

アルツハイマー型認知症前駆期における白質虚血に対する修復法の開発

石崎泰樹

群馬大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学

【研究の背景】

アルツハイマー病などの認知症を、まだ認知機能低下の顕在化していない前駆期に早期診断、早期先制治療を実施し、認知症発症を防止することが国家的な課題となっている。MRI 解析による白質高信号はアルツハイマー型認知症の発症前駆期からの急激な認知機能低下に関連する危険因子であるが、その修復法に関する研究はアミロイドβ 蛋白に対する治療法開発研究に比して、極めて乏しい。これまでに MRI の T2 強調・FLAIR 画像で高齢者にみられる大脳白質高信号と血管性認知症、高齢発症アルツハイマー型認知症、中高年発症うつ病などの精神神経疾患との関連が検討されてきた。しかし、前頭葉白質の微細な高信号は中高年うつ病の発症脆弱性であり、また脳室周囲や側頭葉白質のそれは認知症の前駆状態を形成している可能性が示唆されただけである。アルツハイマー型認知症の神経病理はアミロイドβ 蛋白の蓄積や神経原線維変化に注目されすぎ、MRI で認められる深部白質高信号は含まれてはこなかった。

最近、Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative の一連の研究によって、軽度認知障害における MRI での大脳白質高信号の容積が大きければ大きいほど、認知機能低下の危険因子である APOE ε 4 保有と嗅内皮質萎縮の効果を有意に増強させることが明らかにされた¹⁾。また、常染色体優性遺伝性アルツハイマー病ネットワークの国際共同研究では、深部白質高信号はアミロイドβ 蛋白の蓄積や神経原線維変化とともにアルツハイマー型認知症の中核的神経病理を構成していると結論づけられている²⁾。これらの知見は認知機能低下が顕在化する前のアルツハイマー型認知症の発症防止には白質高信号対策が重要であることを示唆しているが、残念ながら、これに対する対策はほとんどなされてきていない。

申請者らは神経系の修復に血管内皮系が関わるのではないかと考え、ラット大脳内包へ定量的にエンドセリン-1 を微量注入して作製した白質虚血ラットモデルの内包に大脳皮質微小血管内皮細胞を移植し、脱髄病巣を縮小させる効果があることを明らかにした³⁾。また、血管内皮細胞移植によって脱髄巣周辺のオリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cells, OPCs) の数が増加すること、この増加が細胞増殖促進ではなくアポトーシス抑制によるものであることを明らかにした⁴⁾。さらに血管内皮細胞が分泌する細胞外小胞 (extracellular vesicle, EV) に着目し、血管内皮細胞の培養上清から単離した EV は OPCs のアポトーシスを抑制し、増殖を亢進させるが、線維芽細胞由来 EV は同様の効果をもたないことを明らかにした⁵⁾。これらの所見から、EV が包含する分子を明らかにすることで白質脱髄病巣の再髄鞘化を促進して認知症発症を防止できる可能性が示唆される。

【目 的】

認知機能低下の基盤にある白質高信号に有効であると考えられる、血管内皮細胞由来の細胞外小胞 (EV) に含まれる OPCs の生存・増殖促進分子を同定、この分子を含む人工的な EV を用いた白質病巣の修復法を開発し、認知症発症予防法の確立を目指す。

【方 法】

ラット脳微小血管内皮細胞由来 EV (MVEC-EV) に比べ、ラット線維芽細胞由来 EV (Rat-1-EV) は OPCs の生存・増殖を促進する活性が低い。これら 2 つの異なる EV が含む分子を比較して候補分子を探索する。

MVEC-EV と Rat-1-EV について質量分析 (nanoLC-MS/MS 分析) により各 EV に含まれるタンパク質を網羅的に解析する。MVEC-EV に多く含まれるタンパク質についての Pathway 解析から OPCs の生存・増殖を促進する候補タンパク質を探索する。MVEC-EV における候補タンパク質の存在を免疫電子顕微鏡法、ELISA 法、ウェスタンブロット法により確認する。また、候補タンパク質に対する中和抗体を用いた機能阻害により、MVEC-EV の OPCs の生存・増殖に対する効果を調べる。

MVEC-EV と Rat-1-EV について、microRNA 定量 PCR パネルならびに次世代シーケンサーを用いた miRNA-Seq 解析によりそれぞれの EV に含まれる全 miRNA 発現プロファイルを得る。Rat-1-EV に比べて MVEC-EV に多く存在し、OPCs の生存・増殖促進に関連する miRNA を探索する。

【結 果】

タンパク質量分析により MVEC-EV に含まれるタンパク質として 1388 個、Rat-1-EV に含まれるタンパク質として 695 個のタンパク質を同定した。このうち MVEC-EV のみに含まれるタンパク質は 869 個であり、この中で OPCs の生存・増殖促進に関連することが強く示唆される血小板由来成長因子 PDGF-B を候補タンパク質として検討した。ELISA 測定により MVEC-EV 1 μ g あたり約 10pg の PDGF-B が検出されたが、Rat-1-EV については検出限界以下であった。また、抗 PDGF-B 抗体を用いたウェスタンブロット法において MVEC-EV (30 μ g) に明瞭なバンドが認められたが、Rat-1-EV では検出されなかった。さらに、抗 PDGF-B 抗体を用いた免疫電子顕微鏡により MVEC-EV の膜表面に金コロイドの付着が観察され、PDGF-B の存在が確認された。OPCs に対する MVEC-EV に含まれる PDGF-B の効果を検討するため、MVEC-EV を添加した OPCs 培養系に PDGF-B に対する中和抗体を加えたところ、抗体存在下で OPCs の増殖が有意に抑制されたが、OPCs の生存に変化は認められなかった。

MVEC-EV と Rat-1-EV に含まれる miRNA の解析結果から、MVEC-EV に多く含まれる miRNA として、miR-126a-3p、miR-126a-5p、miR-139-5p、miR-146-5p を候補因子として選び、OPCs に対するこれら miRNA の効果について検討を始めた。

【考 察】

今回の結果により、脳微小血管内皮細胞由来の細胞外小胞 (MVEC-EV) に血小板由来成長因子 PDGF-B が含まれていることが明らかとなった。また、この MVEC-EV に含まれる PDGF-B により、OPCs の増殖が促進される可能性が高いことが示唆された。

MVEC-EV による OPCs の生存・増殖促進をもたらす因子が今回見出された PDGF-B のみとは考えにくいことから、質量分析の結果をもとに別の候補タンパク質について検討するとともに、今回候補因子として選んだ数種の miRNA の OPCs に対する効果の検討を進め、OPCs の生存・増殖促進に寄与する因子を明らかにしたい。

今回効果因子として見出された PDGF-B が MVEC-EV の膜内、膜外のどちらに存在するのかは現段階では不明である。酵素処理による膜外タンパク質処理などの手法により PDGF-B が EV のどこに存在するかを明らかにし、治療ツールとしての人工 EV の開発に繋げていきたい。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

近年、白質高信号はアミロイド β 蛋白の蓄積や神経原線維変化とともにアルツハイマー型認知症の中核的神経病理を構成していることが強く示唆されているが、これへの対策はほとんどなされていない。本研究の目的が達成された場合には、患者の身体的な負担が極めて低く、簡便な操作で認知症前駆期における早期先制治療・進行予防が可能となり、高齢化社会における重度の認知症患者の数を抑制できると考えられる。また、梗塞巣における再髄鞘化を誘導することで失われた機能を再生する脳梗塞の治療にも応用できると考えられ、患者の QOL を著しく向上させることが期待される。これにより医療現場だけでなく、介護福祉現場でも負担が低減するなど、増大傾向にある人的・物的な医療資源を抑制できると考える。

【参考・引用文献】

- 1) Tosto, G., MD; Zimmerman, M.E., Carmichael, O.T., Brickman, A.M.: Predicting aggressive decline in mild cognitive impairment: the importance of white matter hyperintensities. *JAMA Neurol.* **71**: 872-877, 2014.
- 2) Lee, S., Viqar, F., Zimmerman, ME., Narkhede, A., Tosto, G., Benzinger, T.L., Marcus, D.S., Fagan, A.M., Goate, A., Fox, N.C., Cairns, N.J., Holtzman, D.M., Buckles, V., Ghetti, B., McDade, E., Martins, R.N., Saykin, A.J., Masters, C.L., Ringman, J.M., Ryan, N.S., Förster, S., Laske, C., Schofield, P.R., Sperling, R.A., Salloway, S., Correia, S., Jack, C. Jr, Weiner, M., Bateman, R.J., Morris, J.C., Mayeux, R., Brickman, A.M.: White matter hyperintensities are a core feature of Alzheimer's disease: Evidence from the dominantly inherited Alzheimer network. *Ann Neurol.* **79**: 929-939, 2016.
- 3) Puentes, S., Kurachi, M., Shibasaki, K., Naruse, M., Yoshimoto, Y., Mikuni, M., Imai, H. and Ishizaki, Y.: Brain microvascular endothelial cell transplantation ameliorates ischemic white matter damage., *Brain Res.*, **1469**: 43-53, 2012.
- 4) Iijima, K., Kurachi, M., Shibasaki, K., Naruse, M., Puentes, S., Imai, H., Yoshimoto, Y., Mikuni, M. and Ishizaki, Y.: Transplanted microvascular endothelial cells promote oligodendrocyte precursor cell survival in ischemic demyelinating lesions., *J. Neurochem.* **135**: 539-550, 2015.
- 5) Kurachi, M., Mikuni, M. and Ishizaki, Y.: Extracellular vesicles from vascular endothelial cells promote survival, proliferation and motility of oligodendrocyte precursor cells., *PLOS ONE* **11**: e0159158, 2016.