

令和元年6月18日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08286

研究課題名(和文)アルツハイマー病の細胞治療法の開発に向けた多種幹細胞由来A β 貪食細胞の機能解析研究課題名(英文) Functional analysis of stem cell derived-A β phagocytic cells for the development of cell therapeutic strategies in Alzheimer's disease

研究代表者

高田 和幸 (Takata, Kazuyuki)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10434664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：社会問題にまで発展するアルツハイマー病(AD)の治療法の開発は喫緊の課題である。脳免疫細胞ミクログリアは、AD発症の原因として知られるアミロイド(A β)を貪食除去する。本研究では、幹細胞由来A β 貪食ミクログリア様細胞を作製してADモデルマウス脳に移植し、その効果を解析した。その結果、移植した骨髄由来ミクログリア様A β 貪食細胞は脳内のA β 蓄積部位を認識して貪食除去に働き、認知機能障害を改善すること分かった。今後iPS細胞やES細胞から作製したミクログリア様細胞を用いることでさらなる臨床応用の実現性が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在アルツハイマー病(AD)に対する治療は期間も効能も限定的な対症療法のみである。そこで発症機序に根差したより根本的な治療法の開発が必要である。本研究では、骨髄細胞から脳の免疫担当細胞であるミクログリア様の細胞を作製して脳内に移植すると、AD発症における原因物質であるアミロイドA β の脳内蓄積量が減少し、さらには認知記憶障害をも改善し得ることをADモデルマウスを用いて明らかとした。この成果は、社会問題にまで発展するADに対する全く新しい細胞治療法の開発を提案するものであり、もって人類の福祉に大きく貢献できる可能性を有する画期的な成果である。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease, and the development of more effective therapy is urgently required. Amyloid- β (A β) is thought to be a causative peptide for the development of AD. Microglia are brain immune cells and contribute to the clearance of A β in brains by their phagocytic function. In this study, mouse bone marrow derived-microglia like (BMDML) A β phagocytic cells were prepared and injected into brains of a mouse models of AD. As the results, BMDML cells recognized and decreased accumulations of A β in brains by their phagocytic function. Furthermore, the transplantation of BMDML cells attenuated the cognitive impairment in a model mouse of AD. Further studies using induced pluripotent stem (iPS) cells and/or embryonic stem (ES) cells are expected to contribute to the clinical application of cell therapeutic strategy against AD.

研究分野：神経科学

キーワード：Alzheimer's disease microglia phagocytosis amyloid-beta clearance stem cells bone marrow cells transplantation

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

認知症患者数は2025年には日本で700万人(65歳以上の5人に1人)を超えると予想されている。認知症を招く原因疾患の50%~70%はアルツハイマー病(AD)である。現在、ADの治療は薬物療法を含めて対症療法の域を出ておらず、発症機序も未だ不明である。しかしながら、脳内でのアミロイドβタンパク質(Aβ)の蓄積がAD病態形成における最初の引き金であることは示唆されており(アミロイドカスケード仮説)、脳内Aβ蓄積の早期発見、早期除去が根本的治療法の開発に重要であると考えられている。

これまでに我々は、脳の免疫担当細胞であるミクログリアがその貪食機能によりAβを貪食し、脳内のAβ除去に働くことを報告しており、さらに、ミクログリアの脳内移植がAβ除去に有効であることを見出している。そこで、ミクログリアを用いた細胞移植療法(細胞療法)があらたなAD治療戦略として考えられるが、ヒトミクログリアの入手や調製は倫理的にも技術的にも困難である。この背景のもと、幹細胞調製したミクログリア様細胞をADの細胞治療法の開発に応用する研究に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究では、マウス骨髄細胞から採取した造血幹細胞からミクログリア様細胞を作製して、その機能を詳細に解析し、さらにADモデルマウスの脳内へ移植することで、脳内のAβ蓄積や認知機能への効果を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨髄由来ミクログリア様(BMDML)細胞の調製および機能解析

骨髄細胞はC57BL/6系マウスより採取した。得られた骨髄細胞をヒトCSF-1製剤(Leukoprol®; 協和発酵キリンより供与を受けた)の存在下において培養することで骨髄由来ミクログリア様細胞へと分化誘導した。細胞の形態や発現タンパク質はギムザ染色や免疫細胞染色を行い、明視野顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。またフローサイトメーターを用いた細胞表面抗原の発現についても解析した。なお、本研究の動物実験は京都薬科大学動物実験委員会の承認を得ており、「動物実験に関する指針(日本実験動物学会)」に従い実施した。

BMDML細胞の貪食機能の解析として、デキストラン被覆酸化鉄(III)やAβを処置した。貪食された酸化鉄およびAβはプルシアンブルー染色ならびに免疫蛍光染色にて解析し、貪食したAβは画像解析ならびにenzyme linked-immunosorbent assay (ELISA)により定量化して解析した。

(2) ADモデルマウスを用いた移植実験:

ADモデルマウスとしてAPdE9マウスを使用した。APdE9マウスは、ヒトAPPの変異遺伝子(Swedish mutation, K595N/M596L)とPSEN1の変異遺伝子(PS1-dE9)を導入したマウスである。また、移植に用いるBMDML細胞は生後7週齢のenhanced green fluorescent protein (EGFP)マウスの大腿骨および脛骨よりGFP陽性骨髄細胞を採取し、上記の方法で調製した。なお、本研究の動物実験は京都薬科大学動物実験委員会ならびに遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得ており、「動物実験に関する指針(日本実験動物学会)」に従い実施した。

APdE9マウス脳へのEGFPマウス由来BMDML細胞の移植は、脳定位固定装置を用いてAPdE9マウスを深麻酔下に固定し、左右両方の海馬へマイクロシリッジを用いて移植した。移植後、マウスを深麻酔下で脳を摘出して4%パラホルムアルデヒドで固定した。クライオスタットを用いて凍結切片を作製し、免疫組織化学的染色にて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

Aβプラーク面積ならびに移植細胞間距離については画像解析を実施した。細胞移植によるAβ病態への影響および移植細胞の脳内動態を画像解析により解析した。さらに、移植細胞のAβへの指向性について、数理モデルであるモンテカルロシミュレーションによりランダムな細胞の動きと実際に海馬領域内での移植細胞動きを比較した。ADモデルマウスの認知記憶に対するBMDML細胞移植の効果については新規物体認識試験により解析した。

(3) 統計解析

2群間の平均値の比較にはStudentのt検定を2群間の中央値の比較にはMann-WhitneyのU検定を用いた。3群以上の比較での統計学的解析は分散分析法ANOVAを用い、検定にはBonferroni/Dunnの検定を用いた。得られた実験結果は、平均値±標準誤差(SEM)で表示した。危険率5%以下を統計学的に有意差があると判定した。

4. 研究成果

(1) 骨髄由来細胞の形態学的ならびに表現型解析

マウス骨髄細胞にCSF-1を処置することでほぼ単球の細胞となり純度よく単球のみの集団を得られた(Fig. 1A)。CSF-1を処置し分化誘導した骨髄由来細胞の分化状態を確認するため、細胞マーカータンパク質を免疫細胞化学的染色により解析した。その結果、初代培養マウスミクログリア(microglia)と同じように骨髄由来の分化細胞(BM-derived cells)はMac-2、CD11bおよびionized calcium-binding adapter molecule 1(Iba1)の発現が確認され、さらにミクログリアに比較的特異性の高い発現が知られるtriggering receptor expressed on

myeloid cells 2 (TREM2) は、ミクログリアおよび骨髄由来細胞において高い発現が確認されたが、腹腔マクロファージ (pMφ) においてはほとんど発現が認められなかった (Fig. 1B)。

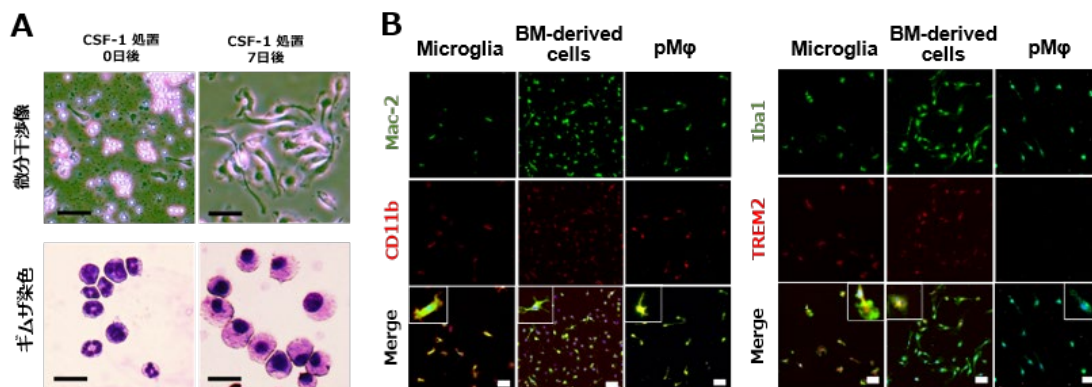


図1 骨髄由来細胞の形態学および免疫細胞化学的解析

Scale bars: 25 μm (A), 50 μm (B).

さらに他のミクログリア/マクロファージマーカーも含め、より詳細に各マーカーの発現強度をフローサイトメトリーにより比較した。発現強度の指標として未染色サンプルの蛍光強度の中央値である、陰性 median fluorescence intensity (MFI) と蛍光標識抗体で染色したサンプルの中央値である陽性 MFI の比をとった MFI 比を用いてグラフを作製し、さらにその値からヒートマップを作製した。その結果、細胞染色の結果と同様に、骨髄由来細胞におけるミクログリアマーカーの発現が検出されたが、P2Y12R や CD11b、Mac-2 の発現量はミクログリアとは類似性はなかった。これらの結果から、骨髄由来細胞は、腹腔マクロファージに比べるとミクログリアに類似した細胞へ分化していることが示唆された (Fig. 2)。

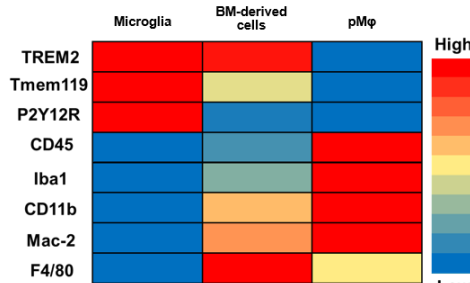


図2 骨髄由来細胞の表面抗原発現の解析

(2) 骨髄由来ミクログリア様 (BMDML) 細胞の貪食機能の解析

上記のように、CFS-1 で分化誘導した骨髄由来細胞の表現型がミクログリアに類似していたことから、本細胞を骨髄由来ミクログリア様 (bone marrow-derived microglia like: BMDML) 細胞と名づけた。そこで、BMDML 細胞の貪食機能についてカルボキシデキストランで被覆された酸化鉄粒子を処置して解析した結果、BMDML 細胞の貪食機能はミクログリアや腹腔マクロファージと同程度の貪食能を示した (Fig. 3A)。一方、Aβ の貪食機能を解析したところ、BMDML 細胞はミクログリアと同程度で腹腔マクロファージよりも有意に高い貪食活性を示した (Fig. 3B)。

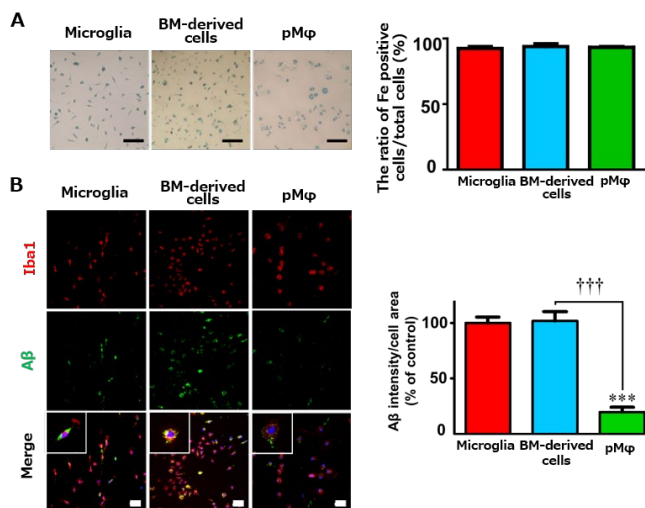


図3 骨髄由来細胞の貪食機能の解析

Scale bars: 50 μm (A), 50 μm (B), *** $P < 0.001$ vs. microglia.

(3) BMDML 細胞の脳内移植と脳内動態

次に EGFP マウス骨髄から調製した BMDML 細胞を AD モデル (APdE9) マウスの脳海馬内に直接投与 (移植) してその脳内分布を解析した (Fig. 4)。その結果、移植細胞は日数依存的に脳内での細胞間距離が広がり分散するが (Fig. 4A)、野生型マウス (wild-type) 脳内に比べ APdE9 マウス脳内においてその細胞間距離が大きく (Fig. 4D)、移植 14 日後ではその距離に有意な差が検出された (Fig. 4E)。また、移植細胞は脳内でもミクログリアマーカー (TREM2) 陽性であり (Fig. 4B)、内在性の静止型ミクログリアと同じく分岐した突起を有するラミファイド型として生着する移植細胞も検出された (Fig. 4C)。

以上の結果から、移植した骨髄由来細胞はミクログリアマーカーの発現や形態学的類似性を伴い脳に生着し、さらに脳内を拡散していくが、AD病態脳ではその移動距離が大きく、A β プラークへの指向性をもって移動する可能性が示唆された。

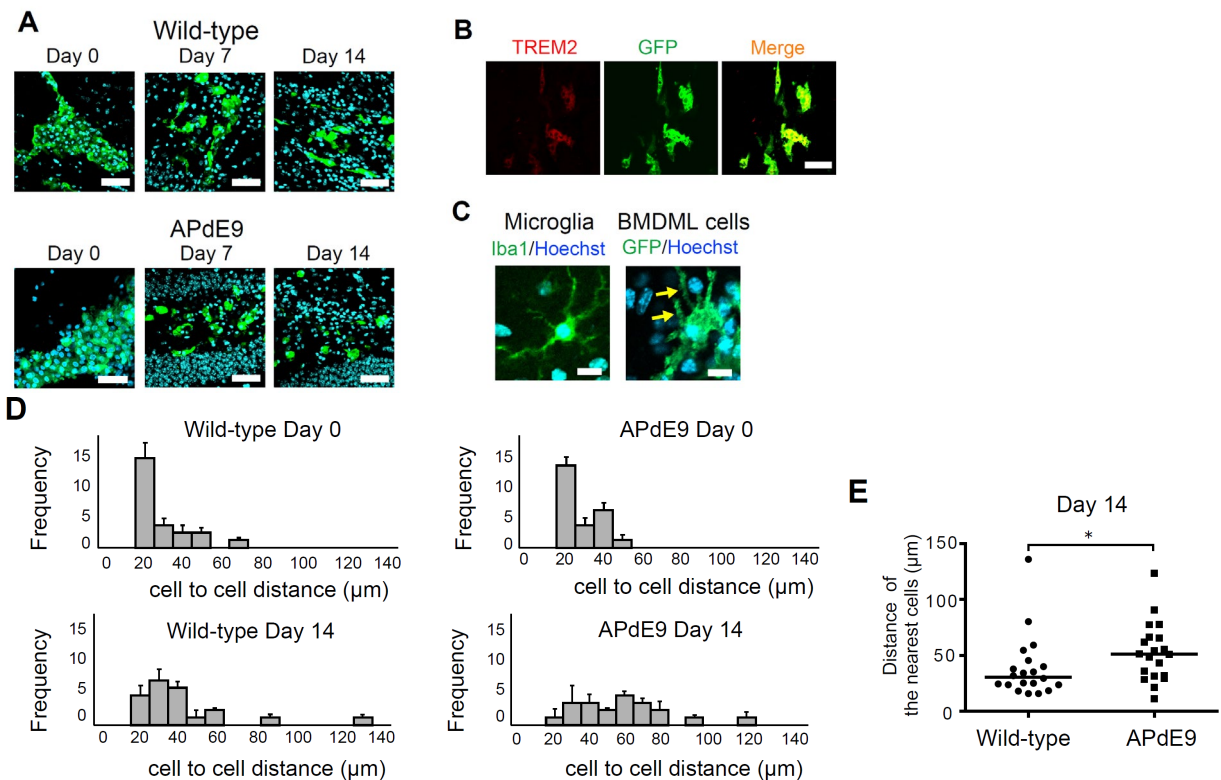


図4 BMDML細胞の脳内での生着と動態
Scale bars = 25 μ m (A-C), * P <0.05.

(4) BMDML細胞の移植後のA β プラークへの集積と除去ならびに認知機能への作用

次に、移植したBMDML細胞のA β プラークへの集積について解析したところ移植細胞とA β との共局在が認められた (Fig. 5A)。そこで無指向性に移植細胞が分散すると仮定した場合のシミュレーションと、実際の移植細胞がA β プラークに局在している確率を比較したところ、実際の移植細胞の方がその確率が高いことが分かった (Fig. 5B)。さらに、A β プラークは移植から7日後と比べ、14日後において数や面積ともに有意に減少していた (Fig. 5C)。

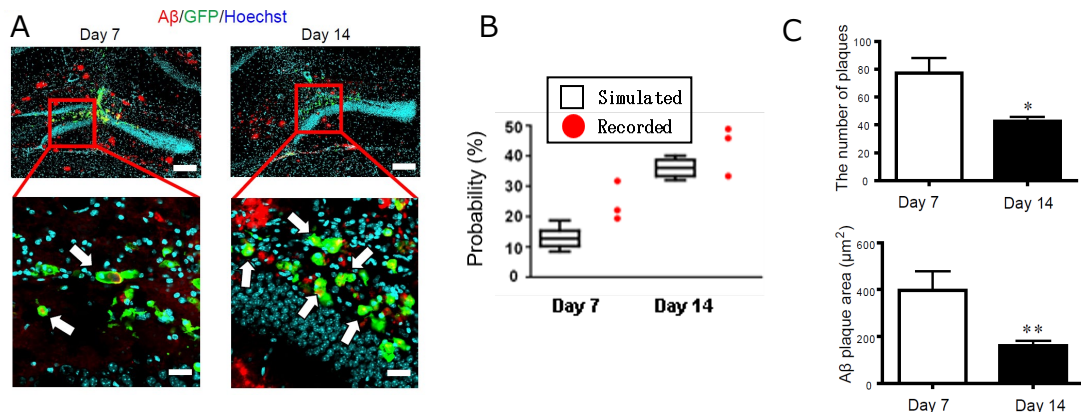


図5 BMDML細胞のA β プラークへの指向性とA β 除去

Scale bars = 200 μ m (Aの上部パネル), 25 μ m (Aの下部パネル), 矢印はA β を貪食するBMDML細胞を示す。* P <0.05.

(5) ADモデルマウスへのBMDML細胞移植による認知機能の改善

最後にAPdE9マウスへのBMDML細胞移植後、新奇物体探索試験を実施したところ、野生型と比べAPdE9マウスは細胞移植前にすでに新奇物体の認知機能に障害を示していたが、移植により日数依存的にその障害が回復した (Fig. 6A-C)。以上より、移植細胞は指向性をもってA β プラークへと集積し、A β 貪食によりその除去に働き、その結果、ADモデルマウスの認知機能障害が改善されることが明らかとなった。

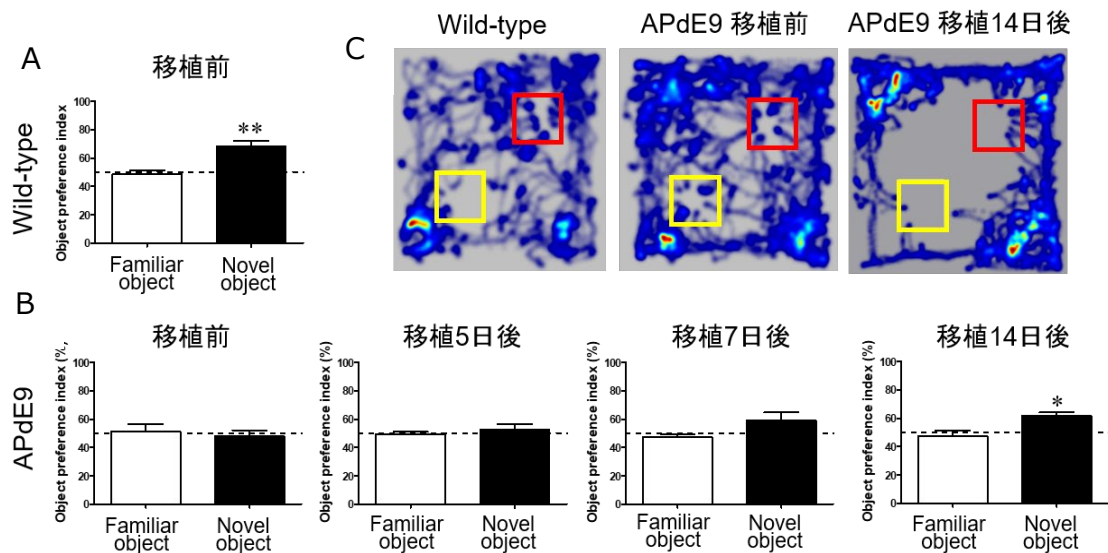


図6 BMDML細胞移植の認知機能の改善作用
* $P < 0.05$.

以上の結果より、骨髄細胞から $A\beta$ 貪食機能を有するミクログリア様の細胞が作製できることがわかり、さらにこの細胞の移植が脳内 $A\beta$ の減少や認知機能の改善に有効であることが分かった。さらに今後、BMDML細胞の末梢血中から脳実質への送達法の開発や、induced pluripotent stem (iPS)細胞や embryonic stem (ES)細胞にも適応して、これらの幹細胞から分化誘導したミクログリア様細胞を用いた解析を同様に進めることで、ADに対する新規細胞治療戦略の臨床応用への道が開かれることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ① Shohei Kawanishi, [Kazuyuki Takata](#), Shouma Itezono, Hiroko Nagayama, Sayaka Konoya, Yugo Chisaki, Yuki Toda, Susumu Nakata, Yoshitaka Yano, Yoshihisa Kitamura, and Eishi Ashihara : Bone-marrow-derived microglia-like cells ameliorate brain amyloid pathology and cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 64, 査読あり, 2018, 563-585.
DOI:10.3233/JAD-170994
- ② [Kazuyuki Takata](#), Takahide Amamiya, Hiroaki Mizoguchi, Shohei Kawanishi, Eriko Kuroda, Risa Kitamura, Aina Ito, Yuki Saito, Manami Tawa, Tomofumi Nagasawa, Haruka Okamoto, Yuko Sugino, Shigehiko Takegami, Tatsuya Kitade, Yuki Toda, William R Kem, Yoshihisa Kitamura, Shun Shimohama and Eishi Ashihara : Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-specific agonist DMXBA (GTS-21) attenuates amyloid- β accumulation through suppression of neuronal γ -secretase activity and promotion of microglial amyloid- β phagocytosis and ameliorates cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 査読あり, 62, 2018, 197-209.
DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2017.10.021
- ③ Yoshihisa Kitamura, Masatoshi Inden, Yasuto Kimoto, [Kazuyuki Takata](#), Daijiro Yanagisawa, Masanori Hijioka, Eishi Ashihara, Ikuo Tooyama, Shun Shimohama, and Hiroyoshi Ariga: Effects of a DJ-1-Binding Compound on Spatial Learning and Memory Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.*, 査読あり, 55, 2017, 67-72
DOI:10.3233/JAD-160574
- ④ Katrin I. Andreasson, Adam D. Bachstetter, Marco Colonna, Florent Ginhoux, Clive Holmes, Bruce Lamb, Gary Landreth, Daniel C. Lee, Donovan Low, Marina A. Lynch, Alon Monsonego, M. Kerry O' Banion, Milos Pekny, Till Puschmann, Niva Russek-Blum, Leslie A. Sandusky, Maj-Linda B. Selenica, [Kazuyuki Takata](#), Jessica Teeling, Terrence Town, Linda J. Van Eldik: Targeting innate immunity for neurodegenerative disorders of the central nervous system. *J. Neurochem.*, 査読あり, 138, 2016, 653-693.
DOI:10.1111/jnc.13667

〔学会発表〕（計 8 件）

- ① 高田和幸：ミクログリアの発生過程から迫る認知症治療戦略の開発、日本薬学会第 139 年会、2019
- ② 高田和幸：幹細胞由来ミクログリア様細胞を用いた認知症細胞治療戦略、第 37 回日本認知症学会学術集会、2018
- ③ 高田和幸：幹細胞由来免疫細胞を用いた認知症の治療戦略、第 61 回日本神経化学学会大会、2018
- ④ 高田和幸、黒田絵莉子、河西翔平、戸田侑紀、下濱 俊、芦原英司： γ -セクレターゼ活性およびミクログリアの食食機能を介した $\alpha 7$ ニコチン受容体特異的刺激薬 DMXBA のアミロイド β 蓄積抑制作用の解析、日本薬学会第 138 年会、2018
- ⑤ 高田和幸：認知症克服へ向けた脳の基礎研究とその展望「脳の免疫がアルツハイマー病克服のカギを握る！？」、京都産業 21・けいはんなオープンイノベーションセンター（KICK）第 13 回大学リレーセミナー、2018
- ⑥ 河西翔平、高田和幸、射手園将真、長山紘子、黒田絵莉子、戸田侑紀、芦原英司：骨髄由来アミロイド β 食食細胞の機能解析およびアルツハイマー病モデルマウスへの脳内移植、日本薬学会 第 137 年会、2017
- ⑦ 黒田絵莉子、高田和幸、河西翔平、戸田侑紀、芦原英司：マウス末梢血由来造血幹細胞からミクログリア様細胞への分化誘導とその機能解析、日本薬学会 第 137 年会、2017
- ⑧ 高田和幸：iPS 細胞を用いたアルツハイマー病細胞治療の可能性、第 21 回大文字クラブ、2017

〔図書〕（計 1 件）

- ① 濱 進，高田和幸、技術情報協会、認知症の早期診断技術と進行抑制/予防薬・機能的食品の開発、2019、518（345-355）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

該当なし

○取得状況（計 0 件）

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

ホームページ：<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/dips/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：芦原 英司、北村 佳久、下濱 俊、地寄 悠吾、戸田 侑紀、中田 晋、矢野 義孝

ローマ字氏名：Eishi Ashihara、Yoshihisa Kitamura、Shun Shimohama、Yugo Chisaki、Yuki Toda、Susumu Nakata、Yoshitaka Yano

※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。