

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06101・19K21221

研究課題名(和文) ミクログリアによる神経炎症に着目したアルツハイマー病の分子病態解明とその制御

研究課題名(英文) Elucidating mechanisms of microglial activity in Alzheimer's disease

研究代表者

祖父江 顕 (Sobue, Akira)

名古屋大学・環境医学研究所・特任助教

研究者番号：80823343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、候補遺伝子アプローチにより炎症調節因子として知られているSOCSファミリー遺伝子に着目し研究をした。炎症性ミクログリアにSOCSの阻害剤Xを添加し、炎症性サイトカインの放出抑制を確認した。さらに、ADモデルマウスにXを連続投与することで脳内炎症、A $\beta$ 蓄積および認知機能の改善を明らかにした。また、次世代シーケンスによりAD患者脳とADモデルマウスから抽出したミクログリアからカンナビノイド受容体2型(CB2)など炎症関連遺伝子を抽出した。このことからグリア細胞におけるSOCSファミリー遺伝子やCB2はADの治療標的となりう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

前臨床試験として用いられてきた従来のADモデルマウスと実際のAD患者における分子病態の乖離などが原因でAD治療候補薬のほとんどが開発中止や第III相試験で有効性を示せていないのが現状であった。本研究はミクログリアにおける神経炎症やA $\beta$ のクリアランスに着目しており候補因子についてはAD患者脳から抽出済みである。更に、問題となっているヒト-モデル動物間のギャップについては次世代ADモデルを用いて限りなく臨床に近い実験を実施することが可能である。従って、本研究は、他に類のない独自性の高い課題であり、ADの根治療法薬開発に繋がる十分な実現性をもった研究である。

研究成果の概要(英文)：Suppressor of cytokine signalling (SOCS) proteins act as negative feedback inhibitors, dampening specific cytokine signals to prevent excessive cellular responses and returning the cell to a homeostatic state. In this study, we focused on glial SOCS family genes. Regent X, which is SOCS inhibitor, negatively regulated the expression of inflammatory cytokines in activated microglia in vitro. In addition, chronic X injection ameliorated the cognitive impairments of AppNL-G-F (App-K1) mice. X-treated App-K1 mice also showed significantly decrease of amyloid accumulation and activated astrocyte's markers compared to veh-treated App-K1 mice. Moreover, we performed next-generation sequence using RNA isolated from AD precuneus and isolated-microglia from cortex of App-K1 mice, and some genes, including the expression of cannabinoid type II receptor (CB2) gene were commonly altered. Astroglial SOCS and microglial CB2 may be a potential therapeutic target for AD.

研究分野：病態神経科学

キーワード：アルツハイマー病 グリア細胞 神経炎症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

認知症の主要な原因疾患であるアルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)の中核となる病理は、アミロイド  $\beta$ (A $\beta$ )・タウ蛋白の異常蓄積であり、これらは神経変性につながる主要因子である。本疾患における現行の治療薬はこれらの因子の制御ではなく対症療法の域に留まっているため、その克服に向けた社会的要請は強い。従って、本疾患の病因と病態関連シグナルを明らかにし、病態に即した革新的治療法を開拓するための基盤整備が必要である。これまで、ADの病態研究は主に神経細胞にフォーカスしたものであった。一方でAD脳の老人斑に集簇するグリア細胞の一種であるミクログリアは、A $\beta$  クリアランスや神経炎症に寄与し、ADの病態に関与することが示され、近年注目されている。

### 2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究では炎症関連因子とそのAD病態制御機構の解明およびAD患者の病理に近い最新のモデルである *App<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup>*マウス(APP-KIマウス)とAD患者脳を用いた炎症関連遺伝子発現解析とその制御因子の探索の2つの研究目標を設定した。

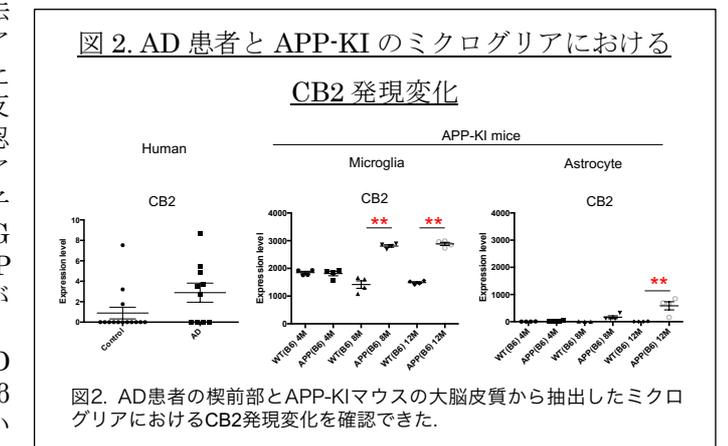
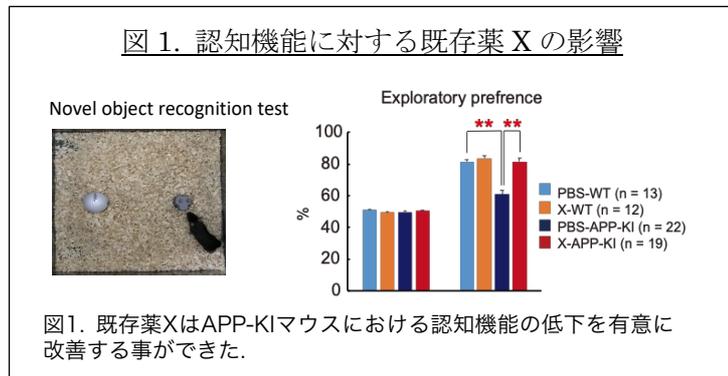
### 3. 研究の方法

マクローファージなど免疫関連細胞の炎症調節に関わる因子として知られるSOCSファミリー遺伝子に着目した。培養ミクログリアにIFN- $\gamma$ を添加し神経炎症性ミクログリアを誘導した際に、SOCSファミリー遺伝子の阻害作用を持つ既存薬Xを添加することでSOCSファミリー遺伝子を介した炎症関連遺伝子の発現量変化を評価した。また、5ヶ月齢のAPP-KIマウス(名古屋市立大学: 齊藤貴志博士から供与)に対して既存薬Xの連続投与を行い、新規物体認知試験により認知機能への影響や組織免疫染色法によりA $\beta$ の量および磁気細胞分離法により各グリア細胞(ミクログリアおよびアストロサイト)特異的なSOCSファミリー遺伝子および炎症関連遺伝子の発現変動を解析して、SOCSファミリー遺伝子の制御によるAD治療の可能性を検討した。さらに、早期AD患者脳(高齢者ブレインバンク: 村山繁雄博士から供与)とAPP-KIマウスから抽出したグリア細胞を用いて次世代シーケンスを実施し、共通して変動した遺伝子のプロファイルを作製した。

### 4. 研究成果

IFN- $\gamma$ で炎症性に誘導した培養ミクログリアに対してSOCSファミリー遺伝子の阻害剤Xの添加により、SOCSファミリー遺伝子の発現低下とそれに伴う炎症性サイトカイン(*Cxcl10*や*Tnf- $\alpha$* )の発現低下が確認できた。さらに、5ヶ月齢のAPP-KIマウスに対してXを連続投与し、物体認知記憶を評価する新奇物体探索試験など行動解析を行い、X投与によるAD病態への影響を評価した。Xの反復投与はAPP-KIマウスにおける認知機能低下を有意に改善する事が明らかとなった(図1)。この行動解析の後に組織免疫染色法によりA $\beta$ の量および磁気細胞分離法により各グリア細胞(ミクログリアおよびアストロサイト)特異的なSOCSファミリー遺伝子の発現量変化とそれに伴う炎症関連遺伝子の発現変動を解析して、SOCSファミリー遺伝子の制御によるAD治療の可能性を検討した。その結果、APP-KIマウスの大脳皮質で蓄積したA $\beta$ はXを反復投与することで低下することが明らかとなった。さらに磁気細胞分離法によりAPP-KIマウスの単離したアストロサイトにおいて上昇したSOCSファミリー遺伝子はXの反復投与により抑制したことが確認でき、その抑制に伴い神経傷害性アストロサイト関連遺伝子(*Serping1*: Serpin Family G Member 1 および *Fkbp5*: FKBP Prolyl Isomerase 5)の発現上昇が抑えられたことが明らかとなった。

さらに、神経病理学的に早期ADと診断された剖検脳(Braak A $\beta$  stage: 3, NFT stage: 3-4)において、早期からアミロイド病理が見られる楔前部の脳試料の供与を得た。早期AD患者脳とAPP-KIマウスから抽出したグリア細胞



早期AD患者脳とAPP-KIマウスから抽出したグリア細胞

を用いて次世代シーケンスを実施し、共通して変動した炎症関連遺伝子のプロファイルを作製した。その結果、主に免疫関連細胞に発現し、炎症調節に関与することが知られているカンナビノイド受容体 2 型 (CB2) を含む炎症関連遺伝子が確認された (図 2)。

本研究において、SOCS ファミリー遺伝子の阻害剤は APP-KI マウスにおいてアストロサイトの活性化の抑制と A $\beta$  蓄積の低下および認知機能の改善をもたらすことが明らかとなった。このことから SOCS ファミリー遺伝子の制御による AD 治療の可能性が示唆された。今後は、SOCS ファミリー遺伝子の発現変化に伴う周囲の細胞 (ミクログリアや神経細胞) への影響の解析を進める予定である。また、AD 患者の楔前部および APP-KI マウス的大脑皮質から単離したミクログリアで CB2 を含むいくつか共通して変動する炎症関連遺伝子を同定した。今後は AD 患者および APP-KI マウスにて共通して変動する遺伝子リストの作成を進めるとともに、ミクログリアにおける CB2 刺激が A $\beta$  蓄積や神経炎症およびそれらに伴う認知機能低下に与える影響の検討を進める予定である。引き続き、SOCS ファミリー遺伝子が AD 病理に与える影響の検討や AD 患者の病理に近い最新のモデルである APP-KI マウスと AD 患者脳との比較解析を進めることで臨床との分子病態の乖離が少なく神経炎症を標的とした治療法開発への道筋を明確にすることができると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakazawa Yuka, Hara Yuichiro, Oka Yasuyoshi, Komine Okiru, . . . Sobue Akira, Mitsutake Norisato, Suganami Takayoshi, Masuda Akio, Ohno Kinji, Nakada Shinichiro, Mashimo Tomoji, Yamanaka Koji, Luijsterburg Martijn S., Ogi Tomoo	4. 巻 180
2. 論文標題 Ubiquitination of DNA Damage-Stalled RNAPII Promotes Transcription-Coupled Repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1228 ~ 1244.e24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2020.02.010	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 Sawahata Masahito, Mori Daisuke, Arioka Yuko, Kubo Hisako, Kushima Itaru, Kitagawa Kanako, Sobue Akira, Shishido Emiko, Sekiguchi Mariko, Kodama Akiko, Ikeda Ryosuke, Aleksic Branko, Kimura Hiroki, Ishizuka Kanako, Nagai Taku, Kaibuchi Kozo, Nabeshima Toshitaka, Yamada Kiyofumi, Ozaki Norio	4. 巻 74
2. 論文標題 Generation and analysis of novel Reln deleted mouse model corresponding to exonic Reln deletion in schizophrenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 318 ~ 327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.12993	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 -

1. 著者名 Watanabe Seiji, Oiwa Kotaro, Murata Yuri, Komine Okiru, Sobue Akira, Endo Fumito, Takahashi Eiki, Yamanaka Koji	4. 巻 13
2. 論文標題 ALS-linked TDP-43M337V knock-in mice exhibit splicing deregulation without neurodegeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-0550-4	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 祖父江 颯、小峯 起、遠藤史人、村山繁雄、斉藤貴志、西道 隆臣、山中宏二
2. 発表標題 アルツハイマー病患者脳とAPP- KIマウス由来ミクログリアにおける遺伝子発現解析
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会第62回日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大岩康太郎、渡邊征爾、祖父江 顕、小峯 起、勝野雅央、山中宏二
2. 発表標題 TDP-43の多量体化が、その細胞内局在の決定に重要である
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会第62回日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 祖父江 顕、小峯 起、遠藤史人、村山繁雄、斉藤貴志、西道隆臣、山中宏二
2. 発表標題 アルツハイマー病患者とAppNL-G-F マウスにおける神経炎症関連遺伝子解析
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝口博之、小峯 起、Md. Ali Bin Saifullah1、祖父江 顕、遠藤史人、山中宏二
2. 発表標題 タッチスクリーン式学習試験法はアルツハイマー病モデル動物の早期の認知機能障害を検出できる
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
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
---------	---------------------------	-----------------------	----