

令和 3 年 4 月 23 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07507

研究課題名(和文) 脳内異常蛋白質のGlymphatic系を介した排出経路と脳内播種の解明

研究課題名(英文) Washout of Accumulated Abnormal Proteins via Glymphatic System

研究代表者

伊藤 義彰 (Itoh, Yoshiaki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90265786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：認知症の原因物質の一つであるアミロイドの排出経路として、血管周囲の隙間が重要であることを突き止めました。実験では動物モデルとして脳の表面に滴下したアミロイドが血管周囲腔を伝わって深部に搬送される様子を観察しました。生きている動物に麻酔をかけて脳の表面にガラスを張って、顕微鏡を用いてアミロイドが徐々に深部に入っていく様子を観察しました。実際の病気では、脳のニューロンから切り離されたアミロイドがこの経路を逆行性に脳表に排出されると考えられ、排出低下がアルツハイマー病の発症を引き起こす可能性が示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病の原因物質であるアミロイドの排出経路を突き止めた研究です。現在アルツハイマー病には根本的な治療がなく、アミロイドに対する抗体療法によって脳内アミロイドを低下させ、認知症の進行抑制、発症予防ができないか検討されています。抗体療法の問題の一つがARIAと呼ばれる血管の炎症と脳浮腫で、これが起きると折角アミロイドを低下させても認知症が悪化します。今回の我々の研究は別の角度からアミロイドを低下させる可能性が示唆され、今後の治療法開発に期待されています。

研究成果の概要(英文)：We successfully identified the perivascular space as one of the washing-out route of amyloid beta, the causative substance of Alzheimer disease. In the experiment, we observed that amyloid beta, applied on the surface of the cerebral cortex, was transferred gradually in the space along the penetrating vessels. We used live imaging system with cover glass on the top of the cerebral cortex and a two-photon microscopy. The passage of amyloid beta was localized to a segment of perivascular space. In the clinical setting, amyloid beta is thought to be cut from the neurons and washed-out from the deep parenchyma through this perivascular space in the direction opposite to the observed flow and disturbance of this clearance may trigger the development of Alzheimer's disease.

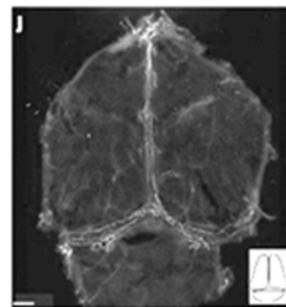
研究分野：脳神経内科

キーワード：アミロイド アルツハイマー病 血管周囲腔 認知症治療

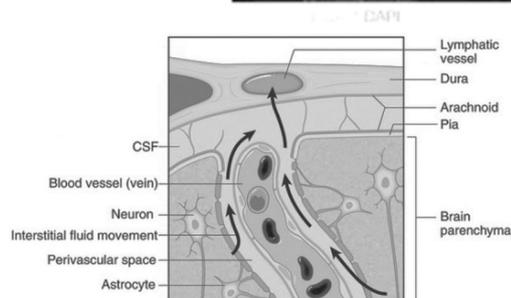
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

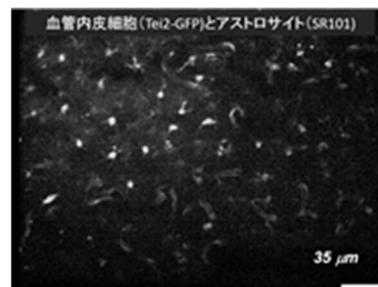
2015年、LouveauらはT細胞の出入り口として硬膜静脈洞に沿ったリンパ管を発見し、中枢神経におけるリンパ系の存在を実証した(右図)(Louveau A, et al. Nature 2015;523:337-41)。これまで中枢神経系は古典的なリンパ系排出機構を持たないと考えられてきたが、これにより髄腔からの間質液およびそれに含まれる蛋白質の排出経路の一部が明らかとなると同時に、中枢神経系への免疫担当細胞の出入りの機序が示唆された。



この排出経路の発見により、その上流にあるリンパ系として血管周囲腔を介した「リンパ流」が注目されている(右図)。特にアミロイドは従来から、毛細血管にて脳実質から血管内に排出される経路と、血管周囲腔を伝わって髄液中に排出される経路の二つが想定されていたが、いまだに詳細は不明である。アルツハイマー病の最大のリスク遺伝子であるApo-E4は、毛細管レベルでのアミロイドクリアランスを低下させる(Zlokovic. J Neurochem 2004; 89:807-11)。一方、アルツハイマー病では高率に穿通動脈から軟膜動脈にアミロイドの沈着を認めることは、血管周囲を伝わるアミロイドの排出を示唆する。



我々はこれまで、Neurovascular Unitの様々な病態における役割を画像化技術にて明らかにしてきた(右図、血管周囲を取り囲むアストロサイトendfootのin vivo imaging)。基礎的モデルとしては脳循環の調節(Itoh Y, Suzuki N. J Cereb Blood Flow Metab. 2012)、エネルギー代謝の維持(Itoh Y, Sokoloff L et al. PNAS. 2003)、シナプス伝導性の調節、血管の新生(Itoh Y. Brain Res. 2011 ;1406:74)などを報告してきた。また臨床的には、こうした概念が脳梗塞などの脳卒中、



高血圧性脳症、子癇、白質脳症、脱髄疾患などの病態に關与していることを解明してきた。

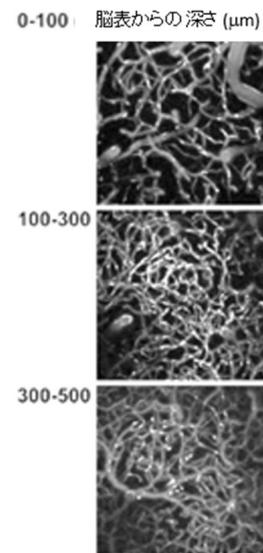
2. 研究の目的

こうしたニューロンの活動と脳血管系のダイナミックな関係を明らかにしてきた研究経験・知識と技術力を背景に、本研究では、中枢神経系におけるAβの生成、脳組織液への排出、局所の重合・集積、毛細血管でのクリアランスなどを評価する。またそれらを調節する因子を検討し、アミロイドの沈着を抑制する方法を探索する。また病的には辺縁系から大脳皮質へと病巣が進展することが知られているが、局所で産生されたAβやタウ蛋白がどのように脳内に伝播していくのかをin vivo画像化によって解明していこうと考えた。

3. 研究の方法

< 光学系 >

脳内の異常蛋白の描出には、現有のニコン社製高速多光子共焦点レーザーシステム A1R MP+1080 を用いる。このシステムでは超高感度 GaAsP NDD を用いて、頭窓下に脳表から深部 1200 μm までを観察することができるため、海馬錐体細胞周辺までを可視化することができる。また血管系を空間の指標に用いることで約一か月間、繰り返し同じひとつひとつのニューロンを追跡できる（右図、大脳皮質深部の血管 in vivo イメージング）。



頭窓の作成および長期間にわたる in vivo の大脳皮質の観察は我々の研究室では数多くの成果を発表してきている（Sekiguchi Y, et al. J Cereb Blood Flow Metab 2014;34:1761-70 など）。蓄積したアミロイド 蛋白およびタウ蛋白の検出には methoxy-X04 や thiazin red などの蛍光色素や PBB3 などの PET トレーサーを用いる。これらのトレーサーは脳内移行が良好で標的への選択性も高い。また繰り返し投与し標的物質の増減や移動をトレースすることができる。また周囲のニューロンやミクログリア、アストロサイトの変化を同時に画像化することも可能である。またアミロイド 自体は蛍光を有するため、凝集すればトレーサーがなくとも可視化は可能である。

< モデル動物・蛍光標識動物 >

- ・タウ蓄積動物モデル：rTg(tauP301L)4510
- ・アミロイド蓄積動物：APPSN1
- ・ミクログリア可視化マウス：CX3CR1-GFP（保有）（右図）
- ・脳ニューロン可視化マウス：B6.CgTg(Thy1-YFP)16Jrs/J
- ・血管内皮細胞可視化マウス：TIE2-GFP

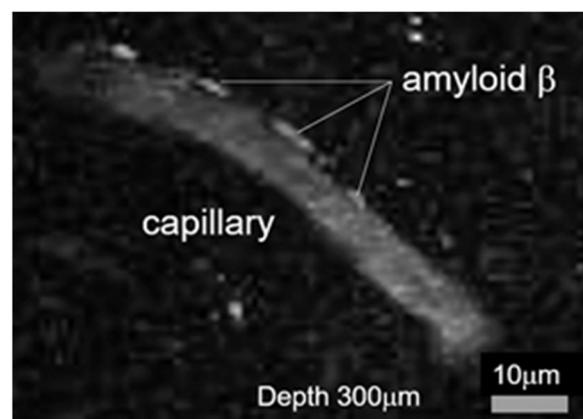


< 血管周囲リンパ流 Glymphatic Flow の測定方法 >

血管周囲のリンパ流の同定・描出には蛍光標識 dextran を用いる。これにより脳実質から血管周囲への移行、さらに脳表への排出が測定でき、これを経時的に測定することでリンパ流の方向、動脈・静脈選択性、拡散と対流の区別などが可能となり、脳実質の蛋白質の排泄経路を明らかにすることができる。また逆に脳表から脳実質に流入する経路は、標識物質を脳表へ滴下したり大槽内へ注入したりした後で血管周囲および実質への移行を評価する。

< A クリアランスの測定方法 >

当研究室では、すでにプレリミナリーな検討を始めている。まずイソフルラン麻酔下で雄性 C57/BL6 マウスの左側頭頂部の頭皮を切除し頭骨（径 3.5mm）を除去した。A の追跡として、脳表に HiLyte488-A 1-42(Anaspec)を滴下し、その後カバーガラスによって閉鎖頭窓を作製した。早期相の血管および後期相のアストロサイトの描出には SR101(Dojindo) をマウス腹腔に投与した。こうした処置後に多光子顕微鏡による脳微小血管周囲の反復イメージングを行ったところ、画像化 30 分ですでに A が血管周囲腔に豊富に沈着している様子を捉えることに成功した（右図、未発表）。



これにより脳表から脳深部へタンパク質を運ぶ経路が明らかとなったが、生理的・病的過程ではニューロンにて生成された A が脳実質の間質液を介して血管周囲へ運ばれ、脳表から排出されると考えられている。こうした流れを明らかにするためには、脳実質への注入や過剰に A を産生するマウスでの A の動態、排泄を測定する必要がある。

また髄液、血管周囲液、組織液の相互の流入を明らかにするためには、脳室内へのトレーサー投与（側脳室に 33GA 針を刺入し、シリンジポンプで 200nl/min でトレーサーを注入、同時に大槽から同速度で髄液を吸引する）や大槽注入（大槽に 33GA 針を刺入し、2 μ l/min で 5 分間注入する）などの方法を検討する（Iliff JJ. Sci Transl Med 2012;4:147）。

< 蛋白伝播の画像的評価 >

上記のような方法で血管周囲のタンパク質の移動、沈着は明らかにできる。さらに我々はこの方法を用いて、実質内の異常蛋白の播種 spreading を画像化する。方法としては、脳実質内にアミロイド、タウトレーサーを注入し、実質内の移動方向、速度を測定する方法や過剰に異常蛋白を発現する遺伝子改変マウスを用いる方法を検討する。ステレオにて 33GA 針を様々な脳表、海馬、視床、基底核に刺入し、人口髄液に溶解した 1.0 μ l のトレーサーを 17nl/min で持続注入する。レシピエント動物としては、健常のマウスに加え、アミロイド、タウ、シヌクレイン発現マウスにてこれらのトレーサーの移動変化、二次的な蛋白の凝集を評価する。また蛋白の変異がこうしたトレーサーの移動、二次凝集に及ぼす影響を評価する。

4 . 研究成果

本研究はアミロイド（A）の排出経路について動物モデルを用いて研究した。実際の病態においては脳内のニューロンで A は産生され、一定量の A が血管周囲腔 glymphatic 系を伝わって脳表に排出されると考えられるが、本研究では脳表に投与した A の動態を観察した。Tie2-GFP マウスの脳表に滴下した 100 μ M の A（HiLyte647-Amyloid 1-42 (AnaSpec, Inc.)）は PEG にて溶解すると、皮質動脈周囲に移動、さらに穿通動脈を取り囲むアストロサイトの endfoot を伝播することが初めて観察された。血管周囲のアストロサイトに取り込まれた A はさらに深さ 150 μ m の毛細血管周囲アストロサイトの endfoot まで syncytium を介して伝播し、最終的には実質内のアストロサイトに移動することが確認された。

一方、溶液を作成後に 37 度で数時間インキュベートした fibril A は、glymphatic 系を介して脳表から 50、100、150 μ m さらに最深で 200 μ m へと次第に移動していくのが観察された。時間は 30 分後には 50 μ m に到達し、60、90 分とさらに脳内深部に到達していく様子を確認した。fibril A の移動は、同時に投与した dextran とほぼ同じ場所を移動しており、血管周囲の対流 convective flow に乗って移動していると推測された。

これに対して溶液作成直後の monomer A は脳実質にそのまま浸透していき、glymphatic 系を介しての移動はほとんど認めなかった。

このように本研究では、A の運搬が、溶解条件、重合度の度合いなどで異なった経路を介することが示唆された。今後の治療法の開発に役立つと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Jun Takeuchi, Takayuki Kikukawa, Haruna Saito, Itsuki Hasegawa, Akitoshi Takeda, Hiroyuki Hatsuta, Joji Kawabe, Yasuhiro Wada, Aya Mawatari, Ami Igesaka, Hisashi Doi, Yasuyoshi Watanabe, Hitoshi Shimada, Soichiro Kitamura, Makoto Higuchi, Tetsuya Suhara, Yoshiaki Itoh	4. 巻 13
2. 論文標題 Amyloid-Negative Dementia in the Elderly is Associated with High Accumulation of Tau in the Temporal Lobes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Open Biomedical Engineering Journal.	6. 最初と最後の頁 55-66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1874120701913010055	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 該当する

1. 著者名 Kenta Aohara, Shinobu Minatani, Hiroko Kimura, Jun Takeuchi, Akitoshi Takeda, Joji Kawabe, Yasuhiro Wada, Aya Mawatari, Yasuyoshi Watanabe, Hitoshi Shimada, Makoto Higuchi, Tetsuya Suhara, Yoshiaki Itoh.	4. 巻 8
2. 論文標題 Staging of tau distribution by positron emission tomography may be useful in clinical staging of Alzheimer disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurology and Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 61-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ncn3.12366	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 該当する

1. 著者名 Ming-Jang Chiu, Lih-Fen Lue, Ming-Chyi Pai, Ta-Fu Chen, Chaur-Jong Hu, Likai Huang, Wei-Che Lin, Chau-Chung Wu, Jiann-Shing Jeng, Kaj Blennow, Marwan N Sabbagh, Sui-Hing Yan, Pei-Ning Wang, Shieh-Yueh Yang, Hiroyuki Hatsuta, Satoru Morimoto, Akitoshi Takeda, Yoshiaki Itoh, Jun Liu, Haiqun Xie	4. 巻 11
2. 論文標題 Age-Dependent Relationship Between Plasma A ₄₀ and A ₄₂ and Total Tau Levels in Cognitively Normal Subjects	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Aging Neuroscience	6. 最初と最後の頁 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnagi.2019.00222	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 該当する

1. 著者名 Unekawa M, Tomita Y, Toriumi H, Osada T, Masamoto K, Kawaguchi H, Izawa Y, Itoh Y, Kanno I, Suzuki N, Nakahara J	4. 巻 26
2. 論文標題 Spatiotemporal dynamics of red blood cells in capillaries in layer I of the cerebral cortex and changes in arterial diameter during cortical spreading depression and response to hypercapnia in anesthetized mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microcirculation	6. 最初と最後の頁 e12552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/micc.12552	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 該当する

1. 著者名 Takeda A, Sturm VE, Rankin KP, Ketelle R, Miller BL, Perry DC	4. 巻 51
2. 論文標題 Relationship Turmoil and Emotional Empathy in Frontotemporal Dementia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Alzheimer Dis Assoc Disord	6. 最初と最後の頁 1222-1232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WAD.0000000000000317.	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 該当する

1. 著者名 Hasegawa Itsuki, Takeda Akitoshi, Hatsuta Hiroyuki, Kubo Yuki, Ohsawa Masahiko, Nakano Yuta, Ikeuchi Takeshi, Hasegawa Masato, Murayama Shigeo, Itoh Yoshiaki	4. 巻 38
2. 論文標題 An autopsy case of globular glial tauopathy presenting with clinical features of motor neuron disease with dementia and iron deposition in the motor cortex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 372 ~ 379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12457	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katsumata M, Oki K, Tsukada N, Abe T, Itoh Y, Takahashi S, Suzuki N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Rivaroxaban Promotes Reduction of Embolus Size within Cerebrocortical Microvessels in a Mouse Model of Embolic Stroke.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Keio J Med	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naoki Tsukada, Masahiro Katsumata, Koichi Oki, Takato Abe, Shinichi Takahashi, Yoshiaki Itoh, Norihiro Suzuki.	4. 巻 1679
2. 論文標題 Diameter of fluorescent microspheres determines their distribution throughout the cortical watershed area in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Res.	6. 最初と最後の頁 109-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikukawa T, Abe T, Ataka S, Saito H, Hasegawa I, Mino T, Takeuchi J, Kawabe J, Wada Y, Watanabe Y, Itoh Y.	4. 巻 39
2. 論文標題 Amyloid deposition and CBF patterns predict conversion of mild cognitive impairment to dementia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurol Sci	6. 最初と最後の頁 1597-1602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 木村裕子、竹内潤、蔦田強司、大畑建治、大澤政彦、伊藤義彰。	4. 巻 58
2. 論文標題 繰り返す脳梗塞に閉塞性水頭症と脳幹萎縮を併発した神経サルコイドーシスの1例。	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床神経学	6. 最初と最後の頁 445-451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 伊藤義彰、平良庸子、澤田礼子、長谷川樹、安部貴人
2. 発表標題 アルツハイマー病とGlymphatic系
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 初田裕幸、武田景敏、伊藤義彰、桑江優子、大澤雅彦、松原知康、村山繁雄
2. 発表標題 死亡時92歳の進行性核上性麻痺（PSP）生前同意剖検例
3. 学会等名 第19回日本神経病理学会近畿地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Itsuki Hasegawa, Reiko Sawada, Shinobu Minatani, Takato Abe, Yoshiaki Itoh
2. 発表標題 In vivo dynamics of amyloid in glymphatic system observed with multiphoton microscopy
3. 学会等名 BRAIN&BRAIN PET 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiaki Itoh
2. 発表標題 Cerebral Microcirculation and Glymphatic System
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of Japanese Society for Microcirculation（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田景敏、竹内潤、皆谷忍、水田秀子、東山滋明、河邊讓治、伊藤義彰
2. 発表標題 進行性失語症患者における言語機能の神経基盤 - FDG-PETの脳糖代謝低下部位との相関 -
3. 学会等名 認知症学会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 初田裕幸、諸岡千暁、岡本光祐、武田景敏、大畑麻衣、大澤政彦、三木幸雄、伊藤義彰
2. 発表標題 磁化率強調画像 (SWI) および病理学的に後頭葉の鉄沈着を確認しえた進行性多巣性白質脳症 (PML) の一剖検例
3. 学会等名 第20回日本神経病理学会近畿地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤義彰
2. 発表標題 「脳梗塞治療への実験的アプローチ」
3. 学会等名 日本神経学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤義彰
2. 発表標題 「脳卒中の予防と慢性期治療」
3. 学会等名 日本神経学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤義彰
2. 発表標題 「脳微小循環とGlymphatic系」
3. 学会等名 日本微小循環学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤義彰
2. 発表標題 「脳卒中急性期の病態と治療」
3. 学会等名 日本神経学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤義彰
2. 発表標題 「アルツハイマー病とGlymphatic」
3. 学会等名 日本脳卒中学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Itoh Y, Takeuchi J, Kikukawa T, Saito H, Hasegawa I, Takeda A, Hatsuta H, Kawabe J, Wada Y, Mawatari A, Igesaka A, Doi H, Watanabe Y, Shimada H, Kitamura S, Higuchi M, Suhara T
2. 発表標題 36.Amyloid-negative dementia in the elderly is associated with very heavy accumulation of tau in the parietal lobes.
3. 学会等名 CME2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 伊藤義彰	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 254
3. 書名 症例から学ぶ戦略的急性期脳卒中診断・治療	

1. 著者名 伊藤義彰	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 243
3. 書名 脳卒中エキスパート抗血栓療法を究める	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪市立大学大学院医学系研究科脳神経内科業績 http://www.med.osaka-cu.ac.jp/Neurology/achievements.html</p>
--

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	安部 貴人 (Abe Takato) (30365233)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授 (24402)	
研究分担者	武田 景敏 (Takeda Akitoshi) (90445015)	大阪市立大学・大学院医学研究科・講師 (24402)	
研究分担者	竹内 潤 (Takeuchi Jun) (20771819)	大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師 (24402)	

6. 研究組織（つづき）

	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	三野 俊和 (Mino Toshikazu) (60597566)	大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師 (24402)	
研究分担者	長谷川 樹 (Hasegawa Itsuki) (90793753)	大阪市立大学・大学院医学研究科・医員 (24402)	
研究分担者	木村 裕子 (Kimura Hiroko) (20815394)	大阪市立大学・大学院医学研究科・前期臨床研究医 (24402)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関