

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592142

研究課題名(和文) 老化に伴う髄液のクリアランス低下により惹起される認知機能障害の病態解明と治療

研究課題名(英文) Pathogenesis and treatment of cognitive dysfunction induced by reduced clearance of cerebrospinal fluid associated with aging

研究代表者

宮嶋 雅一 (MIYAJIMA, Masakazu)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60200177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：髄液のクリアランスの低下は、有害物質の脳からの排泄が障害され、認知機能障害の原因として注目されている。老化による髄液のクリアランス低下と leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LRG) の発現に着目した。剖検脳では、LRG は大脳皮質のアストロサイトのと小脳のプルキンエ細胞に発現し、加齢によりその発現は増加していた。LRG を脳に過剰発現させたマウスでは、神経細胞変性と神経細胞の減少を認めた。LRG は脳の老化を促進する蛋白である事が明らかになり、LRG の発現を制御することにより、脳の老化を防止できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The function of LRG in the brain during aging and neurodegenerative diseases has not been investigated. Here, we observed hLRG expression in post-mortem human cerebral cortex. We then generated transgenic mice that over-expressed mouse LRG in the brain to examine the effects of mLRG accumulation. Our results show that in both humans and mouse brains, LRG increases with age. Increased LRG in neurons and glial cells was associated with mouse cerebral cortex neurodegeneration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、脳神経外科

キーワード：老化 髄液 認知機能障害 水頭症 クリアランス

1. 研究開始当初の背景

老化による髄液-間質液のクリアランスの低下は、髄液-間質液中のベータアミロイドなどの有害物質の脳内の蓄積を生じ、認知機能障害に関与していると考えられている。一方、髄液のクリアランスの低下は、脳室の拡大をきたし、脳の神経細胞や神経線維への物理的な圧迫と血流障害を生じ、認知障害、歩行障害、排尿障害を来す特発性正常圧水頭症 (iNPH) を生ずる。iNPH ではアルツハイマー病の合併を 31~50% に認め、両者の病態に関連がある事が推定されている。我々は髄液のプロテオーム解析を行い、iNPH 患者の髄液において発現が特異的に増加している蛋白 Leucine-rich 2-glycoprotein (LRG) を同定した。剖検脳では LRG は大脳深部皮質の常在性アストロサイトに発現を認め、加齢とともにその発現は増加する。一方、LRG が発現しているアストロサイトにおいては、水チャネル AQP4 の抗体による免疫反応が消失していた。最近、髄液は脳実質の間質液と自由に交通しており、髄液と間質液を脳の細胞外液として捉え、毛細血管より主に産生・吸収されていると考えられている。更に毛細血管周囲のアストロサイトは髄液-間質液の吸収・移動に重要な役割を演じていると考えられている。加齢とともに髄液吸収抵抗は増加し、髄液-間質液のクリアランスが低下するとされており、老化における LRG 発現の増加は、髄液と間質液のクリアランスの低下に関係していることが推察される。

2. 研究の目的

老化による髄液のクリアランス低下の原因が、加齢によるアストロサイトの LRG 発現の増加に起因していることを証明することを目的とする。これにより iNPH のみならず加齢に伴う認知症の発症機序の解明及び治療に新たな知見を与えるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 剖検脳大脳皮質の免疫組織染色：中枢神

経系以外の疾患 (対照) iNPH、アルツハイマー病 (AD)、認知症を伴うパーキンソン病 (PDD)、進行性核上性麻痺 (PSP) の剖検脳より組織切片を作製し、抗 LRG 抗体、アストロサイトを認識する抗 GFAP 抗体、血管内皮細胞を認識する抗 CD4 抗体、水チャネル抗 AQP1 & 4 抗体、抗リン酸化タウ抗体、抗ベータアミロイド抗体を用いて免疫組織染色を行った。

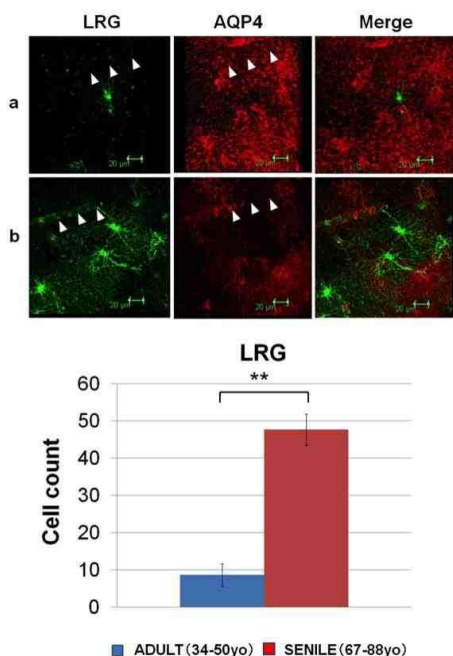
(2) マウス脳における LRG の局在と加齢による変化：マウス LRG の抗体を作製し、マウス大脳皮質 (4 週齢、8 週齢、48 週齢) における LRG の発現を免疫組織染色、Western blot 法と LRG 遺伝子の発現を in situ hybridization 法にて検討した。

(3) CAG-loxP-GFP-loxP-LRG ベクターを作製し、これをマウス卵に遺伝子導入し、CAG-loxP-GFP-loxP-LRG 遺伝子導入マウスを作製した。次にこのマウスと GFAP-Cre Tag マウスを交配し、GFAP プロモーターが活性化される細胞において、Cre 組換え酵素により GFP を除去し、LRG が過剰発現する double transgenic mouse (Tg) を作製した。脳組織での LRG 発現の確認は、RT-PCR 法とマウス LRG 抗体を用いた Western blot 法で行った。TG mouse と wild type mouse (WT) を用いて、生後 8 週及び 1 年での大脳皮質の形態学的変化を LRG 抗体、抗リン酸化タウ抗体と抗 neurofilament 抗体を用いて免疫組織染色にて比較検討した。

4. 研究成果

(1) 剖検脳 (対照) では、LRG は大脳皮質深部の常在性アストロサイトの細胞質及び突起と小脳のプルキンエ細胞に免疫反応を強く認めた。40-50 歳代と 70-80 歳代で比較すると、高齢者では大脳皮質深部の LRG 陽性アストロサイトは増加していた。一方同部位の水チャネル AQP4 陽性細胞は減少していた。(Fig.1) 近年、間質液と溶質のクリアランスの経路として、paravascular pathway

が注目され、この経路にアストロサイトの AQP4 が重要な役割を担っている事が報告されている。加齢により、AQP4 陽性のアストロサイトが LRG 陽性 AQP4 陰性の細胞に置き換わることが観察され、加齢による LRG 発現細胞の増加が、間質液と溶質のクリアランスの低下に関与していることが推察される。



a;50 歳, b;77 歳

(Fig.1)

(2) iNPH の剖検脳では、LRG 陽性のアストロサイトが対照と比較して増加していた。(Fig.2) 更に PDD と PSP では LRG 陽性のアストロサイトが著しく増加しており、アストロサイトの突起の先端まで免疫反応を強く認めた。また、一部の神経細胞にも LRG の免疫反応を認めた。(矢印) AD ではアストロサイトよりもむしろ神経細胞に強く LRG の免疫反応を認めた。(Fig.2A) 各顕微鏡視野の LRG 陽性の細胞数は、対照と比較して、iNPH, PDD, PSP で有意に増加していた。(Fig.2B)

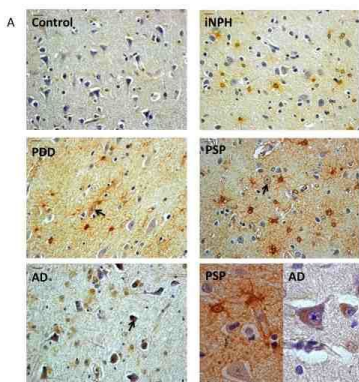
(3) 生後 4 週齢、8 週齢と 48 週齢のマウス大脳皮質の LRG 免疫染色では、4 週齢と 8 週齢のマウスでは僅かに神経細胞とグリア

細胞内に LRG の免疫反応を認めるのみであるが、生後 48 週齢のマウスの神経細胞及びグリア細胞では、若年齢のマウスと比較して LRG の免疫反応を強く認めた。(Fig.3C) Western blot 法においても 4 週齢と 8 週齢と比較して 48 週齢では LRG 蛋白の著しい増加を認めた。(Fig.3A,B) また、LRG の in situ hybridization でも 4 週齢と 8 週齢に比較して、48 週齢のマウスの大脳皮質では LRG mRNA の発現の増加を認めた。(Fig.3D) 即ち、ヒトの大脳皮質と同様に、マウスの大脳皮質の神経細胞及びグリア細胞内に LRG の発現を認め、加齢により LRG の発現は増加することが明らかとなった。

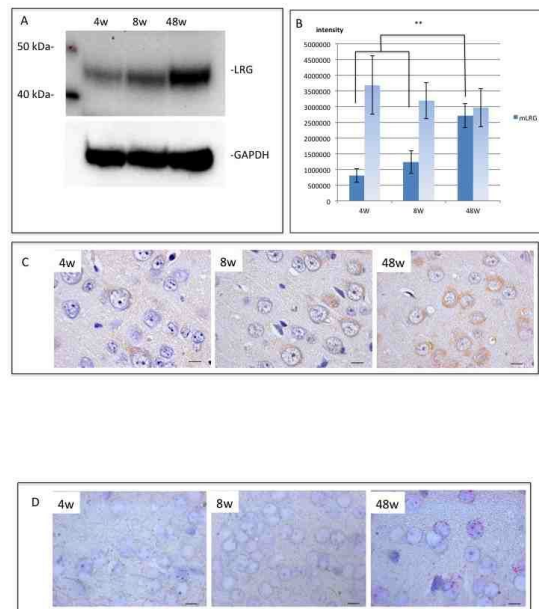
(4) 脳に特異的に LRG を過剰発現する Tg を作成し、その中で、出生直後に運動機能の障害のない LRG の発現が比較的軽度な Tg マウスを対象として、病理組織学的に解析した。8 週齢 Tg の肉眼所見は、WT と比較して大脳が小さく、一方脳幹及び小脳の大きさは同等であった。(Fig.4A) 断面では、大脳皮質及び海馬は WT と比較して小さく非薄化していた。しかし、脳の形態の異常は認めなかった。(Fig.4B) 48 歳では、更に大脳皮質は非薄化し、軽度の脳室拡大を認め、大脳萎縮を呈していた。(Fig.4C) 組織学的には生後 8 週齢の Tg の大脳皮質は 6 層構造は保たれていたが、WT と比較して非薄化し、細胞数の減少を認めた。LRG は大脳皮質、基底核、視床、視床下部、脳幹の神経細胞とグリア細胞に、小脳のプルキンエ細胞、グリア細胞と小脳核の神経細胞に広範囲に発現を認めた。大脳皮質での LRG の発現は WT と比較して Tg で著明に増加している事が確認された。(Fig.4D) この傾向は 8 週齢の Tg で顕著に認めた。(Fig.4E) 抗リン酸化タウ抗体を用いた免疫組織染色は、生後 8 週齢の大脳皮質では、WT と比較して Tg で、タウ陽性の神経細胞とグリア細胞は著明に増加していた。(Fig.5) 抗 neurofilament 抗体を用いた免疫染色では、

Tgの神経細胞は、樹状突起が太く蛇行しており、神経原性変化を疑わせる所見を呈していた。(Fig.6) 抗 NeuN 抗体を用いた免疫染色では、NeuN 陽性の神経細胞の数は、4週から8週齢では、WTとTgでは顕著な差を認めなかったが、48週齢ではTgで、神経細胞の減少を認めた。(Fig.7) これらのマウスの実験により、LRGの脳における過剰発現は、神経細胞変性の促進、神経細胞の減少とグリア細胞の活性化を呈する事が明らかとなった。

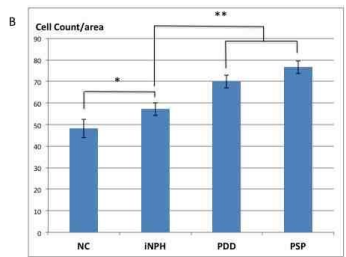
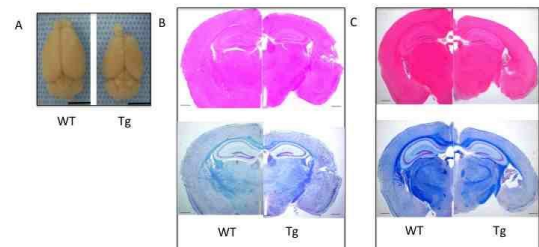
高齢者における大脳皮質でのLRGの発現増加は、髄液-間質液のクリアランス機能の低下に関与することが推察され、脳の老廃物のクリアランスの低下が神経細胞の機能低下や細胞死を惹起し、認知症や神経変性疾患の病期の進行に深く関与していると考えられる。LRGは、髄液-間質液のクリアランス低下により、老化を促進する蛋白である事が初めて明らかになった。高齢者や神経変性疾患の大脳皮質では、LRGの発現は著しく増加しており、LRG発現を制御することができれば、脳の老化を防止できる可能性が示唆される。



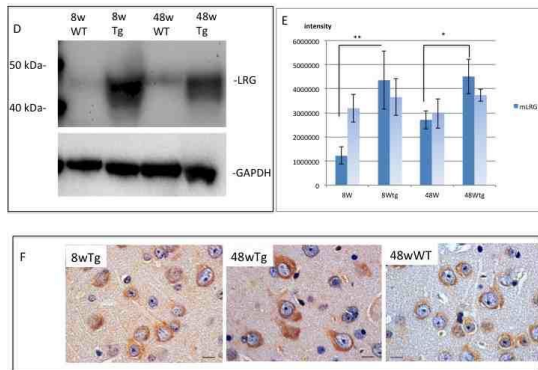
(Fig.2)



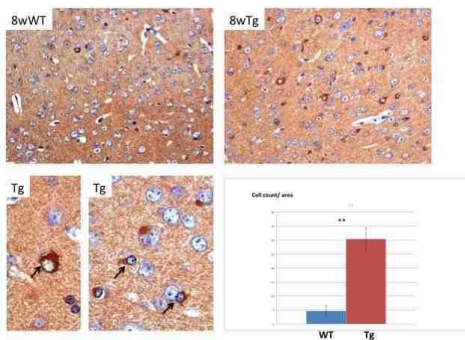
(Fig.3)



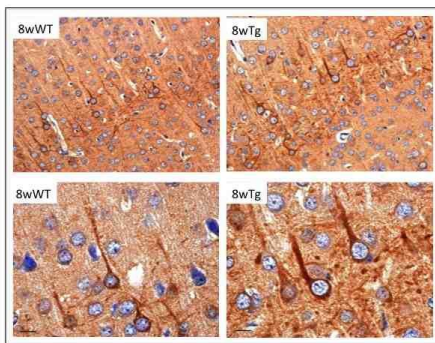
(Fig.2)



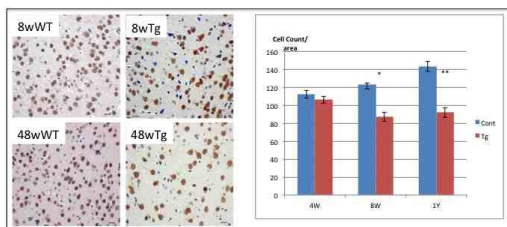
(Fig.4)



(Fig.5)



(Fig.6)



(Fig.7)

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2件)

1. Miyajima M, Nakajima M, Motoi Y, Moriya M, Sugano H, Ogino I, Nakamura E, Tada N, Kunichika M, Arai H : Leucine-rich 2-glycoprotein is a novel biomarker of neurodegenerative disease in human cerebrospinal fluid and causes neurodegeneration in mouse cerebral cortex. PLoS One. 2013 Sep 18;8(9):e74453
2. Nakajima M, Miyajima M, Ogino I, Watanabe M, Hagiwara Y, Segawa T, Kobayashi K, Arai H: Brain localization of leucine-rich 2-glycoprotein and its role. Acta Neurochir Suppl.113: 97-101, 2012

[学会発表](計1件)

1. Miyajima M: Leucine-rich 2-glycoprotein (LRG) is a novel biomarker of neurodegenerative disease in human cerebrospinal fluid and causes neurodegeneration in mouse cerebral cortex. Hydrocephalus 2013, Athens, July, 201

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮嶋 雅一 (MIYAJIMA, Masakazu)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60200177