

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19417

研究課題名（和文）ミクログリアにおけるミエロイドチェックポイントの機能とアルツハイマー病

研究課題名（英文）Role of immune checkpoint molecules in microglia and Alzheimer's disease

研究代表者

高井 俊行（TAKAI, Toshiyuki）

東北大学・加齢医学研究所・特任教授

研究者番号：20187917

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）：アルツハイマー型認知症（AD）に対する創薬として、アミロイド（A $\beta$ ）除去を担うミクログリア細胞（MG）活性化機構を刺激する第三世代の新薬開発を超えた第四世代の創薬の礎となる学術的基盤を作る目的でMGが有するミエロイド免疫チェックポイント（MIC）がADの治療標的になるというコンセプトを実証し、その分子基盤の解明を試みた結果、MGをMICのLILRB4が抑制し、この効果がフィブロネクチンの共存下で影響を受けることが示唆された。また本研究の過程でMGに新しいIMICが機能する可能性が発見され、現在ヒト末梢血単球などを対象に基礎的検討を進めており、今後の応用研究への展開が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー型認知症（AD）に対してアミロイド（A $\beta$ ）に対する抗体を用いて分解処理を期待した第二世代の抗体医薬は効果が期待されたほど高くない。ミクログリア細胞（MG）を活性化してA $\beta$ 除去を狙う第三世代の創薬が注目されているが、これを超えた第四世代を開拓する礎となる学術的基盤を作る目的で本研究を行なった。MGをミエロイド免疫チェックポイント（MIC）LILRB4がフィブロネクチンを介して抑制する新しい機構が示唆され、学術的に意義ある成果が得られた。さらに新しいIMICが共存する可能性が示され、今後、学術的に注目される分野となり、第四世代の新薬開発への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：Objectives: To establish the basis for development of novel, the fourth generation of Alzheimer's disease therapeutics.

Results and conclusions: We focused on the immune checkpoint receptors expressed on myeloid cells, such as Leukocyte immunoglobulin-like receptor B4 (B4) and analyzed its function in murine brain microglial cells in vitro. We found that B4 inhibits brain microglial cell functions via binding to immobilized fibronectin. We also found a novel myeloid immune checkpoint receptor on microglial cells and obtained some clues to elucidate its function on microglia. These studies provided novel drug targets for Alzheimer's disease therapy.

研究分野：免疫学

キーワード：ミクログリア アルツハイマー病 免疫チェックポイント フィブロネクチン インテグリン

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会が抱える重要課題のひとつは、認知症の克服である。神経伝達の強化や神経細胞の保護を狙った第一世代の認知症、中でも患者数の多いアルツハイマー型認知症 (AD) 治療薬は概して成績不良である。AD のアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) の除去を狙った第二世代の抗体 医薬の効果は今のところ期待外れである。 $A\beta$  除去を担うミクログリア (MG) 活性化機構を刺激する第三世代の創薬の臨床効果は未知である。

我々は免疫チェックポイント LILRB4 (B4) の研究により、MG ではたらくミエロイド免疫チェックポイントが脳機能の恒常性維持に重要であり、このバランスが崩れると脳の健全性が破綻すると発想した。この仮説を支持する報告として、AD モデルマウスや老齢マウスの脳内 MG 上には B4 の mRNA が高発現し、脳内の慢性炎症の原因のひとつとなる可能性が報告されている [1, 2]。とりわけ我々の強みは B4 欠損マウスを有し、B4 の生理的・病理的リガンドがヒトとマウスで共通のフィブロネクチン N 末端 30 キロダルトンドメイン (FN30) であることを突き止めており、マウス AD モデルで B4 の役割を評価できることも相まって本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

本挑戦的萌芽研究では第四世代を開拓する礎となる学術的基盤を作ることを目的とした。即ち、MG が有するミエロイド免疫チェックポイントを阻害することで MG を賦活化し、 $A\beta$  など神経毒となる脳老廃物の蓄積を恒常的に抑制し、AD 発症を阻止するという斬新なコンセプト (図 1) を評価し、分子基盤を解明する。

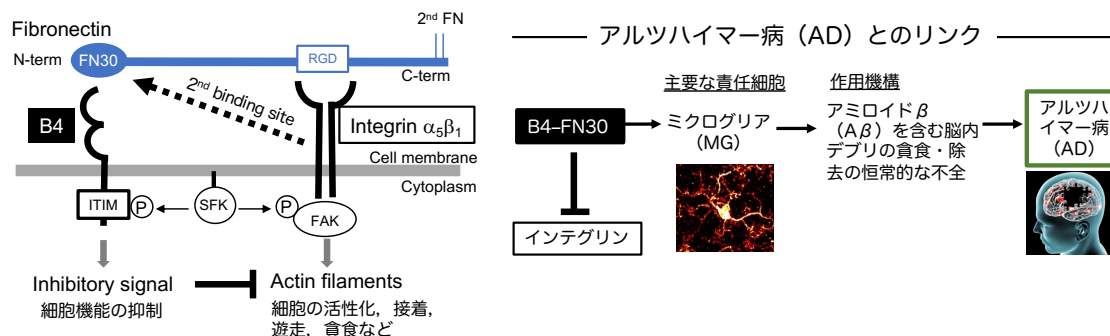


図1. 想定されるB4-FN-ITGの三者複合体と細胞機能の修飾およびアルツハイマー病 (AD) とのリンク。フィブロネクチンN末端30kDaドメイン (FN30) はミエロイド免疫チェックポイントB4のリガンドであると同時にインテグリン (ITG)  $\alpha 5\beta 1$  の結合領域となる (破線の矢印)。RGDは主要なインテグリン結合配列。ITIMは抑制性アミノ酸配列モチーフ、FAK、SFKはそれぞれ Focal adhesion kinase, Src family kinase。右の図はB4-FN-ITGユニットでB4がはたらき過ぎた場合の慢性炎症とAD発症の仮説。

### 3. 研究の方法

(1) B4 遺伝子欠損 AD モデルマウスの病理解析：家族性 AD の 3 種の変異  $A\beta$  プレカサータンパク質をコードする遺伝子をノックインした App<NL-G-F>マウス (理研・西道隆 臣博士より供与された) は 2 ヶ月齢から脳内にアミロイド斑が形成され、神経炎症、シナプスの脱落が認められる [3]。この AD モデルマウスと当研究室が開発したミエロイド免疫チェックポイント B4 遺伝子欠損マウスを交配して B4 欠損下で  $A\beta$  の蓄積、MG の  $A\beta$  周辺への集積、神経  $\tau$  タンパク質のレベル、シナプスの脱落などがどのように影響されるかを病理学的に調査することに着手した。

(2) マウス初代培養 MG の細胞生物学的、免疫学的解析：野生型マウスおよび上記 B4 欠損 AD モデルマウスの脳組織から MG を単離し、我々が独自に発見した B4 リガンドである FN30 をコートした培養皿への接着後の活性化の指標となる形態の評価、FN の古典的レセプターであるインテグリン (ITG) 経由の接着刺激で誘導される Focal adhesion kinase (FAK) リン酸化、炎症性サイトカイン TNF  $\alpha$  産生など刺激応答性を調査した。

(3) AD モデルの治療実験：AD モデルマウスに B4 抗体、B4 リガンドである FN30-Fc 組み換えタンパク質、FN30 抗体を投与し、上記指標を病理学的、生化学的に調査することを計画している。

(4) AD 患者由来脳組織標本の病理解析：AD 患者由来脳組織標本を大学病院病理部との連携により調査する計画である。MG の B4 発現レベル、周辺組織の FN/FN30 発現レベル、 $A\beta$  蓄積と MG の集積度、神経細胞の  $\tau$  タンパク質の蓄積度などのパラメーター間の相関を統計学的に調査する内容である。

以上、(1)~(4)により仮説の妥当性を評価することを計画した。

#### 4. 研究成果

(1) 初代培養 MG を野生型 B6 マウス及び gp49B (ヒト B4 の相同分子, 遺伝子) 欠損 B6 マウスから調製し, gp49B および FN の発現をフローサイトメトリーにて解析した。振盪法にて単離した野生型初代培養 MG では, gp49A の発現は確認できず, gp49B のみ発現していると考えられた。野生型及び gp49B 欠損 MG のどちらにおいても, FN の細胞表面上での発現は見られなかったため, 恒常的にインテグリンが FN をテザリングしている量は少ないと判断された。なお MG 上にはインテグリンに関しては  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_M\beta_3$ ,  $\alpha_V\beta_3$ ,  $\alpha_V\beta_5$  が発現することが知られており [4, 5], 特に  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_3$  は FN をリガンドとしている [6]。インテグリンサブユニットの発現を確認したところ,  $\alpha_M$ ,  $\alpha_V$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  サブユニットの発現が確認できた。したがって  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_3$  インテグリンとなって FN と結合する可能性があることが示唆された。

(2) MG は脳内にてその形態から 2 つに分類されている。通常時はラミファイド型と呼ばれ, 細胞体が小さく突起が細長い形態であるが, 感染や疾患の際には細胞体が大きく突起が短いアメボイド型となる。アメボイド型のミクログリアは活性化していると考えられ, 移動機能が亢進し貪食や液性因子の放出も活発に行うようになる [7, 8]。FN はインテグリンを介して MG を活性化するという報告 [4, 9] がある上, gp49B のリガンドが FN であることから, MG の動態と FN との関係について初代培養 MG を FN を固相化したプレートで培養し, 顕微鏡下で観察を行った。その結果, 野生型及び gp49B 欠損 MG の両方で形態の変化が見られた。さらに野生型は細長い突起を伸ばした形態の細胞が多い一方, gp49B 欠損型はアメバ状の形態が多く観察された (図 2A)。そこで細胞の長軸径を測定したところ, FN コートをを行った野生型 MG について, 同表現型のノンコートと比較して長軸径が有意に大きいという結果が得られた。また FN コートをを行った野生型と gp49B 欠損型の間で有意差が得られた (図 2B)。さらに 24 時間の移動距離をタイムラプスビデオで経時的に記録し計測したところ, コントロールのノンコートプレート及び FN コートプレート上で培養した MG の両方で野生型より gp49B 欠損型の方が移動距離について有意に大きいという結果が得られた。ただし, それぞれの表現型でノンコートと FN コートの間で有意差はなかった (図 2C)。よって B4 欠損 MG は FN コート培養皿への接着時の形態が Amoeboid 優勢であり, 活性化していることが示唆され, 当初の仮説が支持された。

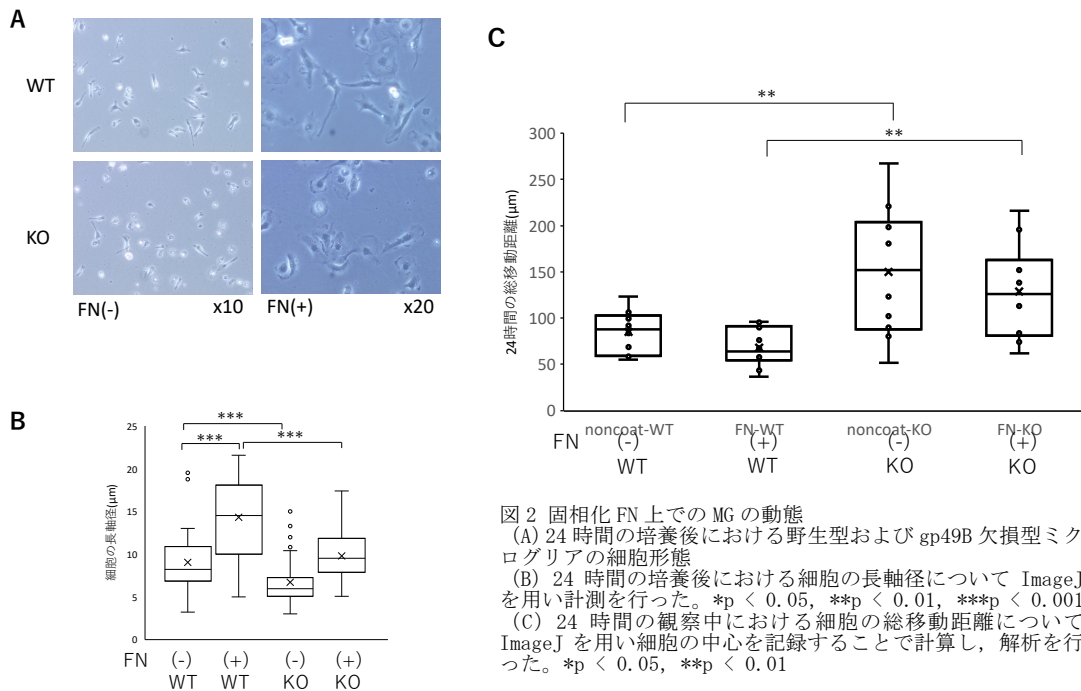


図 2 固相化 FN 上での MG の動態  
 (A) 24 時間の培養後における野生型および gp49B 欠損型ミクログリアの細胞形態  
 (B) 24 時間の培養後における細胞の長軸径について ImageJ を用い計測を行った。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$   
 (C) 24 時間の観察中における細胞の総移動距離について ImageJ を用い細胞の中心を記録することで計算し, 解析を行った。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

#### (3) CpG 刺激による炎症性サイトカイン産生量測定

TLR 様受容体のシグナル伝達経路を介した自然免疫の刺激は, AD の病態の抑制において有益であるという報告がある一方, その刺激は神経の炎症において悪影響を及ぼすという可能性もある [10, 11]。本研究では自然免疫刺激を模すため非メチル化オリゴヌクレオチド CpG 1668 を用いて TLR 9 経路で刺激を行った。gp49B-FN の関与を確かめるため, 予め FN をプレートにコートして固相化しておき, 野生型及び gp49B 欠損型 MG を播種し, CpG およびコントロールとして GpC を添加した。24 時間培養後, その上清について炎症性サイトカインである IL-6 と TNF- $\alpha$  について ELISA 法にて産生量を比較した (図 3)。その結果, 野生型及び gp49B 欠損型 MG のどちら

も CpG 刺激によって炎症性サイトカインの産生が確認された。FN の有無では炎症性サイトカイン産生量に差は見られなかった。しかしながら野生型に比べて gp49B 欠損 MG では FN コート及びノンコートの条件に関わらず炎症性サイトカインの産生量が野生型 MG に比べ有意に高いという結果が得られた。

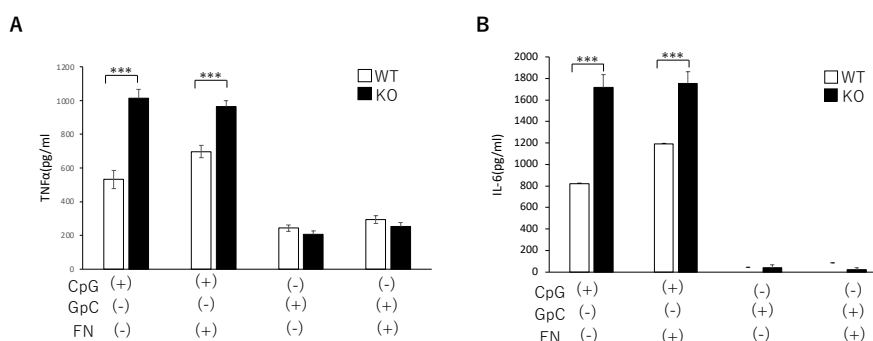


図3 固相化FN上で野生型およびgp49B欠損型MGを培養し、さらに自然免疫系を模すために非メチル化オリゴヌクレオチドCpGもしくはそのコントロールとしてGpCを添加することでトル様受容体9の刺激を行った。24時間後に培養上清を回収し、TNF- $\alpha$  (A)とIL-6 (B)についてELISA法にて産生量を測定した。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$

(4) 本研究の過程でMGにおいて新しいミエロイド免疫チェックポイントが機能している可能性が生理的リガンドとともに発見され、現在ヒト末梢血単球などを対象に基礎的検討を進めているが、知財の関係で詳細は報告できない。本件も今後の応用研究や創薬への展開が期待される。

#### <引用文献>

1. Kamphuis W et al. Transcriptional profiling of CD11c-positive microglia accumulating around amyloid plaques in a mouse model for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2016 Oct;1862(10):1847-60. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.07.007.
2. Zöllner T et al. Aged Mouse Cortical Microglia Display an Activation Profile Suggesting Immunotolerogenic Functions. *Int J Mol Sci* 2018 Mar 1;19(3):706. doi: 10.3390/ijms19030706.
3. Sasaguri H et al. APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J* 2017 Sep 1;36(17):2473-2487. doi: 10.15252/embj.201797397.
4. Milner R & Campbell IL. The Extracellular Matrix and Cytokines Regulate Microglial Integrin Expression and Activation. *J Immunol.* 2003 Apr 1;170(7):3850-8. doi: 10.4049/jimmunol.170.7.3850.
5. Welser-Alves JV et al. Microglia use multiple mechanisms to mediate interactions with vitronectin; non-essential roles for the highly-expressed  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  integrins. *Journal of Neuroinflammation.* 2011 Nov 10;8:157. doi: 10.1186/1742-2094-8-157.
6. Plow EF et al. Ligand binding to integrins. *Journal of Biological Chemistry.* 2000; 275(29):21785-8.
7. Lucin KM & Wyss-Coray T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron* 2010; 64(1):110-122.
8. 澤田健 高齢認知症におけるミクログリアと前シナプスタンパク. *日本生物学的精神医学会誌* 2021; 32(1):33-37.
9. Arend H, Sikkema AH et al. Fibronectin aggregates promote features of a classically and alternatively activated phenotype in macrophages. *J Neuroinflammation* 2018; 15:218.
10. Doi Y et al. Microglia Activated with the Toll-Like Receptor 9 Ligand CpG Attenuate Oligomeric Amyloid  $\beta$  Neurotoxicity in in Vitro and in Vivo Models of Alzheimer's Disease. *Am J Pathol.* 2009; 175(5):2121-2132.
11. Maria E Gambuzza M et al. Toll-like receptors in Alzheimer's disease: a therapeutic perspective. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2014; 13(9):1542-58.

## 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 3件）

1. 著者名 Miyamoto S, Chiba T, Itoi S, Su MT, Takai T.	4. 巻 259
2. 論文標題 LILRB4/gp49B co-localize with integrin via fibronectin at focal adhesion sites on mast cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Tohoku J Exp Med	6. 最初と最後の頁 273-284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1620/tjem.2023.J001.	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 Su MT, Ono K, Kezuka D, Miyamoto S, Mori Y, Takai T.	4. 巻 Mar 14:35(3)
2. 論文標題 Fibronectin-LILRB4/gp49B interaction negatively regulates osteoclastogenesis through inhibition of RANKL-induced TRAF6/TAK1/NF-kB/MAPK signaling.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int Immu	6. 最初と最後の頁 135-145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxac051.	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 Itagaki F, Nakatsuka K, Sakai H, Endo S, Su M-T, Takai T.	4. 巻 Jul 7:35(7)
2. 論文標題 Fibronectin on target cells attenuates natural cytotoxicity of NK cells via myeloid immune checkpoint ILT3/LILRB4/gp49B	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int Immu	6. 最初と最後の頁 339-348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxad012.	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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 インテグリンの活性化剤、及びインテグリンの活性化阻害に関連する慢性炎症疾患の治療剤	発明者 高井俊行, 蘇 美慈	権利者 国立大学法人東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/013315	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 非公開	発明者 非公開	権利者 国立大学法人東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、非公開	出願年 2024年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	蘇 美慈  (Su Mei-Tzu)	台湾国立陽明交通大学・医学工学部・助教	

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			
米国	ワシントン大学セントルイス校			
その他の国・地域	台湾国立陽明交通大学			