

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：34306
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24590222
 研究課題名(和文)アルツハイマー病治療への臨床応用を目指した骨髄由来ミクログリア様細胞移植の解析

 研究課題名(英文)Transplantation of bone marrow-derived microglia-like cells for the new cell therapy against Alzheimer's disease

 研究代表者
 高田 和幸(Takata, Kazuyuki)

 京都薬科大学・薬学部・助教

 研究者番号：10434664

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳内amyloid- β (A β)除去がアルツハイマー病(AD)の根本的治療として期待される。脳構成細胞の一つであるミクログリアはA β の貪食機能を有する。本研究では、骨髄細胞由来ミクログリア様細胞を用いたAD細胞治療法の開発に向けた研究を実施した。マウスやヒト骨髄細胞をM-CSFで刺激すると、ミクログリア様A β 貪食細胞へと分化し、脳室内や尾静脈からの投与により、一部の細胞が脳実質内に移行した。脳室内移植では脳内のA β 量は減少したが、尾静脈移植ではA β 量の減少や空間記憶学習の改善作用は検出できなかった。ミクログリア様細胞の効率的な脳実質移行が、AD細胞治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Clearance of amyloid- β (A β) from the brains of patients with Alzheimer's disease (AD) has been expected to be a disease-modifying therapy. Microglia are immune cells in the brain and have an ability of A β phagocytosis. In this study, we demonstrated that mouse or human bone marrow cells are able to differentiate into microglia-like cells by the stimulation of M-CSF and indicate the ability of A β phagocytosis. By the administration of bone marrow cell-derived microglia-like cells into lateral ventricle or tail vein, a part of cells moves to the brain parenchyma. Furthermore, the intra-ventricle injection of the cells decreases brain A β level, while the injection from the tail vein does not attenuate the brain A β burden and deficit of spatial learning and memory. More efficient delivery of bone marrow-derived microglia-like cells into the brain parenchyma will be the crucial key for the development of the disease-modifying therapy against AD.

研究分野：神経科学

 キーワード：移植・再生医療 神経科学 痴呆 トランスレーショナルリサーチ 脳神経疾患 アルツハイマー病
 ミクログリア 骨髄幹細胞

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は加齢とともに発症頻度が著しく高まる進行性の認知機能障害である。現在実施されている AD に対する薬物治療は対症療法であり、発症機序に基づく根本的治療法の早急な開発が望まれる。

AD 脳において認められる老人斑はアミロイドタンパク質 (A β) が細胞外で蓄積して形成されるが、この脳内 A β 蓄積は AD 病態形成における原因または誘導因子として捉えられている。すなわち、脳内 A β 蓄積の早期発見ならびに早期除去が AD の有効な根本的治療になり得ることが期待されている。

これまで研究者らは、脳構成細胞の一つであるミクログリアが A β を貪食して脳内 A β 除去に働くことを報告してきた。一方、加齢とともにミクログリアも老化して機能不全に陥る可能性が報告されている。そこで、研究者は内在性ミクログリアの機能促進だけでなく、外来性ミクログリアの移植療法を提案し、その有効性を見出した。しかしながら、臨床応用に際してヒトのミクログリア調製・調達は困難である。

骨髄幹細胞は体内の様々な細胞に分化誘導できる多能性幹細胞である。そこで研究者らは、骨髄細胞由来ミクログリア様細胞を用いた AD 細胞治療法の開発を目指した本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、骨髄幹細胞に着目し、薬物処置によるミクログリア様の A β 貪食細胞への効率的な分化誘導法を解析する。さらに得られた骨髄由来細胞を AD モデル動物へ移植し、脳内 A β 除去に対する有効性・安全性とメカニズムを解析する。本研究の目的は、AD における骨髄由来細胞移植という独創的な根本的治療法の開発を目指し、臨床応用へ向けた基盤を構築することである。

3. 研究の方法

(1) マウス骨髄細胞採取と分化誘導

マウスの大腿骨から骨髄細胞を採取し、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) で刺激後、フローサイトメトリーを用いて細胞の分化状態を解析した。ミクログリアマーカーとして ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) および CD11b を指標とした。

(2) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた A β 貪食機能の解析

マウスおよびヒト骨髄細胞を M-CSF で刺激後、A β 1-42 (A β 42) を 12 時間処置した。細胞表面をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄、4% PFA で固定後、細胞を抗 Iba1 抗体、抗 CD11b 抗体、ならびに抗 A β 抗体と反応させた。その後、蛍光標識二次抗体で処置して共焦点レーザー顕微鏡を用いて A β 貪食を解析した。

(3) 細胞の脳室内投与と脳移行性の解析
EGFP マウス由来の骨髄細胞または M-CSF を 3 日間処置してミクログリア様細胞に分化させた骨髄由来細胞をリン酸緩衝生理食塩水を用いて 1.0×10^6 cells / 5 μ l に調製し、野生型マウスの脳室内に移植した。移植 7 日後の脳組織切片 (6 枚/マウス) を抗 GFP 抗体で染色後、脳室内エリアおよび脳実質エリア (脳室から 50 μ m 以上離れた部位) に分けて、GFP 免疫反応陽性細胞 (移植細胞) 数を計測した。

(4) 細胞の尾静脈投与と脳移行性の解析
M-CSF を処置していない EGFP マウス由来の骨髄細胞と M-CSF を 3 日間処置してミクログリア様細胞に分化させた骨髄由来細胞をリン酸緩衝生理食塩水を用いて 1.0×10^7 cells / 500 μ l に調製し野生型マウスの尾静脈から移植した。この細胞移植の 20 分前に脳実質内への薬物透過性を促進することが報告されているマンニトール (2.2 g / kg) を尾静脈から投与し、対照群にはリン酸緩衝生理食塩水を投与した。また移植 7 日後に脳組織切片 (55 枚/マウス) を抗 GFP 抗体で染色後 GFP 免疫反応陽性細胞 (移植細胞) 数を計測した。移植細胞の局在については GFP の免疫反応性を、血管マーカーとして P 糖タンパク質の免疫反応性を指標に移植細胞の詳細な局在を解析した。

(5) 細胞の脳室内および尾静脈投与と脳 A β の解析

脳室内投与では、12 カ月齢の遺伝子改変 AD モデルマウス (PS/APP マウス) に、 1.0×10^6 cells / 5 μ l に調製したマウス骨髄細胞および M-CSF 処置ミクログリア様細胞を投与した。移植から 28 日後に脳をサンプリングし、ギ酸で脳内の A β を抽出した。

尾静脈投与では、12 カ月齢の PS/APP マウスに 1.0×10^7 cells / 500 μ l に調製したマウス骨髄細胞および M-CSF 処置ミクログリア様細胞を投与した。移植から 28 日後に脳をサンプリングし、ギ酸で脳内の A β を抽出した。サンプルを専用の ELISA キットを用いて A β 1-40 (A β 40) ならびに A β 42 を定量した。

(6) モリス水迷路 (MWM)

12 ヶ月齢 PS/APP マウスにおいて、細胞移植前ならびに移植から 14 日後にそれぞれ MWM を行った。細胞移植は 1.0×10^7 cells / 500 μ l に調製したマウス骨髄細胞および M-CSF 処置ミクログリア様細胞を尾静脈より投与した。MWM 装置は円形のプールに水を張って使用した。シンプルな 4 つのマークをプール外の 4 方向にそれぞれ設置し、空間認識の手がかりとした。水面より 1.5 cm 下に透明のプラットフォームを一つ設置した。MWM トレーニングの期間には、プール内にプラットフォームを設置し、そこへたどり着くまでの時間を遊泳時間として測定した。こ

の試行を1日3回、4日間行った。計12回の試行終了一日後に、空間学習の保持を評価するためプローブ試験を行った。プローブ試験では、プール内のプラットフォームを取り除きマウスを自由に100秒間遊泳させて、トレーニング時にプラットフォームを設置していた区画の遊泳時間比率を測定した。

4. 研究成果

(1) 骨髄由来ミクログリア様細胞

マウス骨髄細胞の培養において、M-CSF 非存在下では、ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1)やCD11bなどのミクログリアマーカーを発現する細胞の日数依存的な変化はほぼ見られなかったが、M-CSF 処置により、培養3日目において7割以上の細胞がミクログリア様マーカー陽性細胞へと分化することがわかった(図1)。

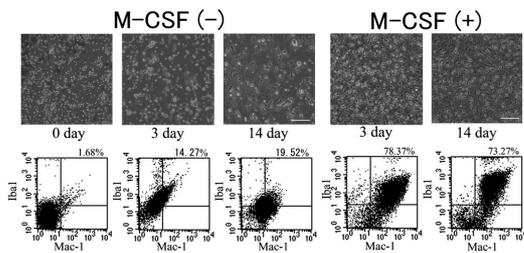


図1：マウス骨髄幹細胞由来細胞の分化
Scale bars = 200 μ m

(2) 骨髄由来ミクログリア様細胞のA β 貪食機能の解析

マウス骨髄幹細胞由来細胞にA β を処置し、その貪食機能について共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した(図2)。その結果、M-CSFを処置していないマウスならびにヒト骨髄由来細胞の中に少数のA β の貪食機能を有する細胞が存在していた。一方、M-CSFをしたマウス(3日間処置)およびヒト骨髄由来細胞(14日間処置)では、A β 貪食細胞の数が増加することがわかった。

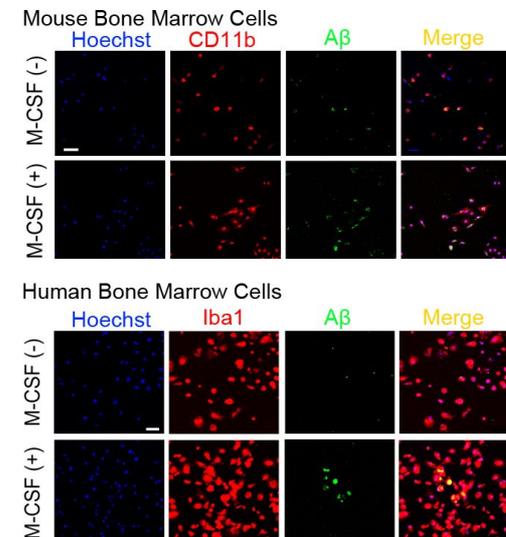


図2：マウスおよびヒト骨髄幹細胞由来細胞の分化
Scale bars = 50 μ m.

(3) 脳室内投与による骨髄由来細胞の脳実質移行性の解析

EGFP マウス由来の骨髄細胞を M-CSF を処置してミクログリア様細胞へと分化させた細胞と、M-CSF 非処置の骨髄細胞を野生型マウスの脳室内に移植した(図3)。移植7日後の脳組織切片(6枚/マウス)を抗 GFP 抗体で染色後(図3 A-D)、脳室内エリア(図3 Bおよび図3 Dの灰色のエリア)および脳実質エリア(脳室から 50 μ m 以上離れた部位: 3 Bの青色および3 Dの赤色のエリア)に分けて、GFP 免疫反応陽性細胞(移植細胞)数を計測した(3 E)。その結果、脳室内ならびに脳実質内のどちらの場合でも M-CSF を処置していない骨髄細胞において、その存在数が多いことが分かったが、ミクログリア様細胞も脳室内に移行できることが分かった。

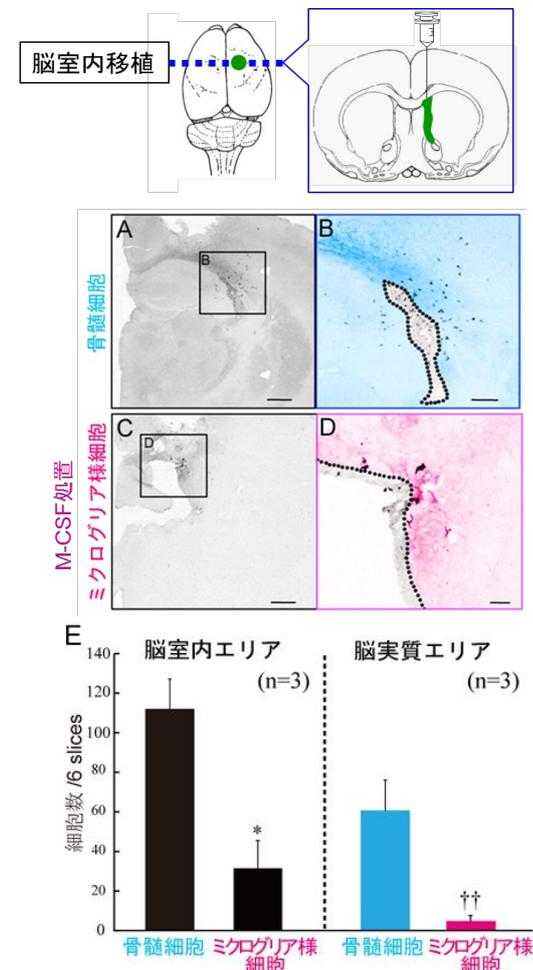


図3：EGFP マウス由来骨髄細胞およびミクログリア様細胞移植後の脳切片解析
Scale bar in A and C = 500 μ m. Scale bar in B = 200 μ m. Scale bar in D = 50 μ m. 各データは平均値 \pm 標準誤差で示し、有意差検定には student's t-test を用いた (* $P < 0.05$ vs. 脳室内骨髄細胞数, ** $P < 0.01$ vs. 脳実質内骨髄細胞数)

(4) 尾静脈投与による骨髄由来細胞の脳実質移行性の解析

M-CSF を処置していない EGFP マウス由来

の骨髄細胞と M-CSF 処置マイクログリア様細胞を野生型マウスの尾静脈から移植した。この細胞移植の 20 分前に脳実質内への薬物透過性を促進することが報告されているマンニトールを尾静脈から投与し、対照群にはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を投与した。(図 4)。尾静脈への骨髄細胞移植から 7 日後、移植細胞が脳血管や脳実質内に分布していることが検出され、さらにマンニトールの前投与が脳実質への移行性を高めることがわかった。脳実質領域に存在する細胞数は、骨髄細胞を移植した場合の方が、M-CSF 処置マイクログリア様細胞を移植した場合よりも多いことが明らかとなった。

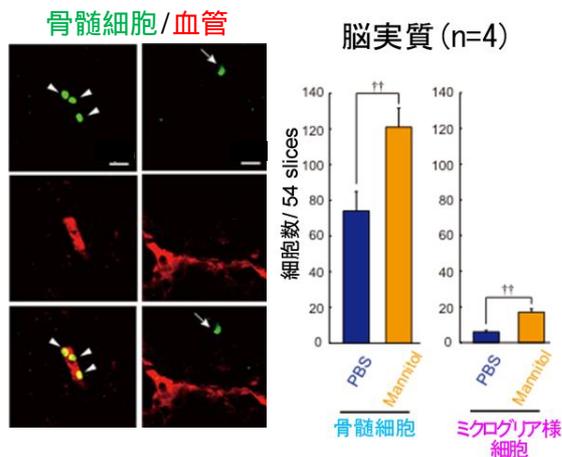


図 4 : 骨髄由来細胞の尾静脈投与後の脳内局在と細胞数 Scale bars = 10 μ m. 各データは平均値 \pm 標準誤差で示し、有意差検定には student's t-test を用いた ($\dagger\dagger P < 0.01$ vs. PBS 投与群), PBS : リン酸緩衝生理食塩水

(5) AD モデル (PS/APP) マウス脳室内への骨髄由来細胞移植による脳内 A β 量の変化 主要な A β 分子種である A β 1-40 (A β 40 : A) と A β 1-42 (A β 42 : B) を測定した (図 5)。その結果、それぞれの A β 量は PBS 投与群に比べ、骨髄細胞移植群およびマイクログリア様細胞移植群においてともに減少傾向であった。特に A β 42 量においてはリン酸緩衝生理食塩水投与群に比べ、細胞移植群では有意な減少が確認された。これらの結果から、脳室内に投与したマウスの骨髄細胞やマイクログリア様細胞は A β を貪食したことにより、脳内の A β が減少したことが示唆された。

(6) PS/APP マウス尾静脈からの骨髄由来細胞移植による記憶学習能力の変化 (MWM トレーニング) マウスから採取した骨髄細胞や M-CSF ミクログリア様細胞を PS/APP マウスの尾静脈から移植し、MWM を用いて空間学習記憶の習得能力について解析した (図 6)。細胞移植前の 12 ヶ月齢時のトレーニングの結果、PS/APP マウスは野生型マウスに比べゴール到達までの遊泳時間が有意に長く、空間学習記憶の習得能力が障害されていることわか

った (図 6 A)。移植から 14 日後の解析において、骨髄細胞移植群では空間学習記憶の習得能力の改善傾向がみられた (図 6 B)。

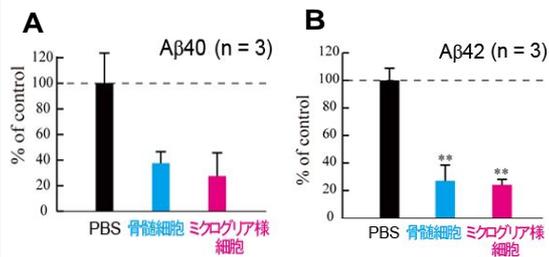


図 5 : PS/APP マウスの細胞移植による脳内 A β 量変化 (脳室内移植) 各データは平均値 \pm 標準誤差で示し、有意差検定には Bonferroni/Dunn 検定を用いた ($**P < 0.01$ vs. PBS 投与群), PBS : リン酸緩衝生理食塩水

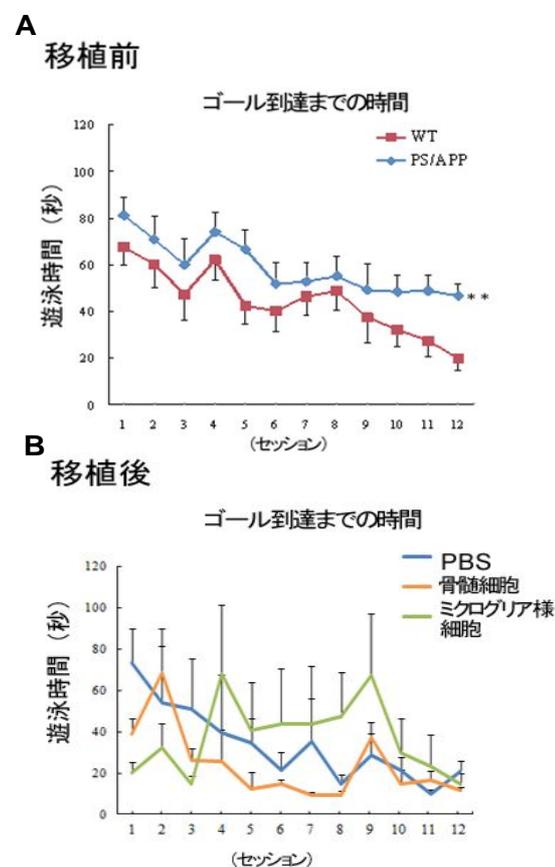


図 6 : 骨髄由来細胞移植 (尾静脈) による記憶学習能力への作用 (MWM トレーニング) 各データは平均値 \pm 標準誤差で示し、反復測定二元配置分散分析をおこない、後検定に Fisher's PLSD test を用いた ($**P < 0.01$ vs. WT)。WT: wild type mice, PBS: リン酸緩衝生理食塩水. n = 9 (WT), 9 (PS/APP), 3 (PBS), 3 (骨髄細胞), 3 (マイクログリア様細胞)

(7) PS/APP マウス尾静脈からの骨髄由来細胞移植による記憶学習能力の変化 (MWM プローブテスト) トレーニングが終了してから一日後、空間学習記憶の保持能力についてプローブテスト

を実施した(図7)。細胞移植前の12ヶ月齢のプロベテストの結果、PS/APPマウスは野生型マウスに比べ、ゴール周辺を泳ぐ時間の割合が小さく、空間学習記憶の保持能力が障害されていることがわかった(図7A)。移植から二週間後の解析において、骨髄細胞移植群では空間学習記憶の保持能力の改善傾向が強くみられた(図7B)。

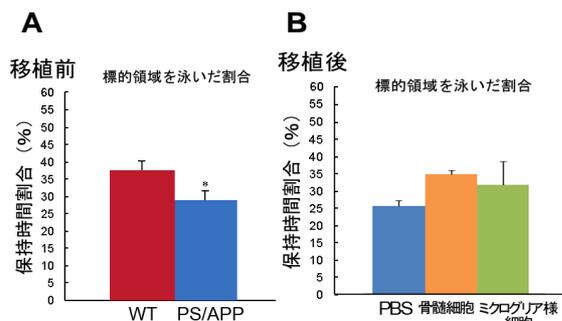


図4：骨髄由来細胞移植による記憶学習保持能力の解析(MWMプロベテスト) 各データは平均値±標準誤差で示し、移植前のデータの有意差検定には student's t-test を用い(* $P < 0.05$ vs. WT)、移植後の有意差検定には Bonferroni/Dunn 検定を用いた。WT: wild type mice, PBS: リン酸緩衝生理食塩水. n = 9 (WT), 9 (PS/APP), 3 (PBS), 3 (骨髄細胞), 3 (ミクログリア様細胞)

(8) PS/APPマウス尾静脈からの骨髄由来細胞移植による脳内A β 量の変化 骨髄由来細胞を移植して21日後、A β 40(図5A)とA β 42(図5B)を測定した結果、それぞれのA β 量はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)投与群に比べ、骨髄細胞移植群において減少傾向であったが、ミクログリア様細胞移植群において減少傾向が認められなかった。

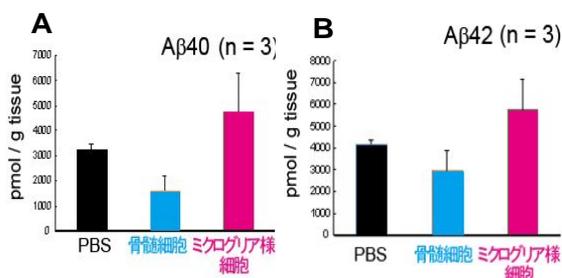


図5：PS/APPマウスの細胞移植による脳内A β 量変化(尾静脈移植) 各データは平均値±標準誤差で示し、有意差検定には Bonferroni/Dunn 検定を用いた。PBS: リン酸緩衝生理食塩水

本研究において、マウスやヒト骨髄細胞をM-CSFで刺激すると、ミクログリア様のA β 貪食細胞へと分化・誘導できることがわかった。さらに脳室内や尾静脈から骨髄細胞やミクログリア様細胞を移植すると、一部の移植細胞が脳実質内に移行することがわかった。細胞移植前にマンニトールを投与すると、末梢血からの細胞の移行性が若干ではあるが

有意に増加することも示唆された。しかし、ミクログリア様細胞の脳血管ならびに脳実質への移行数の定量化によって、ミクログリア様細胞の脳への移行性は骨髄細胞に比べて少ないことが明確となった。

PS/APPマウスを用いた、脳内A β 量や空間学習記憶能力に対する細胞移植の効果について、脳室内への骨髄細胞ならびにミクログリア様細胞の移植により、脳内のA β 量は減少することがわかり、特に神経障害性の高いA β 42については有意な減少であった。一方、尾静脈からの移植では、骨髄細胞の移植によって脳内A β 量の減少傾向がみられたが、ミクログリア様細胞の移植では減少傾向は認められなかった。このミクログリア様細胞の結果は、脳室内移植の場合と矛盾しているが、これは、尾静脈からの移植と比べて、ミクログリア様細胞移行数の絶対量が脳室内移植において多いことが理由として考えられる。空間学習記憶解析において、骨髄細胞の尾静脈移植により改善傾向が認められたが、ミクログリア様細胞の移植では改善傾向は認められなかった。やはり、ミクログリア様細胞の脳移行性の低さが原因として考えられる。以上の結果より、末梢血管からの細胞移植では、骨髄細胞の移植が脳内A β の除去や空間学習記憶の改善に有効であることが示唆された。しかし、脳室内移植の結果より、ミクログリア様細胞を脳実質に移行することができれば、より有効な移植細胞として利用できることも示唆された。今後は細胞の脳移行性を高めるための研究が重要であることが判明した。

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5件)

Kazuyuki Takata, Florent Ginhoux: Poised for action: USP18 restrains microglial activation in the white matter. EMBO J. 査読無, 34, 1603-1605 (2015) DOI: 10.15252/embj.201591899.

高田 和幸: アルツハイマー病の根本的治療を目指した治療標的の探索と双方向性橋渡し研究. 薬学雑誌, 査読有, 133, 1389-1399 (2013). https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/133/12/133_13-00219/_article/-char/ja/

Masatoshi Inden, Kazuyuki Takata, Kaneyasu Nishimura, Yoshihisa Kitamura, Eishi Ashihara, Kanji Yoshimoto, Hiroyoshi Ariga, Osamu Honmou, and Shun Shimohama: Therapeutic effects of human mesenchymal and hematopoietic

steam cells on rotenone-treated parkinsonian mice. *J. Neurosci. Res.*, 査読有, 91, 62-72 (2013).
DOI: 10.1002/jnr.23128.

Kazuyuki Takata and Yoshihisa Kitamura: Molecular approaches to the treatment, prophylaxis, and diagnosis of Alzheimer's disease: tangle formation, amyloid- β , and microglia in Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Sci.*, 査読有, 188, 331-337 (2012).
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/118/3/118_11R10FM/_article

Kazuyuki Takata, Tetsuya Takada, Aina Ito, Mayo Asai, Manami Tawa, Yuki Saito, Eishi Ashihara, Hidekazu Tomimoto, Yoshihisa Kitamura, and Shun Shimohama: Microglial amyloid- β 1-40 phagocytosis dysfunction is caused by high mobility group box protein-1: implications for the pathological progression of Alzheimer's disease. *Int. J. Alz. Dis.*, 査読有, 2012, 1-11 (2012).
DOI:10.1155/2012/685739.

〔学会発表〕(計8件)

河西 翔平、高田 和幸ら: M-CSFを処置した骨髄由来アミロイド 貪食細胞の加齢に伴う機能変化の解析. 日本薬学会第135年会 (神戸学院大学ほか, 兵庫県, 神戸市) 2015.3.25-28.

Kazuyuki Takata, et al: Microglia as a therapeutic target for Alzheimer's disease. Monthly Neuroscience Seminar in Faculty of Medicine & Health Science, University Putra Malaysia (Serdang, Malaysia), 2014. 10.15.

杜氏 裕美子、高田 和幸ら: アルツハイマー病の細胞治療法開発に向けた骨髄由来細胞のA β 貪食機能と内在性ミクログリアへの作用解析. 日本薬学会第134年会 (ホテル日航熊本ほか, 熊本県, 熊本市) 2014.3.27-30.

Kazuyuki Takata et al: Microglia-like monocytic cells derived from bone marrow cells phagocytose amyloid- β and facilitate phagocytosis of amyloid- β by resident microglia. American Society of Hematology (ASH) 55th annual meeting (New Orleans, USA), 2013. 12. 7-10.

高田 和幸ら: M-CSF刺激による造血幹細胞からのアミロイド 貪食細胞への分化誘導. 第75回日本血液学会学術総会 (ロイトン札幌ほか, 北海道, 札幌市) 2013.3.21-23. 2013.10.11-13.

高田 和幸: アルツハイマー病の根本的治療を目指した治療標的の探索と双方向性橋渡し研究. 日本薬学会第133年会 (パシフィコ横浜, 神奈川県・横浜) 2013.3.27-30.

高田 和幸ら: アルツハイマー病克服に向けたトランスレーショナルリサーチ. 第86回日本薬理学会 (福岡国際会議場, 福岡県, 福岡市) 2013.3.21-23.

Kazuyuki Takata et al: Monocytes derived from bone marrow cells by macrophage colony-stimulating factor treatment effectively phagocytose amyloid- β . ISEH-Society for Hematology and Stem Cells-41st Annual Scientific Meeting (Amsterdam, Netherlands) 2012. 8.23-26..

〔図書〕(計2件)

Kazuyuki Takata, Shohei Kawanishi, Yumiko Touji, Tetsuya Takada, Yoshihisa Kitamura, and Eishi Ashihara: Development of Cell Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Using Animal Models. *Animal Models in Human Disease: Applications, Outcomes and Controversies*, Edited by Sean A. Murray, pp. 87-103, NOVA Science Publishers (2013).

Kazuyuki Takata and Yoshihisa Kitamura: Chapter 8: Microglial functions against amyloid- β accumulation in brains of Alzheimer's disease. *Microglia: Biology, Functions and Roles in Disease*, Edited by Charanjit Kaur and Ling Eng-Ang, pp. 153-165, NOVA Science Publishers (2012).

〔その他〕

ホームページ等
<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/seiri/seiri-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 和幸 (TAKATA, Kazuyuki)
京都薬科大学・病態生理学分野・助教
研究者番号: 10434664

(2) 研究分担者

北村 佳久 (KITAMURA, Yoshihisa)
京都薬科大学・病態生理学分野・准教授
研究者番号: 60195295