

令和元年5月14日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05279

研究課題名(和文)アルツハイマー病モデルマウスを用いた酸化ストレス状態制御の試みと治療への応用研究

研究課題名(英文) Regulation of oxidative stress in Alzheimer model mice and its application for treatment

研究代表者

下濱 俊 (Shimohama, Shun)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：60235687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)の根本の病因は未だ不明であり、アミロイドカスケード仮説に基づきA $\beta$ をターゲットとする治療薬を認知症が発症しているAD患者に使用しても進行抑制効果が認められていない。本研究では、ADモデルAPdE9マウスに対して、7nAChR刺激作用をもつガラントミンの早期投与によって認知機能改善、A $\beta$ 病理の抑制だけでなく、ミクログリア活性の抑制や脳内酸化ストレスの抑制が認められた。一方、骨髄間葉系幹細胞治療も酸化還元状態を改善し、空間記憶能を改善させ、脳A $\beta$ 病理を改善させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急激に高齢化が進む中で、費用対効果に優れたADに対する治療方法の確立が急務である。ガラントミンはすでにAD治療薬として使用されているため、安全性という面でも確立されている薬剤であり、費用対効果に優れた予防薬となる可能性がある。骨髄間葉系幹細胞は他疾患ですでに実臨床応用が開始されている治療であり安全性の検討がなされていることから、詳細な分子生物学的機序を解明することができれば、ADに対する新規治療として近い将来に実現可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is recognized that increased oxidative damage on neurons is an early event in Alzheimer's disease (AD). Galantamine is one of acetylcholinesterase inhibitors and has an allosteric potentiating ligand function for nicotinic acetylcholine receptors. We showed that earlier treatment (before the appearance of A $\beta$  plaques) of galantamine results in the improvement of cognitive function and suppresses the oxidative stress and the progression of pathological findings in AD mice. Bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC)-treatment improved spatial memory impairment and reduced A $\beta$  plaques deposition and A $\beta$  1-42 levels of soluble fraction of brain homogenates in AD mice. The oxidative stress in the BMSC-treated mouse brain were also ameliorated. These findings suggest that galantamine and BMSC may prevent the progression of AD pathology by controlling oxidative stress and excessive A $\beta$  deposition.

研究分野：神経内科学

キーワード：アルツハイマー病 酸化ストレス アミロイド ミクログリア 7ニコチン性受容体作動薬 ガラントミン 骨髄間葉系幹細胞 治療・予防薬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病(AD)は認知症の60-70%を占め、80歳以上の高齢者の20%にみられる有病率の高い疾患である。ADは病理学的にアミロイド(A $\beta$ )を主成分とする老人斑の形成、リン酸化タウを主成分とする神経原線維変化および著しい神経細胞死を特徴とし、アミロイドカスケード仮説においてA $\beta$ が最上流の原因とされる。しかしその根本の病因は未だ不明であり、根治療法は無く対症療法に限られている。これまでのところアミロイドカスケード仮説に基づきA $\beta$ をターゲットとする治療薬を認知症が発症しているAD患者に使用しても進行抑制効果が認められていない。

(2) AD脳においては脳内A $\beta$ 増加、酸化ストレス増加、A $\beta$ 増加という悪循環が生じている可能性が考えられ、ADの病態とミクログリア、酸化ストレスの関連について注目した。最近、申請者らはADモデルマウス(APdE9マウス)脳を用いた免疫組織学的評価において、病理像初期の段階ではM1ミクログリアのマーカーであるCD68発現はわずかな増強にとどまるが、ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 7$ サブユニット( $\alpha 7$ nAChR)の発現が著増している一方、進行期ではミクログリアにおけるCD68発現が著増して $\alpha 7$ nAChR発現は減弱していることを示した。申請者らは、 $\alpha 7$ nAChR刺激によりミクログリアのA $\beta$ 貪食能が促進されることを示し、また、 $\alpha 7$ nAChR刺激によるROS減少効果も報告されており、 $\alpha 7$ nAChR刺激によりミクログリアをM1からM2にシフトさせ、酸化ストレス状態を制御できる可能性があると考えている。

(3) 一方、連携研究者の藤井が開発した非侵襲的に酸化ストレスを視覚化する新規画像技術である“in vivo EPR(electron paramagnetic resonance:電子常磁性共鳴法)イメージング法”は、イメージングプローブとしてナイトロオキシド化合物を体内に投与し、生体のもつ抗酸化作用によりプローブが還元され消失する反応速度をモニタリングすることで酸化ストレスと抗酸化能のバランスを包括的に評価する画期的な検査法である。BBBを通過するプローブを使用することで脳内酸化ストレスを非侵襲的に評価することが可能になる。また、EPR画像とMRI画像を重ね合わせることで脳内酸化ストレスの局在分布についても解析可能である。この方法を用いて申請者らはAPdE9マウスおよびWTマウスの脳内酸化ストレス評価を施行することにより、生後9ヶ月以降のAPdE9マウス海馬において同月齢のWTマウスより有意に酸化ストレスが亢進していることを示した。

### 2. 研究の目的

本研究では、病態と酸化ストレスの関連性をin vivoで定量的に画像評価できるMRI・EPR(電子常磁性共鳴法)両手法を駆逐した磁気共鳴分子イメージングシステムを利用して、ADモデル動物において神経変性時および治療介入時の脳内酸化ストレスの動態を経時的に解析する。また、免疫組織学的解析・生化学的解析などにより、AD様病理変化およびミクログリアを中心とした神経免疫システムの動態と脳内酸化ストレスの動態を比較検証してADの病態解明を試み、ADに対する新規予防法・治療法を考案するための根拠となる基礎データを提供する。

### 3. 研究の方法

ADモデル動物として行動記憶評価、病理組織学的・生化学的評価がともに可能であるAPdE9マウスに対して、ニコチン性受容体作動薬、骨髄幹細胞を用いて投与時期を変えた治療介入を行い、電子常磁性共鳴法(EPR)で脳内酸化ストレス状態をイメージ化して解析する。また、モリス水迷路試験による行動記憶評価で予防・治療効果を判定する。さらに、脳組織を用いた免疫組織学的・生化学的評価を行い、治療効果と脳内免疫系細胞の動態、A $\beta$ の動態を評価し、脳内酸化ストレス状態と比較検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) APdE9マウスに対する $\alpha 7$ nAChR刺激作用をもつガラントミンによる治療介入実験

ADモデル動物として家族性アルツハイマー病の変異型APP遺伝子および変異型プレセニン1遺伝子を導入したAD-Tgマウス(APP<sup>Swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>: APdE9マウス)を用いた。Tgマウスを(A)ガラントミンを投与しないコントロール群、(B)A $\beta$ が沈着し始める生後6ヶ月からガラントミンを投与した群、(C)脳の病理的变化がほとんど認められない生後3ヶ月という早期からガラントミンを投与した群の3群に割り振った。各群いずれも生後9ヶ月目に認知行動評価(MWM試験)を行った。MWM試験終了後、EPRイメージングを施行した。ニトロキシドラジカル的一种であるMCP(3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl)を尾静脈から注射し、MCPのEPR信号を9秒間隔で計測した。その後、脳を摘出し、20 $\mu$ m厚の半脳切片標本作製し、抗6E10抗体、抗Iba1抗体を用いてDAB染色を施行した。また、抗6E10抗体、抗Iba1抗体を用いて、蛍光免疫二重染色も行った。得られた染色標本は大脳皮質を倒立型蛍光位相差顕微鏡で観察して組織像を撮影した。撮影したDAB画像はImage Jを用い、一定面積内の6E10およびIba1陽性面積が占める割合(%)を算出した。群別のデータは平均値 $\pm$ SEで表示し、統計解析ソフトJMP17を用いone-way ANOVAで比較した。事後検定はTukey-Kramer's HSD検定を用いた。

MWMでは、platformへの到達時間は生後3~9ヶ月投与群と生後6~9ヶ月投与群で、非投与群と比較して有意差をもって改善を認めた。また、platformへの到達回数および局在率においては生後3~9ヶ月投与群のみで、非投与群と比較して有意差をもって改善を認めた。EPRイメージング法を用いた評価では、ガラントミンの生後3~9ヶ月投与群で、同齢のADマウス脳と

比較して脳内酸化ストレスの抑制を認めた。抗 6E10 抗体による A $\beta$  の染色標本の解析では皮質に占める A $\beta$  の面積の割合が生後 3~9 ヶ月投与群および生後 6~9 ヶ月投与群で共にガラントミン非投与群と比較して減少していた。ELISA 法を用いた可溶性分画および不溶性分画における A $\beta$  40、42 の測定では、不溶性分画の A $\beta$  42 が生後 3~9 ヶ月投与群で非投与群と比較して有意差をもって減少していた。その他の項目では有意差は認めなかったが、介入群で A $\beta$  が減少する傾向にあった。抗 Iba1 抗体によるミクログリアの染色標本の解析では皮質に占めるミクログリアの割合が生後 3~9 ヶ月投与群および生後 6~9 ヶ月投与群で共にガラントミン非投与群と比較して減少していた。

本研究では、ガラントミンの早期投与によって認知機能改善、A $\beta$  病理の抑制だけでなく、ミクログリア活性の抑制や脳内酸化ストレスの抑制が認められた。これは、ガラントミンが病態修飾作用を有していることを示唆しており、その機序として、我々は A $\beta$  貪食に関与しているミクログリアのガラントミンによる 7nAChR の刺激が A $\beta$  の貪食を亢進させ、これが疾患修飾として有効であると考えている。更に、ガラントミンによる脳内酸化ストレスの抑制もまた AD 病態の改善に関与していると考えている。最近、我々は AD モデルマウスでは病初期にミトコンドリア分画優位に A $\beta$  蓄積が生じる可能性があることを明らかにしており、ミトコンドリア分画における A $\beta$  量が SOD 活性および EPR spectroscopy の結果と相関していることも明らかにした。この結果からガラントミンがミトコンドリアに与える影響をミトコンドリア分画における A $\beta$  の蓄積という観点から調べることはガラントミンの新たなメカニズムを見つける一助となるかもしれない。今後、急激に高齢化が進む中で、費用対効果に優れた治療方法の確立が急務である。現在ガラントミンはすでに軽度から中等度のアルツハイマー型認知症に使用されているため、安全性という面でも確立されている薬剤であり、費用対効果に優れた薬剤となる可能性を秘めている。今後も新規の知見が得られる可能性は十分に考えられるため、引き続き nAChR 作動性薬剤に関する研究を継続していくことが重要である。

## (2) APdE9 マウスに対する骨髄幹細胞による治療介入実験

札幌医科大学では骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell; MSC) 移植が神経再生に有用であると報告し、脳梗塞や脊髄損傷に対する自己培養骨髄 MSC 治療の医師主導治験が実施された。AD モデル動物においても MSC 治療が認知機能の改善をもたらすとされる報告が複数あり、その治療メカニズムとしては抗炎症作用、内因性神経再生の賦活作用などの関与が想定されているが、その分子生物学的機序を含めた詳細なメカニズムは明らかにされていない。我々は先行研究においてパーキンソン病モデルラットに対する MSC 治療の有用性を報告し、MSC 治療を受けたラット線条体においてミクログリアの活性が有意に減少していたことを示した。MSC はその神経保護作用や免疫調整作用から、脳内酸化ストレスをターゲットとした AD 新規治療法としての可能性がある。本研究は、AD モデルマウスに対する MSC 治療介入を行い、MSC 治療を新規治療法として確立するための基礎データを獲得することを目的とする。また、MSC 治療によってもたらされる酸化ストレスの改善作用をその分子メカニズムを含めて明らかにすることを目的とした。

本研究では、AD モデルマウス (APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>) を用いた。7.5 ヶ月齢の APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> マウスと同胞の野生型マウスを治療群とコントロール群に分け、治療群には生後 6 週齢 SD ラット骨髄から分離培養した MSC  $3 \times 10^5$  個を細胞培養用培地に懸濁して尾静脈より静脈内投与した。コントロール群には培地のみを投与した。治療 1 ヶ月後より行動学的評価として Morris 水迷路試験 (MWM) を行った。その後、脳内酸化ストレス動態の評価のため、*in vivo* EPR イメージングを行なった。これらの評価を終えたマウスは 9 ヶ月齢で脳を取り出し、組織学的評価として脳内 アミロイド (A $\beta$ ) プラークの定量評価、脳内ミクログリアの動態の評価、酸化ストレスマーカーの解析を行った。また、マウス脳サンプルの生化学的評価として、可溶性・不溶性 A $\beta$  蛋白の定量、各種酸化ストレスマーカー、活性酸素分解酵素の活性、炎症性サイトカイン等の測定を行なった。また、神経細胞に対する MSC の抗酸化ストレス作用の解析のため、培養系細胞を用いた検討を行った。

MWM では、MSC 治療介入を行った AD マウスは、コントロールの AD マウスに比べて空間記憶能が有意に優れていた。また、抗 A $\beta$  抗体を用いた免疫組織学的検討では、MSC 治療介入を行った AD マウス脳の大脳皮質や海馬において、コントロールの AD マウスに比べて A $\beta$  プラークの総面積が減少していた。また、脳サンプルを用いた ELISA 法による A $\beta$  定量では、MSC 治療介入を行った AD マウスでは、コントロールの AD マウスに比べて可溶性 A $\beta$  量が減少していた。In vivo EPR イメージング実験では、MSC 治療介入を行った AD マウスの大脳皮質におけるレドックス状態はコントロールの AD マウスのものに比べて有意に改善していた。また脳組織学的検討では、MSC 治療介入を行った AD マウス脳の大脳皮質ではミクログリアの活性が有意に減少していた一方で、A $\beta$  プラーク周囲のミクログリアに着目した場合、MSC 治療介入を行った AD マウス脳の大脳皮質は細胞体内に A $\beta$  を取り込む細胞の割合が有意に多かった。

MSC 治療は、AD モデルマウスの空間記憶能を改善させ、脳 A $\beta$  病理を改善させることが示唆された。MSC 治療は AD マウス脳における酸化還元状態を改善した。また、MSC 治療はミクログリアによる過剰な炎症応答を抑える一方でミクログリアによる A $\beta$  クリアランスを促進している可能性が示された。今後検討すべき点としては、MSC 治療の実臨床応用を目指すため、複数回の MSC 治療による長期的な治療介入効果の検討を行う。また治療メカニズムの面からは、

培養神経細胞を用いて MSC 治療の酸化ストレスに対する防御機構のより詳細な機序の解明を目指す。移植後 MSC の生体内での生着の有無の検討も行う。MSC は他疾患ですでに実臨床応用が開始されている治療であり安全性の検討がなされていることから、MSC 治療の詳細な分子生物学的機序を解明することができれば、AD に対する新規治療として近い将来に実現可能であると考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Fujikura M, Iwahara N, Hisahara S, Kawamata J, Matsumura A, Yokokawa K, Saito T, Manabe T, Matsushita T, Suzuki S, Shimohama S. CD14 and Toll-Like Receptor 4 Promote Fibrillar A $\beta$  Uptake by Microglia Through a Clathrin-Mediated Pathway. *J Alzheimers Dis.* 2019;68(1):323-337. doi: 10.3233/JAD-180904. PubMed PMID:30775984. 査読有

Manabe T, Matsumura A, Yokokawa K, Saito T, Fujikura M, Iwahara N, Matsushita T, Suzuki S, Hisahara S, Kawamata J, Suzuki H, Emoto MC, Fujii HG, Shimohama S. Evaluation of Mitochondrial Oxidative Stress in the Brain of a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease by in vitro Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *J Alzheimers Dis.* 2019;67(3):1079-1087. doi: 10.3233/JAD-180985. PubMed PMID: 30714961. 査読有

Suzuki A, Shinozaki J, Yazawa S, Ueki Y, Matsukawa N, Shimohama S, Nagamine T. Establishing a New Screening System for Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease with Mental Rotation Tasks that Evaluate Visuospatial Function. *J Alzheimers Dis.* 2018;61(4):1653-1665. doi: 10.3233/JAD-170801. PubMed PMID: 29376869. 査読有

Takata K, Amamiya T, Mizoguchi H, Kawanishi S, Kuroda E, Kitamura R, Ito A, Saito Y, Tawa M, Nagasawa T, Okamoto H, Sugino Y, Takegami S, Kitade T, Toda Y, Kem WR, Kitamura Y, Shimohama S, Ashihara E. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-specific agonist DMXB A (GTS-21) attenuates A $\beta$  accumulation through suppression of neuronal  $\gamma$ -secretase activity and promotion of microglial amyloid- $\beta$  phagocytosis and ameliorates cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2018 Feb;62:197-209. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2017.10.021. Epub 2017 Nov 22. PubMed PMID: 29175709. 査読有

Iwahara N, Hisahara S, Kawamata J, Matsumura A, Yokokawa K, Saito T, Fujikura M, Manabe T, Suzuki H, Matsushita T, Suzuki S, Shimohama S. Role of Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) in Altering Activated Microglia Phenotype in APPswe/PS1dE9 Mice. *J Alzheimers Dis.* 2017;55(3):1235-1247. PubMed PMID: 27814300. 査読有

Kitamura Y, Inden M, Kimoto Y, Takata K, Yanagisawa D, Hijioka M, Ashihara E, Tooyama I, Shimohama S, Ariga H. Effects of a DJ-1-Binding Compound on Spatial Learning and Memory Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017;55(1):67-72. PubMed PMID: 27662308. 査読有

Watanabe K, Uemura K, Asada M, Maesako M, Akiyama H, Shimohama S, Takahashi R, Kinoshita A. The participation of insulin-like growth factor-binding protein 3 released by astrocytes in the pathology of Alzheimer's disease. *Mol Brain.* 2015 Dec 4;8(1):82. doi: 10.1186/s13041-015-0174-2. PubMed PMID: 26637371; PubMed Central PMCID: PMC4670528. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

Yokokawa K, Shimohama S, et al. Rat Bone Marrow-derived MSCs Attenuates Oxidative Stress and Neuroinflammation in APP/PS1 mice. 60th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (2019/5/25)

Saito T, Shimohama S, et al. Effectiveness of galantamine treatment in normal cognition phase of APPswe/PS1dE9 mice. 60th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (2019/5/25)

Fujikura M, Shimohama S, et al. CD14 and Toll-like receptor 4 promote fibrillar A $\beta$  uptake by microglia through clathrin-mediated pathway. 37th Annual Meeting of Japanese Society for Dementia Research (2018/10/12)

齋藤太郎, 下濱 俊ら. APPswe/PS1dE9 マウスにおけるガラントミンの超早期治療の有効性. 37th Annual Meeting of Japanese Society for Dementia Research (2018/10/12)

真部達郎, 下濱 俊ら. アルツハイマー病モデルマウスでは早期にミトコンドリアで酸化ストレスが増大する. 37th Annual Meeting of Japanese Society for Dementia Research (2018/10/12)

横川和樹, 下濱 俊ら. アルツハイマー病モデルマウスにおける骨髄間葉系幹細胞治療のメカニズム検討. 37th Annual Meeting of Japanese Society for Dementia Research (2018/10/12)

松村晃寛, 下濱 俊ら. 脳血流 IMP-SPECT における C1Score 解析による DLB・AD 鑑別の検証. 37th Annual Meeting of Japanese Society for Dementia Research (2018/10/12)

Saito T, Shimohama S, et al. Effectiveness of galantamine treatment in normal cognition phase of APPswe/PS1dE9 mice. 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (2018/5/26)

Yokokawa K, Shimohama S, et al. Rat Bone Marrow-derived MSC Improve Oxidative Stress in Alzheimer's Disease Mouse Model. 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (2018/5/26)

Fujikura M, Shimohama S, et al. Temporal changes of CD14 expression in APdE9 mice. 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (2018/5/25)

Manabe T, Shimohama S, et al. The evaluation of mitochondrial Abeta accumulation and oxidative stress in APdE9 mice 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (2018/5/25)

〔図書〕(計1件)

Shimohama S, Kawamata J. Role of Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Pathology and Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Diseases. p137-158, In "Nicotinic Acetylcholine Receptor Signaling in Neuroprotection" Ed. by Akaike A, Shimohama S, Misu Y, Springer, 2018.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sapmed.ac.jp/neurol/new/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 連携研究者

連携研究者氏名：藤井 博匡

ローマ字氏名：Fujii Hirotada

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医療人育成センター

職名：教授

研究者番号(8桁)：70209013

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、研究者個人に帰属されます。