

平成21年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006 ～ 2008  
 課題番号：18500276  
 研究課題名（和文） ミクログリアは有益か有害か：剖検脳と認知症モデル動物脳の神経病理学的研究  
 研究課題名（英文） Neuropathological study of microglia in autopsied brains and transgenic model dementia disorders.  
 研究代表者  
 佐々木 惇 （SASAKI ATSUSHI）  
 群馬大学・大学院医学系研究科・准教授  
 研究者番号：80225862

研究成果の概要：我々はヒト認知症剖検脳とアミロイドβ蛋白（A $\cdot$ ）ないしリン酸化 tau の transgenic (TG) mice を主な研究対象として、ミクログリアの変化を病理学的に検索し、その機能・役割を検討した。その結果、ミクログリアはA $\cdot$ とリン酸化 tau の沈着と相関して活性化され、その活性化はA $\cdot$ 沈着後に明瞭となり、その処理・清掃に関与する生体防御機能が示唆された。さらに、活性化は、モデルマウス脳よりもヒト認知症脳でより強く、今後の実験解析で注意する必要性が示された。

交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2006年度 | 1,600,000 | 0       | 1,600,000 |
| 2007年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2008年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,500,000 | 570,000 | 4,070,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：ミクログリア、神経病理学、認知症、トランスジェニックマウス、アルツハイマー病、タウオパチー、脳腫瘍、

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)に代表される神経変性疾患は中年以降、進行性に障害され、根本的な治療法はいまだに見出されていない。特に認知症の多くを占めるADは本邦でも加齢とともに増加し、有効な治療法や予防法の開発が急がれている。近年のβアミロイド免疫療法の検討からは、安全で効率良く、ミクログリアを活性化し、アミロイドを貪食処理する方法の開発がAD治療で期待されている。一方、代表的脳腫瘍である神経膠芽腫は現在の治療法でも5生率

は数%である。ミクログリアは本来、脳の修復を担当し、貪食・清掃だけでなく、神経保護因子を産生すると考えられてきたが、近年の研究から、変性・炎症・腫瘍・虚血疾患においては神経障害因子や基質分解酵素を産生し、疾患の発症や増悪に関与する可能性が主に *in vitro* の実験結果から示唆されてきた。

## 2. 研究の目的

本研究の主目的は、以下の4点である。1) 痴呆疾患、神経変性疾患、脳腫瘍などのヒト剖

検・生検脳において、ミクログリアの形態学的変化・活性化、サイトカイン・ケモカイン、神経保護因子ならびに神経障害因子の発現を明らかにする、2) 痴呆・変性モデル TG マウスにおけるミクログリア活性化と A $\cdot$ ないしリン酸化 tau 沈着との関係を経時的に解明すること、3) 上記1)と2)の結果よりヒト疾患とモデルマウスとの相同性と相違点を明らかにすること、4) 各種神経疾患脳とモデル動物マウス脳において、脳病変でのミクログリア由来因子の発現と他の細胞の変化（神経細胞減少、アストロサイトの反応）を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト神経疾患剖検脳での検討：群馬大学医学部附属病院および関連病院でなど剖検された脳のホルマリン固定パラフィン包埋組織と凍結組織を用いた。検索対象は、AD、PD、multiple sclerosis (MS)などの神経疾患である。コントロールとして age-matched の非神経疾患患者脳を用いた。

(2) TG マウスでの検討：AD や前頭側頭痴呆症のモデル動物である APP TG mice (Tg2576)、Tau TG mice (P301L)、alpha-synuclein (aSYN) TG mice を使用した。Tg2576 は月齢 5~21 ヶ月、P301L は月齢 17~27 ヶ月で、age-matched の Wild type (Wt) mice をコントロールとした。

(3) ヒト脳腫瘍組織での検討：群馬大学医学部附属病院および関連病院で生検された脳腫瘍のホルマリン固定組織と凍結組織を用いた。これらの材料は、すべて倫理委員会で承認されたものである。検索対象の組織型は、astrocytic tumor (WHO grade I-IV) および malignant lymphoma。

(4) 免疫組織化学的検索：静止型および活性化ミクログリアのマーカーとして、ヒトでは、Iba-1、GLUT5、MHC class II、scavenger receptor A (SRA) 抗体を、マウスでは、F4/80、Mac-1 モノクローナル抗体、Ia 抗原、MSR-A、CD45 抗原に対するモノクローナル抗体を用いた。ミクログリア産生因子の中、神経障害因子とされる IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、iNOS、グルタミン酸、キノリン酸および神経保護・栄養因子とされる BDNF、IL-6、bFGF、TGF $\beta$  1、GDNF それぞれの特異抗体を検討した。パラフィン切片、凍結切片において、酵素抗体法を、一部の症例で蛍光抗体法二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。

(5) 遺伝子発現解析：Tg2576 マウス凍結脳組織より DNA 抽出し、DNA マイクロアレイにて各腫瘍型におけるミクログリア/マクロファージ関連遺伝子の発現パターンを解析した。

(6) Western immunoblot assay：腫瘍細胞・組織より蛋白を抽出、SDS 電気泳動後、特異蛋白抗体を用いた blotting を行った。

### 4. 研究成果

ヒトタウオパチー脳において、ミクログリアの病態を免疫組織化学および電子顕微鏡により検討した結果、ミクログリアの活性化はリン酸化 tau 沈着と相関することが示された。

ヒト $\alpha$ シヌクレイノパチー脳組織の病理学的検討では、ミクログリア活性化の程度は様々であり、病変部灰白質では SRA や神経障害性因子 (iNOS) を発現する活性化ミクログリアが神経細胞死と関連して出現することが示された。

ヒトの二次性進行性 MS の剖検材料を用いて、ミクログリアとアストロサイトのケモカインとその受容体発現を検討した。その結果、ミクログリアはケモカインを発現せず、受容体である CCR-2、CXCR3 を発現すること、アストロサイトから産生されたケモカインによって病変部に誘導されたミクログリアは MMP-9 などの神経障害因子を分泌し、脱髄や軸索障害を引き起こすことが示唆された。MS 病巣の周辺部では有害なミクログリアが存在し、その遊走・活性化はケモカインで制御されていると考えられた。

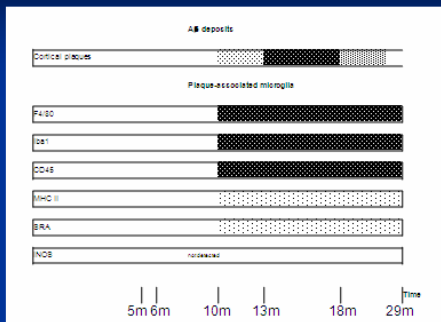
ヒトの脳原発リンパ腫の腫瘍組織では、活性化ミクログリア/マクロファージがアポトーシスの食食・処理に関与することが見いだされ、ミクログリアの有益性が示唆された。さらに、ミクログリアマーカーの一つであるグルコーストランスポーター-5 (GLUT5) がリンパ腫腫瘍細胞にも発現することを病理学的に提示した。培養リンパ腫細胞の Western blotting においても GLUT5 発現が確認された。

脳 A $\cdot$ 沈着を再現する Tg2576 マウスを用いて、ミクログリアの活性化状態を検討した結果、Tg2576 マウスにおけるミクログリアの活性化は、A $\beta$  沈着部位の周囲に限局してみられ、A $\beta$  沈着後に明瞭となることが示された (図 1)。以上の結果から、ミクログリアのアミロイド清掃機能が示唆された。

Tg2576 マウスの遺伝子発現を DNA マイクロアレイで検索したところ、検索した 2 セットサンプルに共通して、2 倍以上の発現変動を示した遺伝子は、39 個 (増加)、13 個 (減少) であった。免疫組織化学的に検索したミクログリア由来分子で、2 倍以上の発現増加を示したものは無かった。

変異 tau P301L を有する tau を過剰発現する TG マウスにおいて、ミクログリアの病態を免疫組織化学および電子顕微鏡により検討した結果では、ミクログリアの活性化は tau 沈着と相関すること、そして、P301LTG マウスのミクログリア活性化は、ヒトタウオパチーのミクログリアと比較して class II 抗原と SRA の発現が弱いことが示された。今回の結果からヒトとマウスのミクログリア活性化の違いが明らかとなった。

図1 Representation of the temporal pattern of pathology in TG2576 TG mice



Tg2576TG マウス(月齢 5~21 ヶ月)、P301L TG マウス(月齢 17~27 ヶ月)を対象とし、病理学的検索を行ったところ、ミクログリアの活性化は、組織学的に、A・沈着後に明瞭となり、リン酸化 tau よりも A・とより強く関連していることが示された。

aSYN TGでは神経細胞内・核内封入体を示した。このaSYN TGマウスは封入体形成前に2.5カ月の時点から運動障害を認めることから、aSYN蓄積の途中段階でシナプスの機能不全を来たすものと思われる。生体内でのtau蓄積、アミロイド沈着の形成過程におけるaSYNの関与の可能性が高いものと考え、ミクログリア関与を含めて今後の更なる検討を要すると考える。

その他、ラット初代培養ミクログリア細胞に電波照射実験を行い、ミクログリアの形態的及び機能的変化を評価した。その結果、携帯電話電波がミクログリアを活性化する可能性は極めて低いと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Ikeda M, Sasaki A, Shoji M (他 14 名、1-4-17 番目)、Motor impairment ameliorated by L-DOPA administration in human alpha-synuclein A30P+A53T transgenic mice with alpha-synuclein pathology, *Brain Research*, 1250 巻、232-241、2009、査読有
- ② Sasaki A, Ikeda M, Shoji M (他 7 名、1-5-9 番目)、Microglial activation in brain lesions with tau deposits: comparison of human tauopathies and tau transgenic mice TgTau<sup>P301L</sup>, *Brain Research*, 1214 巻、159-168、2008、査読有
- ③ Tanaka Y, Sasaki A (他 2 名、2 番目)、

Diversity of glial cell components in pilocytic astrocytoma, *Neuropathology*, 28 巻、399-407、2008、査読有

- ④ Kurata T, Ikeda M, Shoji M (他 13 名、9-15 番目)、Enhanced accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in double transgenic mice expressing mutant beta-amyloid precursor protein and presenilin-1, *Journal of Neuroscience Research*, 85 巻、2246-2252、2008、査読有
- ⑤ 佐々木 博、病理診断に役立つグリア細胞のマーカー、*病理と臨床*、25 巻、1014-1020、2007、査読無
- ⑥ Harigaya Y, Ikeda M, Sasaki A, Shoji M (他 6 名、3-4-10 番目)、Type-specific evolution of amyloid plaque and angiopathy in APPsw mice, *Neuroscience Letter*, 395 巻、37-41、2006、査読有
- ⑦ Samura E, Shoji M, Sasaki A, Ikeda M (他 11 名、2-4-9 番目)、Enhanced accumulation of tau in doubly transgenic mice expressing mutant APP and presenilin-1, *Brain Research*, 1094 巻、192-199、2006、査読有
- ⑧ Tanuma N, Sakuma H, Sasaki A (他 1 名、3 番目)、Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis, *Acta Neuropathologica*, 112 巻、195-204、2006、査読有
- ⑨ Murakami T, Ikeda M, Sasaki A, Shoji M (他 22 名、4-8-26 番目)、Cortical neuronal and glial pathology in TgTauP301L transgenic mice: Neuronal degeneration, memory disturbance, and phenotypic variation, *American Journal of Pathology*, 169 巻、1365-1376、2006、査読有
- ⑩ Sasaki A, Shoji M, Ikeda M (他 3 名、1-2-4 番目)、Microglial response in alpha-synucleinopathies, *Neuropathology (proceedings)*, 26 巻、A7、2006、査読無

[学会発表] (計 10 件)

- ① Yu K, Sasaki Aら、Microglial density in astrocytic and oligodendroglial tumours, Annual meeting of the British Neuro-oncology society, 2008. 6. 25、Preston, UK
- ② Sekijima M, Sasaki Aら、Morphological and functional analysis of radiofrequency field-exposed

- microglial cells *in vitro*, BEMS 30<sup>th</sup> annual meeting, 2008. 6. 8, San Diego
- ③ 佐々木 惇ら、アミロイドβ蛋白、リン酸化タウ沈着とミクログリア活性化：トランスジェニックマウスを用いた病理学的検討、第 97 回日本病理学会総会、2008. 5. 16、金沢
  - ④ Ikeda M, Sasaki A, Shoji Mら、Analysis of phosphorylation of tau in transgenic mice overexpressing GSK-3b、Neuroscience 2007、2007. 11. 17、San Diego
  - ⑤ Ikeda M, Sasaki A, Shoji Mら、Analysis of transgenic mice overexpressing mutant tau and GSK-3b、第 26 回日本認知症学会、2007. 10. 15、大阪
  - ⑥ 佐々木 惇、東海林 幹夫、池田 将樹ら、Tg2576 トランスジェニックマウスにおけるミクログリア活性化状態について、第 48 回日本神経病理学会、2007. 6. 1、東京
  - ⑦ 佐々木 惇ら、脳原発悪性リンパ腫におけるミクログリアマーカーの発現：解析と意義について、第 25 回日本脳腫瘍病理学会、2007. 4. 20、熊本
  - ⑧ Sasaki A, Shoji M, Ikeda Mら、Microglial activation in human tauopathies and transgenic mice models、16<sup>th</sup> International Congress of Neuropathology、2006. 9. 12、San Francisco
  - ⑨ 佐々木 惇、東海林 幹夫、池田 将樹ら、αシヌクレイノパチーにおけるミクログリアの病態について、第 47 回日本神経病理学会、2006. 5. 24、岡山
  - ⑩ 田中 優子、佐々木 惇ら、Pilocytic astrocytomaを構成する細胞の多様性について、第 47 回日本神経病理学会、2006. 5. 24、岡山

○取得状況 (計 1 件)

- ①名称：パーキンソン病モデルトランスジェニックマウス  
発明者：池田 将樹、山田 秀一、東海林 幹夫  
権利者：池田 将樹、山田 秀一、東海林 幹夫  
種類：特許  
番号：第 4174212 号  
取得年月日：平成 20 年 8 月 22 日  
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 惇 (SASAKI ATSUSHI)  
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：80225862

(2) 研究分担者

東海林 幹夫 (SHOJI MIKIO)  
弘前大学・医学部・教授  
研究者番号：60171021

(東海林は 2008 年度は連携研究者)

池田 将樹 (IKEDA MASAKI)  
群馬大学・医学部・講師  
研究者番号：50222899