

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：84503

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16022

研究課題名(和文)脳アミロイド血管症における血管機能障害によるアルツハイマー病増悪の作用機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism worsening Alzheimer's disease by vascular endothelial dysfunction in cerebral amyloid angiopathy.

研究代表者

笹原 智也 (Sasahara, Tomoya)

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・研究員(上席・主任研究員クラス)

研究者番号：30735345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳アミロイド血管症はアルツハイマー病の増悪因子だが、増悪の詳細な分子機序は未だ解明されていない。本研究では分子機序の解明のため、血管内皮細胞と周皮細胞、脳初代培養を用いた脳神経血管の培養モデルを新規に構築した。分子機序として、血管毒性のあるアミロイド凝集体アミロスフェロイドをこの培養モデルの血管細胞に処置することで血管内皮細胞からのアンジオテンシンII遊離とそれに続く神経細胞AT2受容体-B2受容体-BACE mRNA増加を介してBACEタンパク量が増加することを見出した。またアミロスフェロイドが周皮細胞にも作用し、神経細胞AEPを活性化することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではA遊離を促進する2つの酵素セクレターゼ(BACE)とセクレターゼ(AEP)が血管障害により増悪することを解明した。脳実質でのアミロイド沈着はアルツハイマー病発症の十数年前から起きているが、血管障害があるとA沈着量が増加することが知られており、今回の研究成果はこの現象の分子機序の解明とそれに基づく新規アルツハイマー病治療薬の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Cerebral amyloid angiopathy worsens Alzheimer's disease. However, the detailed molecular mechanism remains unclear. In this study, to elucidate the molecular mechanism, we first constructed a novel culture system of cerebral neuro-vascular unit using cerebrovascular endothelial cells, brain pericytes, and cerebral cortex-derived primary culture. We then found that treatment of vascular cells in this culture system with amylospheroid (a neurotoxic and vasotoxic amyloid- aggregate deposited in cerebral blood vessels in Alzheimer's patients) increases BACE protein level via angiotensin II release from endothelial cells and subsequent neuronal AT2 receptor-B2 receptor-BACE mRNA transcription pathway. We additionally found that amylospheroid acts on pericytes and then neuronal AEP is activated. Because both BACE and AEP increase amyloid-release, the molecular mechanism found in this study may be a useful therapeutic target for Alzheimer's disease.

研究分野：循環器薬理学

キーワード：血管内皮 血管機能障害 アミロイド アミロスフェロイド -セクレターゼ -セクレターゼ
脳血管アミロイド血症 アルツハイマー病

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

脳アミロイド血管症 (cerebral amyloid angiopathy, CAA) は老化に伴い脳微小血管の血管中間層あるいは内腔に amyloid β ($A\beta$) を主とした不溶性タンパクが沈着し、その結果血管機能の低下とそれに伴う血管壁脆弱化により脳出血などの症状が認められる病気である。CAA の血管障害はアルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) を含む様々な病気を増悪する。従って、CAA をターゲットに AD の新規治療薬を開発できる可能性があり、超高齢社会を迎えた日本においてこの研究に取り組むことは研究者の責務である。

これまで多くの研究者が CAA を様々な切り口で研究し、脳微小血管に沈着した $A\beta$ が内皮細胞の機能障害を引き起こし、その結果血管機能が低下することが解明されてきた。申請者も $A\beta$ 凝集体 amylospheroids (ASPD) が AD 患者脳の微小血管に沈着していること、血管内皮細胞の内皮型 NO 合成酵素活性を抑制して血管拡張能を阻害すること、そしてその作用機序に活性酸素種やプロテインキナーゼ C が関与することを解明し、ASPD による血管内皮依存性血流量調整機能の破綻について研究成果を報告している (Sasahara et al., *iScience*2021)。このように CAA での $A\beta$ による脳微小血管の内皮細胞の障害とその作用機序は徐々に解明されつつある。

血管内皮機能障害により神経細胞での $A\beta$ 遊離量やリン酸化 tau などの AD マーカーが増悪すること (Austin et al., *Circ Res*2016. Austin et al., *Circ Res*2010) や血管 $A\beta$ 除去による血管内皮障害の回避により AD の増悪が抑制されること (Gregory et al., *J Neuropathol Neurol*2012. Saito et al., *Acta Neuropathol Commun*2017) を示すこれらの研究報告は、 $A\beta$ による血管内皮障害が AD の増悪に寄与することを示唆する。しかしながら、その作用機序は未だ解明されていない。

2. 研究の目的

CAA で惹起される血管内皮障害は神経細胞の AD マーカーを悪化するが、その詳細な作用機序は未だ明らかになっていない。CAA をターゲットにした新規 AD 治療薬の開発にはこれを明らかにすることが必須である。本研究では脳血管に沈着する ASPD が惹起する血管内皮障害による神経細胞 AD マーカーの増悪作用機序の解明に取り組む。CAA と AD の相互作用解析はこれまで動物モデルを用いた *in vivo* 解析が中心であった。*in vivo* 研究は実際の生理機能や病態に近い環境で研究できるが、作用機序解析などのミクロな解析研究が困難である。本研究では新規に脳微小血管由来の内皮細胞と初代培養神経細胞の共培養評価システムを構築し、これを用いて研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞と脳毛細血管細胞の共培養解析モデルの調製：

妊娠 17 日の Wistar 胎児 (ジャクソンラボラトリージャパン) から単離した大脳皮質を Neurobasal 培地/B-27 サプリメント/10% astrocytes condition 培地に懸濁後、カルチャーディッシュに播種し、22 日間培養することで成熟大脳皮質初代培養を調製した。大脳皮質初代培養の培養 20 日目に、コラーゲンコート処理した 0.4 μm -pore カルチャーインサートの下面に EGM-2MV 培地に懸濁したヒト脳由来血管周皮細胞 (ペリサイト) を播種し、ペリサイトの接着後にカルチャーインサートの上面に同培地に懸濁したヒト脳微小血管由来内皮細胞を播種した。脳皮質初代培養の培養 22 日目に、内皮細胞とペリサイトを播種したカルチャーインサートと大脳皮質初代培養を培養するカルチャーディッシュを合わせることで、共培養評価システムを構築した (Fig. 1)。

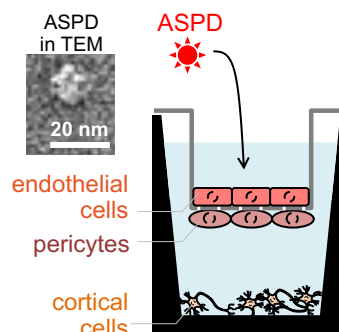


Fig. 1 共培養評価システム

(2) ASPD による内皮機能障害が神経細胞の AD マーカーを悪化する作用機序の解明：

- ① ASPD 調製：実験毎に $A\beta$ から slow rotation 法を用いて ASPD を作成した (Hoshi et al., *PNAS*2003)。調製した ASPD の品質評価として抗 ASPD 抗体を用いた dot blot 法と電子顕微鏡での検鏡で直径 15~20 nm の ASPD 粒子 (Fig. 1 左上) が認められることを確認し、ASPD 濃度を ASPD 発光 ELISA 法により定量した (Komura et al., *iScience*2019)。
- ② タンパク量の解析：共培養評価システムのカルチャーインサート内側 (血管内皮細胞) に ASPD を処置し、一定時間後に神経細胞の総タンパクを RIPA buffer を用いて回収した。還元式 SDS-PAGE/Western blot/Immunoblot 法を用いて回収したサンプル中の各種 AD マーカーの増悪を評価した。また実験に応じて ASPD 刺激 30 分前に、各種阻害薬を共培養評価系に前処置した。
- ③ タンパク局在の解析：コラーゲンコート処理したカバーガラス上で培養したペリサイトを ASPD で処置し、その後 4% PFA で固定した。固定した細胞を免疫細胞染色法にて蛍光染色

し、共焦点顕微鏡にて蛍光画像を撮影した。

- ④ mRNA 量の解析： 共培養評価システムのカルチャーインサート内側に ASPD を処置し、一定時間後に神経細胞の mRNA を RNA spiculum を用いて回収した。回収した mRNA は oligo-dT を用いて逆転写し、PCR 法を用いて回収したサンプル中の各種 AD マーカーの mRNA 転写量の変化を評価した。

(3) 統計処理：

データは平均値±標準偏差を用いて示している。なお、本報告書内で使用されている ASPD モル濃度は $A\beta_{1-42}$ 分子量 (4.514 kDa) を基に算出している。統計は多重比較検定と post-hoc test Scheffe's *F*-test の組み合わせ、あるいは Student's *t*-test により処理し、*P* 値 0.05 未満を有意な差として検出した (**P* < 0.05, ***P* < 0.01)。

4. 研究成果

(1) 神経-脳微小血管の *in vivo* 環境を模倣した新規共培養解析システムの構築：

血管内皮細胞障害による神経細胞 AD マーカー増悪の作用機序を評価するためには、培養細胞を駆使した *in vitro* 評価システムが必須である。研究を開始した当初、作用機序解析に適した脳神経細胞と血管細胞の共培養システムは未だ報告されていなかった。そこで、研究の最初に脳神経細胞と脳微小血管細胞を用いた新規共培養評価システムの構築に着手した。神経細胞には CAA の好発部位である大脳皮質の初代培養を用い、カルチャーディッシュに初代培養細胞を播種した。血管細胞には、脳の微小血管を構成する脳微小血管由来内皮細胞と血管ペリサイトを用い、それぞれをカルチャーインサートの上下面に播種した。神経細胞を培養したカルチャーディッシュと血管細胞 (血管内皮細胞およびペリサイト) を培養したカルチャーインサートを組み合わせることで共培養評価システムを構築した (Fig. 1)。

ASPD の分子サイズ (10~15 nm in TEM (Fig. 1 左上) (Matsumura et al., *J Biol Chem*2011. Noguchi et al., *J Biol Chem* 2009)) はカルチャーインサート膜の pore サイズ (0.4 μ m) より小さいため、カルチャーインサート内側に添加した ASPD がカルチャーインサート膜を透過し、神経細胞に直接作用する可能性がある。ASPD のカルチャーインサート透過性を評価するために、カルチャーインサート内側に ASPD 添加した後、48 時間後までインサートカルチャーおよびカルチャーディッシュのそれぞれの培地を経時的に回収し、ASPD ELISA 法を用いて ASPD 濃度を定量した。定量の結果、ASPD は経時的にカルチャーインサートを透過していることが判明したが、48 時間後でもカルチャーディッシュ側の培地中の ASPD 濃度は 3.1 ± 0.4 nM (カルチャーインサートを透過した ASPD は $0.7 \pm 0.1\%$) と非常に薄く (Fig. 2)、神経細胞毒性を發揮しない濃度であった (Ohnishi et al., *PNAS*2015)。以降の実験で検討した 48 時間のタイムウィンドウで認められた神経細胞 AD マーカーの変化は ASPD による血管細胞障害が原因であることを示唆している。

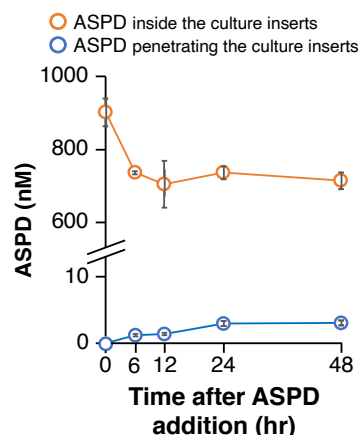


Fig. 2 ASPD のカルチャーインサート透過性

(2) ASPD 刺激による血管障害が及ぼす神経細胞 $A\beta$ 前駆タンパク切断酵素の活性変化の検証：

ASPD により惹起された血管内皮細胞の機能障害が神経細胞の各種 AD マーカーを増悪するかを検討するために、共培養評価システムのインサートカルチャー内側に ASPD を添加し、48 時間後まで経時的に回収した神経細胞の RIPA lysate 中の AD マーカーの変化を Western blot 法にて解析した。本研究では AD マーカーとして $A\beta$ 前駆タンパク ($A\beta$ precursor protein, APP) からの $A\beta$ 遊離に関わる β -secretase (BACE) や γ -secretase、 δ -secretase (AEP) について解析した。解析の結果、BACE 量が ASPD 添加 12 時間後以降に増加、AEP が 48 時間後に活性化すること、 γ -secretase 量は 48 時間のタイムウィンドウでは変化しないことを見出した (Fig. 3, γ -

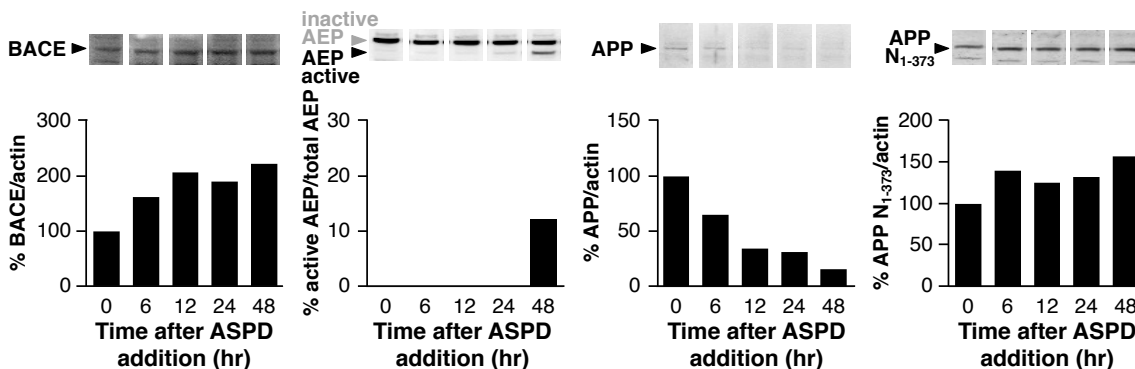


Fig. 3 ASPD-血管細胞障害により増悪した AD マーカー

secretase は data not shown)。これら AD マーカーの増悪に相関して、APP タンパク量が 12 時間以降に減少すること、AEP により切り出された APP N 末断片 (APP N₁₋₃₇₃) が 48 時間後に増加することも見出した (Fig. 3)。これら結果は血管内皮障害が神経細胞の Aβ 病理を増悪する可能性を示唆している。

(3) BACE 増加および AEP 活性化に関する血管細胞の特定：

共培養評価システムのカルチャーインサート内側に ASPD を添加することで誘導された神経細胞の BACE 増加や AEP 活性化が血管内皮細胞を介した反応であることを確認するために、ペリサイトあるいは内皮細胞を除いたカルチャーインサートを作製し、BACE や AEP の変化が抑制されるかを確認した。内皮細胞とペリサイト両方が存在する共培養評価システムを ASPD で 48 時間刺激した場合と比較して、BACE 増加はペリサイトの除去では影響されなかったが、内皮細胞の除去によりその増加が抑制された (Fig. 4)。同様に AEP 活性化への各細胞の関与を評価すると、AEP 活性化は内皮細胞の除去では影響されず、ペリサイトの除去により抑制された (Fig. 4)。なお、内皮細胞とペリサイト両方を除去した共培養評価システムでは BACE 増加も AEP 活性化も認められなかった (Fig. 4)。これら結果は、BACE 増加は ASPD-血管内皮細胞を介した作用機序であり、一方で AEP 活性化は予想外にも ASPD-ペリサイトを介した作用機序であることを示している。

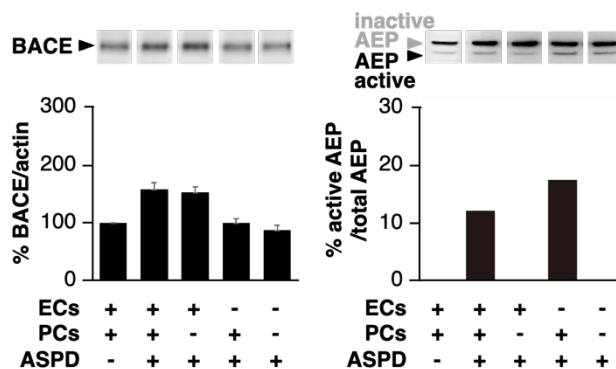


Fig. 4 BACE 増加および AEP 活性化に対する内皮細胞 (ECs) とペリサイト (PCs) の関与

ASPD は Na⁺ ポンプの α3 サブユニット (Na⁺, K⁺-ATPase α3, NAKα3) に結合し (Ohnishi et al., *PNAS*2015)、血管毒性を発揮する (Sasahara et al., *iScience*2021)。血管内皮細胞では ASPD はカベオラに存在する NAKα3 に結合することが申請者の先行研究でわかっているが (Sasahara et al., *iScience*2021)、ペリサイトにおける NAKα3 発現の有無は報告されていない。Western blot 法によりペリサイトの NAKα3 発現量を調べると、内皮細胞の NAKα3 発現量と比較してより多くの NAKα3 がペリサイトに発現していることが判明した。ペリサイトの NAKα3 が神経細胞や内皮細胞の NAKα3 (Ohnishi et al., *PNAS*2015, Sasahara et al., *iScience*2021) と同様に ASPD の結合ターゲットとして機能するかを調べるために、ASPD を処置したペリサイトを細胞免疫染色法による蛍光多重染色により ASPD と NAKα3 の共局在を調べた。その結果、ASPD 染色シグナルと NAKα3 染色シグナルが共局在することを見出した (Fig. 5、図中の矢印は ASPD-NAKα3 が共局在する部位を示す)。即ち ASPD-ペリサイト相互作用による神経細胞 AEP 活性化も、NAKα3 を介した反応であることを示唆している。

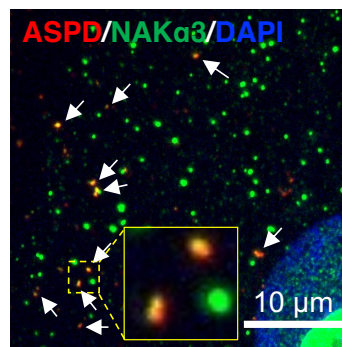


Fig. 5 ASPD 処置ペリサイトの多重蛍光染色像

(4) ASPD による血管内皮障害により遊離し、神経細胞 BACE 増加を誘導する液性因子の探索：

本研究で用いている共培養評価システムでは、血管細胞と神経細胞は直接接していない。従って、ASPD により障害された血管内皮細胞はケモカインに代表される液性因子を遊離し、神経細胞に作用することで BACE 増加を誘導しているしていると推察される。本研究では液性因子の探索として血管内皮障害に伴い遊離することが報告されているアラキドン酸代謝物やエンドセリン、ブラジキニン、活性酸素種の阻害薬を ASPD 添加の 30 分前に共培養評価システムに前処置し、BACE 増加が抑制されるかを検討した。検討した阻害薬の中でブラジキニン B₂ 受容体アンタゴニスト (icatibant, 50 nM) のみが ASPD-内皮細胞障害による BACE 増加を抑制した (Fig. 6)。この結果に反して、大脳皮質初代培養をブラジキニンで直接処置しても BACE は増加しなかった。論文検索の結果、ブラジキニン受容体はアンジオテンシン受容体とヘテロダイマーを形成することで、ブラジキニン受容体単独とは異なる反応性を示し、ヘテロダイマー受容体はアンジオテンシン II によりアンジオテンシン受容体が活性化されることでブラジキニン受容体をトランスアクティベーションすると報告されており、ASPD-内皮細胞障害はアンジオテンシン受容体活性化を介して B₂ 受容体をトランスアクティベーションしている可能性が考えられた。そこで、ASPD-内皮障害による BACE 増加がアンジオテンシン受容体を解しているか

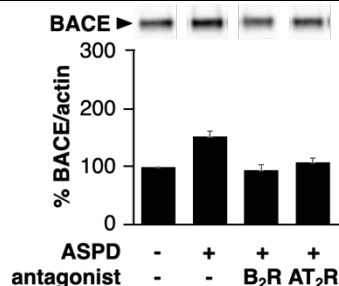


Fig. 6 BACE 増加に対する B₂ 受容体 (B₂R) および AT₂ 受容体 (AT₂R) の関与

を検証した結果、アンジオテンシン AT_2 受容体アンタゴニスト (PD123319, 1 μ M) の前処置により BACE 増加は抑制された (Fig. 6)。この結果は ASPD の血管内皮障害による BACE 増加の作用機序が、細胞障害による血管内皮細胞からのアンジオテンシン II 遊離と、それに続く神経細胞の AT_2 受容体の活性化による B_2 受容体のリガンド非依存的トランスアクティベーションであることを示唆している。

(5) BACE 増加に対する転写制御の関与：

次に、BACE 増加に mRNA 転写が関与するかを調べた。ASPD を共培養評価システムのインサートカルチャー内側に添加後、経時的に神経細胞から mRNA を回収し、逆転写 PCR 法にて BACE mRNA 量の変化を検証した。ASPD 添加の 12 時間後をピークに BACE mRNA が一過性に増加していた (Fig. 7)。神経細胞 BACE タンパクは ASPD 添加後 12 時間以降に発現量が増加していたことから、BACE mRNA の増加が BACE タンパクの増加を誘導したと示唆される。

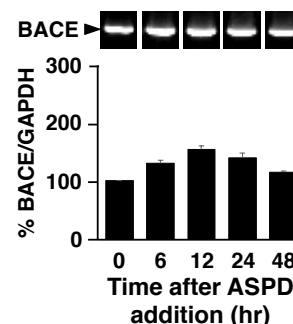


Fig. 7 BACE mRNA 量の経時変化

(6) ASPD-血管内皮障害による神経細胞 BACE 増加の作用機序の解明：

以上の研究成果 (1) ~ (5) を総括すると、アルツハイマー病患者の脳微小血管に沈着した ASPD が血管内皮細胞を障害すると (Sasahara et al., *iScience*2021)、血管内皮細胞からアンジオテンシン II が遊離し、神経細胞の AT_2 受容体の活性化とそれに続く B_2 受容体へのトランスアクティベーションにより BACE mRNA が増加、その結果 BACE タンパクが増加することを本研究では明らかにすることに成功した (Fig. 8)。その他、ASPD は内皮細胞だけでなく、血管ペリサイト $NAK\alpha 3$ への結合を介して神経細胞の AEP を活性化することを明らかにした。

BACE 増加や AEP 活性化は共に APP からの $A\beta$ 遊離を促進することから、本研究結果は血管障害による AD 増悪の作用機序の一端を捉えることに成功したと考えられる。特に、AEP は AD でその活性を抑制することで認知機能の低下が改善することが動物モデルで明らかにされている (Zhang et al., *Nat Commun*2017) が、その活性化機序は未だよくわかっておらず、本研究でその活性化機序を部分的に解明できたことは今後の AD 治療薬の開発に繋がるものと期待される。

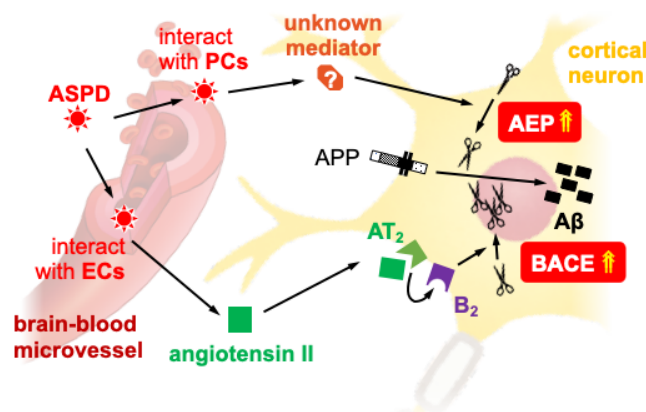


Fig. 8 研究結果から示唆される ASPD による血管障害が神経細胞 AD マーカーを増悪する作用機序

(7) Limitation

本研究では見出された血管細胞の障害による BACE や AEP など APP からの $A\beta$ 遊離に関わる AD マーカーの悪化は、神経での $A\beta$ 遊離量が増加することを示唆している。しかしながら、当該研究期間では $A\beta$ ELISA などを用いて $A\beta$ 量の検出を試みたが、 $A\beta$ 量が測定下限値以下などの理由で検出できなかった。今後 APP を過剰発現させた神経細胞を用いて、改めて $A\beta$ 遊離量が増加するかを検証予定である。その他、ASPD 処置により内皮細胞から遊離するアンジオテンシン II の直接的な検出や、大脳皮質初代培養の神経細胞における AT_2 受容体- B_2 受容体のヘテロダイマーの形成を確かめておらず、これらの検証が今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasahara Tomoya, Hoshi Minako	4. 巻 3
2. 論文標題 High-throughput screening for agonists of ROS production in live human vascular endothelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101053 ~ 101053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2021.101053	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasahara Tomoya, Satomura Kaori, Tada Mari, Kakita Akiyoshi, Hoshi Minako	4. 巻 24
2. 論文標題 Alzheimer's A assembly binds sodium pump and blocks endothelial NOS activity via ROS-PKC pathway in brain vascular endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102936 ~ 102936
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102936	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 笹原智也、星美奈子
2. 発表標題 Establishment of a new tri-culture system for elucidating crosstalk mechanisms between central nervous system and brain microvascular endothelial system in Alzheimer's disease brains
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹原智也、星美奈子
2. 発表標題 Establishment of a new tri-culture system for elucidating crosstalk mechanisms between central nervous system and brain microvascular endothelial system in Alzheimer's disease brains
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------