

アルツハイマー病治療法開発：新規アミロイド凝集抑制薬と高純度間葉系幹細胞移植治療

長井 篤

島根大学医学部 臨床検査医学

【研究の背景】

アルツハイマー病は認知症をきたす主要疾患であり、神経病理学的に神経細胞内の神経原線維変化と β タンパクがアミロイド線維として沈着することによる大脳皮質神経細胞死が原因と考えられている。神経細胞での β タンパク代謝や脳からの排除過程の変化を通してアミロイド凝集が生じるメカニズムについては不明な点が多く、根治療法の開発に至っていない。

【目 的】

認知症の主要な原因疾患であるアルツハイマー病 (Alzheimer disease: AD) の新規治療法開発の基礎的検討を行う。

- 1) AD の発症原因は脳内のアミロイド β タンパク凝集体 ($A\beta$) 沈着と考えられるため、医理工連携でアミロイド凝集抑制物質を作製し、AD モデル動物で治療効果を検討する。
- 2) AD の細胞再生医療研究として、ヒト間葉系幹細胞を用いた移植治療効果を、AD モデル動物で検討する。臨床応用を目指し、神経病理学的改善機序や神経毒性、体内動態を検討する。

【方 法】

- 1) $A\beta$ 凝集抑制技術開発: フタロシアニンおよびイリジウム錯体の合成と治療応用

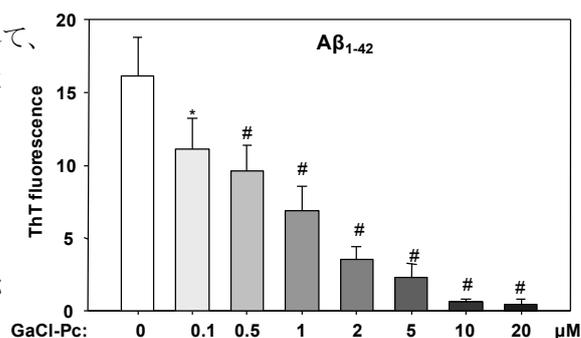
上記材料の置換基変更、ダイマー合成などで、科学的・構造的性質を変化させ、 $A\beta$ 凝集抑制の程度、脳内移行性、安全性などの最適な誘導体を合成する。In vitro で、 $A\beta$ との親和性、凝集抑制について、化学的・構造的に解析する。凝集抑制の確認された錯体について、AD モデル動物 (当大学で確立された $A\beta$ 注入モデルラットおよび APP トランスジェニックマウス) 脳内または静脈内投与を行い、体内・脳内の動態、 $A\beta$ との結合、 $A\beta$ 凝集抑制について、病理学的、分子科学的に検討する。

- 2) 幹細胞移植による再生医療

ヒト間葉系幹細胞を、AD モデル動物に脳室内移植、静注移植、回数など条件を変えて移植を行い、経時的に高次機能、病理的改善度、 $A\beta$ 凝集・沈着の程度、タンパク・遺伝子発現などを分析する。

【結 果】

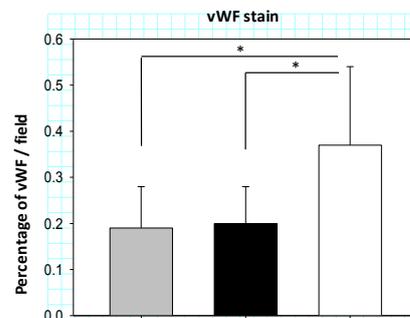
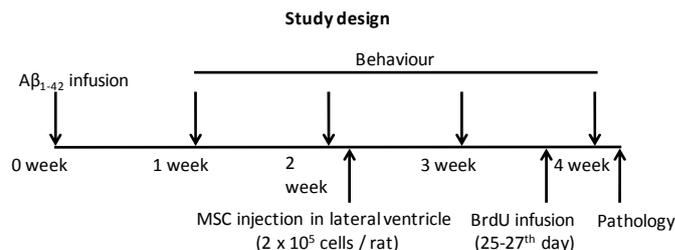
今回の研究では、試行錯誤の上 $A\beta$ のアミロイド凝集抑制物質として、Gallium phthalocyanine chloride (GaCl-Pc) を作製した。GaCl-Pc は thioflavin T (ThT) 蛍光色素で線維凝集レベルを測定すると、濃度依存性に $A\beta_{1-42}$ および $A\beta_{1-40}$ の凝集を抑制した (右図: $A\beta_{1-42}$)。更なる kinetic 分析では、凝集量を低下させるとともに、凝集の進行を遅らせる作用が確認された。また、あらかじめ凝集させた $A\beta$ に対して GaCl-Pc を添加すると濃度依存性にアミロイド線維を解離させることが示された。次に $A\beta$ が沈着した AD トランスジェニックマウス (AD モ



デルマウス) 脳病理標本を用いて、実際にアミロイドを分解するかどうか検討したところ、24 時間処理で $A\beta$ の免疫染色性は

有意に低下した。GaCl-Pc の神経毒性を検討した。神経細胞株である A1 cell を培養し、GaCl-Pc を添加して検討すると、神経細胞への取り込みはみられたが、明らかな神経細胞死は誘導されなかった。

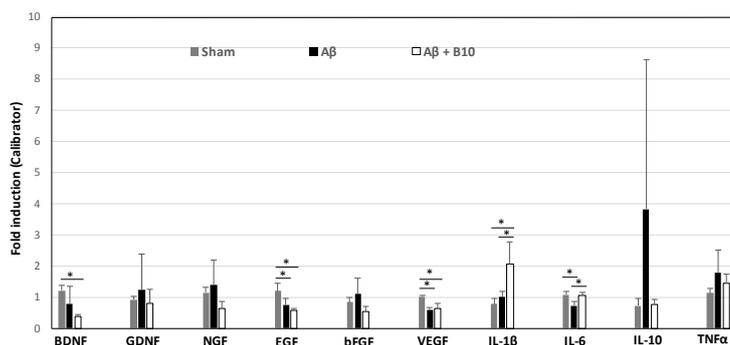
次に、アルツハイマー病モデルラットを作製し、間葉系幹細胞を脳室内投与 (2×10^5 cells) した後、高次機能、脳病理変化を検討した。右図に示すように $A\beta_{1-42}$ を脳室内に持続投与することで AD モデルマウスを作製した。 $A\beta$ 注入により、脳高次機能は低下するが、間葉系幹細胞移植により、症状は改善した。病理学的検討では、海馬 CA1 領域を検討した。 $A\beta_{1-42}$ 脳室内投与は海馬の神経細胞死を誘導し、神経細胞数を減少させるが、移植は神経細胞の減少を抑制した。移植によりグリア細胞であるアストロサイト、ミクログリアの数を検討すると、いずれも $A\beta$ 注入により減少するが、移植により増加が確認された。さらに血管数を von Willebrand factor (vWF) 染色で検討した(右図)ところ、血管は移植により増加がみられた。さらに海馬におけるサイトカインや神経栄養因子の発現変化をみるために、組織の mRNA 発現を real-time PCR 法で確認した(右下図)。Interleukin-1 β (IL-1 β) や IL-6 の発現が移植海馬で有意に増加した。



【考 察】

1) GaCl-Pc によるアミロイド凝集抑制: 今回作製したフタロシアン錯体は *in vitro* で AD 脳に沈着する $A\beta$ の凝集抑制および凝集解離能を有することが確認された。さらに、病理組織標本に添加することでもアミロイド線維を減少させることを示すことができた。これらの成果から GaCl-Pc は今後 *in vivo* レベルでの効果や毒性検討をする価値がある誘導体であると思われる。

2) アルツハイマー病モデル動物における間葉系幹細胞の治療効果: 今回の実験で、脳室内移植がモデル動物の認知機能障害を改善し、病理学的にも海馬において神経保護作用、グリア細胞増加を引き起こし、さらに血管増生を伴っていた。これらの効果は、間葉系幹細胞の有するサイトカイン・免疫調整効果によることが推察され、発現分析からは IL-1 β や IL-6 などの炎症性サイトカインが寄与している可能性があると思われる。



【臨床的意義・臨床への貢献度】

今回アルツハイマー病をターゲットとして、2 つの基礎的実験からアプローチを試みた。いずれの実験も、病態を改善させる可能性が示唆されたことは意義深い。臨床応用を目指して、今後さらに研究を進展させる必要がある。

【参考・引用文献】

1) Sheikh AM, Nagai A: Lysophosphatidylcholine modulates fibril formation amyloid beta peptide. FEBS J 278:634-642, 2011

- 2) Sheikh AM, Nagai A, Wakabayashi K, Narantuya D, Kobayashi S, Yamaguchi S, Kim SU: Mesenchymal stem cell transplantation modulates neuroinflammation in focal cerebral ischemia: contribution of fractalkine and IL-5. *Neurobiol Dis*, 41:717-724, 2011
- 3) Tabassum S, Sheikh AM, Yano S, Ikeue T, Handa M, Nagai A: A carboxylated Zn-phthalocyanine inhibits fibril formation of Alzheimer's amyloid β peptide. *FEBS J*, 282(3):463-476, 2015.