

令和元年5月16日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19317

研究課題名(和文)豊かな環境による認知症抑制機序の解明～ヒト・マウスのアストロサイトに着目した検討

研究課題名(英文) The effectiveness of an enriched environment for preventing progression of cognitive impairment and astrogial damage

研究代表者

中野 正子 (Nakano, Masako)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：20709646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は豊かな環境(enriched environment; EE)を用いて、認知障害に対する有効性のメカニズムを検索した。EEによって、糖尿病モデルラットおよびアルツハイマー型認知症モデルマウスの認知障害が抑制され、アストロサイトの炎症も改善していた。

また我々は、札幌医科大学に献体された方の死後脳の研究も行い、脳の病理学的にはアルツハイマー型認知症の診断であるが、生前に認知症を発症しなかった症例を検索した(倫理委員会承認研究)。結果、そのような症例では、アストロサイトの機能が保たれていることが示唆された。以上から、認知症発症予防にはアストロサイトが重要であることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでアルツハイマー型認知症の治療薬は、コリンエステラーゼ阻害薬など、直接ニューロンを標的とした薬物が中心であるが、その効果は限定的であった。今回、EEやヒト死後脳の研究から、アストロサイトが認知機能維持に重要であることが分かり、今後アストロサイトを標的とした治療薬の開発や有効性が期待できる。

またEEの研究から、生き生きとしたライフスタイルが認知症予防につながることを考えられる。このことは、認知症による医療費や介護にかかる費用を抑えられるだけでなく、社会の活性化につながると思われる。

研究成果の概要(英文)： We investigated the effectiveness of an enriched environment (EE) for preventing progression of cognitive impairment. In both diabetic rats and Alzheimer's disease (AD) mice housed in an EE, cognitive impairment was significantly reduced and astrogial damage was ameliorated.

We also investigated cognitive normal human subjects with AD brain pathology who was donated to Sapporo Medical University by the body donation program. (All study methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulation of Sapporo Medical University.) In those cases, the function of astrocytes was found to be restored compared with the cases of cognitive impaired subjects with AD brain pathology.

Therefore, astrocytes might be a key factor for preventive progression of cognitive impairment.

研究分野：神経科学

キーワード：豊かな環境 認知症 アストロサイト

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

我が国の糖尿病患者は約 950 万人にのぼり、一方認知症患者は約 460 万人とも推定されている。糖尿病は認知症リスクを 2~3 倍引き上げることが知られている。研究者代表は、糖尿病モデルマウス (STZ マウス) では、神経を保護するアストロサイトが異常化していることを確認した。また STZ マウスを豊かな環境 (Enriched Environment: EE) で飼育すると、認知症発症が予防され、また脳内のアストロサイトの異常が改善していることを見出した。本研究では、EE によってなぜアストロサイトの機能が改善するかを目的とした。

一方で認知症の原因の半数以上は、アルツハイマー型認知症 (Alzheimer's disease: AD) と言われている。AD はアミロイド β ($A\beta$) やリン酸化タウの沈着が主な原因とされているが、 $A\beta$ が蓄積する以前からアストロサイトの機能が低下していることが知られている。申請者らは AD マウスも EE で飼育し、認知機能への影響や、アストロサイトの異常化が抑制されるかについても検討することとした。

またヒトの研究では、死後脳と生前の認知機能について検索した先行研究がある。脳に $A\beta$ やリン酸化タウの沈着が沈着し、病理学的には AD と診断された脳でも、生前の認知機能は保たれていた症例が報告されている。申請者は、札幌医科大学の解剖学講座に属しており、献体された方の脳および生前の認知機能を評価し、脳病理所見と生前の認知機能が乖離する原因について、アストロサイトに着目し検索することを目的とした。(札幌医科大学倫理委員会承認研究: 26-2-51)

2. 研究の目的

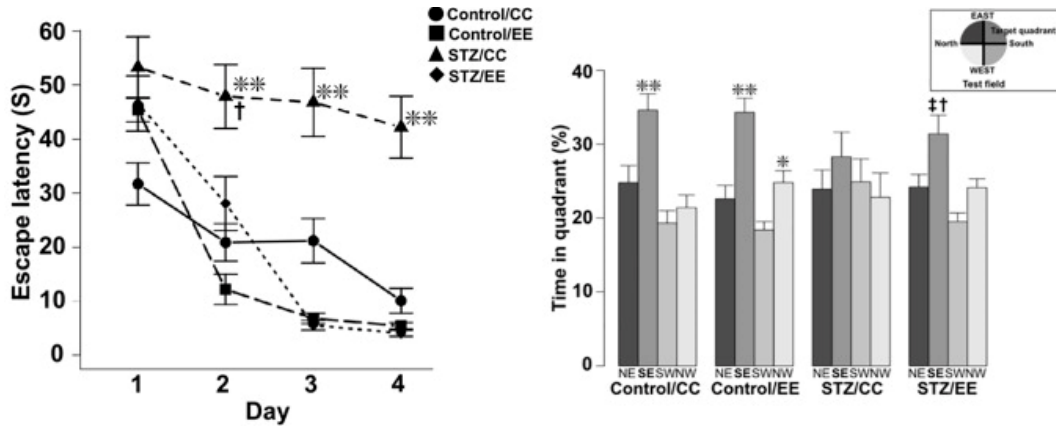
- (1) STZ ラットに対する、EE の効果 (認知機能およびアストロサイトへの影響) を検索する。
- (2) AD マウスに対する、EE の効果 (認知機能およびアストロサイトへの影響) を検索する。
- (3) 献体された方の死後脳および生前の認知機能を評価し、脳病理所見と生前の認知機能に乖離の原因を検索する。

3. 研究の方法

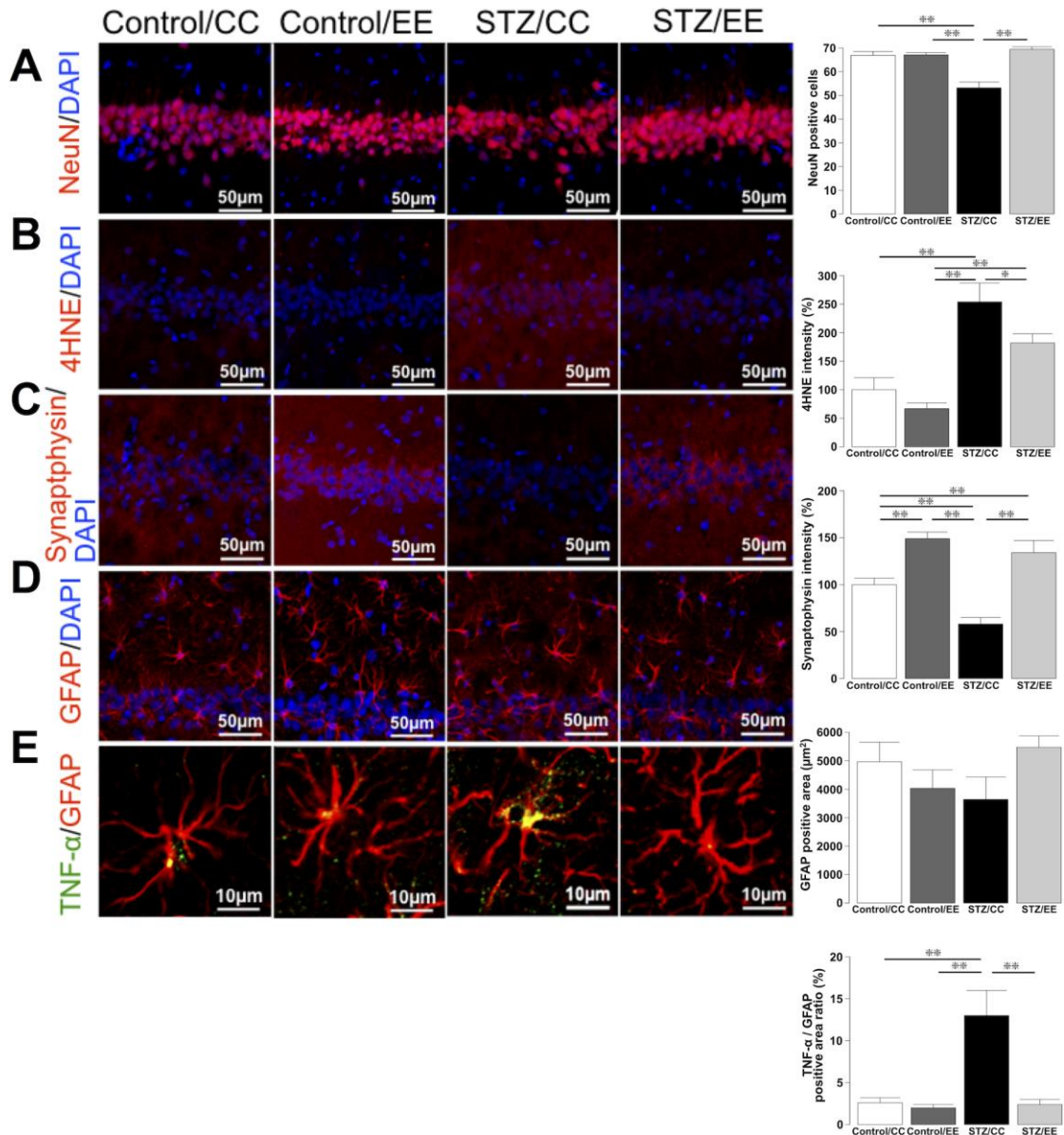
- (1) ① STZ ラットと Control ラットを、Control ケージ(CC)と EE ケージで 8 週間飼育し、認知機能を、モリス水迷路で評価する。
② モリス水迷路後、各群ラットを屠殺し、脳の組織学的検索を行う。
③ モリス水迷路後、各群ラットを屠殺し、骨髄から骨髄間葉系細胞 (Bone marrow mesenchymal stem cells: BM-MSC) を取り出し、培養する。その培養液中から、エクソソームを単離し、microRNA (miR)-146a を測定する。
④ モリス水迷路後、各群ラットを屠殺し、血液からエクソソームを単離し、miR-146a を測定する。
⑤ アストロサイトを *in vitro* で培養し、AGE を添加し、糖尿病状態を模倣したモデルを作成する。さらに、miR-146a をトランスフェクションさせ、遺伝子発現の変化を検索する。-
- (2) ① AD マウスと Control マウスを、Control ケージと EE ケージで 3 か月飼育し、認知機能を、モリス水迷路で評価する。
② モリス水迷路後、各群マウスを屠殺し、脳の組織学的検索を行う。
③ モリス水迷路後、各群マウスを屠殺し、脳の miR-146a の発現の変化を検索する。
- (3) ① 札幌医科大学に献体された方の脳を AD 病理所見と、生前の認知機能の評価を行う。
② 脳病理所見と生前の認知機能が乖離する症例と、乖離しない症例について、その組織学的な違いを検索する。

4. 研究成果

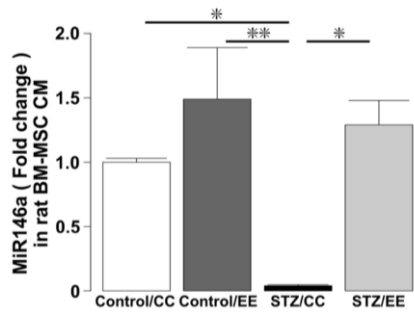
(1) ① STZ/CC ラットでは、認知機能障害がみられたのに対し、STZ/EE ラットでは認知機能障害が抑制されていた。



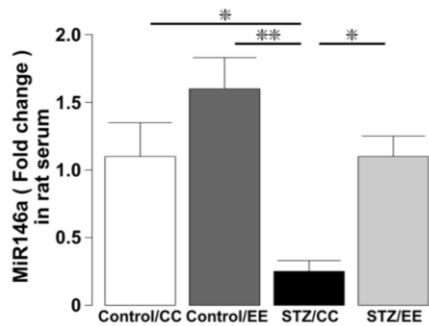
② STZ/CC ラットでは、神経細胞 (NeuN 陽性細胞) が減少、樹状突起の酸化ストレス (4HNE) の増加、シナプス密度 (Synaptophysin) の低下、アストロサイトにおける $TNF-\alpha$ 発現のがみられた。STZ/EE ラットでは、これらの変化が抑制されていた。



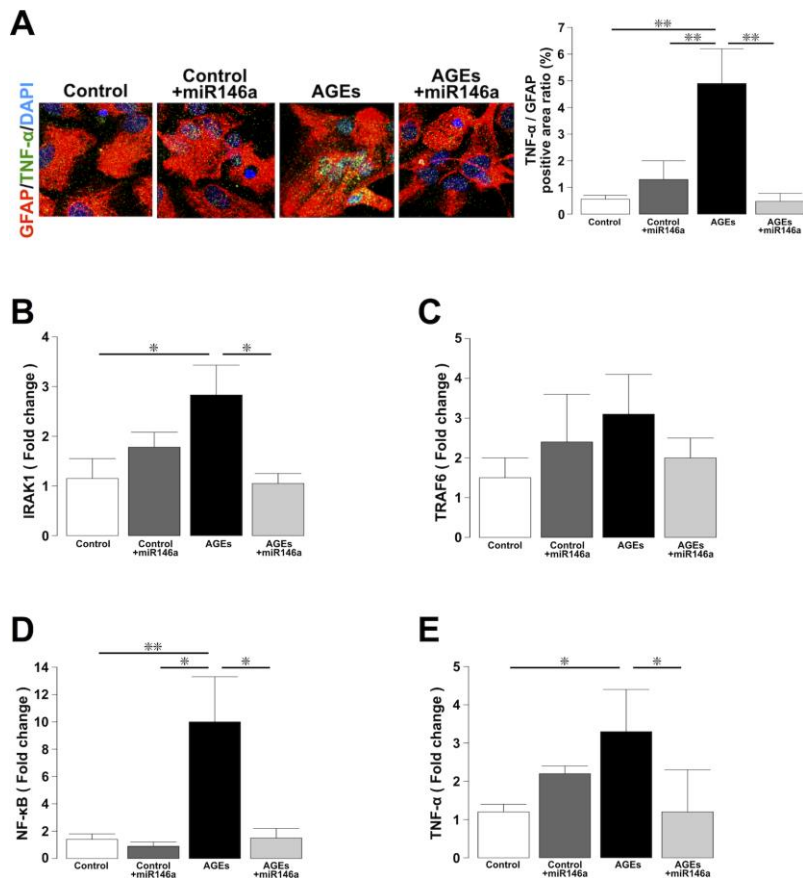
③ STZ/CC ラット由来の BM-MSC を培養したところ、培養液中エクソソーム内に含まれる miR-146a は、Control/CC および Control/EE 由来と比較し、低下していた。STZ/EE ラット由来の BM-MSC 培養液中に含まれる miR-146a では、低下がみられなかった。



④ STZ/CC ラット血清中エクソソーム内に含有される miR-146a は、Control/CC および Control/EE ラットの血清と比較し低下していた。STZ/EE ラット血清中エクソソーム内に含有される miR-146a は、その低下がみられなかった。



⑤ in vitro でアストロサイトを培養し、AGE を添加したところ、TNF- α ・NF- κ B・IRAK1 の発現が増加していたが、miR-146a をトランスフェクションしたところこれらの発現が抑制されていた。



以上から、EE によって内在性 BM-MSC から分泌されるエクソソームに含まれる miR-146a が増加し、血液中の miR-146a も増加する。さらに miR-146a がアストロサイトに取り込まれて、細胞内炎症が改善し、神経保護に作用したと考えられた。

(2) ① アルツハイマー病モデルマウス APP/PS1 マウスを用いて実験したところ、APP/PS1+CC では認知機能障害がみられたのに対し、APP/PS1+EE では認知機能障害が抑制されていた。(未発表データ)

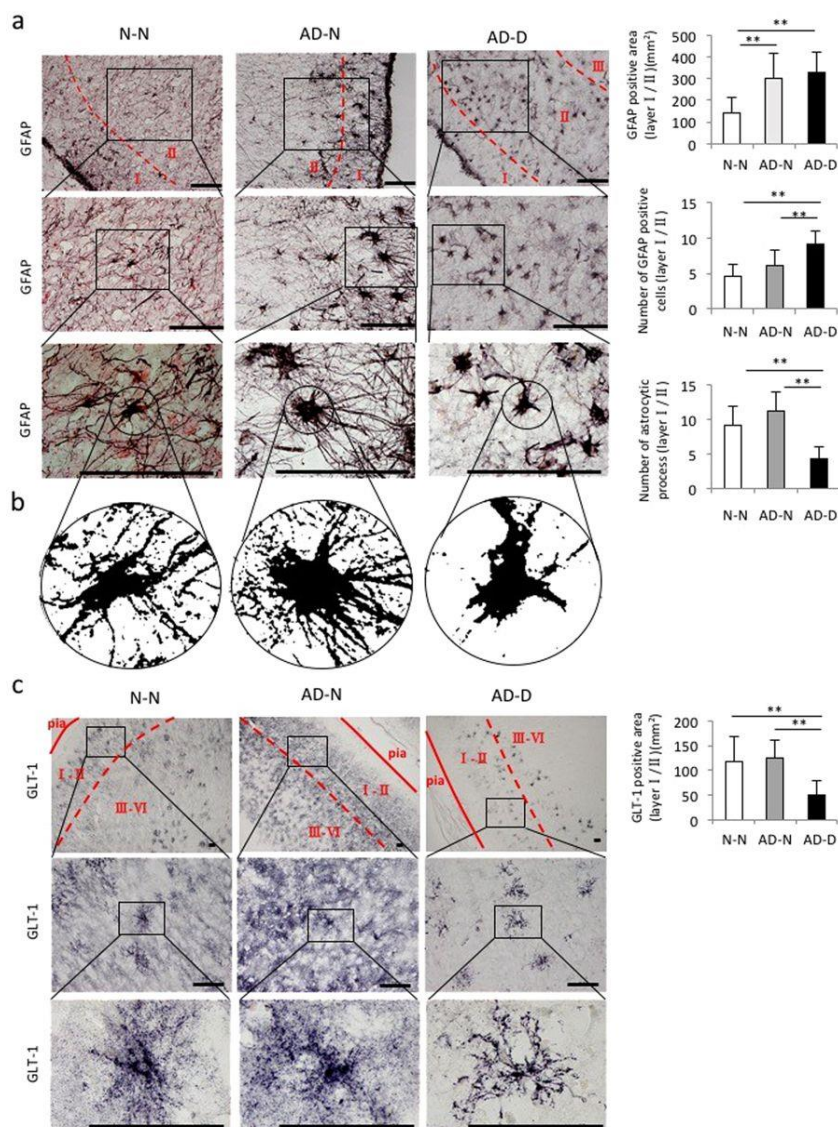
② APP/PS1+CC ではアストロサイトの TNF- α の発現が増加していたのに対し、APP/PS1+EE ではその増加が抑制されていた。(未発表データ)

③ 脳内の miR-146a の発現を調べたところ、APP/PS1+CC と APP/PS1+EE では違いがみられ、アストロサイトの TNF- α の発現と関連すると考えられた。(未発表データ)

(3) ① 47 例の症例を検討したところ、AD 病理がなく認知障害がなかった症例 (N-N: No AD neuropathological changes with no dementia) が 19 例、AD 病理があり認知障害がなかった症例 (AD-N : AD neuropathological changes with no dementia) が 10 例、AD 病理があり認知障害がみられた症例 (AD-D : AD neuropathological changes with dementia) が 18 例存在した。

② N-N に比べて、AD-N と AD-D では、海馬における A β およびタウの蓄積が顕著であった。AD-N における神経細胞数とシナプス密度は、N-N と同程度であったが、AD-D では低下していた。AD-N におけるアストロサイトの足突起の数と GLT-1 発現は、N-N と同程度であったが、AD-D では低下していた。

以上から、アストロサイトの機能が正常であれば、A β およびタウが蓄積しても神経保護作用を発揮し、認知機能が保たれることが示唆された。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Kubota K, Nakano M, Kobayashi E, Mizue Y, Chikenji T, Otani M, Nagaishi K, Fujimiya M. An enriched environment prevents diabetes-induced cognitive impairment in rats by enhancing exosomal miR-146a secretion from endogenous bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2018 Sep 21;13(9):e0204252.(査読あり)
doi: 10.1371/journal.pone.0204252.
2. Kobayashi E, Nakano M, Kubota K, Himuro N, Mizoguchi S, Chikenji T, Otani M, Mizue Y, Nagaishi K, Fujimiya M. Activated forms of astrocytes with higher GLT-1 expression are associated with cognitive normal subjects with Alzheimer pathology in human brain. *Sci Rep*. 2018 Jan 26;8(1):1712. (査読あり) doi: 10.1038/s41598-018-19442-7.
3. Nakano M, Nagaishi K, Konari N, Saito Y, Chikenji T, Mizue Y, Fujimiya M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetes-induced cognitive impairment by exosome transfer into damaged neurons and astrocytes. *Sci Rep*. 2016 Apr 22;6:24805. (査読あり) doi: 10.1038/srep24805.

[学会発表] (計 3 件)

1. Eiji Kobayashi. Activated forms of astrocytes with higher GLT-1 expression are associated with cognitive normal subjects with Alzheimer pathology in human brain. International Conference on Neurovascular and Neurodegenerative Disease, 2018 年 (招待講演)
2. 中野正子、刺激豊かな環境での飼育がアルツハイマー病モデルマウスに与える影響の解析、日本認知症学会、2017 年
3. 小林英司、アルツハイマー病理陽性で非認知症であった症例における反応性アストロサイトの解析、日本認知症学会、2017 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：小林 英司

ローマ字氏名：Kobayashi Eiji

研究協力者氏名：久保田 健太

ローマ字氏名：Kubota Kenta

※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。