

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591266

研究課題名(和文)アルツハイマー病における脳の慢性炎症病態解析と治療法開発

研究課題名(英文) Analysis of chronic inflammation in the Alzheimer's brain and development of the treatment for the suppression of T cell activation.

研究代表者

原 英夫 (Hara, Hideo)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：00260381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の病態修飾治療の中でA β ワクチン療法の開発が進行しているが、能動免疫の臨床治験(AN1792)では、一部の患者に髄膜脳炎が起こり原因としてA β 反応性のT細胞による自己免疫性脳脊髄炎が考えられている。我々はA β ペプチドを免役し脳炎を惹起した場合と、A β 反応性のCD4+Th1+ T cellを移入した場合において、新たな免疫抑制因子であるSPARC/osteonectinを用いて治療し、免疫反応の抑制、脳炎の改善効果を解析した。その結果、SPARC/osteonectinによる炎症細胞の脳内浸潤抑制、炎症性サイトカインの発現低下と抑制系IL-6産生誘導が認められた。

研究成果の概要(英文)：A β vaccines were developed for the treatment of Alzheimer's disease. However, clinical trial of active immunization of A β peptides showed that 6% of patients suffered from meningoencephalitis. It is thought that the cause of meningoencephalitis may be mainly due to the CD4+ T cells reactive to A β . We found new function of SPARC/osteonectin, extracellular cysteine-rich matrix protein as immune-suppressant, and we tried to suppress inflammation under the conditions of A β peptide-active immunization and transfer of A β -reactive encephalitogenic T cells to APP transgenic mice by SPARC/osteonectin. SPARC/osteonectin suppressed infiltrations of lymphocytes into the brain and also down-regulated the expression of inflammatory cytokines such as TNF- α .

研究分野：神経内科学

キーワード：アルツハイマー病 脳炎 炎症性サイトカイン リンパ球 免疫抑制因子

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の免疫療法 (A β ワクチン療法) には、A β ペプチドをアジュバントと共に免疫する能動免疫と A β に対する抗体を直接投与する受動免疫が行われてきた。アルツハイマー病患者への臨床治験 (AN1792 能動免疫) では、phase II study で、6% (300 名中 18 名) の患者に髄膜脳炎の副作用が起り、死亡例も報告された。脳炎の所見として、髄膜、髄膜血管周囲および大脳皮質への T 細胞の浸潤が認められ、A β 反応性の CD4+Th1+ T cell に惹起された自己免疫性脳脊髄炎の機序が考えられた。またアルツハイマー病における神経細胞死の機序の 1 つとして活性化されたアストロサイトやミクログリアから炎症性サイトカインが分泌され神経細胞障害を起していると考えられている。このようにアルツハイマー病脳の炎症病態、特に炎症性サイトカインの分泌による神経細胞障害を改善する治療法の開発が必要である。また能動ワクチン療法による自己免疫生脳脊髄炎を抑制する治療法があれば、ワクチン療法の開発が容易になると考えられる。

一方、我々は新たな免疫抑制因子をアストロサイトから同定した (J. Neuroimmunol. 233;135, 2011)。2 種類の免疫抑制因子をクローニングし、その 1 つは細胞外マトリックスに分泌される多機能な SPARC/osteonectin と判明した。SPARC/osteonectin は各組織に発現し、特に骨組織で発現が強く、脳ではシナプスの豊富な部位に発現している。

2. 研究の目的

我々はアルツハイマー病動物モデルマウスに A β ペプチドを免役し脳炎を惹起させ、アルツハイマー病の炎症機序における炎症性サイトカインと T 細胞の関与の機序を解析する。さらに A β ペプチドを免役し脳炎を惹起した場合と、A β 反応性の CD4+T cell を移入した場合において、新たな免疫抑制因子である SPARC/osteonectin を用いて治療し、免疫反応の抑制、脳炎の改善効果を解析する事を

目的とする。

3. 研究の方法

(1) APP トランスジェニック (tg) マウス ; アルツハイマー病の動物モデルとして、PDAPP transgenic mouse を用いた。このマウスは、PDGF promotor に変異型 APP (APP^{swe}) を組み込み、amyloid- β を大量に作成し、脳内に多くの老人斑が年齢とともに沈着する。

(2) A β ペプチド免疫

A β 1-42 ペプチド (PBS に 2mg/ml 濃度) と同容量の Freund 完全アジュバントと混和し、各マウスに 100~200 μ l 皮下注した。さらに 3 日後、Peturix Toxin (Sigma P7028) 200ng/250 μ l を各マウス腹腔内に投与した。

(3) T 細胞株, A β 反応性 T cell clone 樹立。

A β 反応性 T 細胞株は下記の様に作成した。A β 1-42 ペプチドと Freund 完全アジュバントで免役した APP tg マウスの脾臓およびリンパ節から細胞を分離し、培養液 RPMI 1640/10% FCS の中で 3 日間培養した。更に A β 反応性 T cell clone の樹立には、T 細胞株を A β 1-42 ペプチドと recombinant IL-2 を含む RPMI 1640/10% FCS 培養液で培養した。

(4) 細胞増殖試験

T 細胞の細胞増殖能力は、代謝活性のある細胞が作り出すホルマザン色素を定量する WST-1 cell proliferation assay を用いて測定した。テトラゾリウム塩は、生細胞にのみ活性のあるミトコンドリアのコハク酸テトラゾリウム還元酵素によりホルマザン色素に変換されるので、ELISA リーダーで色素溶液の吸光度を測定することにより、細胞増殖能反応を判定した。

(4) サイトカイン測定

T 細胞培養液上清中のサイトカインは、Multi-Analytic ELISArray kit (QIAGEN) を用いて ELISA 法で測定した。

種類として、炎症性サイトカイン (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A,

IFN- γ , TNF- α , G-CSF, GM-CSF) および Th1/Th2/Th17 サイトカイン (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-23, TGF- β)について測定した。

(5) 免疫組織染色

CD4, CD8, CD19, CD11b, GFAP(アストロサイト)、Iba-1 (ミクログリア), IL-6, IL-13, IL-17, TNF- α , Tau などに対する抗体を用いて凍結切片を ABC 法にて染色した。

(6) 老人斑染色

A β 蛋白や老人斑を検出するために、70% formic acid で処理し、抗 A β 抗体(polyclonal 抗 A β 抗体; 1000 倍希釈)と反応させた後、peroxidase 標識 2 次抗体を加え、DAB 染色を行った。

4. 研究成果

結果 1; 7ヶ月齢の APP トランスジェニック (tg) マウス (APP^{swe}) に A β 1-42 ペプチドと完全 Freund アジュバントで免疫し(能動免疫)、そのリンパ節、脾臓から T 細胞株を樹立し、脳炎惹起性 (Th1/17) および脳炎非惹起性 (Th2) の性格付けの実験を行った。

T 細胞株および脳炎惹起性 (Th1/17) T 細胞クローンから産生される炎症性サイトカインを ELISA 法 (Multi-Analytic ELISArray kit; QIAGEN)で測定した。

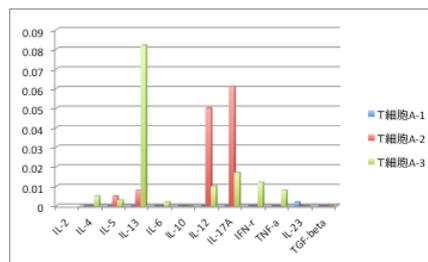
(1) T 細胞から分泌される炎症性サイトカインの測定結果:T 細胞株は 2 種類作成した。1 つは APP トランスジェニック (tg) マウスに A β 1-42 ペプチドと完全 Freund アジュバントで免疫し、そのリンパ節、脾臓および脳から T 細胞株であり、もう 1 つはこれらの細胞株をさらに IL-2 (100 μ g/ml, 0.1ml)と A β 1-42 ペプチドを用いて、*in vitro* で細胞を刺激して作成した A β 反応性 T 細胞クローンである。T 細胞(3 種類)で分泌増加していたサイトカインとしては、

T 細胞株 A-1; IL-23 軽度分泌

T 細胞株 A-2; IL-5, IL-12, IL17A, IL-1 α ,

T 細胞株 A-3; IL-6, IL-13, IFN- γ , TNF- α ,

IL-1 α , GM-CSF



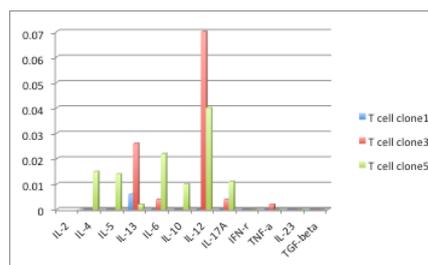
以上のように T 細胞株によって分泌される炎症性サイトカインの種類は異なっていた。

T 細胞株 A-2 と A-3 からさらに A β 反応性 T 細胞クローン (3 クローン) 作成し、それぞれから分泌増加していたサイトカインは、

T cell clone 1; IL-1 β ,

T cell clone 3; IL-6, IL-12, IL-13, TNF- α , IL-17A

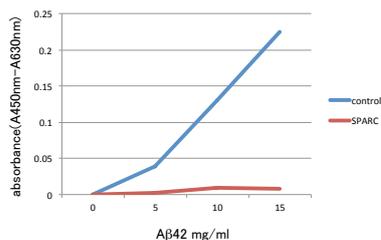
T cell clone 5; IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-1 β , IL-17A



各 T cell clone から分泌されるサイトカインの解析結果。

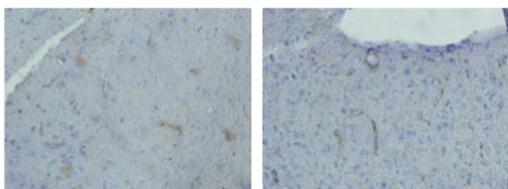
(2) 脳炎惹起性 (Th1/17) T 細胞クローンに対して、SPARC/osteonectin リコンビナント蛋白が *in vitro* でどのように抑制効果を示すか、細胞増殖反応で評価を行った。マウスより脾細胞を分離し、96 well plate の 1 well に 5 x 10⁴ 細胞を加え、A β 42 ペプチドを各濃度で加えた培養液中で 48 時間培養した。細胞培養終了後、テトラゾリウム塩(WST-1)を加えた。テトラゾリウム塩は、生細胞にのみ活性のあるミトコンドリアのコハク酸テトラゾリウム還元酵素によりホルマザン色素に変換されるので、ELISA リーダーで色素溶液の吸光度を測定することにより、細胞増殖能反応を判定した。SPARC/osteonectin 100 μ g 添加により細胞増殖抑制効果が観察され、抑制とともに炎症性サイトカイン (IL-4, IL-5,

IL-6, IL-12) が減少した。



(3) 7ヶ月齢の若年 APP tg マウスに Aβ1-42 ペプチドを免疫した後、その脳を免疫組織学的に解析した。若年マウスでは Ab の沈着は極少量であり、血管周囲のリンパ球浸潤も極軽度であり、炎症性サイトカインの発現も少なかった。IL-13 のみが一部のマウス脳で発現が増加していた。

大脳皮質での IL-13 の発現 (下図)



(4) 7ヶ月齢の若年 APP tg マウス脳における老人斑、Aβ沈着の解析。

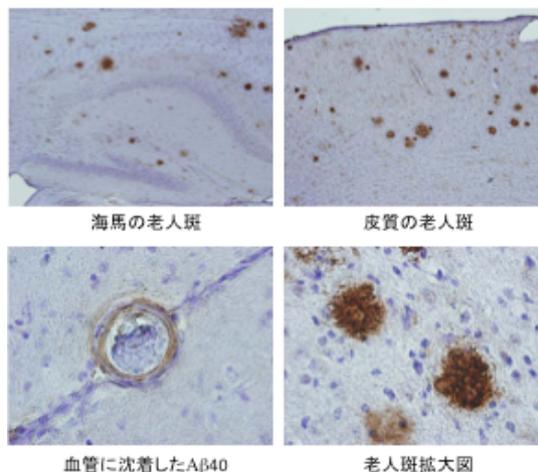
海馬や皮質を精査したが、7ヶ月例では海馬、大脳皮質ではほとんど老人斑の形成は認められず、一部に Aβ沈着が認められた。

結果 2 ; 高齢(26ヶ月齢)の APP トランスジェニック (tg) マウスに Aβペプチドを免疫し脳炎を惹起した場合と、Aβ反応性の CD4+Th1+ T cell を移入した場合において、新たな免疫抑制因子である SPARC/osteonectin を用いて治療し、免疫反応の抑制、脳炎の改善効果を解析した。

脳炎惹起性 (Th1/17) および脳炎非惹起性 (Th2) T 細胞クローンを樹立し、これらの T 細胞クローンを高齢(26ヶ月齢)の APP tg マウスに移入し、AD 病態に及ぼす影響を観察した。特に脳の炎症状態、老人斑の解析などを組織学的に検索した。

高齢(26ヶ月齢)の APP トランスジェニック (tg) マウスでは、海馬や皮質に多量の老人斑沈着が認められ、血管周囲には Aβ40 が

沈着した、いわゆるアミロイドアンギオパチーが認められた (脳染色)。



コントロール APP Tg マウス (26ヶ月齢)

中枢神経系にリンパ球の浸潤の有無を検索するため、CD4、CD8、CD19、CD11b、GFAP (アストロサイト)、Iba-1 (ミクログリア)、IL-6、IL-13、IL-17、TNF-α、Tau などに対する抗体を用いて凍結切片を ABC 法にて染色した。

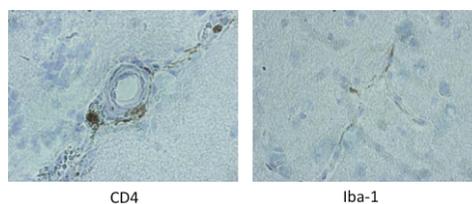
高齢(26ヶ月齢)の APP トランスジェニック (tg) マウス (APP^{swe}) ; A, B, C, D, の4群に分け、次の実験を行った。

まず、Aβペプチドを免疫し脳炎を惹起した A 群と、更に SPARC/osteonectin リコンビナント蛋白をマウスに投与した B 群において、抗炎症作用を解析した。

A 群 2 匹 ; Aβ1-42 ペプチド + CFA 免疫。

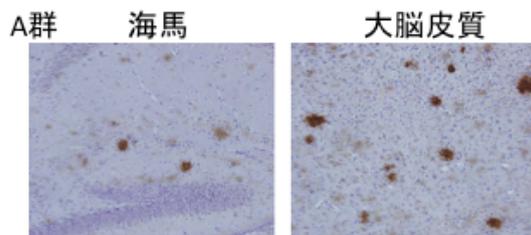
B 群 3 匹 ; Aβ1-42 ペプチド + CFA 免疫したのち、7 日後に recombinant SPARC/osteonectin (100mg/ml, R&D SYSTEMS) 1ml 腹腔内追加投与した。

いずれも 3 週後に解剖し、脳組織と各臓器を検索した。A 群のマウス脳においては血管周囲に CD4+ T 細胞と Iba-1 陽性のミクログリアを認めた。



B 群マウスにおいては、明らかな CD4+T

細胞やB細胞の浸潤は認められなかった。A, B群の脳の老人斑染色では、A β 沈着の量は両群に有意な差は無かった（下図）。



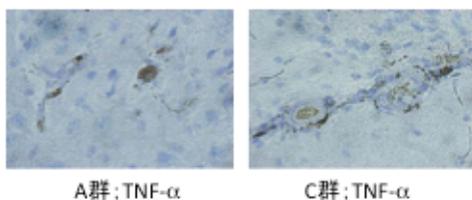
次に脳炎惹起性 (Th1/17) T細胞クローンを高齢(26ヶ月齢)のAPPトランスジェニック (tg) マウスに移入し、マウスの脳にどの程度の炎症が惹起されるかと同時に、SPARC/osteonectinリコンビナント蛋白をマウスに投与し、その抗炎症作用を解析した (C, D群)。脳炎非惹起性 (Th2) T細胞クローンを腹腔内投与したマウスの脳では特に変化は認められなかった。

C群 2匹；A β 反応性T細胞 1×10^6 cells/100 μ l PBSを腹腔内投与。

D群 3匹；A β 反応性T細胞 1×10^6 cells/100 μ l PBSを腹腔内投与し、7日後にrecombinant SPARC/osteonectin (100 μ g/ml) 1ml腹腔内追加投与。

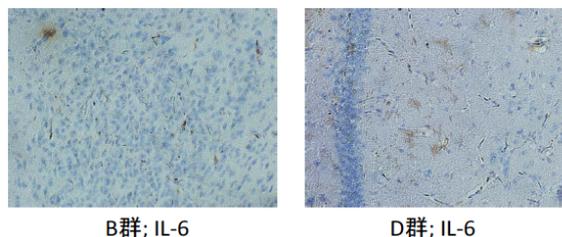
いずれも3週後に解剖し、脳組織と各臓器検索した。C群においては、血管周囲にCD4+T細胞浸潤を認めた。

SPARC/osteonectinを投与したD群のマウスではT細胞、B細胞とも浸潤は認められなかった。炎症性サイトカインの発現は、特にA群とC群に認められた。下図にTNF- α の発現を示す。



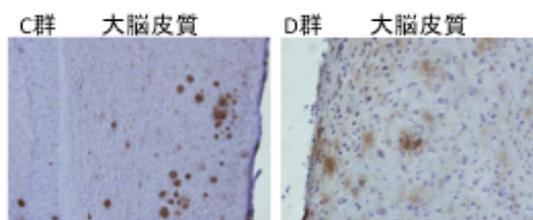
一方でSPARC/osteonectinを投与したB群とD群のマウス脳においては、炎症性サイトカインTNF- α の発現はA, C群と比べ低下して

いた。興味あることに、SPARC/osteonectinを投与したB群とD群のマウス脳においては、サイトカインIL-6の発現が増加していた。



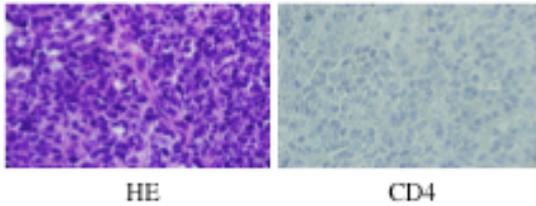
A, C群においてはIL-6の発現は低下していた。以上の結果からは、A β 1-42ペプチド免疫役した場合も、脳炎惹起性 (Th1/17) T細胞クローンを移入した場合もSPARC/osteonectinによる炎症細胞の脳内増殖抑制、およびIL-6産生誘導による炎症性サイトカインの発現抑制に効果があったと推察される。

C, D群の脳の老人斑染色では、A β 沈着の量は両群に有意な差は無かった。しかしよく観察すると、C群ではcompact plaqueが大部分であったのに比べ、D群ではdiffuse plaqueが多く見られた（下図参照）。



この違いの機序は不明だが、SPARC/osteonectinによる炎症抑制が何らかの老人斑形成に作用した可能性が残る。さらに老人斑周囲の反応性細胞（アストロサイトやミクログリア）は、C群に比べD群では減少していた。このことはD群において炎症反応の抑制が示唆された。

一方、SPARC/osteonectinを投与したD群のマウスにおいては、1匹のマウスでは著明な脾腫があり、別の1匹のマウスでは脾臓周囲に腫瘍ができ、形態的にもリンパ系の腫瘍と考えられた。CD19, CD4, CD8染色はいずれも陰性で、未分化癌と考えられた。



しかし、B群のマウスでは脾腫やリンパ系腫瘍は認められず、D群において移入したT細胞の腫瘍性増殖をSPARC/osteonectinが助長し腫瘍化した可能性が考えられた。SPARC/osteonectinに催腫瘍効果は報告されておらず、興味ある点である。

結論；APPトランスジェニックマウスにAβ1-42ペプチド免疫した場合も、脳炎惹起性(Th1/17)T細胞クローンを移入した場合もSPARC/osteonectinによる炎症細胞の脳内浸潤抑制、炎症性サイトカインの発現低下と抑制系IL-6産生誘導などの効果があったと推察される。

5. 主な発表論文等[雑誌論文、計16件]

1. Distributional impact of brain microbleeds on global cognitive function in adults without neurological disorder. *Stroke* 43; 1800-1805, 2012. Yakushiji Y, Noguchi T, Hara M, et al. (Hara.H last author). 査読有
2. Joint effect of hypertension and life-style-related risk factors on the risk of brain microbleeds in healthy individuals. *Hypertension Research*, 36:789-794, 2013. Hara M, Yakushiji Y, Nannri H, et al. (Hara.H last author). 査読有
3. Norms of the Mini-Mental state Examination for Japanese subjects that underwent comprehensive brain examinations: the Kashima Scan Study. *Intern Med.* 53: 2447-2453, 2014. Yakushiji Y, Horikawa E, Eriguchi M, et al. (Hara.H last author). 査読有
4. Topography and associations of perivascular spaces in healthy adults: the Kashima scan study. *Neurology* .83:2116-2123, 2014. Yakushiji Y, Charidimou A, Hara M, et al. (Hara.H last author). 査読有
5. Basal Ganglia Cerebral Microbleeds and Global Cognitive Function: The Kashima Scan Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 24:431-439, 2014. Yakushiji Y,

Noguchi T, Charidimou A, Eriguchi M, et al. (Hara.H last author). 査読有

6. Alzheimer病の根本的治療を目指して *神経治療学* 30; 150~152, 2013 原英夫。査読有
 7. 根本的治療；今までの軌跡と未来への展望。 *認知神経科学* 16;61-66, 2014 原英夫。査読有
 8. Alzheimer病の免疫治療-最近の動向- *神経内科* 80;371-375, 2014. 原英夫。査読無し
- 【学会発表】(計 9件)

1. 第18回日本認知症科学会学術集会 2013 7.28 東京大学(東京都文京区)；根本的治療；今までの軌跡と未来への展望；原英夫
 2. 第2回認知症研修会 in 米子。平成25年8月24日、鳥取大学医学部記念講堂(鳥取県米子市)。治療；抗認知症薬-現状と展望。原英夫
 3. 認知症予防・治療・介護の最前線シンポジウム2013。平成25年11月16日出雲市医師会館(島根県出雲市)。主催；島根大学プロジェクト研究・萌芽研究部門 認知症の治療と将来への展望。原英夫
 4. 第55回日本神経学会学術大会；福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2014.5.23。Overview of disease modifying therapy trials for Alzheimer's disease. H Hara
 5. Alzheimer's Association International Conference 2014 (AAIC2014). Bella Center, Copenhagen, Denmark, July 12-17, 2014. Regulation of amyloid precursor protein expression by tetratricopeptide repeat protein 2 (Tpr2). Hideo Hara, Takeshi Tabira
- 【図書】(計 5件)

1. 髄膜炎、脳炎；朝倉書店；内科学第9版。原英夫
 2. 神経ボレリア症(ライム病)。今日の神経疾患治療指針 2013。原英夫
 3. 新規治療薬開発の展望-免疫療法を中心に。最新医学別冊、ABC22 アルツハイマー病改訂第2版。2014。原英夫
- 〔産業財産権〕
 ○出願状況(計 0件)
 ○取得状況(計 0件)
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 原 英夫 (Hara Hideo)
 佐賀大学・医学部内科学講座神経内科・教授
 研究者番号：00260381
 (2) 研究分担者；なし
 (3) 連携研究者；なし