

氏名 (生年月日) **黒田 絵莉子** (1991年8月14日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博薬第186号

学位授与の日付 2020年3月20日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 マウス末梢血造血幹細胞からミクログリア様細胞への分化誘導とアルツハイマー病モデルマウスへの移植による治療効果の解析

論文審査委員 (主査) 教授 芦原 英司

(副査) 教授 長澤 一樹

(副査) 教授 藤室 雅弘

論文内容の要旨

序章

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は、認知症を主症状とした神経変性疾患であり、超高齢社会を迎えた本邦において根本的治療法の開発は急務である。現在、アミロイド β タンパク質 (amyloid- β ; A β) の蓄積が AD 発症の引き金であると考えられており (アミロイドカスケード仮説)、本仮説に基づく新規根本的治療法開発が期待されている。

脳内免疫担当細胞であるミクログリアは AD 脳で A β 貪食除去に働いており、ミクログリアの脳内補填が AD 新規細胞治療法となる可能性がある。しかし、ヒトミクログリアの調製は倫理的・技術的に困難であり、代替となる細胞ソースを考案する必要がある。これまでに当研究室では骨髄細胞よりミクログリア様細胞を作製し、その AD 病態への治療効果を報告している。しかし、自己骨髄細胞の採取には骨髄穿刺を実施する必要がある、侵襲性の高い手法である。

そこで本研究では、新たに自己の細胞を低侵襲性に採取できる「末梢血」を用いてミクログリアの代替となる細胞の作製を試み、その表現型や機能を解析した。また、本細胞を AD モデルマウス海馬内へ移植し、移植細胞の脳内動態や A β 病態、認知機能への効果を解析した。さらに本研究では、これまで不明であった移植細胞の脳内生存率や、細胞移植による脳内炎症状態や脳の内在性細胞への影響を解析し、末梢血から作製した自己ミクログリア様細胞を用いた新規 AD 細胞治療戦略の開発が可能か否かを評価した。

第1章 末梢血造血幹細胞の採取ならびにミクログリア様細胞への分化誘導と機能解析

末梢血にも造血幹細胞が存在しており、その数を解析したところ、マウス 1 匹から採取できる造血幹細胞数は、マウス 1 匹あたりの骨髄造血幹細胞数の約 1.4% と極めて少なかった。そこで、骨髄から末梢血中へ造血幹細胞を動員する作用のある granulocyte colony-stimulating factor および CXCR4 阻害剤をマウスに前投与し、末梢血造血幹細胞を分取したところ、それら非投与群と比べて約 11 倍の造血幹細胞が得られた。次に、ミクログリア様細胞への分化能を上げるため、これまでに用いてきた colony-stimulating factor (CSF) -1 に加え、ミクログリアの成熟に重要な interleukin (IL) -34 を新たに用いた。その結果、CSF-1 単独処置と比べてミクログリア様細胞への分化効率が約 1.3 倍増加した。本細胞の表現型をフローサイトメトリーで解析したところ、ミクログリア特異的な表面抗原 (triggering receptor expressing on myeloid 2, TMEM119, P2Y12R, CX3CR1) の発現強度が腹腔マクロファージと

比べて初代培養ミクログリアに類似していた。A β 貪食能は腹腔マクロファージより約 3.7 倍高く、初代培養ミクログリアと同程度の貪食活性を示した。また、本細胞の炎症刺激に対する応答性を解析したところ、無処置では抗炎症性サイトカイン (Tgf- β 1) や抗炎症性マーカー (Arg1, Cdl63) の mRNA 発現量が初代培養ミクログリアや腹腔マクロファージと比べて高かった。一方、炎症性サイトカインの mRNA 発現量は、炎症惹起物質である lipopolysaccharide (LPS) 処置では、無処置下と比べ、それぞれ約 1100 倍 (Il-1 β)、約 550 倍 (Il-6)、約 100 倍 (Tnf- α) 発現が増加し、これらは LPS を処置した初代培養ミクログリアや腹腔マクロファージと同程度であった。また、AD 患者の多くが高齢者であることから、老齢マウスを用いて末梢血からミクログリア様細胞の調製を試みたところ、末梢血から採取できる造血幹細胞数は若齢マウスの約 35%であったが、ミクログリア様細胞への分化効率は同程度であり、またそれらの A β 貪食能は若齢マウスの約 0.66 倍であったが、腹腔マクロファージの約 2.3 倍であった。以上より、今回新たに採取や分化誘導を工夫することで、年齢を問わず、末梢血から造血幹細胞を得て、A β 貪食活性の高い自己細胞としてのミクログリア様細胞を調製できる方法が確立できた。

第 2 章 AD モデルマウスへの末梢血造血幹細胞由来ミクログリア様細胞移植による AD 治療効果の解析

Green fluorescent protein マウスから作製した末梢血造血幹細胞由来ミクログリア様細胞を、AD モデルマウスの脳海馬部位に移植して治療効果を解析した。その結果、本細胞は、野生型マウス脳内と比べて AD モデルマウス脳内で約 1.3 倍移動距離が増加しており、A β によりその移動が促進されることが示唆された。また、移植細胞生存率は日数依存的に減少したが、移植 36 日後でも一定数が生存することを見出した。一方、三次元的定量法であるステレオロジーを用い、AD モデルマウス海馬内の A β プラークの体積および数を解析したところ、それらは細胞移植後、日数依存的に減少しており、移植 36 日後ではそれぞれ移植前の約 27%および約 26%程度まで減少した。最後に、AD の臨床症状として重要な作業記憶障害と空間認知機能障害への効果を評価するため、新規物体認識試験およびモーリス水迷路を用いて解析した結果、いずれの試験においても有意な改善効果が得られた。移植細胞の脳内炎症環境への影響を解析したところ、AD モデルマウスの細胞移植群では、PBS 投与群と比べて炎症性サイトカインの mRNA 発現量が約 70% (Il-1 β)、約 75% (Il-6)、約 81% (Tnf- α) と少なかった。一方、野生型マウスの細胞移植群では同炎症性サイトカインの mRNA 発現量が増加しており、本マウスにおける認知機能の低下と対応していた。さらに、神経軸索で髄鞘を形成する脳構成細胞の一つであるオリゴデンドロサイトへの影響について、そのマーカーである myelin basic protein の mRNA 発現量を指標に解析したところ、野生型マウスの細胞移植群では発現量が減少していたのに対し、AD モデルマウスの細胞移植群では約 1.2 倍増加しており、髄鞘再形成を介して神経機能の回復に働く可能性が示唆された。また、免疫組織染色法での解析でも同様の結果が得られた。さらに本研究では、内在性ミクログリアへの影響を解析する目的で、骨髓造血幹細胞由来ミクログリア様細胞が分泌する液性因子を解析したところ、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) を多量に産生し、TGF- β 1 を介して内在性ミクログリアの A β 貪食を促進することを初めて見出した。

以上より、末梢血造血幹細胞由来ミクログリア様細胞は、脳内移植後に移動しながら生着し、その A β 貪食能のみならず、脳内炎症抑制作用ならびに髄鞘再形成作用により AD における認知機能障害の改善に働くことがわかった。また、骨髓由来ミクログリア様細胞は TGF- β 1 産生を介して内在性ミクログリアの A β 貪食促進にも働くことを発見した。一方、野生型マウスへの移植では認知機能障害が引き起こされることから、移植のタイミングに留意する必要があることが示唆された。

総括

本研究において、薬剤による造血幹細胞の末梢血への動員と分化誘導の効率化により、末梢血から十分量の自己細胞としてのミクログリア様細胞を調製することに成功した。また、本細胞の脳内移植は A β 除去のみならず、脳内炎症抑制や脳内在性細胞の機能変化を介して認知機能障害の改善をもたらす可能性を発見した。以上より、末梢血造血幹細胞由来ミクログリア様細胞は、多くが高齢者である AD において、拒絶反応の少ない自己細胞として低侵襲性に調製でき、新規 AD 細胞治療法の開発に大きく貢献する細胞であることが期待される。

審査の結果の要旨

《緒言》

増加の一途をたどるアルツハイマー病 (AD) に対し、発症機序に根差した新たな治療法の開発は必須である。この根本的治療開発における有力な分子標的は、AD 特異的に脳内で蓄積するアミロイド β タンパク質 (A β) である。脳の組織マクロファージとして脳免疫を司るミクログリアは、加齢に伴い A β 貪食活性が低下し、炎症性に機能して AD 病態形成に深く関与すると考えられている。この機能制御も AD 治療法開発の重要な標的である。

本研究は、ミクログリアの機能補填を目的に、幹細胞から分化誘導したミクログリア様細胞を用いる細胞治療の開発を指向する基礎研究である。対象が高齢者であることを念頭に、低侵襲性に採取できる末梢血造血幹細胞から治療細胞を作製し、モデルマウス脳への移植による脳内環境変化を詳細に解析して治療効果を評価している。

《審査結果の要旨》

第1章では、マウス末梢血造血幹細胞由来ミクログリア様 (PBDML) 細胞の作製が試みられた。まず、マウス全血を用いても造血幹細胞の採取数が極めて少なく、granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) と CXCR4 阻害剤の投与で、大幅な採取効率の改善に成功した。さらに、常法の colony-stimulating factor (CSF) -1 に加え、ミクログリアの成熟に関わる interleukin (IL) -34 を新たに添加し、PBDML 細胞への分化誘導効率を向上させた。続いて、細胞表面抗原や A β 貪食活性を解析して PBDML 細胞の初代培養ミクログリアへの類似性を示し、通常培養条件では抗炎症性型であることや、lipopolysaccharide の刺激で炎症反応を惹起することが示された。さらに、老齢マウスの末梢血を用いても、造血幹細胞数の減少や A β 貪食活性の低下が見られるが、機能性 PBDML 細胞が作製できることが示され、造血幹細胞の採取方法や分化誘導法の工夫により、老齢マウスを含めて、末梢血から細胞治療に用いる PBDML 細胞が調製できると結論付けられる。

第2章では、PBDML 細胞を AD モデルマウスの脳に移植し治療効果を解析している。移植後、PBDML 細胞数は脳内で減少していくが、一部の細胞は A β 斑に集積して A β を貪食し、認知機能障害の改善に働くことを見出している。しかし、野生型マウスへの移植では、記憶障害が誘発されることが示唆された。また、認知機能への効果が、脳内炎症性サイトカイン量や神経細胞の髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトのマーカーである myelin basic protein の発現量と関連しており、PBDML 細胞移植による治療効果は、A β 貪食だけでなく、脳内炎症の抑制や髄鞘再形成にも作用してもたらされるこ

とを見出した。さらに、付加的に骨髄造血幹細胞由来ミクログリア様細胞が transforming growth factor- β 1 を分泌し、内在性のミクログリアの A β 貪食活性を高めることも発見している。以上より、PBDML 細胞は A β 貪食のみならず、脳内環境に様々な影響をもたらし、AD 病態の改善に働くことを見出したが、野生型マウスの認知機能への有害事象から、臨床応用には慎重になる必要があると結論付けられる。

《審査の結論》

本論文では、幹細胞の採取方法や分化誘導法を新たに確立し、低侵襲性に AD 細胞治療に有用な自己の PBDML 細胞が調製できることをマウスで実証し、作用機序や臨床応用に際する懸念事項も今回発見された科学的根拠をもとに明確に論じられている。根本的治療法のない AD において、細胞治療の開発という新たな可能性を切り開く PBDML 細胞の発見は、ヒトの健康と福祉への貢献を基盤とする薬学研究において高い意義を有するものと考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。