

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09355

研究課題名(和文) 髄液及び脳からの老廃物の排泄の改善による認知症発症の予防

研究課題名(英文) Prevention of dementia by improving excretion of waste products from cerebrospinal fluid and brain

研究代表者

宮嶋 雅一 (Miyajima, Masakazu)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：60200177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：正常圧水頭症(NPH)の一家系より、線毛運動に關与するダイニン蛋白Dnah14の欠失を同定し、Dnah14ノックアウトマウス(Dnah14KO)を作成した。このマウスは遅発性水頭症を発症し、脳室上衣線毛運動異常と蛍光物質の排泄遅滞を証明した。Dnah14KOとAPPノックインマウスと交配することにより、アルツハイマー病理を伴うNPHモデルマウスを作成に成功した。このマウスは線毛運動低下による脳の老廃物の排泄遅滞により、アミロイドの脳内への蓄積が促進され、若年から認知機能が低下することが証明された。更に、髄液ドレナージにより、脳実質に投与した低分子の蛍光物質の排泄を促進することが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性正常圧水頭症(iNPH)の約半数にアルツハイマー病理(AD)を認めると報告されており、脳の老廃物の排泄機構の障害が、水頭症における認知機能障害とアルツハイマー病理の進行に寄与することが推定されている。本研究結果より、加齢や飲酒などによる線毛運動の低下が脳の老廃物の蓄積を招き、認知機能障害に寄与していることが証明された。更に、髄液ドレナージにより、老廃物の排出を促進することが、認知機能障害の予防に寄与することが証明された。

研究成果の概要(英文)：We identified a deletion of Dnah14, which is involved in ciliary movement, from a pedigree with normal pressure hydrocephalus (NPH), and generated a Dnah14 knockout mouse (Dnah14KO). This mouse developed late-onset hydrocephalus, demonstrating abnormal ependymal ciliary movement and delayed excretion of fluorescent substances. By mating Dnah14KO with APP knock-in mice, we succeeded in creating NPH model mice with Alzheimer's disease pathology. In this mouse, it was proved that the accumulation of β -amyloid in the brain is accelerated due to the delayed excretion of waste products from the brain due to decreased ciliary motility, and cognitive function declines from a young age. Furthermore, we demonstrated that the drainage of cerebrospinal fluid (CSF) from the cerebral cistern promotes the excretion of fluorescent substances administered into the brain parenchyma. CSF drainage promotes the excretion of waste products and contributes to the prevention of cognitive dysfunction.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：iNPH CSF DNAH14 cilia Alzheimer APP mouse

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢による アミロイドなどの老廃物の排泄低下による神経毒性物質の形成と蓄積が、アルツハイマー病の原因の一つと考えられている。加齢による髄液の排泄障害が主因である iNPH では、頭蓋内の髄液貯留のみならず老廃物の排泄低下が報告されており、特発性正常圧水頭症 (iNPH) の約半数にアルツハイマー病理が認められる。すなわち、両者には加齢による老廃物の排泄障害という共通の病態が、認知機能障害の要因の一つと考えられる。¹⁾血液脳関門を通過できない老廃物は、脳実質内の間質液の対流により、上衣または軟膜を介して脳室またはくも膜下腔に至る経路とグリア細胞足突起に囲まれた血管周囲腔からくも膜下腔へ至る経路 (Glymphatic pathway) より排泄され、これらの排泄経路は相補的に機能していると考えられる。²⁾しかし、髄液中に排出された老廃物が主にどの経路を通り頭蓋外に排泄されるのかは見解が一致していない。また、脳室上衣線毛の老廃物排泄機構における役割も十分に解明されていない。近年、排出経路として硬膜内リンパ管が再発見され、加齢により硬膜内リンパ管は退化し、老廃物の排泄が遅延することが動物実験で報告されている。³⁾⁴⁾ヒトにおいても造影剤を髄液腔に注入した MRI の研究により、iNPH では Glymphatic pathway を介する海馬からの造影剤の排泄遅延が報告されている⁵⁾

2. 研究の目的

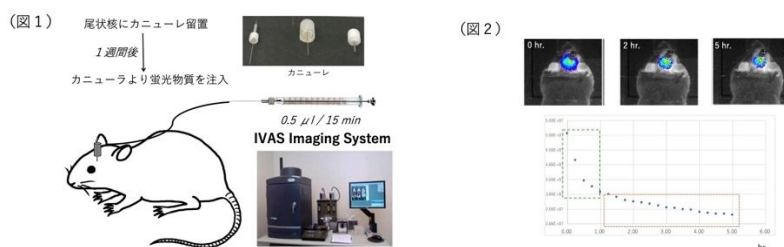
アルツハイマー病の予防を目的とした、老廃物排出機構の活性化の理論基盤を構築することである。

3. 研究の方法

(1) 生体イメージ観察システムによる蛍光物質の定量

微弱な蛍光を超高感度冷却 CCD カメラで捉え、定量化できる in vivo イメージングシステム (IVIS) を用いて、蛍光物質の脳からのクリアランスを測定する方法を確立し、脳のクリアランス機構を明らかにした。定位脳手術装置を用いて、マウス尾状核に正確に蛍光物質: Genhance™750 (MW; 1086g/mol) または AngioSence750EX (MW; 70000g/mol) を微量注入し、注入した蛍光物質を IVIS を用いて経時的に定量した。(図1)

低分子の蛍光物質 Genhance™750 は、注入後1時間で急速にクリアランスされ、その後は緩徐にクリアランスされ、半減期は約3時間であった。一方高分子量の蛍光物質 AngioSence750EX は非常に緩徐にクリアランスされ、半減するまでに2日間を要した。低分子は速やかに脳より排泄されるが、高分子の排泄には長時間を要した。(図2)



加齢による溶質のクリアランスへの影響

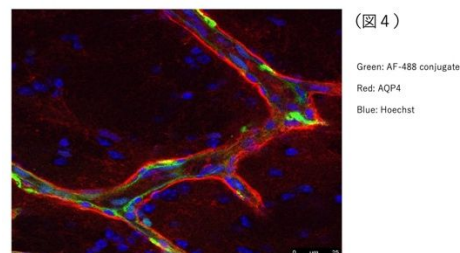
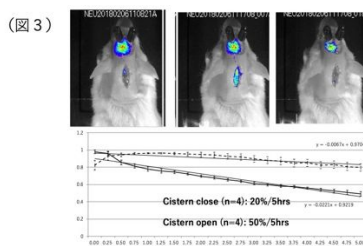
低分子の蛍光物質 Genhance™750 は、若年マウス(8週)では3時間で注入量の22%がクリアランスされたが、一方、老齢マウス(48週)では7%がクリアランスされたのみであった。

髄液排泄による溶質のクリアランス効果

老齢マウス(48週)の尾状核への蛍光物質の注入直前に、大槽(くも膜下腔)を開窓し、髄液をドレナージした。その結果2.5倍速く低分子の蛍光物質 Genhance™750 は脳よりクリアランスされた。一方、高分子の蛍光物質 AngioSence750EX は髄液ドレナージの排泄促進効果はほとんどなかった。(図3)

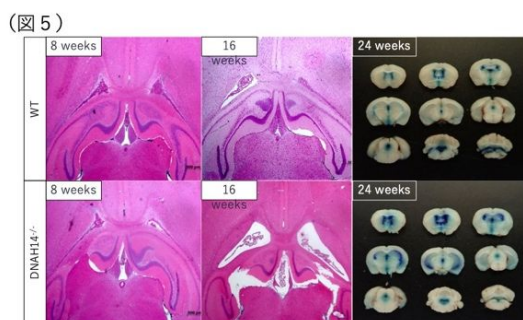
(2) 共焦点顕微鏡による観察

定位脳手術装置を用いて、マウス尾状核に正確に蛍光物質:Alexa Flour 488 Hydrazide (MW;758g/mol)または Alexa Flour 488 conjugate (MW;45000g/mol)を微量注入し、注入15分後と60分後に脳を摘出し、切片を共焦点顕微鏡を用いて観察した。低分子蛍光物質 Alexa Flour 488 Hydrazide は15分後に速かに血管内に移行し、一部は脈絡叢上皮より吸収された。一方、高分子蛍光物質 Alexa Flour 488 conjugate は血管周囲腔と上衣下に集積していた。60分後の脈絡叢上皮では低分子蛍光物質 Alexa Flour 488 Hydrazide は消失し、高分子蛍光物質 Alexa Flour 488 Hydrazide は脈絡叢上皮内に集積していた。(図4)



(3) Dnah14 ノックアウトマウスの作成と線毛運動障害

我々は家族性NPHの家系で、脳室上衣の線毛運動に關与する dynein axonemal heavy chain 14 (Dnah14)の遺伝子変異を同定した。その後、Dnah14 ノックアウトマウス(Dnah 14K0)を作成し、線毛運動の低下を確認した。Dnah14K0 マウスは、8週齢時点では脳室拡大を認めず、24週齢で交通性の脳室拡大を認めたことから、先天性水頭症モデルではなく、後天性に水頭症が発現するNPHに類似していた。Dnah14K0 は、線毛の形態や数においては野生型マウス(WT)と比較しあきらかな変化を認めなかったが、気管線毛を用いた検討によって有効打と回復打のバランスの障害が確認され、精子の運動の観察においてもその特徴的な運動障害が観察された。内腕機能の障害による、線毛の有効打と回復打のバランスが障害されることで、線毛の鞭打の統制が乱れたことにより脳室内髄液流の変化を生じた。(図5)



脳室上衣線毛の運動障害によるマイクロビーズ排泄低下

8週齢 Dnah14 と WT の脳室内に、それぞれマイクロビーズを微量注入し、大槽髄液内ビーズ量を経時的に測定した。Dnah14 では WT と比較して、ビーズの排出は遅延し、排出された総量は少なかった。

脳室上衣線毛の運動障害による認知機能低下

WT と Dnah 14 に Y 字型迷路テストとモリス水迷路テストを用いて認知機能(参照記憶、作業記憶)を評価した。このマウスの認知機能の評価では、24 週齢でモリス水迷路における空間記憶

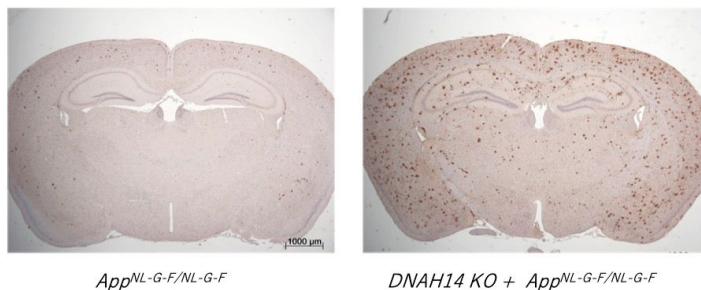
障害を認め、48 週齢においても WT と比較し空間記憶の低下を認めた。Y 迷路テストにおける交替行動率は 24 週齢では有意差を認めず、48 週齢において有意な低下を認めた。このことから、Dnah14 における認知機能障害は、加齢とともに出現し、悪化していくものと考えられ、iNPH の症状の発現と類似していた。

(4) 脳室上衣線毛運動障害による脳内アミロイド沈着の促進

理化学研究所の西道グループは APP を過剰発現させない新規 AD モデルマウスとして、APP 家族性変異の Swedish 変異(NL)と Iberian 変異(L)をノックイン手法 (knockin:KI)により導入した APP^{NL-FKI} マウスを開発した。⁶⁾更に APP^{NL-FKI} マウスに Arctic 変異(G)を加えた APP^{NL-G-FKI} マウスを創出した。我々は Dnah14KO マウスと APP^{NL-G-FKI} マウスを用い、APP^{NL-G-FKI} マウスの受精卵に、ゲノム編集を用いて、アルツハイマー病理を合併する正常圧水頭症モデルマウスである Dnah14KO/ APP^{NL-G-FKI} マウスの作成に成功した。生後 8 週齢時点において、APP^{NL-G-FKI} マウスでは大脳皮質及び海馬での A β の沈着は僅かであるが、Dnah14KO/ APP^{NL-G-FKI} マウスでは、大脳皮質及び海馬での多量の A β の沈着を認めた。(図 6)

(図 6)

8 weeks



App^{NL-G-F/NL-G-F}

DNAH14 KO + App^{NL-G-F/NL-G-F}

4. 研究成果

- (1)老廃物質の脳からのクリアランスを、生存したまま経時的に測定できる方法を確立した。
- (2)低分子物質は主に血管内に、一部は脈絡叢からもクリアランスされた。高分子物質は血管周囲腔に集積し、一部は髄液腔へ移行した。
- (3)加齢により脳からの溶質のクリアランスは遅滞し、低分子物質は髄液ドレナージによりクリアランスは促進されたが、一方、高分子物質ではクリアランスの促進効果が得られなかった。
- (4)脳室上衣線毛の運動障害により、脳からの A β の排泄が障害された。上衣線毛運動は A β のみならず他の脳の老廃物の排泄にも関与していると考えられ、認知症の進行に寄与していることが示唆される。
- (5)髄液ドレナージにより、アミロイドなどの低分子物質の排泄促進が、老廃物の脳内への蓄積を軽減し、認知機能を維持できることが予想され、一方、アミロイド凝集体やタウ蛋白などの高分子物質の排泄は期待できない。進行したアルツハイマー病では髄液ドレナージ術は無効である。

引用文献

1. Leinonen V, Koivisto AM, Savolainen S, et al. Amyloid and tau proteins in cortical brain biopsy and Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2010 Oct;68(4):446-53.

2. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid .Sci Transl Med. 2012 Aug 15;4(147):147ra111.
3. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels.Nature. 2015 Jul 16;523(7560):337-41.
4. Da Mesquita S, Louveau A, Vaccari A, et al. Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer's disease.Nature. 2018 Aug;560(7717):185-191.
5. Ringstad G, Eide PK. Cerebrospinal fluid tracer efflux to parasagittal dura in humans.Nat Commun. 2020 Jan 17;11(1):354.
6. Saito T, Matsuba Y, Mihira N, Tet al. Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease.Nat Neurosci. 2014 May;17(5):661-3.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮嶋雅一
2. 発表標題 正常圧水頭症の病態と病理
3. 学会等名 日本神経病理学会総会学術研究会（招待講演）
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
研究分担者	秋葉 ちひろ (Akiba Chihiro) (40837754)	順天堂大学・医学部・助教 (32620)	
研究分担者	中島 円 (Nakajima Madoka) (50317450)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

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
---------	---------