

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：58001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460479

研究課題名(和文) 認知症特異的リゾリン脂質シグナリング解明および改変による幹細胞治療

研究課題名(英文) Analyses of lysophosphatidic signaling for dementia and changing the signaling of neural stem cell for treatment

研究代表者

千葉 俊明 (CHIBA, SHUNMEI)

沖縄工業高等専門学校・生物資源工学科・特命教授

研究者番号：20367361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：認知症モデルマウスを用いて、リゾリン脂質シグナルの一つであるリゾフォスファチジル酸の影響を解析した。まずは、認知症モデルマウスのホモ同士を交配し、実験に用いる匹数を確保した。6か月齢での症状発現および12か月齢での海馬萎縮を組織学的に解析した。また、抽出した神経幹細胞はそのままでは増殖困難であったが、LPA投与により増殖が確認できた。12か月齢のメスマウスにおいて、LPA1シグナルを阻害するKi16425を2か月間経口投与し、認知機能の改善が見られた。投与群および非投与群の脳組織は解析中である。

研究成果の概要(英文)：We analysed the effect of LPA signaling for an dementia model of mice. Homozygous transgenic mice were mated, and bred for in vivo experiment. 6 monthes mice started showing a memory disturbance, and the hippocampus of 12 monthes mice was degenerated. The extracted neural stem cells from mice were not expandable as well, but LPA improved proliferation. Ki16425, as a inhibitor of LPA1 signaling, could improved the phenomenon of dementia in 12 monthes model mice. Though, we were now analysing the movement and changing of neural stem cells in the brain, LPA signaling, especially in LPA1 inhibiton could be a high-potential drug for dementia, like as Alzheimer`s.

研究分野：神経再生

キーワード：認知症 神経幹細胞 リゾリン脂質 神経再生 治療

1. 研究開始当初の背景

日本は長寿地域でありながら、生活様式の欧米化を契機に生活習慣病有病率が急増している。脂質代謝異常症はアルツハイマー病における危険因子として周知の事実であり、患者脳ではLPA合成酵素であるATXおよびLPA産生亢進がみられることやApoE4遺伝子と発症との因果関係がある事、実験的にもApoEとアミロイド 蛋白やタウ蛋白との相互作用がある事など、脂質代謝異常と認知症発症機序に関する知見も徐々に得られつつある。しかし、脳重量は体重の2%ながら体内の23%もの脂質を含む脳における上記などの脂質および脂質メディエーターの役割・意義に関しては、ほとんど解析されていない。

LPAが及ぼす細胞への生物学的活性としては、細胞増殖、生存率増加などのプラス(正)要素の報告がほとんどであるが、胚性幹細胞、神経幹細胞および腫瘍細胞を用いた最近の我々の経験では、リン脂質シグナルには受容体特異性があり、LPAで神経幹細胞への刺激を行なうと1型受容体は増殖性(正)に働き、かつ未分化維持に関与する事、逆に4型受容体は分化方向(負)に働く事がわかっている。また通常、LPAはSQ20B扁平上皮癌細胞株には増殖性に働くが、4型受容体を強制発現させた株では増殖抑制を示すことがわかっている。タウ型認知症モデルマウスを用いた我々の経験においては前脳・海馬・線条体などの神経萎縮・変性が6ヶ月齢から見られ始めると共に症状の発現もみられており、L-dopaや神経保護を目的としてカフェインなどの薬物に対しても症状の改善が見られなかった(Chiba S, Neurobio. Aging)。また、アルツハイマー型モデルマウスを用いた研究においても細胞移植のみでは機能改善を得がたいという知見を得ている。

現存する抗アセチルコリンエステラーゼ阻害薬および新規NMDA受容体阻害薬においても、進行期での認知症治療効果には乏しく原因治療にはならない。アミロイド 蛋白が主因と考え、原因治療法として、脳内で減少させる目的で開発された選択的抗体は非常に期待されたものの、その臨床治験により期待された効果が見られず、H24年の7月23日に開発中止になった。アルツハイマー病とアミロイドの関連性については、再考する必要がある、かつ既存の方法論に囚われない新規治療法の開発が急務であると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、患者脳内に高発現するATXおよび強力な脂質メディエーターであるLPAの役割・意義を受容体特異性の観点から解析することにより、認知症発症への関与・機序を明らかにする。LPAの正の作用は1型

受容体を介する事は既知であるが、本疾患では相反作用を示しているため、4型受容体の関与が示唆される。また、4型受容体下流にはRho-Racシグナルが存在し、アミロイドやタウ蛋白などで構成されている神経細胞骨格や形態変化に関与する事が脳腫瘍細胞でも報告されている。我々の解析でも、4型受容体によって細胞のRoundingや移動能低下および接着能の抑制が起きること、また、Rac1を抑制する事で強力な増殖抑制作用と前述の細胞変化を来す事を発見している。また、通常、神経再生が行なわれている海馬において、アルツハイマー病では神経幹細胞は存在するものの、神経再生が行われないう原因として、4型受容体発現レベル増強もしくはRac1の抑制の関与も示唆される。

また、これらのリン脂質シグナリングを利用した治療法の開発、および内在性幹細胞賦活化による神経再生を含む、既存の認知症治療にない新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) よりヒトのアルツハイマー病に近いモデルマウスの作製

当初予定していた、タウ型マウスおよびアミロイド型マウスによるTransgenic mouseの作製は、施設搬入基準に抵触する為、計画変更を行い、Jakson社より、APP(ヒトアミロイド)、PS1(Preselin1)、Tau(ヒト変異タウ)のTriple Transgenic mouse(B6;129-Psen1^{tm1Mpm} Tg(APPsw, tauP301L)1Lfa/Mjax)をホモで購入し、繁殖する。ゲノムPCRチェック等により、子孫の遺伝子組み換えの検証を行う。

(2) ヒト型アルツハイマー病モデル脳における行動評価ならびにATX、LPAおよびLPA1、4型受容体の発現解析

上記のAPP-Tau-Ps1 transgenic mouseにおける、3・6・12か月齢の脳組織解析(海馬を中心に)、および、水迷路による認知症行動解析を実施(表1)。また、同様にPCRにて、LPA signaling関連遺伝子の発現を解析した。

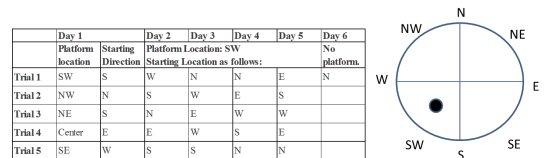


表1. 水迷路試験のプロトコール

(3) モデル脳より神経幹細胞の抽出と発現解析、LPA agonist/antagonistの効果判定

抽出した神経幹細胞を含む細胞懸濁液を、非接着性プレートに播種し、神経幹細胞の増

殖性を確認した。同様に LPA signaling 関連遺伝子の発現を PCR にて解析した。また、接着性プレートを用いて、LPA および Ki16425 を培地中に投与する事で、細胞増殖および細胞変化（突起の伸展など）を観察した。

（４）モデルマウスにおける上記薬剤の投与効果判定

（３）の結果より、Ki16425 が神経伸長へ正の効果がある事が分かったため、100mg/kg の濃度で Ki16425 を DMSO 水に溶かし（対照群は DMSO 水のみ、各 6 匹ずつ）自由水経口投与を行い、12 か月齢における認知症治療効果を判定した。また、行動評価後の脳組織において、神経幹細胞の脳内動向が観察出来る様に、効果判定の 10 日前から、両群に EdU の経口投与を行い、脳内神経幹細胞を標識した。

4. 研究成果

（１）よりヒトのアルツハイマー病に近いモデルマウスの作製

ホモのオスとメスの掛け合わせにより、理論上は、子孫はすべてホモマウスとなるが、F3 までの子孫に関しては、ゲノムチェックを行った（図 1）。いずれの遺伝子も脱落等なくホモマウスの作製・繁殖が可能であった。

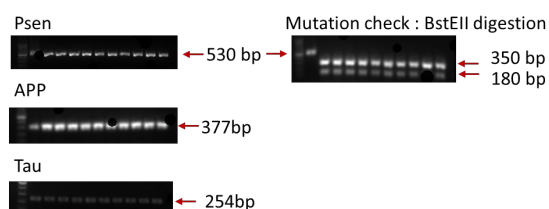


図 1. F3 子孫のゲノムにおける遺伝子組替え、変異の確認。

（２）ヒト型アルツハイマー病モデル脳における行動評価ならびに ATX、LPA および LPA1、4 型受容体の発現解析

水迷路試験においては、3 か月齢に比し、6・12 か月齢マウスは、記憶障害（実験最終日の platform zone 内の保続時間の減少 < sec/ 60 sec >）が見られた。

また、学習能力（実験日 2-5 日における Platform までの到達時間）に関しては、全ての月齢において、保持されていた。

それぞれの月齢マウスより、脳組織を回収し、cDNA を作製後、LPA signaling 関連遺伝子を検索した。LPA1 を含むいずれの遺伝子も、全ての月齢において、発現が確認された。月齢間でのそれぞれの遺伝子の発現量の差は確認されなかった。

（３）モデル脳より神経幹細胞の抽出と発現解析、LPA agonist/antagonist の効果判定

それぞれの月齢マウスより、脳室周囲組織を回収し、分散させた後、神経幹細胞用培地（DMEM/F12、bFGF、N2 supplement）にて非接着性培養した。若い月齢においても、神経塊の形成はあるものの、継代は困難であった（非遺伝子組み換えマウスでは、神経塊の形成と最低 3 回の継代が可能）。認知症モデルマウスにおける神経幹細胞には、何らかの性質変化がある事が分かった。

塊形成後に塊を回収し cDNA を作製後、LPA signaling 関連遺伝子を検索した。LPA1 を含むいずれの遺伝子も、全ての月齢において、発現が確認された。脳組織同様に、月齢間における、それぞれの遺伝子の発現量の差は同定できなかった。

LPA (10 μM) および Ki16425 (10 μM) を培地中に添加し、神経塊における継代評価および、接着・遊走能の変化を観察した。LPA 添加群では、継代培養が可能となった。また、Ki16425 投与群では、継代はできなかったが、神経塊からの接着と遊走が亢進した。本結果から考察し、認知症患者では神経幹細胞は存在するものの、有効に働かない（脳室周囲の SVZ 領域から海馬への移動ができない）事が、海馬の萎縮および症状発現に関与するとの我々の仮説において、Ki16425 を投与する事により、遊走能を惹起し、治療に用いる事が出来る可能性が確認された。

（４）モデルマウスにおける上記薬剤の投与効果判定

12 か月齢メスのマウスを 6 匹ずつ、Ki16425 投与群および非投与群（DMSO 水）に分けて投与し、水迷路を用いて 2 か月間の治療および効果判定を施行した。なお、方法にある様に、EdU を全例に経口投与を行い、行動解析後の神経幹細胞の動向を解析出来る様に標識した。

行動評価においては、学習能力は同様に保持されているものの、投与群（N=6）において Platform への到達時間の短縮（図 2 のデータは N=3）がみられ、かつ、記憶能力の改善（Platform 領域での保続時間の増加、図 3 <データは N=3 >）が見られ、仮説と同じように Ki16425 により、著名な治療効果が確認できた。

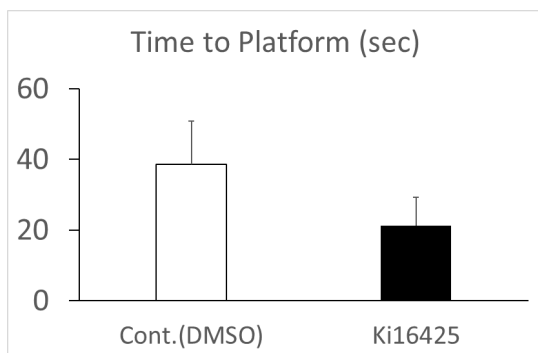


図 2. 学習能力とゴール達成による短期記憶

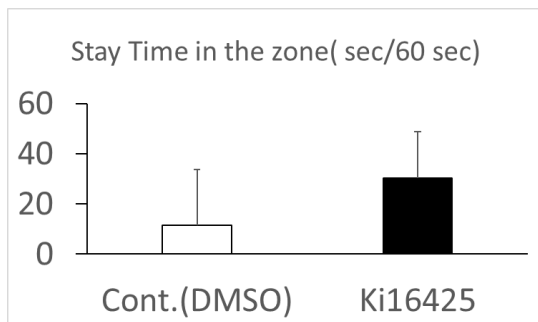


図 3. 長期記憶 (Platform なし環境における、設置領域の記憶保持試験)

行動解析後の脳組織を還流固定後に凍結保存した。脳切片を作製し、EdU 標識された神経幹細胞およびその遊走後の分化細胞を同定する予定であるが、クリオスタットの故障の為、脳スライス作製が困難であり、解析できない状況であった。本年7月より、クリオスタットが使用可能になる為、以後、解析を継続し、神経幹細胞の動向および治療効果判定を組織学的に検証する予定である。その後、速やかに論文化を計画している。

<引用文献>

Chiba S et.al, Loss of dopaminoreceptive neuron causes L-dopa resistant parkinsonism in tauopathy. *Neurobiol Aging*, 2012, 2491-2505.

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)

Matayoshi S, Chiba S, Lin Y, Arakaki K, Matsumoto H, Nakanishi T, Suzuki M, Kato S. Lysophosphatidic acid receptor 4 signaling potentially modulates malignant behavior in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol*. 42:1560-8. 2013.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.u-ryukyu.ac.jp/top_news/hot/research21_2012110801/

6. 研究組織

(1)研究代表者

千葉 俊明 (CHIBA, Shunmei)

沖縄工業高等専門学校・生物資源工学科・特命教授

研究者番号：20367361

(2)研究分担者

谷口 泰造 (TANIGUCHI, Taizo)

姫路獨協大学・薬学部分子病態学・教授

研究者番号：70346253