

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15438

研究課題名(和文) アルツハイマー病と気分障害の関連基礎研究

研究課題名(英文) Research for the pathological relationship between Alzheimer Disease and depression

研究代表者

楯林 義孝 (TATEBAYASHI, Yoshitaka)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：80342814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：オリゴデンドロサイト(Oligodendrocyte: OL)系譜細胞のアルツハイマー病(Alzheimer's Disease: AD)における役割は全く不明である。研究代表者は成体ラット脳海馬からOL前駆細胞(adult OL progenitor cell: aOPC)を分離・培養する方法を確立し、細胞表面にplexin-B3を発現する新しいaOPCを発見した。In vitro、in vivo、ヒトAD死後脳でplexin-B3陽性aOPCがA β 分泌細胞としてAD病理に重要な働きをしていることを発見した。これらの事実は、従来のアミロイド仮説を見直す必要性を強く示唆する。

研究成果の概要(英文)：The roles of oligodendrocyte (OL) lineage cells, the largest glial population in the adult CNS, in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) remain elusive. Here, we show a newly developed culture method for adult OL progenitor cells (aOPCs) and identify novel plexin-B3-expressing aOPCs as amyloid peptides (A β)-secreting cells. A small population of plexin-B3+ aOPCs was found in NG2+ aOPC cultures (> 95%) growing in FGF2. FGF2 withdrawal decreased NG2+, but increased plexin-B3+ aOPCs with increased A β 1-40, -42 secretions and A β 1-42/total A β ratios. In vivo, plexin-B3+ aOPCs are distributed throughout the adult brain, although less densely so than NG2+ aOPCs. Spreading depolarization, a type of brain injury, induced unique delayed cortical plexin-B3+ aOPC gliosis. In AD brains, virtually all senile plaques were immunostained with plexin-B3 antibodies. These findings suggest that plexin-B3+ aOPCs play important roles in AD pathogenesis as a natural A β source.

研究分野：精神医学

キーワード：オリゴデンドロサイト前駆細胞 アルツハイマー病 大うつ病 plexin-B3 老人斑 アミロイド

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病 (AD) の Braak 分類を確立した神経病理学者 Braak らは、灰白質ミエリン化の進行が AD 病理、特に神経原線維変化の進行と逆相関があることを報告している⁸。

(2) 一方代表者は、気分障害のヒト死後脳をより厳密に解析し、前頭極 (BA10) 灰白質に気分障害特異的なミエリン化に関連する異常があることを見出した³⁻⁶。BA10 皮質は海馬貫通路⁷などとともに 50~60 歳代までミエリン化が進行する⁸。

(3) 気分障害が、AD の最も強力な危険因子の一つ^{1,2,10,11}であることを考え合わせると、両病態には、ミエリン化 (オリゴデンドロサイト (OL) 分化) を共通点とする何らかの脳内病理基盤があることを示唆する^{10,11}。

(4) われわれは独自に成体ラット海馬 OL 前駆細胞 (aOPC) 培養系を確立した⁹。

2. 研究の目的

独自開発した aOPC 培養細胞⁹を用い、OL 分化 (Notch 動態など) と APP 代謝の関連基礎研究を行い、AD 研究の新潮流を作る。また気分障害との共通脳内病理を探る。

3. 研究の方法

(1) 胎児の OPC 培養では増殖因子の除去で細胞周期が停止し OL 分化が達成される。aOPC 培養では増殖因子 (Fibroblast growth factor 2: FGF2) の除去によって OL 分化がどうなるのか? また、Notch や APP などの代謝がどうなるのか? を詳細に解析する。

(2) 新たな分子標的を見出し、aOPC の機能や動態などを解明するとともに、AD 病理との関連を調べる。

4. 研究成果

(1) 新規 OPC サブタイプ Plexin B3 陽性細胞 (Plexin B3 陽性 aOPC) の発見

代表者が開発した aOPC 培養は FGF2 濃度依存的に細胞数が増加する。増殖条件下 (FGF2 20ng/ml) では、NG2 陽性 aOPC がほぼ 95%、olig2 陽性 aOPC がほぼ 100% の aOPC が得られる。代表者はマイクロアレイなどの発現解析から、マフォリン受容体である plexin-B3 を強発現する細胞が、通常培養条件下で約数%存在することを発見した。それらの細胞は olig2 陽性でかつ増殖することから、OPC サブタイプの一つであると考えられる。FGF2 による aOPC への影響を調べるために、FGF2 非存在下、または通常培養する濃度 (20ng/ml) より低濃度で aOPC 培養を行った。その結果、plexin-B3 の発現量が増加し、NG2 の発現量が低下していた (図 1a, b)。すなわち plexin-B3 陽性 aOPC は、aOPC 新

規サブタイプの一つで、非増殖 (= 分化) 条件で増加する、すなわち NG2 より分化した aOPC であることが本研究により明らかになった。よって、aOPC 培養法は、成体脳 OPC を解析する有効な in vitro 系のツールであると考えられる。本研究の成果は、特許出願を行った (特願 2016-086033)。

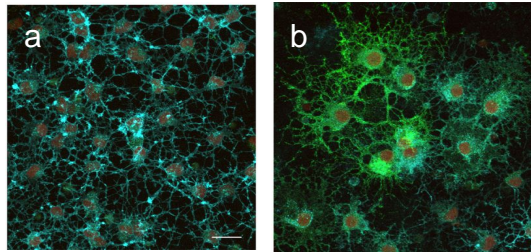


図 1. 培養 aOPC 免疫染色

a) 20 g/ml FGF2 における aOPC 培養細胞の NG2 (シアン)、olig2 (赤) 二重染色 b) 0 g/ml FGF2 における aOPC 培養細胞 plexinB3 (緑)、olig2 (赤) の二重染色

(2) Plexin-B3 陽性 aOPC の機能解析

aOPC は FGF2 濃度依存的に細胞数が増加する。そこで、分化制御をはじめとする細胞運命を司る Notch シグナルについて検討を行い、Notch 受容体から細胞内に遊離する NICD の産生が FGF2 濃度に相関して増加することを明らかにした。NICD は γ -secretase 活性により産生されることから、aOPC において γ -secretase 複合体が発現している可能性を示唆していた。ウエスタンブロット法 (WB 法) による検討を行った結果、 γ -secretase 複合体の構成因子である presenilin1、nicastrin、APH-1 が aOPC に存在し、それらの発現量は FGF2 濃度にほとんど依存していなかった。

γ -secretase 複合体は、Notch と並びアミロイド前駆体タンパク質 (APP) を切断することが知られ、 γ -secretase 活性を検討するため NICD と APP から産生されるアミロイドペプタ (A β) の発現量が以前から研究されてきた。そこで WB 法を行った結果、aOPC は APP が大量に発現し、その発現量は FGF2 濃度と逆相関していた。FGF2 濃度と γ -secretase 活性の関係について更なる検討を行うために、細胞外に放出される A β 、特に A β x-40 と A β x-42 について、aOPC の培養液中を調べた。その結果、FGF2 濃度と逆相関して A β x-40 と A β x-42 が細胞外へ産生され、0 ng/ml FGF2 においては、胎児期由来の培養神経細胞と比較して A β x-42 産生量は 5 倍以上高かった。さらに 5 ng/ml 以上の FGF2 濃度においては、培養神経細胞よりやや多いか同程度の A β x-42 ratio (A β x-40 と A β x-42 産生量の合算に対する A β x-42 の割合) が認められた。aOPC は γ -secretase 活性を持ち、NICD 及び A β を産生した。以上をまとめると、aOPC は FGF2 濃度に応じて Notch、APP の発現量を変え、 γ -secretase

複合体はそれら基質を切断して細胞内へは Notch シグナル伝達、細胞外へは Aβ を放出していると考えられる。

(3) in vivo における plexin-B3 陽性 aOPC と脳外傷における遅発性グリオシス

成体ラット脳 (in vivo) では NG2 陽性 aOPC と同様、plexin-B3 陽性 aOPC が存在し、その分布も全脳にほぼ均一に広がり、密度は NG2 陽性 aOPC の約 1/4 だった(図 2)。

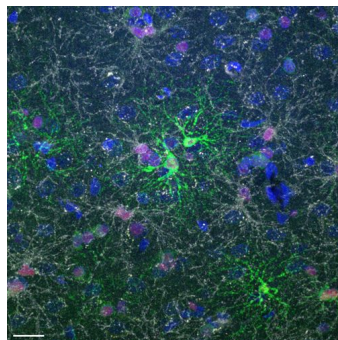


図 2. 成体ラット脳免疫染色

plexin-B3 (緑)、NG2(グレー)、olig2 (赤)、核(青) 四重染色

近年、脳損傷や脳出血、脳虚血におけるペネンブラの発生機序として大脳皮質拡張性抑制(Cortical Spreading Depression: CSD)が注目されている。これは損傷を受けた脳部位から、神経細胞やグリア細胞が脱分極を起こし、それに続いて起こる電気活動抑制状態が大脳皮質を伝播する現象を指す。3M KCl を含ませたコットンを脳硬膜上に当て CSD を誘発し、aOPC の変化を調べた。6~7 日後、皮質局所と局所から遠位部の同腹側皮質にかけて plexin-B3 陽性 aOPC の細胞密度が増加し、反対側より有意に約 3 倍増加していた。他のグリア細胞ではミクログリアのみが有意に増加していた。よって、CSD によって遅発性に plexin-B3 陽性 aOPC のグリオシスが生じる。脳損傷経験者の 30~38% に Aβ の沈着が認められ (12)、将来 AD を発症する環境要因と考えられている (13)。よって、plexin-B3 陽性 aOPC は、AD 研究の新規ターゲットになると考えられた。

(4) ヒト AD 死後脳研究

in vitro で plexin-B3 陽性 aOPC が Aβ を放出していたこと、CSD で大脳皮質に遅発性グリオシスを生じることから、plexin-B3 陽性 aOPC は AD に関与している可能性が示唆された。AD 死後脳のパラフィン切片を plexin-B3 抗体で免疫組織染色を行った。その結果、plexin-B3 抗体は老人斑様の形態を認識し(図 3)、アストロサイトマーカー GFAP とミクログリアマーカー Iba1 がその老人斑様の形態に集積した様子が確認された。Plexin-B3 抗体とその抗原ペプチドを反応させ、ペプチド中和した後は、老人斑様形態の染色強度が著明低下した。以上のことから、plexin-B3 陽性 aOPC は AD の老人斑形成に関与していると考えられる。

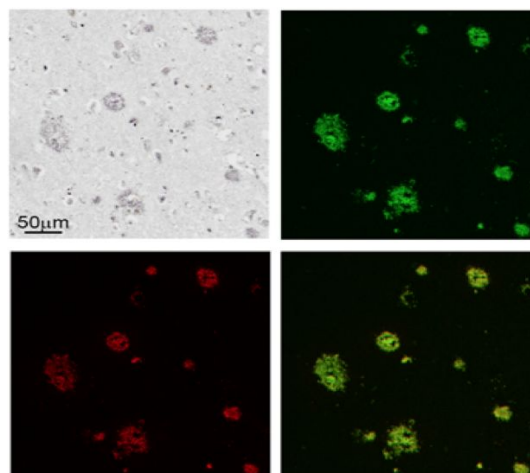


図 3. AD 脳免疫染色

左上から、plexin-B3 抗体による DAB 染色、DAB 染色後の蛍光染色: 右上 Aβ42 抗体(緑)、左下 4G8 抗体(赤)、右下 Aβ42 抗体と 4G8 抗体重ね合わせ(黄緑)

< 引用文献 >

1. Ownby RL et al. (2006) *Arch Gen Psychiatry* 63:530.
2. Profenno LA et al. (2010) *Biol Psychiatry* 67:505.
3. Hayashi Y (他 2 人) Tatebayashi Y (2011) *Mol Psychiatry* 16:1155 (Image invited).
4. Hayashi Y (他 4 人) Tatebayashi Y (2011) *Mol Psychiatry* 16:1156-58.
5. Hayashi Y (他 3 人) Tatebayashi Y (2012) *PLoS ONE* 7: e33019.
6. Tatebayashi Y et al. (2012) *Transl Psychiatry* 2:e204.
7. Benes FM et al. (1994) *Arch Gen Psychiatry* 51:477.
8. Braak H & Braak E (1996) *Acta Neuropathol* 92:197.
9. 楯林義孝ら他 特願 2007-174147.
10. 楯林義孝 (2013) 日本認知症学会誌. 27:151.
11. Nihonmatsu-Kikuchi N(他 1 人) Tatebayashi Y (2013) *J Alzheimer's Disease*. 37:611.
12. Roberts GW et al. (1994) *The Lancet* 338:1422.
13. Breunig JJ et al. (2013) *Front Aging Neurosci* 5:article26.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 楯林 義孝 (2017) うつ病・双極性障害と認知症 認知症とうつ病の共通病態基盤 生物学的観点から. 第 14 回日本うつ病学会総会・第 17 回日本認知療法・認知行動療

- 法学会
2. 榎林 義孝 (2017) 高齢者のうつ病;基礎と臨床、認知症との関連うつ病と認知症の関連 基礎研究の観点から. 第22回日本神経精神医学会
 3. 榎林 義孝 (2017) ヒト死後脳による精神疾患研究. 第4回ゲノム創薬・医療フォーラム
 4. 榎林 義孝 (2017) Plexin B3 陽性新規オリゴデンドロサイト前駆細胞の動態からみた気分障害とアルツハイマー病の関連 第4回サイコグリア研究会
 5. 榎林 義孝 (2017) Plexin B3 陽性新規オリゴデンドロサイト前駆細胞の動態から見た気分障害とアルツハイマー病の関連 第113回日本精神神経学会
 6. Tatebayashi Y (2017) Plexin-B3+ oligodendrocyte precursor cells: a novel cellular source of β -amyloid in Alzheimer's Disease. *Cell Symposia*. Abstract selected.
 7. Tatebayashi Y, Kikuchi-Nihonmatsu N, Matsuda Y, Uchihara T, Aoki K, Watanabe M (2017) Roles of plexin-B3+ oligodendrocyte progenitor cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroscience Meeting 2017*. Nanosymposium abstract selected.
 8. Tatebayashi Y, Kikuchi-Nihonmatsu N, Matsuda Y, Uchihara T (2017) Essential involvement of oligodendroglia in the pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease. *AAIC 2017*. Hot Topics abstract selected.
 9. 二本松尚美、于秀軍、松田芳樹、渡邊萌、青木和久、小澤信幸、篠崎たき子、近藤ひろみ、内原俊記、榎林義孝* (2017) Plexin-B3 陽性新規オリゴデンドロサイト前駆細胞: A 産生能と AD 病理 第36回日本認知症学会学術集会
 10. Kikuchi-Nihonmatsu N, Yu X, Matsuda Y, Aoki K, Kondo H, Uchihara T, Tatebayashi Y (2017) A novel system for functional analysis

of adult oligodendrocyte progenitor cells. *Neuroscience Meeting 2017*.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:アルツハイマー病研究を標的にしたグリア細胞システム
 発明者:榎林義孝、菊池尚美
 権利者:同上
 種類:特許
 番号:特願 2016-086033
 出願年月日:2016年4月22日
 国内外の別:国内

取得状況(計0件)

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎林 義孝 (TATEBAYASHI, Yoshitaka)
 公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・プロジェクトリーダー
 研究者番号:80342814