

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24659352

研究課題名(和文) 神経変性疾患モデルにおける神経免疫システムの解析と治療応用の検討

研究課題名(英文) Analysis and therapeutic application of the neuroimmune system in the neurodegenerative disease models

研究代表者

松村 晃寛 (Matsumura, Akihiro)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20464498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はアルツハイマー病(AD)の複数モデル動物を用いた動物実験により神経変性時の生体反応としてのミクログリアを中心とした神経免疫システムの変化を解析し、その神経保護作用の解明と治療応用を目的として開始した。海馬へのアミロイド(A β)打ち込みモデルマウスを用いた実験では貪食マーカーCD68陽性ミクログリアのA β 沈着部への集積とA β 貪食像を認めた。またADトランスジェニックマウス(APdE9マウス)を用いた実験では脳内A β 沈着部への活性型ミクログリアの集積を認め、病初期にはミクログリアの α 7型ニコチン性アセチルコリン受容体(α 7nAChR)発現が増強し、進行期にはCD68の発現増強を認めた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we analyzed the change of neuroimmune system (e.g. microglia) as the reaction to the neurodegeneration to elucidate the neuroprotective effect of that and apply the result to new therapeutic strategy. We observed accumulation of CD68 (which is phagocytic marker) positive activated microglia at A β deposition sites in the brain of an intra-hippocampal A β -injected mouse model of AD. Those phagocytosed A β deposition early after A β injection. By contrast, we observed the gradual increase of activated microglia accumulation at A β deposition sites in the brain of AD transgenic model mice (APdE9 mice). In the early stage of AD-like pathology, alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor (α 7nAChR) in microglia was upregulated. On the other hand, CD68 was significantly increased in the late stage of AD-like pathology.

研究分野：神経内科

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド トランスジェニック ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性神経変性疾患の大半は今なお原因・病態とも未解明で根治療法も確立していないが、病態の一部が判明しているものや対症療法が考案されているものもある。例えばアルツハイマー病は脳内にアミロイド (A) が蓄積し老人斑を形成して、それが病態に関与していることが知られており、認知症状がアセチルコリン(ACh)濃度の減少に関連していることからコリンエステラーゼ阻害剤(ChEI)により脳内ACh濃度を上昇させる対症療法が現在認可されている。しかしA蓄積を防止したり減少させる方法は確立しておらず、ChEI治療をしても病態は進行する。

髄膜脳炎などの副作用から臨床治験が中止になってしまったが、アルツハイマー病においてはAペプチドを使用したワクチン療法によりAの減少と認知機能改善効果が確認されていた。そこで申請者らは免疫システムによるA除去作用の可能性、およびそれらの病態への関与や治療への応用の可能性に着目した。

(2) 神経変性と免疫系の関連では、神経細胞の変性・脱落とともにアストロサイトやミクログリアの活性化・増殖、サイトカイン放出などの多彩な応答が惹起されることが知られている¹⁾。アルツハイマー病とミクログリアの関連では、かつてはミクログリアにより神経死が誘発されるという説が見られた。しかし近年、アルツハイマー病剖検脳において老人斑へのミクログリアの集積が示され、培養ミクログリアによるA貪食能が確認されており²⁾、ミクログリアが神経保護的に作用している可能性が考えられる。また、脳内にAプラークを形成する遺伝子改変マウスに末梢よりマウス由来の骨髄幹細胞やヒト臍帯血細胞を移植すると、骨髄幹細胞はミクログリアに分化しAプラークに集積することも報告されている。しかしミクログリアを中心とした神経免疫システムと神経変性疾患の病態との関係は未だ解明されておらず、治療への応用の目処も立っていない。

2. 研究の目的

本研究では、疾患モデル動物を用いて生体内での神経変性時および治療介入時の脳神経系における免疫システムの動態を解析し、難治性神経変性疾患の病態論の本質に迫るとともに、従来見られないようなより根治的な新しい治療アプローチを考案することを目的とする。具体的にはアルツハイマー病の複数モデルの動物を用いた動物実験により(1)神経変性時の生体反応としてのミクログリアを中心とした神経免疫システムの経時的推移を解析し、その神経保護作用の解明を試み、続いて(2)薬理的治療や再生治療などの治療介入による神経免疫システムの変化を解析し、より有効かつ画期的な治療法を模索する。また可能であれば(3)神経免疫システ

ムの障害と神経変性疾患の病態の関連を考察し、病態の解明も試みる。

3. 研究の方法

(1) 海馬への急性Aβ投与マウスに対する経時的脳組織学的解析。

急性A投与マウスとして健常マウス海馬にヒトリコンピナントAペプチドを注入したモデルを作製し、注入1、3、7、14、28日後の脳組織学的解析を行った。

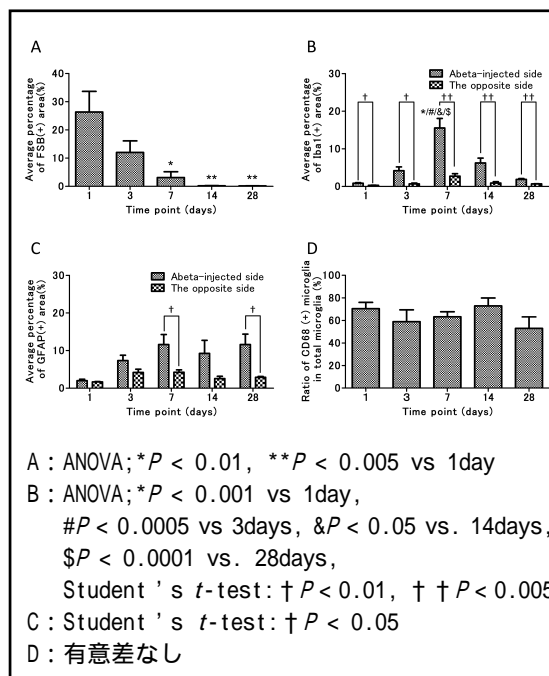
(2) ADトランスジェニックマウスに対する経時的脳組織学的解析。

ADトランスジェニックマウスとしてAPdE9マウスの繁殖を行い、生後3、6、9、12、18ヶ月の脳組織学的評価を行った。

(1)、(2)ともA、ミクログリア、アストロサイト、ニューロン、前シナプスのマーカーおよび活性型ミクログリアのマーカーであるCD68や7nAChRによる免疫染色像、および蛍光多重染色像を観察した。得られた脳組織画像は画像解析ソフトImage Jを用いて染色陽性領域面積などを測定し、定量的に評価した。

4. 研究成果

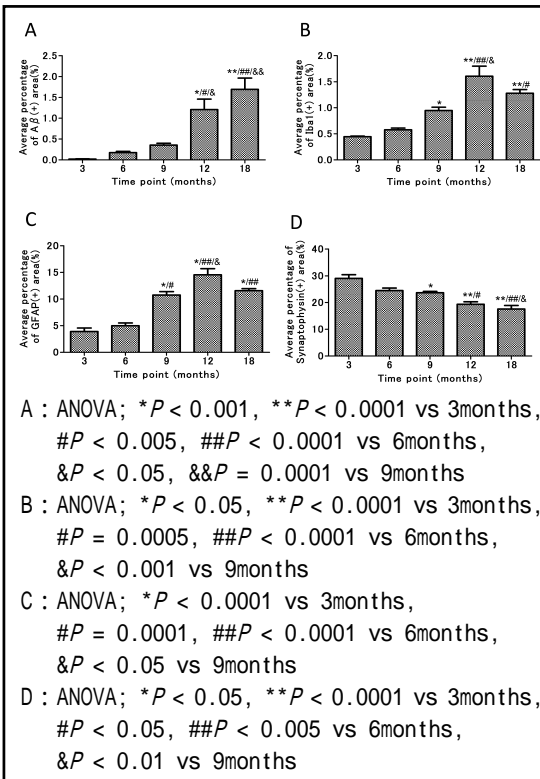
(1) 急性A投与における脳組織学的解析 (各染色陽性面積の比較)



マウス脳へのA注入に対して早期から活性型ミクログリアが集積し、貪食を推測させるような重なり像を認め、A沈着が経時的に縮小したことから*in vivo*においてもミクログリアにはA貪食によるクリアランス作用があると考えた(図1A、B)。一方、アストロサイトはミクログリアより遅れてA注入3日後から集積したが貪食を推測させるような像は見られなかった(図1C)。CD68陽性

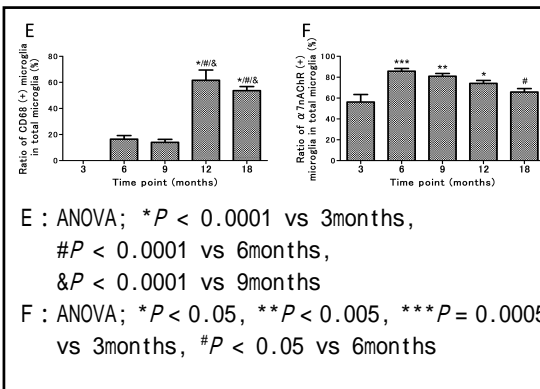
ミクログリアの割合は1日後から多く経時
的变化は認めなかった(図1D)。

(2) APdE9 マウスにおける脳組織学的評価
(2)-(a) 各染色陽性面積の比較



生後3ヶ月ではA β 蓄積を認めず6ヶ月から経時的にA β 沈着量が増加した(図2A)。ミクログリア・アストロサイトとも6ヶ月以降は腫大化してA β 周囲に集積し、生後12ヶ月まではA β 増加とともに集積面積が増大したが18ヶ月ではやや減少していた(図2B、C)。蛍光多重染色においてミクログリアはA β の貪食を推測させるような重なり像を認めたが、アストロサイトは重なりを殆ど認めなかった。前シナプス蛋白はA β 局在に関係なく経時的にびまん性に減少した(図2D)。

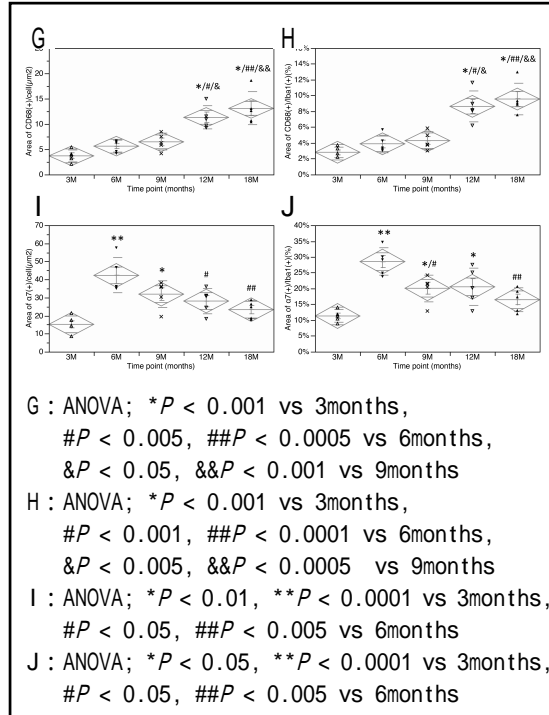
(2)-(b) ミクログリアにおけるCD68、および7nAChR陽性率の比較



CD68陽性ミクログリアはA β が沈着し始める生後6ヶ月から若干出現し、9ヶ月時点での割合は横ばいであったが12ヶ月から有意

な増加を認め、急性A β 投与マウスとは異なりミクログリアの活性化が2段階に変化していた(図2E)。また7nAChRを共発現するミクログリアは生後6ヶ月で有意に増加するが、以後は経時的に減少し18ヶ月では3ヶ月と差がなくなっていた(図2F)。

(2)-(c) ミクログリア中のCD68および7nAChR陽性面積の比較



ミクログリア(Iba1陽性細胞)中のCD68・7nAChR陽性面積はミクログリア1個あたりの面積(μm^2)およびミクログリア面積のうちCD68や7nAChR陽性面積が占める割合(%)という2通りの方法で算出した(図2G~J)。

ミクログリア1個あたりのCD68陽性面積やミクログリア面積のうちCD68陽性面積が占める割合はともに生後3ヶ月が最小で、6、9ヶ月でわずかに増加した後、12ヶ月以降で著明に増加した(図4G、H)。

一方、ミクログリア1個あたりの7nAChR陽性面積は生後6ヶ月で著明な増加を示した後、9ヶ月以降では経時的に減少した(図4I)。ミクログリア面積のうち7nAChR陽性面積が占める割合も6ヶ月で著明に増加した後、9ヶ月で減少した。12ヶ月は横ばいだったが18ヶ月でまた減少し、生後9ヶ月以降は病像の進行に伴いミクログリアの7nAChR陽性面積が減少する様子が確認された(図4J)。

以上のように、AD様病理像において、病初期の活性型ミクログリアでは α 7nAChR発現が増強し、進行期の活性型ミクログリアでは α 7nAChR発現の減弱化とCD68発現増強が認められた。

これまで7nAChR刺激によりミクログリアの産生する炎症性サイトカインが減少したという報告はあるが7nAChRとミクログリ

アの phenotype の関連について考察した報告はない。しかしニコチン曝露を続けた母マウスから産まれた新生児マウス由来の肺胞マクロファージ初代培養系の実験で alternative activation (M2) 優位性が認められたという報告がある³⁾。この報告において肺胞マクロファージは 7nAChR 刺激を介して M2 化すると結論づけられている。

一方、7nAChR と CD68 の関連について述べた過去の報告として、Terrando らはマウス脳に手術侵襲や lipopolysaccharide (LPS) を加えた際の CD68 陽性ミクログリアの集積が 7nAChR 選択的アゴニストにより抑制されると報告している⁴⁾。また Endo らは、術後イレウスモデルマウスにおいて 7nAChR 刺激作用を有する大建中湯投与が小腸筋層間における CD68 陽性マクロファージの集積を軽減させるが、7nAChR アンタゴニスト併用群や 7nAChR ノックアウトマウス群においては、大建中湯の CD68 抑制作用がみられないと報告している⁵⁾。これらの報告から 7nAChR 刺激によりミクログリアの CD68 発現が抑制されることが示唆される。

これらの知見を踏まえると、病初期には 7nAChR 強発現、CD68 軽度発現の活性型ミクログリアが主に可溶性 A のクリアランスに関与し、進行して線維型 A 沈着が増加すると CD68 強発現の活性型ミクログリアが線維型 A のクリアランスに関与しつつ炎症反応を引き起こしている可能性が推察される。従って、本研究の結果は AD の新規治療理論を考える上で重要な所見であったと考える。

<引用文献>

- 1) McGeer PL, McGeer EG The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 21, 1995: 195-218.
- 2) Takata K, Kitamura Y, Yanagisawa D et al. Microglial transplantation increases amyloid-beta clearance in Alzheimer model rats. *FEBS Lett.* 581(3), 2007: 475-478.
- 3) Wongtrakool C, Grooms K, Ping XD et al. In utero nicotine exposure promotes M2 activation in neonatal mouse alveolar macrophages. *Pediatr Res* 72, 2012: 147-53.
- 4) Terrando N, Yang T, Ryu JK et al. Stimulation of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor protects against neuroinflammation after tibia fracture and endotoxemia in mice. *Mol. Med.* 20, 2014: 667-675.
- 5) Endo M, Hori M, Ozaki H et al. Daikenchuto, a traditional Japanese herbal medicine, ameliorates postoperative ileus by anti-inflammatory action through

nicotinic acetylcholine receptors. *J. Gastroenterol.* 49, 2014: 1026-1039.

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1件)

Matsumura A, Suzuki S, Iwahara N, Hisahara S, Kawamata J, Suzuki H, Yamauchi A, Takata K, Kitamura Y, Shimohama S. Temporal Changes of CD68 and 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Expression in Microglia in Alzheimer's Disease-Like Mouse Models. *J. Alzheimers Dis.* 44(2), 2015: 409-423. 査読有り
DOI: 10.3233/JAD-141572.

[学会発表](計6件)

松村晃寛, 藤倉 舞, 岩原直敏, 真部建郎, 松下隆司, 鈴木秀一郎, 久原 真, 川又 純, 下濱 俊「APdE9 マウスにおけるミクログリア内のマーカーの発現の経時的推移」第34回日本認知症学会学術集会. 2015年10月2日~4日. リンクステーションホール青森(青森県青森市).

松村晃寛, 鈴木絃美, 山内綾乃, 岩原直敏, 鈴木秀一郎, 久原 真, 川又 純, 高田和幸, 北村佳久, 下濱 俊「Alzheimer 病モデル動物脳における microglia の経時的動態」第33回日本認知症学会学術集会. 2014年11月28日~12月1日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

松村晃寛, 鈴木絃美, 山内綾乃, 岩原直敏, 鈴木秀一郎, 久原 真, 川又 純, 江本美穂, 藤井博匡, 下濱 俊「電子常磁性共鳴法を用いたアルツハイマー病モデル動物における脳内酸化ストレスの解析」第55回日本神経学会学術大会. 2014年5月21日~24日. 福岡国際センター(福岡県福岡市).

松村晃寛, 鈴木絃美, 大橋乃理子, 岩原直敏, 鈴木秀一郎, 林 貴士, 齊藤正樹, 久原 真, 川又 純, 今井富裕, 下濱 俊, 佐々木祐典, 本望 修, 三國信啓, 高田和幸, 北村佳久「アルツハイマー病トランスジェニックマウスモデルにおける脳内グリア細胞の動態解析」第54回日本神経学会学術大会. 2013年5月29日~6月1日. 東京国際フォーラム(東京都).

松村晃寛, 鈴木絃美, 松下隆司, 鈴木秀

一郎, 林 貴土, 保月隆良, 齊藤正樹,
久原 真, 川又 純, 今井富裕, 下濱 俊,
本望 修, 高田和幸, 北村佳久「脳内アミ
ロイド」に対する脳内グリア細胞の動態
解析」第 53 回日本神経学会学術大会・
2012 年 5 月 22 日～25 日・東京国際フォー
ラム(東京都).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 晃寛 (MATSUMURA, Akihiro)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：2 0 4 6 4 4 9 8

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：