

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：35302

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22984

研究課題名（和文）アミロイドベータのリンパ系クリアランス促進による認知症治療の萌芽的研究

研究課題名（英文）Lymphatic system facilitates amyloid beta clearance for dementia

研究代表者

水野 理介（Risuke, Mizuno）

岡山理科大学・獣医学部・教授

研究者番号：30273080

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：マウス・ラットの頸部リンパ管の走行を解剖学的に確認した。特にGlymphatic pathwayを形成する頸部深部リンパ管系（Deep Cervical Efferent Lymphatics: DCEL）の関係を明らかにした。DCELに対するアミロイド（Ab）1-40の用量反応を検討した結果、リンパ管自発性収縮の非可逆的障害を惹起することが判明した。L-NAME、アポシニン、アラキドン酸、プロプラノロール、Dooku-1およびグリベンクラミドは、Ab1-40によるリンパ管障害を改善しなかった。Ab1-40のDCEL自発性収縮は、リンパ管平滑筋に対する直接作用であ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

先進国超高齢社会のトップランナーである本邦において、「健康寿命の延伸」を妨げる加齢神経変性疾患認知症の有病者人口は右肩上がりであり、当該疾患は医学的のみならず社会的にも解決しなければならない喫緊の課題である。近年、その原因物質であるアミロイドベータ（Ab）やタウタンパク質の脳脊髄液を介するクリアランス減弱がアルツハイマー型認知症の病態に関与することが示唆されている。本研究の学術的意義は、Abが、そのクリアランスの中心をなす頸部リンパ管系機能を抑制することを見出した事であり、また、社会的意義は、これらの機能解析が加齢神経変性疾患認知症の新規治療法の萌芽となる可能性を示唆している点である。

研究成果の概要（英文）：We confirmed anatomical location of the cervical lymphatic system of rats and mice and that deep cervical efferent lymphatics (DCEL) involved glymphatic system. Amyloid beta (Ab) 1-40 elicited an irreversible inhibition of spontaneous oscillatory changes in the diameter of DCEL, suggesting that this peptide evoked dysfunction of active lymphatic transport mechanisms of glymphatic pathway. Neither L-NAME, apocynin, arachidonic acid, propranolol, Dooku-1, nor glibenclamide improve the Ab-induced dysfunction of DCEL. These results suggested that Ab directly inhibited spontaneous contraction of smooth muscle of DCEL.

研究分野：医用生体工学

キーワード：リンパ管 平滑筋 アミロイドベータ 認知症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リンパ管系研究のターゲットは、大きく分けて毛細リンパ管と集合リンパ管である。毛細リンパ管は、1層の内皮細胞（平滑筋を欠如）からなりリンパ産生に働く。集合リンパ管は、その壁に平滑筋を有しリンパ輸送に関与する。集合リンパ管平滑筋のユニークな心臓様自発性収縮能は、ヒトを含めて多くの種に存在することが知られている。応募者は、集合リンパ管に着目し、その機能解析を行い世界に先駆けて多くの新知見を報告してきた (*Pharmacol Ther.* 105(2): 165-188, 2005)。特出すべきは、集合リンパ管には収縮機能のみならず、水溶性物質に対する内皮細胞依存性分子量依存性透過性機能の存在を証明したことである (*Am J Physiol.* 289(4): H1676-H1682, 2005)。古典的に中枢神経、聴覚器ならびに視覚器に、リンパ系は存在しないとされていた。しかし、最先端サイエンスはこれらの部位においても、リンパ循環に相当する経路が存在することを証明した。特に、脳実質の Glymphatic pathway (*The Lancet Neurol* 17(11), 1016-1024, Nov 1 2018) の存在と意義は、微小リンパ循環学領域におけるパラダイムシフトを興しつつある。すなわち、アルツハイマー型認知症の原因物質である Ab やタウタンパク質は、Glymphatic pathway-脳脊髄液を介して脳内から除去され、さらに頸部リンパ系に排出・処理（クリアランス）されることが強く示唆されている。応募者は、これまでの研究実績とそれに関連する世界最先端の知見を包括的に関連付け、「現在未知であるリンパ循環系における Ab の作用解明は、アルツハイマー型認知症に対する新規治療につながる」と着想し本研究の構想に至った。

2. 研究の目的

第5期科学技術基本計画 Society 5.0 に向けた戦略分野の一つに、「健康寿命の延伸」が掲げられている (http://www8.cao.go.jp/cstp/society5_0/index.html)。先進国超高齢社会のトップランナーである本邦において、「健康寿命の延伸」を妨げる加齢神経変性疾患認知症の有病者人口は右肩上がりであり（2025年65歳以上の20%と推定）、当該疾患は医学的のみならず社会的にも解決しなければならない喫緊の課題である。

近年、その原因物質であるアミロイドベータ (Ab) やタウタンパク質の脳脊髄液を介する自浄・除去作用（クリアランス）の減弱がアルツハイマー型認知症の病態に関与することが示唆されている。古典的な脳脊髄液排出路として、1) 脳・脊髄クモ膜顆粒-静脈洞系、2) 嗅神経-頸部リン

パ系、3) 脊髄神経根-硬膜外リンパ系が知られている。最近では、脳脊髄液排出路として、4) 脳実質における Glymphatic pathway と 5) 硬膜リンパ系-頸部リンパ系の存在が注目されている。これらすべての脳脊髄液排出路の協調的オペレーションは、脳内環境の清浄を維持する。一方、Ab は、脳実質のみならず脳血管にも沈着し、様々な障害（血管アミロイドーシス・血液脳関門破綻）を引き起こすことも明らかとなっている。すなわち、Ab は脳血管内皮細胞機能（NO 産生）を減弱し（*Physiology* 2017 32: 20-32）、この脳血管障害による脳実質への物質供給不全（酸素・栄養素・体液）は、脳内環境ホメオスタシスを破壊する。しかしながら、脳脊髄液排出路の一部を担う頸部リンパ系に対する Ab の作用は全く不明である。

本研究の目的は、頸部リンパ輸送系に対する Ab の作用解明に挑戦し、そのメカニズムを基盤としたリンパ循環改善方法によって認知症治療を萌芽する研究を実施することである。

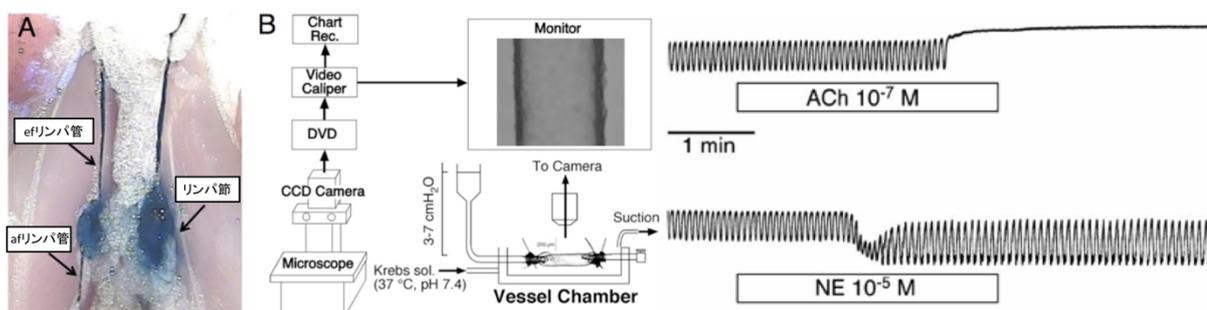
3. 研究の方法

本研究では、集合リンパ管の収縮制御機構 [内皮細胞由来一酸化窒素 (NO)・プロスタノイド (PN)] に対する Ab の作用について、*ex vivo* 実験を実施し、Ab による集合リンパ管収縮阻害効果をレスキューする手法を探索する。

材料: マウス・ラットから摘出した集合リンパ管標本 (図 A: 例マウスリンパ管系) を使用する。

実体顕微鏡下、マイクロサージカルの手法にてリンパ管を摘出する。

方法: 摘出したリンパ管は、vessel chamber 内でカニューレシオンされ、内圧誘発性自発性収縮（ポンプ輸送作用）を惹起させる。Ab や関連薬物を標本に投与し、DVD-microscopy を用いて標本の機械的活動を計測・記録し収縮機能を定量評価する (図 B: ACh/NE の反応例)。



4. 研究成果

マウス・ラットの頸部リンパ管の走行を解剖学的に確認した。その結果、表在性ならび深部リンパ管系が存在し、特に Glymphatic pathway を形成する頸部深部リンパ管系の関係を明らか

にした。頸部深部リンパ管系は、頸動脈に近接してそのリンパ節が存在し、輸入・輸出リンパ管の走行を確認できた。本実験では、頸部深部リンパ管系(Deep Cervical Efferent Lymphatics: DCEL)の輸出リンパ管の機能解析を行った。アミロイドベータ(Ab)1-40を標本内腔に選択的に投与できる実験系を確立した。標本に連結するinflowリザーバーとoutflowリザーバーの静水圧差を利用して、約1時間かけて標本内腔に2mL薬液を投与できた。DCELに対するAb1-40の用量反応を検討した結果、nMレベルでリンパ管自発性収縮の非可逆的障害を惹起することが判明した(図1)。次にリンパ管自発性収縮を制御する以下の分子の関与について検討した。L-NAME(内因性NO阻害薬)、アポシニン(内因性活性酸素種阻害薬)、アラキドン酸(内因性プロスタノイド基質)、プロプラノロール(β アドレナリン受容体拮抗薬)、Dooku-1(Piezo-1チャネル阻害薬)およびグリベンクラミド(ATP感受性 K^+ チャネル阻害薬)は、Ab1-40によるリンパ管障害を改善しなかった。以上の結果から、Ab1-40のDCEL自発性収縮は、リンパ管平滑筋に対する直接作用であることが示唆された。Abは、メタロプロテアーゼの一種であるネプリライシンによって分解されること知られている。そこで、集合リンパ管におけるネプリライシンの発現と分布を免疫組織学で検討した。その結果、ラット集合リンパ管平滑筋にネプリライシンの発現していることを確認できた(図2)。

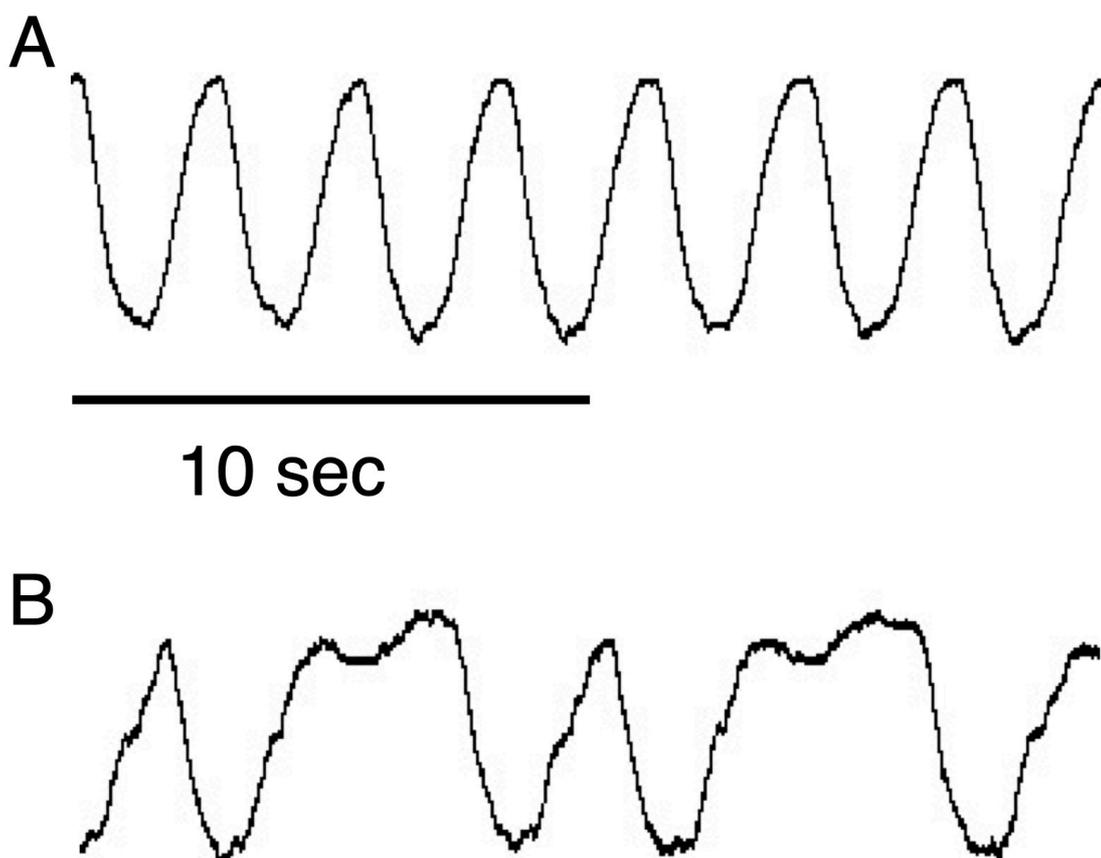


図 1 : 摘出頸部深部リンパ管に対する、アミロイドベータ 1-40 の反応。A は Ab 内腔還流前の B は Ab 内腔還流後の典型例を示す。

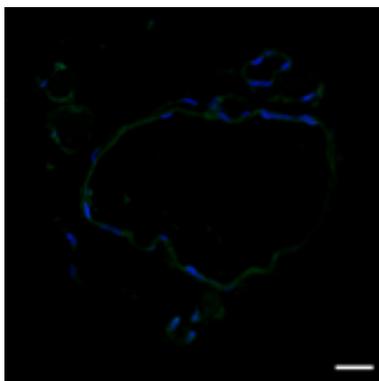


図 2 : ネプリライシンは、平滑筋に発現している。

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 Kawarazaki W, Mizuno R, Nishimoto M, Ayuzawa N, Hirohama D, Ueda K, Kawakami- Mori F, Oba S, Marumo T, Fujita T.	4. 巻 130
2. 論文標題 Salt causes aging-associated hypertension via vascular Wnt5a under Klotho deficiency.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Invest	6. 最初と最後の頁 4152-4166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI134431	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 Mukohda M, Mizuno R, Ozaki H.	4. 巻 76
2. 論文標題 Increased Blood Pressure Causes Lymphatic Endothelial Dysfunction via Oxidative Stress in Spontaneously Hypertensive Rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 598-606
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14636	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 Yoshida Y, Kosaki K, Sugasawa T, Matsui M, Yoshioka M, Aoki K, Kuji T, Mizuno R, Kuro-O M, Yamagata K, Maeda S, Takekoshi K.	4. 巻 12
2. 論文標題 High Salt Diet Impacts the Risk of Sarcopenia Associated with Reduction of Skeletal Muscle Performance in the Japanese Population.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu12113474	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10件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 向田昌司、水野理介、尾崎博
2. 発表標題 自然発症高血圧ラットにおいて、胸管の収縮反応性が増強される
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向田昌司、水野理介、尾崎博
2. 発表標題 高血圧症におけるリンパ管収縮性機能の検討
3. 学会等名 第29回日本循環薬理学会 第55回高血圧関連疾患モデル学会 合同学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向田昌司、水野理介、尾崎博
2. 発表標題 高血圧症におけるリンパ管収縮性機能の検討
3. 学会等名 第2回日本比較薬理・毒性学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masashi Mukohda, Risuke Mizuno, Hiroshi Ozaki
2. 発表標題 Lymphatic Smooth Muscle Relaxation Was Impaired in Spontaneously Hypertensive Rats
3. 学会等名 Gordon Research Conference 2020: Lymphatics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西本光宏、水野理介、藤田敏郎、一色政志
2. 発表標題 血管内皮における細胞内カルシウムセンサー STIM1による血圧調節機構の解析
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原崎和歌子、水野理介、西本光宏、鮎澤信宏、広浜大五郎、大庭成喜、丸茂 丈史、藤田 敏郎
2. 発表標題 加齢に伴う食塩感受性高血圧発症機序の解明
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原崎和歌子、水野理介、西本光宏、鮎澤信宏、広浜大五郎、大庭成喜、丸茂 丈史、藤田 敏郎
2. 発表標題 加齢に伴う食塩感受性高血圧発症機序の解明
3. 学会等名 第29回日本循環薬理学会 第55回高血圧関連疾患モデル学会 合同学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向田昌司、水野理介、尾崎博
2. 発表標題 動脈スティフネス病態における血管反応性の変化
3. 学会等名 第62回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水野理介、岩田恵理、樋渡敬介、土井公明
2. 発表標題 第20回日本抗加齢学会総会
3. 学会等名 しなやかな異種共生社会を営むためのペット・フレイルに対する獣医療の展開（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向田昌司、永西紗耶香、中村翔、竹谷浩介、松田彬、矢野嵩典、水野理介、尾崎博
2. 発表標題 細菌毒素streptolysin Oは血管内皮障害を引き起こす
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020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	向田 昌司 (Mukohda Masashi) (80824797)	岡山理科大学・獣医学部・助教 (35302)	
研究分担者	小野 伸幸 (Ono Nobuyuki) (60214186)	長野工業高等専門学校・電子制御工学科・教授 (53601)	

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
---------	---------