

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09757

研究課題名(和文)アルツハイマー病のタウ伝播と軸索変性でのグリアの役割解明とグリアを標的とした治療

研究課題名(英文)Elucidation of the role of glial cell in tau transmission and axonal degeneration in Alzheimer's disease and targeted therapy with glial cell

研究代表者

浅井 宏英 (Asai, Hirohide)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：50510210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、エクソソームが血液脳関門を通過することから、APP-K1 アルツハイマー病(AD)モデルマウスの末梢血液からエクソソームを抽出し、ドットブロットを用いて毒性ターン構造を持つA₄₂の検出を試み成功した。このエクソソームからマイクロRNA(miRNA)を抽出し、次世代シーケンシングによりADと野生型マウスを比較したところ、アップレギュレーションされたmiRNA1つと、ダウンレギュレーションされたmiRNAの5つが判明した。これらの血液ベースのバイオマーカーは、AD治療の新たなターゲットとなるだけでなく、早期診断にもつながる可能性がある。現在、ヒトサンプルを用いて、解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞以外のアストログリア、オリゴデンドログリア由来のエクソソームも血液中に存在しており、これらのエクソソームの解析によって、軽度認知障害やアルツハイマー病の分子病態の本態が解明される。エクソソームは、血液脳関門を双方向に通過できることから、ドラッグデリバリーとしても利用することができる。また、同様の細胞特異的エクソソームが腫瘍や免疫疾患などの多くのヒト疾患の分子病態解明につながることに貢献でき、神経疾患以外にも応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Since exosomes cross the blood-brain barrier, we extracted exosomes from the peripheral blood of APP-K1 mouse models of Alzheimer's disease (AD) and attempted to detect toxic turn A₄₂ by dot blotting with success. We extracted microRNAs (miRNAs) from these exosomes and compared AD and wild-type mice by next-generation sequencing, and found that only one miRNA was up-regulated and five miRNAs were down-regulated. These potential blood-based biomarkers may lead to earlier diagnosis as well as new targets for AD treatment. Further analyses using human samples are now under way.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド タンパク ミクログリア エクソソーム マイクロRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病 (AD) 脳ではアミロイドベータ ($A\beta$) 沈着、病的タウ蓄積による軸索変性、ミクログリア・アストロサイトの活性化が必発だが、3者の関係性が不明なため根治薬が開発できていない。 $A\beta$ 蓄積 AD モデルマウスは作成されているものの病的タウ蓄積と軸索変性は再現できていない。私たちは AAV-Tau を野生型マウス嗅内皮質に定位脳手術的に注入することで局所タウ伝播モデルを樹立し、ミクログリア由来エクソソームがタウ伝播に大きく寄与することを明らかにした (Asai H et al., 2015)。

(2) また、我々は 3xTg-AD マウスモデルにおいて、毒性ターンのアミロイド β ペプチド 42 (毒性ターンの $A\beta$ 42) の蓄積が記憶障害と関連している可能性があることを報告した。AD の場合、アミロイドの形成に関与する種である $A\beta$ 40 と $A\beta$ 42 の両方がエクソソームに存在することが示されている (Rajendran et al., 2006)。また、最近の研究では、エクソソームには約 194 個の脂質、4563 個のタンパク質、1639 個のメッセンジャー RNA (mRNA)、764 個のマイクロ RNA (miRNA) が含まれていることが示されている (Mathivanan S et al., 2010) しかし、AD におけるエクソソーム miRNA の制御的役割はまだ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では AD モデルマウスにおいて、ミクログリア、アストログリアの活性化と AD の病態進行におけるエクソソーム miRNA の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

1) APP-KI (APP^{NL-G-F}) マウス

AD モデルマウスである APP-KI (APP^{NL-G-F}) マウスを用いた。6ヶ月齢の APP-KI マウスと年齢をマッチさせた野生型マウスを用いた。

2) 血清エクソソームと RNA の抽出

血清エクソソームと RNA の抽出は、exoEasy Midi Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて、製造元のプロトコールに従い、修正を加えて抽出した。

3) ドットブロッティング

毒性ターンの $A\beta$ 42 の発現は、ドットブロッティングアッセイシステム (BioRad) を用いて、毒性ターンの特異的抗体 (11A1, IBL) を用いた免疫組織化学的および免疫ブロット解析により調べた。

4) miRNA 遺伝子発現の次世代シーケンシング解析

エクソソーム中のマイクロ RNA は、Illumina HiSeq シーケンシングプラットフォームを用いて、SMARTer[®] smRNA-Seq Kit for Illumina[®] を用いて調製したシーケンシングライブラリーを用いて定量した。

5) 機能アノテーション解析

TargetScanMouse v7.1 を用いて、予測される標的遺伝子のリストを生成した。これらの大きな遺伝子リストに関連する生物学的意味を抽出するために、バイオインフォマティクスデータベース DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>, version 6.8) を使用した。

4. 研究成果

1) APP-KI マウスでは Iba-1 の発現が大幅に増加しており、ミクログリアの活性化が示唆された (図 1)。野生型マウスではアミロイドプラークの形成もミクログリアの活性化も見られなかった。活性化したミクログリア細胞は、毒性ターンの $A\beta$ 42 プラークの近傍に集積していた (図 2)。

2) 特に、毒性ターンの $A\beta$ 42 プラークの周辺では、resident ミクログリアの活性化が観察された (図 3)。また、アストログリアも活性化され、特に A1 アストログリアの活性化が確認された。

3) ドットブロッティングの結果、APP-KI マウスでは血清エクソソームに毒性ターンの $A\beta$ 42 が含まれていることが確認された (図 4)。

4) 次世代シーケンシング解析の結果、APP-KI マウスと野生型マウスでは miRNA の発現プロファイルが異なることが明らかになった (図 5)。最も有意にダウンレギュレーションされた miRNA は、 $A\beta$ に応答して減少することが報告されている miRNA の一つであった。さらに、この miRNA は細胞周期に関連していた (図 6)。

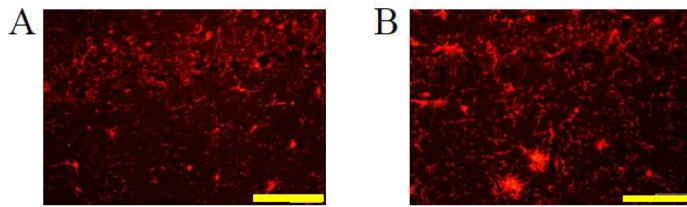


Fig. 1) Microglial staining with Iba1.
A: Wildtype, B: APP-KI Scale bars = 100 μ m

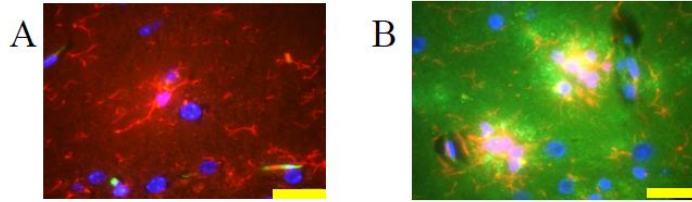


Fig. 2) Double-staining for Iba1 (red) and 11A1 (green) with DAPI (blue).
A: Wildtype, B: APP-KI Scale bars = 20 μ m

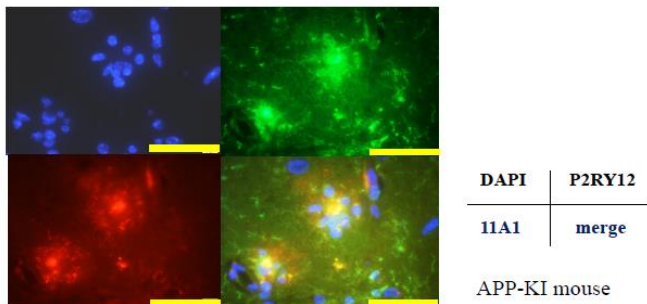


Fig. 3) Double-staining for P2RY12 (red) and 11A1 (green) with DAPI (blue).
Scale bars = 50 μ m



Wildtype APP-KI

Fig. 4) Dot blotting assay of toxic turn A β .

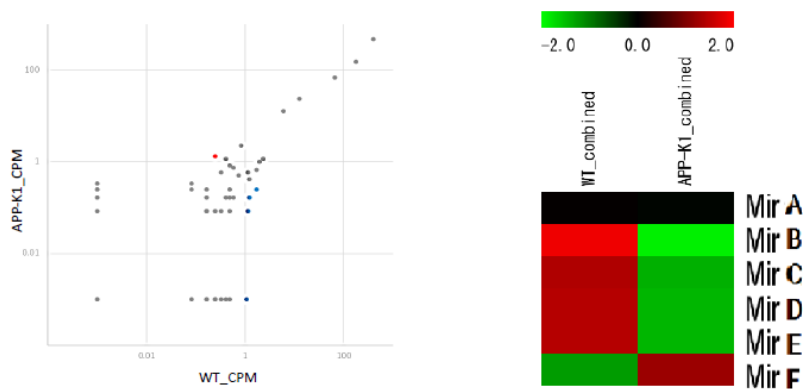


Fig. 5) Profiling of the miRNA expression in APP-KI and wildtype mouse exosomes.

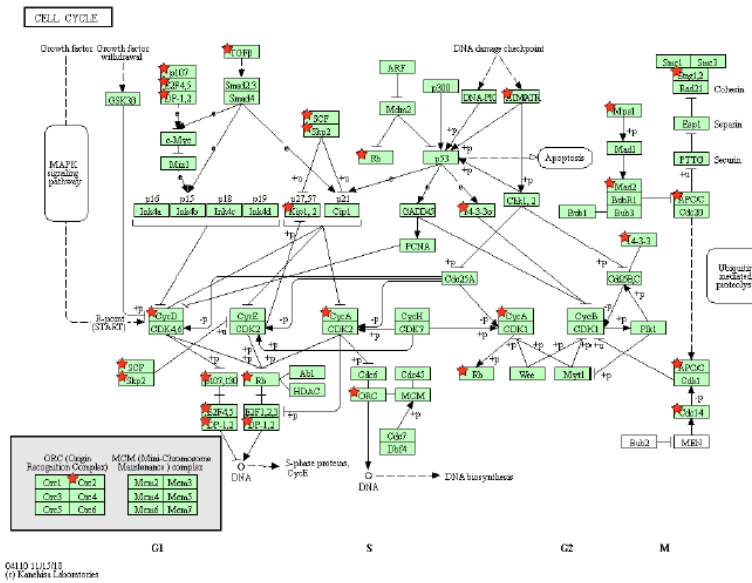


Fig. 6) The results of an enrichment analysis using the bioinformatics database DAVID.

本研究の知見は、i) 毒性タンパク質 Aβ 42 がエクソソームを介して細胞外空間に放出されている可能性、ii) エクソソームに含まれる miRNA が細胞間コミュニケーションに関与している可能性を示唆している。また、最近では、炎症性ミクログリアがミクログリアから分泌されたエクソソームは、受容体のニューロンにおけるシナプスタンパク質のレベルを調節することが可能な miRNA に富む細胞外小胞を放出する。ミクログリアから分泌されたエクソソームは、毒性タンパク質 Aβ 42 の伝播や疾患の進行を促進し、神経細胞の機能障害にも関連している可能性がある。今回は全血から抽出したエクソソームを用いたが、今後はミクログリア、アストログリア、神経細胞由来のエクソソームを区別して抽出し、さらなる解析を行い、その相互作用を検証していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Imamura Tomohiro, Yanagihara Yuki T., Ohyagi Yasumasa, Nakamura Norimichi, Inuma Kyoko M., Yamasaki Ryo, Asai Hirohide, Maeda Masahiro, Murakami Kazuma, Irie Kazuhiro, Kira Jun-ichi	4. 巻 137
2. 論文標題 Insulin deficiency promotes formation of toxic amyloid-42 conformer co-aggregating with hyper-phosphorylated tau oligomer in an Alzheimer's disease model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 104739 ~ 104739
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2020.104739	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今村友裕、浅井宏英、山崎亮、吉良潤一
2. 発表標題 Association CD33 expression on microglia with toxic turn amyloid beta peptide 42 in APP-K1 mice
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村友裕、浅井宏英、山崎亮、吉良潤一
2. 発表標題 Possible regulatory roles of miRNAs in APPKI AD model mice
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術大会
4. 発表年 2019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	山口 浩雄 (Yamaguchi Hiroo) (00701830)	九州大学・大学病院・特任講師 (17102)	

