

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16388

研究課題名(和文)アルツハイマー病における脳内酸化ストレス動態の解明と骨髄間葉系幹細胞治療の確立

研究課題名(英文) Analysis of oxidative stress in the brain in Alzheimer's disease model mice and establishment of bone marrow mesenchymal stem cell therapy

研究代表者

横川 和樹 (Yokokawa, Kazuki)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：30781273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)治療は、神経の保護作用や免疫調整作用をはじめとする様々な機序から、酸化ストレスを標的としたアルツハイマー病(AD)新規治療法としての可能性がある。本研究では、ADモデルマウスに対するMSC治療の効果と治療メカニズムを明らかにすることを目的とした。ADモデルマウスに対するMSC移植治療は、ミクログリアによるアミロイド 蛋白質(A β)の取り込みを促進させることによって脳A β 病理を改善させる効果があり、空間記憶脳を改善させることが示された。このメカニズムにはMSC移植による脳内酸化ストレス状態の改善が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

札幌医科大学が中心となつてすでに脳梗塞や脊髄損傷などの分野で自己骨髄間葉系幹細胞の経静脈的移植の臨床応用が開始されている。本研究ではアルツハイマー病に対する間葉系幹細胞による治療メカニズムの一端を明らかにすることができたと考えられ、将来のアルツハイマー病に対する病態抑制治療としての可能性を広げることができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSC) has a therapeutic potential for Alzheimer's disease (AD) targeting various mechanisms including neuroprotective, immunomodulatory, and antioxidant action. The purpose of this study is to clarify the effect and treatment mechanism of MSC treatment on AD model mice. Transplantation of MSC ameliorated amyloid beta pathology in AD model mice through modifying amyloid beta clearance by microglia and improving the unbalanced redox status of the AD model mouse brain, thereby improving cognitive function.

研究分野：神経内科

キーワード：間葉系幹細胞 アルツハイマー病 認知症 酸化ストレス ミクログリア アミロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)は進行性の認知機能障害を呈する神経変性疾患であり、重要な病理学的特徴の一つとして神経細胞外の老人斑を構成しているアミロイド蛋白(A β)の凝集が挙げられる。A β が神経毒性を発揮するメカニズムの一つとして、フリーラジカルの産生による酸化ストレスの関与が知られている。また、AD患者脳では病理学的変化が軽度であるごく早い病期から神経細胞内の酸化ストレスマーカーの上昇がみられることも知られている。

間葉系幹細胞(MSC)はADをはじめとする神経変性疾患に対する細胞治療のソースとしての有用性についての報告が近年増えている。我々は既報告において、パーキンソン病モデルラットに対しMSCを経静脈的に移植することにより神経炎症を抑制し病態を改善させることを示した。すでにADモデル動物に対してもMSCの有用性について報告が散見されるが、その治療メカニズムについての詳細は明らかにされていない。

札幌医科大学では基礎研究のみならず臨床治験などで骨髄MSCの経静脈的移植が神経再生医療に有用であると報告しており、MSC治療の設備や安全性が確立していることから、本研究の成果によりMSCの治療メカニズムを明らかにすることができれば、ADへの応用実現性が広がると考えた。

2. 研究の目的

本研究はMSC移植がADモデル動物におけるA β 病理や空間認知機能に及ぼす影響を検討することを目的とした。また、生体内の酸化ストレスを可視化するイメージング技術を用いてADモデル動物脳の酸化ストレス状態の変化を検討し、ミクログリアの形態・機能解析を行うことにより、MSC移植の治療メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、ADモデル動物としてAPP^{swe}/PS1^{dE9}ヘテロ変異(APdE9)マウスを用いた。SDラット骨髄から分離培養したMSC 3×10^5 個を7.5ヶ月齢のAPdE9マウスに単回経静脈的に移植した。移植から1ヶ月(8.5ヶ月齢)時点で行動学的評価としてモリス水迷路試験を行った。移植から1.5ヶ月(9ヶ月齢)時点でレドックス感受性プローブを経静脈的投与し電子スピン共鳴(EPR)の画像技術を用いて生体内の酸化還元状態を測定する*in vivo* EPRイメージングを行なった。イメージング実験終了後にマウスの脳サンプルを取り出し、各種免疫組織学的検討、生化学的検討を行なった。

また、移植後のMSCがAPdE9マウスの脳内に生着するかどうかを確認するため、GFPラットの骨髄から分離培養したMSC 3×10^5 個をAPdE9マウスに単回経静脈的に移植し、移植翌日のAPdE9マウスの脳や肺などの組織標本を作成し免疫組織学的に検討した。

培養系のミクログリアによるA β 貪食モデルとして、マウスミクログリア系の株細胞であるMG6細胞を用いた。MG6細胞とラット骨髄MSCを共培養する処置、またはMG6細胞にラット骨髄MSCの培養上清を添加する処置を行なった。処置の有無によるA β 取り込み能の変化をELISA法やフローサイトメトリー法によって検討した。

4. 研究成果

MSC移植を行なったAPdE9マウスはSham処置を行なったAPdE9マウスに比較して空間記憶能が改善していた。*in vivo* EPRイメージングでは、MSC移植を行なったAPdE9マウス脳の酸化ストレス状態はSham処置を行なったAPdE9マウスのそれに比較して改善していた。MSC移植は、病理組織学的にAPdE9マウス脳の海馬や大脳皮質におけるA β 沈着を抑制し、マウス脳の生化学的解析では特に可溶性A β の量を減少させた。A β はROSの産生に密接に関わることが知られており、本研究の結果によりMSC移植はAPdE9マウス脳における可溶性A β 量を減少させ、その結果として脳内酸化ストレスを軽減させ行動学的にも改善が得られることが示唆された。

次に、MSC移植がA β を減少させるメカニズムについてミクログリア機能に着目し検討した。MSC移植を行なったAPdE9マウス脳では病理組織学的にA β 沈着周囲により多くのミクログリアが集積する様子が観察され、細胞体内にA β を取り込むミクログリアの割合が増加していた。ミクログリアによるA β の取り込みに重要な役割を果たすCD14が陽性であるミクログリアの割合もMSC移植によって増加していることがわかった。培養系のMG6細胞を使った検討においても、MSCとの共培養処置はCD14の発現を増加させることによってA β の取り込み能を促進させることが示された。またそのA β 取り込み能を促進させる効果は、MSCが放出する何らかの蛋白成分がもたらすことが示された。

なお、GFP発現ラットより分離したMSCを移植した実験では、移植したMSCの脳実質内への生着は認められなかった。よって、MSCの脳内への以降や生着は治療効果の発揮には必須ではないことが示唆された。

結論として、AD モデルマウスに対する MSC 移植治療は、ミクログリアの A β 取り込み能を促進させることによって脳内 A β 病理を改善させる効果があり、AD モデルマウスの行動障害を改善させることが示された。このメカニズムには MSC 移植による脳内酸化ストレス状態の改善が関与していることが示唆された。

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 Yokokawa Kazuki, Iwahara Naotoshi, Hisahara Shin, Emoto Miho C., Saito Taro, Suzuki Hiromi, Manabe Tatsuo, Matsumura Akihiro, Matsushita Takashi, Suzuki Syuuichirou, Kawamata Jun, Sato-Akaba Hideo, Fujii Hirotada G., Shimohama Shun | 4. 巻 72 |
| 2. 論文標題 Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves Amyloid- Pathology by Modifying Microglial Function and Suppressing Oxidative Stress | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease | 6. 最初と最後の頁 867 ~ 884 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-190817 | 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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuki Yokokawa, Naotoshi Iwahara, Miho C. Emoto, Shin Hisahara, Naoki Gamou, Taro Saito, Mai Fujikura, Tatsuo Manabe, Takashi Matsushita, Akihiro Matsumura, Syuuichirou Suzuki, Jun Kawamata, Hirotada G. Fujii, Shun Shimohama |
| 2. 発表標題 Rat Bone Marrow-derived MSC Improve Oxidative Stress in Alzheimer 's Disease Mouse Model. |
| 3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 横川和樹, 下濱俊 |
| 2. 発表標題 シンポジウム「認知症と再生医療」 間葉系幹細胞によるアルツハイマー病の治療 モデルマウスでの検討を通じて |
| 3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 横川和樹, 岩原直敏, 江本美穂, 久原真, 蒲生直希, 齋藤太郎, 藤倉舞, 眞部建郎, 鈴木紘美, 松下隆司, 松村晃寛, 鈴木秀一郎, 川又純, 藤井博匡, 下濱俊 |
| 2. 発表標題 アルツハイマー病モデルマウスにおける骨髄間葉系幹細胞治療のメカニズム検討 |
| 3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuki Yokokawa, Naotoshi Iwahara, Miho C. Emoto, Shin Hisahara, Taro Saito, Mai Fujikura, Tatsuo Manabe, Takashi Matsushita, Akihiro Matsumura, Syuuichirou Suzuki, Jun Kawamata, Hirotda G. Fujii, Shun Shimohama |
| 2. 発表標題 Rat Bone Marrow-derived MSCs Attenuate Oxidative Stress and Neuroinflammation in APP/PS1 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 Kazuki Yokokawa, Naotoshi Iwahara, Miho C. Emoto, Shin Hisahara, Taro Saito, Mai Fujikura, Tatsuo Manabe, Hiromi Suzuki, Takashi Matsushita, Akihiro Matsumura, Syuuichirou Suzuki, Jun Kawamata, Hirotda G. Fujii, and Shun Shimohama |
| 2. 発表標題 Transplantation of Rat Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells Regulates Oxidative Stress in Alzheimer ' s Disease Transgenic Mouse Model. |
| 3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 横川和樹, 岩原直敏, 江本美穂, 久原真, 齋藤太郎, 藤倉舞, 眞部建郎, 鈴木紘美, 松下隆司, 松村晃寛, 鈴木秀一郎, 川又純, 藤井博匡, 下濱俊 |
| 2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞によるアルツハイマー病治療における脳内酸化ストレス動態の検討 |
| 3. 学会等名 第36回日本認知症学会学術集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kazuki Yokokawa, Naotoshi Iwahara, Miho C. Emoto, Shin Hisahara, Naoki Gamou, Taro Saito, Mai Fujikura, Tatsuo Manabe, Takashi Matsushita, Akihiro Matsumura, Syuuichirou Suzuki, Jun Kawamata, Hirotda G. Fujii, and Shun Shimohama |
| 2. 発表標題 Rat Bone Marrow-derived MSC Improve Oxidative Stress in Alzheimer ' s Disease Mouse Model. |
| 3. 学会等名 第58回日本神経学会学術大会 |
| 4. 発表年 2018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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|