

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

2019 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】病態生理学分野

黒田 絵莉子

課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程 : 薬学専攻・博士課程
氏名 (英字名) : 黒田絵莉子 (Eriko Kuroda)
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

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り、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*, *Cd163*) 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、骨髄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、骨髄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。

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、図の転載については出版社より許可を得ている。また本論文は、一部、未発表データも含んでいる。

1. Eriko Kuroda, Kazuyuki Takata, Kaneyasu Nishimura, Hikaru Oka, Mari Sueyoshi, Mayu Aitani, Atsushi Kouda, Shiho Satake, Chiaki Shima, Yuki Toda, Susumu Nakata, Yoshihisa Kitamura, and Eishi Ashihara. Peripheral blood-derived microglia-like cells decrease A β burden and ameliorate cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2020**, 73, 413–429. [第 1 章、第 2 章]

Copyright (2020), with permission from IOS Press. The final publication is available at IOS Press through <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-190974>.

目次

序論.....	1
1-1. 緒言.....	5
1-2. 実験方法.....	7
1-2-1. 実験動物.....	7
1-2-2. 細胞培養.....	7
1-2-3. フローサイトメトリー.....	8
1-2-4. 免疫細胞化学的染色.....	9
1-2-5. 酸化鉄および A β の貪食の解析.....	9
1-2-6. RT-qPCR 法によるサイトカイン遺伝子発現の解析.....	10
1-2-7. 統計解析.....	11
1-3. 実験結果.....	12
1-3-1. 末梢血からの造血幹細胞の採取.....	12
1-3-2. 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.....	14
1-3-3. 末梢血造血幹細胞由来細胞におけるミクログリア/マクロファージマーカーの発現の免疫細胞化学的解析による比較.....	16
1-3-4. 末梢血造血幹細胞由来細胞におけるミクログリア/マクロファージマーカー発現のフローサイトメトリーによる解析.....	18
1-3-5. 末梢血造血幹細胞由来細胞における酸化鉄貪食能の解析.....	20
1-3-6. 末梢血造血幹細胞由来細胞における A β 貪食能の解析.....	21
1-3-7. PBDML 細胞、骨髄由来ミクログリア様細胞、末梢血単球由来マクロファージにおける A β 貪食能の比較.....	23
1-3-8. 炎症刺激に対する PBDML 細胞のサイトカイン遺伝子の発現解析.....	25
1-3-9. 老齢マウスにおける末梢血造血幹細胞の採取数および PBDML 細胞への分化効率.....	27
1-3-10. 老齢マウス由来 PBDML 細胞のミクログリア/マクロファージマーカー発現強度の解析.....	29
1-3-11. 老齢マウス由来 PBDML 細胞における A β 貪食機能の解析.....	31
1-4. 考察.....	33
2-1. 緒言.....	36

2-2-1. 実験動物	38
2-2-2. 細胞培養	38
2-2-3. 海馬マイクロインジェクションによる PBDML 細胞の移植.....	38
2-2-4. 新規物体認識試験	39
2-2-5. モーリス水迷路.....	40
2-2-6. マウスの脳摘出および薄切切片の作製.....	41
2-2-7. 免疫組織化学的染色法	41
2-2-8. 画像解析による移植細胞の細胞間距離の解析	41
2-2-9. ステレオロジーによる移植した PBDML 細胞数ならびに海馬内 A β プラークの体積および数の定量解析	42
2-2-10. RT-qPCR 法によるマウス海馬におけるサイトカイン遺伝子発現の解析	42
2-2-11. ELISA-based Cytokine Array	43
2-2-12. ELISA.....	43
2-2-13. Western blotting	43
2-2-14. 統計解析	44
2-3. 実験結果	45
2-3-1. PBDML 細胞の脳への生着	45
2-3-2. PBDML 細胞の脳内動態の解析	47
2-3-3. 脳内における PBDML 細胞の A β 貪食能の解析.....	49
2-3-4. PBDML 細胞移植による作業記憶障害の改善効果の解析	52
2-3-5. PBDML 細胞移植による空間認知記憶障害の改善効果の解析.....	54
2-3-6. PBDML 細胞移植による脳内炎症の変化.....	56
2-3-7. PBDML 細胞移植による海馬内オリゴデンドロサイトの発現量の変化	57
2-3-8. 造血幹細胞由来ミクログリア様細胞の内在性ミクログリアに対する作用の解析.....	59
2-4. 考察	62
謝辞	68
参考文献	69

略語一覧表

AD	Alzheimer's disease
ANOVA	analysis of variance
APC	allophycocyanin
APP	amyloid precursor protein
A β	amyloid β
BM	bone marrow
BMDML	bone marrow-derived microglia-like
CSF-1	colony stimulating factor-1
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme linked-immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
IL	interleukin
Iba1	ionized calcium-binding adaptor molecule 1
Irf8	interferon regulatory factor 8
LPS	lipopolysaccharide
MBP	myelin based protein
MEM- α	minimum essential medium- α
MFI	median fluorescence intensity
PB	phosphate buffer
PBDML	peripheral blood-derived microglia-like
PBS (-)	Ca ²⁺ and Mg ²⁺ free phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyde
pM ϕ	peritoneal macrophage
PSEN	presenilin
RT-qPCR	reverse transcript-quantitative polymerase chain reaction
SEM	standard error of the mean
TGF- β 1	transforming growth factor- β 1
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TREM2	triggering receptor expressing on myeloid 2
Tmem119	transmembrane protein 119
iPS	induced pluripotent stem

序論

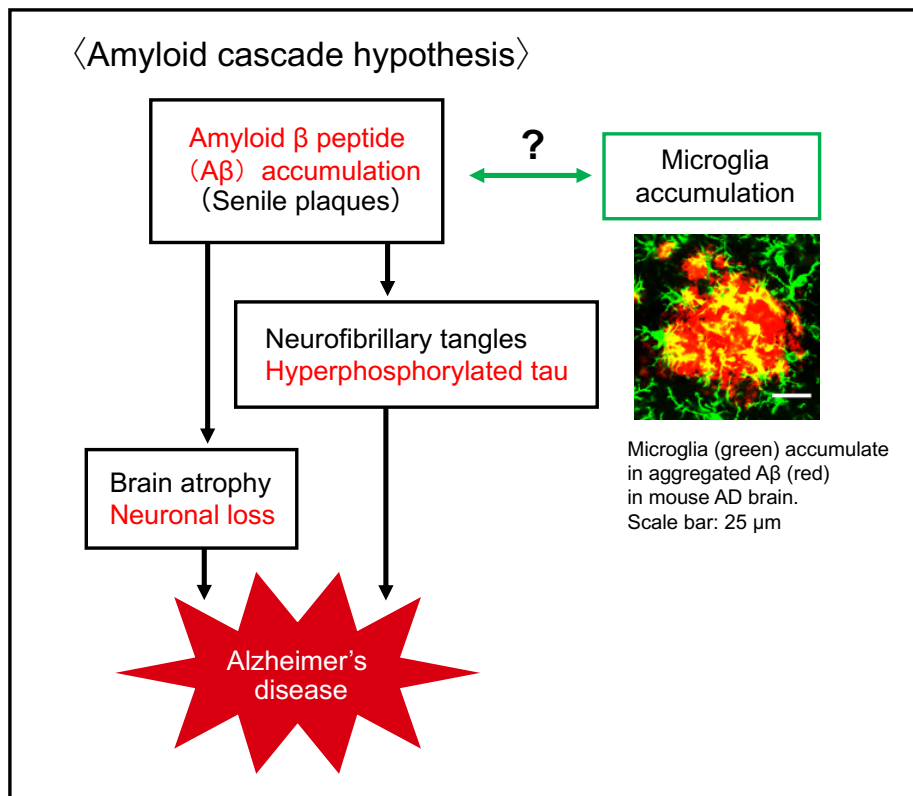
アルツハイマー病 (Alzheimer's disease ; AD) は、進行性に認知機能全般が低下する神経変性疾患である。超高齢社会を迎えた本邦において、高齢者人口の増加とともに認知症患者数が増大しており、今後もその数は上昇することが予測されている。認知症の約 6 割が AD であると言われており、AD 患者は男女ともに 60 歳以降で患者数が急激に増加することから、AD 患者は主に高齢者である。AD は 1906 年に、ドイツの精神医学者アロイス・アルツハイマー博士によって最初の症例報告がなされた(1)。AD 患者剖検脳では、脳内でのアミロイド β タンパク質 (amyloid β ; A β) の蓄積による老人斑の形成や、神経細胞内に過剰リン酸化タウが蓄積することによる神経原線維変化、また神経細胞死による脳の萎縮といった特徴的な病理所見が認められる。

1970 年代後半に、AD 脳の大脳皮質でアセチルコリン (ACh) 合成酵素や ACh 分解酵素 (AChE) 活性の低下(2)、さらに前脳基底部分で ACh 作動性神経細胞の顕著な脱落が認められること(3)、また、ニコチン性 ACh 受容体数が減少することも報告された(4)。これらのことから、ACh 作動性神経系の障害が AD の主要な病態の一つとするコリン仮説が提唱され、シナプス間隙中の ACh 量を維持して、シナプス伝達効率を上げることにより脳機能を改善する目的でコリンエステラーゼ阻害薬が開発された。一方、グルタミン酸は脳内の主な興奮性神経伝達物質であり、その受容体の一つに N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体がある。NMDA 受容体は大脳皮質や海馬に高密度に存在し、記憶に関する長期増強や発達可塑性において重要な役割を担っている。グルタミン酸の神経興奮毒性が AD 脳における神経細胞脱落に関与していると考えられており (グルタミン酸神経毒仮説) (5)、NMDA 受容体拮抗薬が開発された。現在、AD に対する治療薬としてコリンエステラーゼ阻害薬が 3 剤と NMDA 受容体拮抗薬が 1 剤の計 4 剤が本邦で認可され、臨床現場で使用されている。しかしながら、いずれも AD の症状を軽減または進行を遅らせるだけの対症療法薬であり、AD に対する根本的な治療法は未だ存在しない。

AD の病理所見と病気の進行の過程に基づくと、認知症が発症する約 20 年も前から A β の蓄積が始まっており、それに続いてタウによる神経障害、脳萎縮、記憶障害が順番に現れることが示唆されている(6)。また、1980 年代以降に行われた家族性アルツハイマー病の家系における連鎖解析により、原因遺伝子としてアミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein ; APP) 遺伝子(7)と APP から A β を切り出す酵素の活性中心を構成するヒトプレセニリン (presenilin ; PSEN) 1 および 2 遺伝子(8)が同定され、いずれも A β の産生に関与する遺伝子であることがわかった。これらのことから、AD の発症機序として、A β の蓄積が引き金となり、過剰リン酸化タウの蓄積や神経細胞死が引き起こされ AD が発症するという「アミロイドカスケード仮説」が広く支持されている(9,10) (Schema 1)。現在、この仮説をもとに

脳内の A β 蓄積を防ぐ、または減少させることに焦点を当てた AD 根本的治療法の開発研究が世界中で行われている。

Schema 1. Schematic diagram for amyloid cascade hypothesis.



The amyloid cascade hypothesis is believed the cause mechanism of AD. This hypothesis proposes that the deposition and accumulation of A β is the initial pathological event of AD. A β deposition leads to the neurofibrillary tangle, hyperphosphorylated tau and neuronal loss. These pathological changes in brains ultimately cause AD.

ミクログリアは脳内の免疫担当細胞であり、組織マクロファージの一種である。機能としては、A β や死細胞、病原体などの異物の貪食(11-13)や、サイトカインの産生放出(14)、神経回路形成への関与(15,16)、神経保護作用(17)などがあり、脳内環境の恒常性の維持に極めて重要な役割を担っている。一方、近年の全ゲノム相関解析 (genome-wide association study ; GWAS) により AD 関連遺伝子が 20 種類ほど同定されており、そのうち APOE4、TREM2、CR1、CD33、MS4A4/MS4A6、CLU、ABCA7 などの遺伝子がミクログリアの貪食機能に関連していることが報告されている(18,19)。さらに、AD 病態下では、ミクログリアの機能障害や代謝障害が報告されている(20,21)。これまでに当研究室では、AD モデルラット脳室内へのラット初代培養ミクログリアの移植により、脳内 A β 量が減少することを明らかにしている(22)。

以上のことから、ミクログリアの移植が新規 AD 治療法となる可能性がある。しかし、この移植療法の臨床応用を考えると、ミクログリアは脳内にしか存在しないという点から、ヒトミクログリアの調製は倫理的にも技術的にも困難である。そこで、ミクログリアの代替となる細胞ソースの探索が必要と考えられる。

造血幹細胞は、自己複製能と多分化能を併せ持ち、すべての血球系細胞を個体の一生に渡って供給し続けることのできる細胞である。造血幹細胞の存在自体は一世紀も前に想定されており、半世紀前から白血病や悪性リンパ腫、再生不良性貧血等の血液疾患に対して骨髄移植を用いた治療の試みが始まった。当初は造血幹細胞移植の条件や移植免疫に関する知見が乏しく、失敗例が多かったが、1980年代以降は患者が保有する human leukocyte antigen (HLA ; ヒト主要組織適合抗原) を確定するための検査手法の普及および移植片対宿主反応や、移植後感染症の対策が大きく進歩したことにより、骨髄移植が移植療法として確立された。このように造血幹細胞移植は幹細胞を用いた再生医療(幹細胞治療)の最初の成功例であり、臨床的にも手法の確立された安全性の高い治療法となった。現在、造血幹細胞移植は造血幹細胞のソースによって骨髄移植、臍帯血移植、末梢血幹細胞移植に分類される。患者本人がドナーとなり、自己の細胞を採取して自身に移植する「自家幹細胞移植」では、ソースとしては自身の骨髄および末梢血が使用される。この方法は自己の移植細胞を用いることで拒絶反応を回避できることが利点である。

ミクログリアの一部は造血幹細胞に由来する単球系細胞を起源としている可能性も示唆されており(23,24)、造血幹細胞が AD 細胞移植療法に利用できるミクログリアの代替細胞となり得る可能性がある。これまでに当研究室では、マウス骨髄細胞からミクログリア様細胞を調製することに成功し、AD モデルマウスの海馬内移植により脳内の A β が減少し、認知機能障害が改善されることを明らかにしている(25)。しかしながら、ヒトから骨髄細胞を採取するには、全身麻酔下で腸骨に針を繰り返し刺し骨髄液を注射器で吸い上げて採取する骨髄穿刺を行う必要がある。この方法は、麻酔に伴う事故や高い侵襲性を伴うことから、AD 患者の多くが高齢者であることを考慮すると、実施に際して高い障壁となる。

そこで本研究では、より侵襲性の低い簡便な方法で自己の細胞として採取することのできる、「末梢血」に着目した。上述のように、末梢血は、自家幹細胞移植において造血幹細胞のソースの一つであり、骨髄よりも採取が簡便なため、1990年代より自家末梢血移植が自家骨髄移植に代替され始めた(26)。しかし通常、末梢血中に存在する造血幹細胞数はごく僅かであり、AD の細胞治療に用いるのに十分なミクログリア様細胞を調製するためには、採取方法ならびに分化誘導方法の工夫が必要と考えられる。また、これまでの骨髄由来の造血幹細胞から誘導したミクログリア様細胞の解析で明らかとなった知見に加え、移植細胞の脳内での生着や、脳内 A β 蓄積に対する作用のみならず、移植細胞が脳内環境に与える影響もより詳細に多角的に解析する必要がある。

上記の背景のもと、本研究では、AD患者の多くが高齢者であることを考慮して、より低侵襲性に簡便な手法で採取できる末梢血造血幹細胞を用いて、ミクログリア様細胞へと分化誘導し、本細胞を用いたAD細胞治療戦略が開発できるのかどうか評価した。

第1章では、*in vitro*系において、末梢血造血幹細胞の効率的採取方法ならびにミクログリア様細胞への効率的分化誘導法の解析を行った。また、末梢血造血幹細胞由来ミクログリア様細胞に発現している表面抗原マーカーの解析、食食機能、炎症性刺激に対するサイトカインの遺伝子発現量変化の解析を行い、ミクログリアとの類似性を評価した。さらに、AD患者の多くが高齢者であることをふまえ、老齢マウスから調製した末梢血造血幹細胞由来細胞を用いて、採取できる細胞数、分化効率、表面抗原マーカーの発現、A β 食食機能を解析し、若齢マウス由来細胞と比較検討を実施した。

第2章では、第1章で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モデルマウスの海馬内に移植し、*in vivo*脳内での脳内動態および移植細胞の生着、A β 病態への影響を解析した。また、これまでに骨髄由来細胞で解析してきた新規物体認識試験による作業記憶障害への効果のみならず、モーリス水迷路試験による空間認知記憶障害に対する作用を新たに解析した。さらに、細胞移植が脳内環境に及ぼす影響を調べるため、新たに細胞移植後の海馬内の炎症性サイトカインのmRNA発現量や、神経細胞の髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトに対する作用を解析した。また、骨髄造血幹細胞由来ミクログリア様細胞を用い、分泌する液性因子を解析し、内在性ミクログリアへの影響も解析した。

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

1-1. 緒言

ADは認知症を主症状とする進行性の神経変性疾患である。ADの最大の危険因子は老化であり、超高齢社会を迎えた日本において効果的なAD治療法の開発は最重要課題である。現在、ADの発症機序としてアミロイドカスケード仮説(9,10)が広く支持されており、脳内のA β 除去が治療ターゲットとして注目されている。これまでにADモデルラットの脳内へのラット初代培養ミクログリアの移植により脳内A β 量が減少することが報告されている(22)。このことから、ミクログリアの脳内への補填がAD治療に有効であることが示唆される。しかし、この移植療法の臨床応用を想定すると、ヒトミクログリアの調製は倫理的にも技術的にも困難である。そこで、AD治療に用いることのできるミクログリアの代替細胞の調製が必要である。

これまでに当研究室では、マウス骨髄細胞からミクログリア様細胞を分化誘導することに成功しており、ADモデルマウスへの移植により認知機能障害の改善効果が見られることを報告している(25)。しかしながら、ヒト骨髄細胞の採取には全身麻酔下で骨髄穿刺を行う必要があり、AD患者の多くが高齢者であることを考慮すると、侵襲性が高く、患者の身体にかかる負担が大きい。そこで、より低侵襲性に採取できる末梢血造血幹細胞に着目した。末梢血造血幹細胞はすでに白血病などの血液疾患に対して臨床で使用されており、骨髄より簡便に採取できることから、末梢血造血幹細胞移植の件数は年々増えている(26)。しかしながら、末梢血中に存在する造血幹細胞数は極めて少ない。

造血幹細胞は通常、骨芽細胞など周囲の細胞と結合し、微小環境(ニッチ)を形成して骨髄に生着している。G-CSFを投与すると、骨髄中の好中球が増加し、タンパク分解酵素である好中球エラスターゼやカテプシンGの産生が促進される(27,28)。一方、CXCR4阻害剤は造血幹細胞と骨芽細胞の結合に必要なCXCR4-CXCL12シグナルを阻害することで、造血幹細胞の末梢血への動員を促進すると考えられている(29)。以上より、これら2つの薬剤が本研究でも末梢血中の造血幹細胞数増加に応用できる可能性が考えられる。

また、末梢血中の造血幹細胞数を増やす工夫だけでなく、ミクログリア様細胞への分化効率を上げることも重要な課題である。これまでに報告している骨髄造血幹細胞からミクログリア様細胞への分化誘導にはCSF-1のみを用いていたが、ミクログリアの成熟、増殖にはCSF-1だけでなくIL-34が必須であることが近年の研究で示唆されている(30-32)。IL-34は最近発見されたサイトカインで、全身臓器に存在し、マクロファージ系細胞の最終分化に働くCSF-1と同じ受容体(colony stimulating factor-1 receptor : CSF-1R)を介して作用する。神経系では神経細胞のみがIL-34を産生しており、ミクログリアの成熟・増殖に関与している(30)。

そこで本研究では、CSF-1 だけでなく新たに IL-34 を用いることで、ミクログリア様細胞へのより効率的な分化誘導を目指した。

一方、末造血幹細胞の他に、末梢血から採取できる細胞として単球が挙げられる。末梢血単球は末梢血中に 3~6% 存在しており、造血幹細胞と比べてその数が多い。さらにマクロファージの前駆細胞であることから、ミクログリアの代替細胞となり得る可能性が十分に考えられる。

そこで、第 1 章では、G-CSF および CXCR4 阻害剤処置によるマウス末梢血造血幹細胞数の変化を検討した。また、末梢血造血幹細胞からミクログリアの代替となる細胞へのより効率的な分化誘導を検討し、分化誘導した細胞の表面抗原マーカーの発現解析や、貪食機能および炎症刺激に対するサイトカイン mRNA の発現量の変化を解析した。また、末梢血単球由来マクロファージの A β 貪食能を末梢血造血幹細胞由来細胞と比較し、両細胞のミクログリアの代替細胞としての機能を評価した。さらに、AD 患者の多くが高齢者であることから、老齢マウスから採取した末梢血造血幹細胞を用いて、造血幹細胞の採取数や、ミクログリア様細胞への分化効率、ミクログリアに発現する表面抗原マーカーの発現解析、A β 貪食能について解析し、AD 治療に用いることのできる細胞であるか否か評価した。

1-2. 実験方法

1-2-1. 実験動物

使用した動物とその入手先は次の通りである。C57BL/6 マウス（生後 6 週齢、20 ヶ月齢、清水実験材料、京都）を使用した。動物は 25°C の恒温において飼育し、水や餌は自由に摂取させた。照明は 12 時間サイクルとした（8:00～19:59：照明あり、20:00～7:59：照明なし）。動物実験は「動物実験に関する指針（日本実験動物学会）」および「京都薬科大学動物実験に関する指針」に従った。なお、本研究の動物実験は京都薬科大学動物実験委員会（承認番号：DIPS -19-005）ならびに遺伝子組換え実験安全委員会（承認番号：393）の承認を得ており、「動物実験に関する指針（日本実験動物学会）」に従い実施した。

1-2-2. 細胞培養

末梢血造血幹細胞は C57BL/6 マウスの腹腔内に G-CSF（filgrastim；協和キリン、東京、日本）500 µg/kg を 1 日 1 回、5 日間連続投与し、その翌日 CXCR4 阻害剤（AMD3100；Adooq Bioscience、Irvine、CA、USA）5 mg/kg を 1 回投与し、1 時間後に下大静脈から全血を採取した。その後、lysis buffer（Pharm Lyse；BD Biosciences、Billerica、MA、USA）により赤血球を溶血させたのち、磁気ビーズ（Miltenyi Biotec、Bergisch Gladbach、Germany）を用いて造血幹細胞（lineage⁻/c-kit⁺細胞）を分取した。得られた末梢血造血幹細胞の培養に用いた培地は、10%ウシ胎児血清（fetal bovine serum：FBS；Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA）および抗菌剤（100 units/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシン；Sigma、St. Louis、MO、USA）を加えた minimum essential medium- α （MEM- α ；富士フィルム和光、大阪、日本）を基本培地とし、添加因子としてヒト CSF-1 製剤（mirimostim；協和キリン）およびマウス IL-34（R&D Systems、Minneapolis、MN、USA）の存在または非存在下において 37°C、5% CO₂ の環境下にて培養した。

マウス混合グリア細胞（ミクログリアおよびアストロサイト）は、0-2 日齢の C57BL/6 系マウス（清水実験材料）の新生仔脳より調製した。脳組織をセルストレイナー（70 µm；BD Biosciences）に通すことにより、脳髄膜を除去し、200 x g、10 分間の遠心分離により細胞を回収した。回収した細胞は 37°C、5% CO₂ の環境下で、10% FBS および抗菌剤（100 units/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシン；Sigma）を含む Dulbecco's modified eagle medium（DMEM；Thermo Fisher Scientific）で培養した。2 週間後、混合グリア細胞のディッシュを振盪することでミクログリアをディッシュから剥離させ浮遊細胞として回収した。

腹腔マクロファージは 7 週齢の C57BL/6 系マウスより調製した。マウスに 4% thioglycolate medium brewer modified（BD Biosciences）を腹腔内投与し、腹水中に腹腔マクロファージを誘導した。投与 3 日後、腹腔内に phosphate buffered saline（PBS）（-）5 mL を注入し、腹膜

を指で刺激した後、腹腔液を回収し、200 x g、10 分間遠心分離を行い、腹腔マクロファージを回収した。その後、10% FBS および抗菌剤（100 units/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシン）含有 MEM-α（富士フィルム和光）で 37°C、5% CO₂ の環境下で培養した。

骨髓細胞は C57BL/6 系マウスより採取した。すなわち、動物の下腿の皮を剥ぎ、大腿骨・脛骨を取り出した後、針（23G；テルモ、東京、日本）を付けたシリンジにより骨髓液を押し出すことで骨髓細胞を採取した。得られた細胞懸濁液を 300 x g、5 分間の遠心分離を行って細胞を洗浄し、その後、ammonium chloride potassium lysing buffer（0.15 M NH₄Cl、1.0 mM KHCO₃、0.1 mM Na₂C₁₀H₁₆N₂O₈、pH：7.2）により赤血球を溶血させ、セルストレイナー（70 µm；BD Biosciences）に通した。再度、300 x g、5 分間の遠心分離を行って細胞を回収した。回収した骨髓細胞培養に用いた培地は、10% FBS および抗菌剤（100 units/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシン）含有 MEM-α（富士フィルム和光）を基本培地とし、添加因子としてヒト CSF-1 製剤（協和キリン）の存在または非存在下において 37°C、5% CO₂ の環境下にて培養した。

末梢血単球は、6 週齢の C57BL/6 マウスより調製した。マウスの下大静脈から全血を採取し、lysis buffer（BD Biosciences）により赤血球を溶血させたのち、磁気ビーズ（Miltenyi Biotec）を用いて単球（Ly6c⁺細胞）を分取した。得られた単球の培養に用いた培地は、10% FBS（Thermo Fisher Scientific）および抗菌剤（100 units/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシン；Sigma）を加えた MEM-α（富士フィルム和光）を基本培地とし、添加因子としてヒト CSF-1 製剤（協和キリン）存在下において 37°C、5% CO₂ の環境下にて培養した。

1-2-3. フローサイトメトリー

各細胞におけるミクログリア/マクロファージマーカーの発現強度をフローサイトメトリーにより解析した。100 µL の PBS（-）に各細胞を 1.0 x 10⁶ cells/mL になるように調製し、1.5 mL チューブに回収した。以下、抗体の希釈溶媒として FACS buffer（1mM EDTA, 0.1% sodium azide 含有 PBS）を用いた。はじめに、非特異的な抗体反応を防ぐため、ラット抗 mouse CD16/32（1：100；eBioscience Inc、San Diego、CA、USA）を処置し 10 分間反応させブロッキングを行った。300 x g、5 分間の遠心分離を行い、細胞を PBS（-）で 1 回洗浄後、以下の抗体と反応させた。抗 lineage-PerCP-Cy5.5 抗体（1：100；BD Biosciences；cat# 561317）、抗 c-kit（CD117）-allophycocyanin（APC）抗体（1：100；BD Biosciences；cat# 553356）、抗 CD11b-fluorescein isothiocyanate（FITC）抗体（1：100；eBioscience；cat# 11-0112）、抗 TREM2-APC 抗体（1：50；R&D Systems；cat# FAB17291A）、抗 CD45-FITC 抗体（1：100；BD Biosciences；cat# 553030）、ウサギ抗 transmembrane protein 119（Tmem119）抗体（1：100；abcam、Cambridge、England；cat# ab209064）、ウサギ抗 P2Y12R 抗体（1：100；alomone labs、Jerusalem、Israel；

cat# APR-012)、ウサギ抗 CX3CR1 抗体 (1 : 100 ; abcam ; cat# ab8021)、ビオチン化抗 F4/80 抗体 (1 : 1,000 ; clone BM8 ; Biolegend、San Diego、CA、USA ; cat# 123105) を処置し、20 分間、4°C で反応させた。300 x g、5 分間の遠心分離を行って細胞を PBS (-) で 1 回洗浄し、二次抗体として Alexa633 標識ヤギ抗ウサギ抗体 (1 : 500 ; Thermo Fisher Scientific)、APC 標識ストレプトアビジン (1 : 500 ; eBioscience ; cat# 17-4317) で 10 分間、4°C で反応させた。これら二次抗体の希釈溶媒として FACS buffer を用いた。その後 300 x g、5 分間の遠心分離を行って細胞を PBS (-) により 2 回洗浄した。死細胞は propidium iodide (1 : 200 ; Thermo Fisher Scientific) により染色し、細胞懸濁液を 70 μm 径のナイロンメッシュに通した後、FACS Fortessa (BD Biosciences) を用いて解析した。発現量の指標として未染色サンプルの蛍光強度の median fluorescence intensity (MFI) と蛍光標識抗体で染色したサンプルの MFI の比をとった MFI ratio を用いた。解析は FlowJo (Tree Star) により行った。

1-2-4. 免疫細胞化学的染色

各細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュ (松浪硝子) に播種し免疫細胞化学的染色を行った。各細胞を PBS (-) で 3 回洗浄し、4% paraformaldehyde (PFA ; ナカライテスク、京都、日本) で 4°C で 30 分間固定した後、PBS (-) で 5 回洗浄した。一次抗体としてウサギ抗 ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) ポリクローナル抗体 (1 : 1,000 ; 富士フイルム和光 ; cat# 019-19741)、ラット抗 CD11b モノクローナル抗体 (1 : 1,000 ; clone M1/70 ; eBioscience ; cat# 14-0112)、ヒツジ抗 TREM2 抗体 (1 : 500 ; R&D Systems ; cat# MAB17291)、ラット抗 F4/80 モノクローナル抗体 (1 : 1,000 ; clone BM8 ; BioLegend ; cat# 123143)、マウス抗 Aβ モノクローナル抗体 (1 : 1,000 ; clone 82E1 ; 免疫生物研究所、群馬、日本 ; cat# 10323) を処置し、室温で overnight 反応させた。二次抗体として Alexa546 標識ヤギ抗ウサギ抗体、Alexa546 標識ヤギ抗ヒツジ抗体、Alexa488 標識ヤギ抗ラット抗体、Alexa488 標識ヤギ抗マウス抗体 (1 : 500 ; Thermo Fisher Scientific) で 4°C、2 時間反応させた。また、核の標識として Hoechst 33258 (1 : 5,000 ; Thermo Fisher Scientific) を用いた。各蛍光物質は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM800 ; Carl Zeiss、Oberkochen、Germany) を用いて観察した。

1-2-5. 酸化鉄および Aβ の貪食の解析

初代培養ミクログリア、末梢血造血幹細胞由来細胞および腹腔マクロファージをそれぞれ 3.0×10^5 cells /well で 24 穴プレートに播種し、37°C、5% CO₂ の環境下で培養しプレートに細胞を接着させた後、10 μg/mL の鉄濃度に調製した magnetic resonance imaging 肝臓造影剤のデキストラン被覆酸化鉄 (III) (Resovist® ; 日本シェーリング、大阪、日本) を 12 時間処置し、その後、PBS (-) で 3 回洗浄した。その後、4% PFA (ナカライテスク) 含有 PBS (-) で 10 分間細胞を固定し、PBS (-) で 3 回洗浄した。そして、細胞内に取り込まれた鉄粒子を 2%

potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate (ナカライテスク) および2% 塩酸 (富士フィルム和光) を等量混合した試薬を処置し (プルシアンブルー染色)、倒立型顕微鏡 (IX70; Olympus、東京、日本) により観察して、撮像した。

A β 貪食能の解析は画像解析により行った。3.0 x 10⁵ cells/well で 24 穴プレートに播種した初代培養ミクログリア、末梢血造血幹細胞由来細胞および腹腔マクロファージに対して、1 μ M に調製した合成 human A β 1-42 塩酸塩 (A β ; AnaSpec、San Jose、CA、USA) を 12 時間処置した。その後、免疫細胞化学的染色を行い、Iba1 および A β 免疫反応陽性領域を Image J (ver. 1.50i; National Institute of Health; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) (33)を用いて計測し、A β 免疫反応陽性領域の占める割合を A β 貪食細胞率として解析した。

1-2-6. RT-qPCR 法によるサイトカイン遺伝子発現の解析

1.0 x 10⁶ cells/well で 24 穴プレートに播種したミクログリア、骨髄由来細胞および腹腔マクロファージに lipopolysaccharide (LPS) (500 ng/mL、Sigma) を 4 時間処置した。その後、全 RNA を Illustra RNAspin mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare、Amersham、IL、USA) を用いて抽出し、NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。各サンプルの RNA 量を 400 ng に揃え High Capacity cDNA Transcription Kit (Applied Biosystems、Foster、CA、USA) と、Takara PCR Thermal Cycler MP (タカラバイオ、草津、日本) を用いて、逆転写反応を行い、cDNA を合成した。合成した cDNA を用いて mRNA 発現量を Thermal Cycler Dice Real Time System II (タカラバイオ) で解析した。PCR 反応には SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) を使用し、*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)*、*Il-1 β* 、*Il-6*、*tumor necrosis factor (Tnf) - α* 、*transforming growth factor- β 1 (Tgf- β 1)*、*arginase-1 (Arg1)*

Table 1. Specific primer sets used for RT-qPCR amplification.

<i>Gapdh</i>	NM_008084.2	Forward	5'-aacgacccttcattgacctc-3'
		Reverse	5'-actgtgccgttgaattgcc-3'
<i>Il-1β</i>	NM_008361.4	Forward	5'-aagttgacggaccccaaaag-3'
		Reverse	5'-tggctgcgagattgaagctg-3'
<i>Il-6</i>	NM_031168.2	Forward	5'-acaaagccagagtccttcagag-3'
		Reverse	5'-tggaaattgggtaggaaggac-3'
<i>Tnf-α</i>	NM_013693.3	Forward	5'-tcgtagcaaaccaccaagt-3'
		Reverse	5'-tttgatccatgccgttg-3'
<i>Tgf-β1</i>	NM_011577.2	Forward	5'-tgtgagcaacatgtggaac-3'
		Reverse	5'-acgtcaaaagacagccactc-3'
<i>Arg1</i>	NM_007482.3	Forward	5'-tggcttaaccttgcttc-3'
		Reverse	5'-ttcatgtggcgattcacag-3'
<i>Cd163</i>	NM_001170395.1	Forward	5'-actggggcaacaatactgt-3'
		Reverse	5'-ctgccagttttgcattgcc-3'

および *Cd163* のプライマーを用いて PCR 反応を行った。プライマーの配列は Table 1 に示した。mRNA 発現量は *Gapdh* 遺伝子を内部標準に用いて $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法により各遺伝子の発現量を相対的に定量した。

1-2-7. 統計解析

3 群以上の比較での統計学的解析は分散分析法 (analysis of variance ; ANOVA) を用い、検定には Bonferroni/Dunn の検定を用いた。2 群間の平均値の比較には Student t 検定を用いた。統計解析ソフトは GraphPad Prism5 (エムデーエフ、東京、日本) を使用した。得られた実験結果は、平均値 \pm 標準誤差 (standard error of the mean ; SEM) で表示した。危険率 5%以下両側を統計学的に有意差があると判定した。

1-3. 実験結果

1-3-1.末梢血からの造血幹細胞の採取

はじめに、骨髄および末梢血中に存在する造血幹細胞 (lineage⁻/c-kit⁺細胞) の数をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、マウス 1 匹から採取できる末梢血は約 1 mL であり、そこに含まれる造血幹細胞数 (6.0×10^4 cells) は、マウス 1 匹あたりの骨髄中の造血幹細胞数 (3.0×10^6 cells) の約 1.4% であり、極めて少ないことがわかった ($t=5.453, P=0.0055$)

(Fig. 1A)。そこで、骨髄中への造血幹細胞の生着を阻害する作用のある G-CSF および CXCR4 阻害剤 (AMD3100) を用いて、骨髄中に存在する造血幹細胞の移行を促すための使用条件を検討した。まず、G-CSF の投与日数を検討したところ、5 日間投与時に、採取できる造血幹細胞数が最も多いことがわかった ($F(4, 60)=5.265, P=0.0084$) (Fig. 1B)。さらに、AMD3100 との併用効果を検討したところ(29)、G-CSF (5 日間) および AMD3100 (1 日間) 併用投与群では、薬剤非処置群、G-CSF (5 日間) 投与群、AMD3100 (1 日間) 投与群と比べて、それぞれ約 11 倍、約 5.6 倍、約 7.7 倍の造血幹細胞数が採取できることがわかった ($F(3, 27)=8.453, P=0.0027$) (Fig. 1C)。これらの結果より、以降の実験では G-CSF (5 日間) および AMD3100 (1 日間) をマウスに前投与した後、末梢血造血幹細胞を採取した。しかしながら、薬剤の前投与をしても、末梢血から得られる造血幹細胞数は、骨髄と比べ、依然として少ないことが分かった。そこで、移植に用いるのに十分量のミクログリア様細胞を得るため、末梢血造血幹細胞からミクログリア様細胞を効率良く分化誘導する方法の検討を行った。

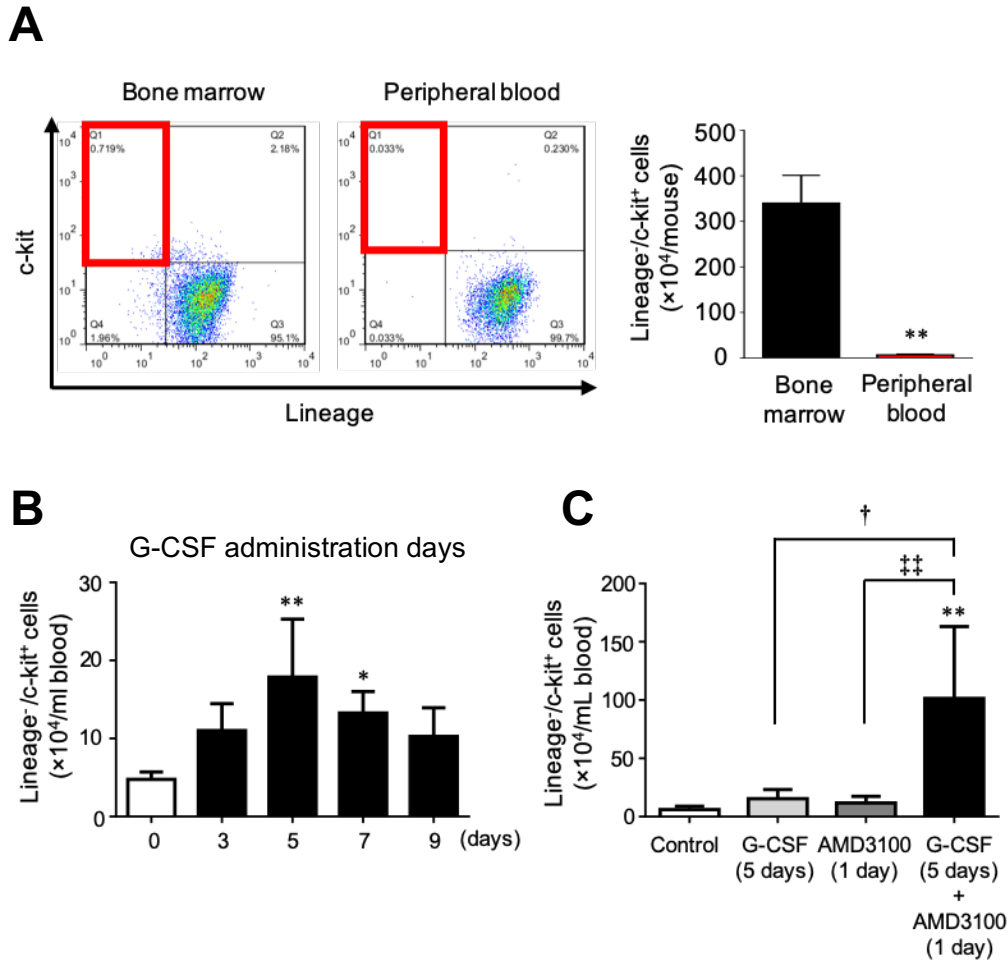


Figure 1. Mobilization of hematopoietic stem cells to peripheral blood (PB) from bone marrow (BM).

A, Comparison of the number of lineage⁻/c-kit⁺ cells (red square fractionation) in BM and PB by flow cytometric analysis. Student's t-test was used for statistical analysis. Data represent means ± SEM of three samples per group. **P < 0.01 vs. lineage⁻/c-kit⁺ cells from PB. **B**, Comparison of the number of lineage⁻/c-kit⁺ cells in PB by injection with G-CSF (500 µg/kg). Data represent means ± SEM of three independent experiments per group. One experiment includes five mice. Statistical significance of differences among groups was determined by one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. day 0. **C**, Comparison of the number of lineage⁻/c-kit⁺ cells in PB among control, G-CSF (500 µg/kg) 5 days, AMD3100 (5 mg/kg) 1 day, and G-CSF 5 days plus AMD3100 1 day. Data represent means ± SEM of three independent experiments per group. One experiment includes five mice. Statistical significance of differences among groups was determined by one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. **P < 0.01 vs. control. †P < 0.05 vs. G-CSF 5 days. ‡‡P < 0.01 vs. AMD3100 1 day. These figures are cited from Fig. 1 in *J. Alzheimers Dis.*, **2020**, 73, 413–429, and Fig. 1A and B are modified.

1-3-2. 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

1-3-1 より、G-CSF および CXCR4 阻害剤併用投与で得られる末梢血造血幹細胞の採取数が、骨髄造血幹細胞数より少ないことから、移植に用いるのに十分量のミクログリア様細胞を得るため、末梢血造血幹細胞からミクログリア様細胞を効率良く分化誘導する方法を検討した。末梢血造血幹細胞に CSF-1 (2.0×10^4 units/mL) を処置したところ、処置後 10 日目では、ミクログリアマーカーである CD11b および F4/80 が陽性の細胞の割合が約 $77.3 \pm 11.1\%$ であったのに対し、CSF-1 (2.0×10^4 units/mL) および IL-34 (10 ng/mL) 処置群では約 $96.9 \pm 4.22\%$ であり、ミクログリア様細胞への分化能が高かった ($t=2.791, P=0.0492$) (Fig. 2A and B)。また、処置後 10 日目における末梢血造血幹細胞由来細胞の接着細胞の数を解析したところ、CSF-1 (2.0×10^4 units/mL) 処置群と比べて、CSF-1 (2.0×10^4 units/mL) および IL-34 (10 ng/mL) 処置群では約 1.1 倍であった ($t=1.485, P=0.2118$) (Fig. 2C)。これらの結果より、CSF-1 だけでなく新たに IL-34 を分化誘導に用いることでミクログリア様細胞への分化誘導率が上がり、さらに効率良くミクログリア様細胞を調製できることが分かった。以降の実験では CSF-1 (2.0×10^4 units/mL) および IL-34 (10 ng/mL) を用いてミクログリア様細胞への分化誘導を行った。

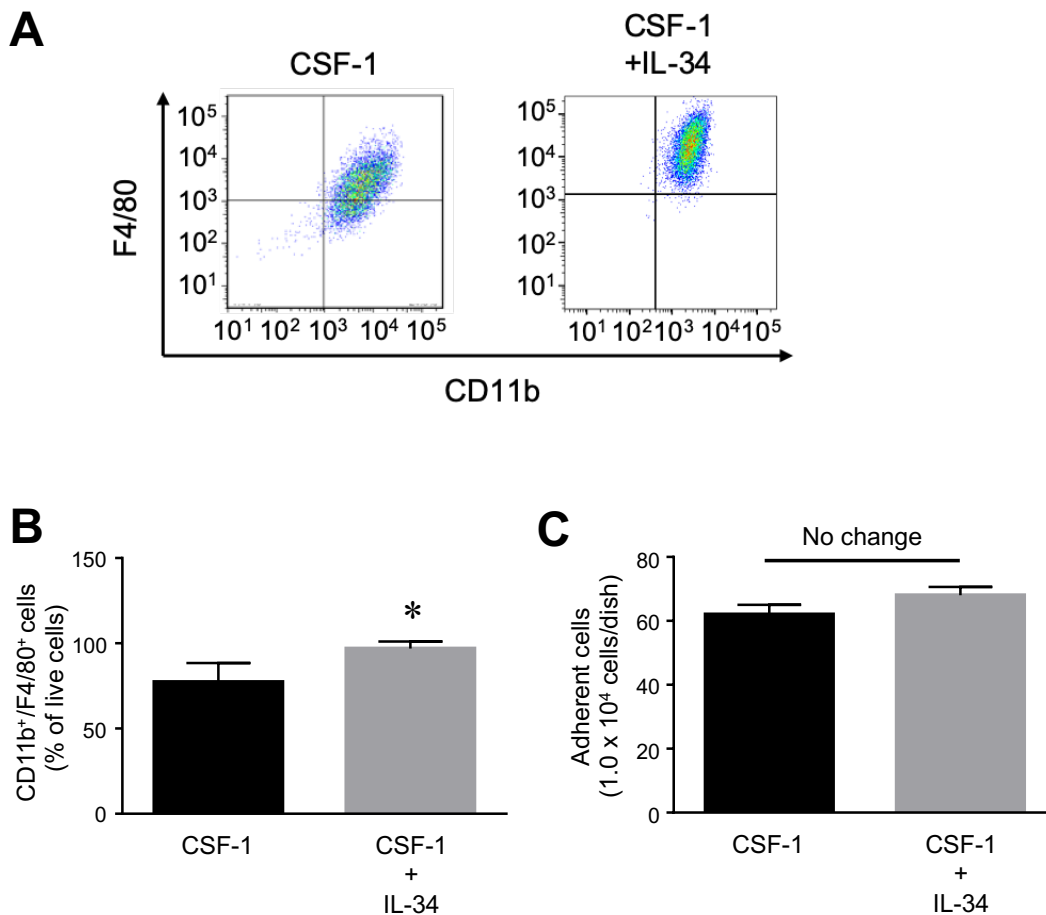


Figure 2. Differentiation from PB-derived cells to microglia-like cells using CSF-1 and IL-34.

A and B, PB-derived cells treated with CSF-1 and CSF-1 plus IL-34 for 10 days expressed the microglial markers CD11b and F4/80 (**A**). A comparison of the proportion of CD11b⁺/F4/80⁺ cells among live cells is shown (**B**). **C**, Numbers of adherent cells that arose in cultures 10 days after stimulation with CSF-1 and CSF-1 plus IL-34. Student's t-test was used for statistical analysis. Data represent the mean ± SEM of 3 samples per group. *P < 0.05 vs. CSF-1. These figures are cited from Supplementary Fig. S1 in *J. Alzheimers Dis.*, **2020**, 73, 413–429, and Fig. 1C is modified.

1-3-3. 末梢血造血幹細胞由来細胞におけるミクログリア/マクロファージマーカーの発現の免疫細胞化学的解析による比較

次に、CSF-1 および IL-34 を処置し分化誘導した末梢血造血幹細胞由来細胞の分化状態を確認するため、細胞マーカータンパク質を免疫細胞化学的染色により解析した。初代培養ミクログリア、分化誘導した末梢血造血幹細胞由来細胞、腹腔マクロファージにおけるミクログリアやマクロファージの様々なマーカーの発現を解析し比較した。その結果、各細胞において Iba1、F4/80 および CD11b の発現が確認された (Fig. 3A and B)。また、ミクログリアに比較的特異的に発現している TREM2(34)は、ミクログリアおよび末梢血造血幹細胞由来細胞において発現が確認されたが、腹腔マクロファージにおいてはほとんど発現が認められなかった (Fig. 3B)。

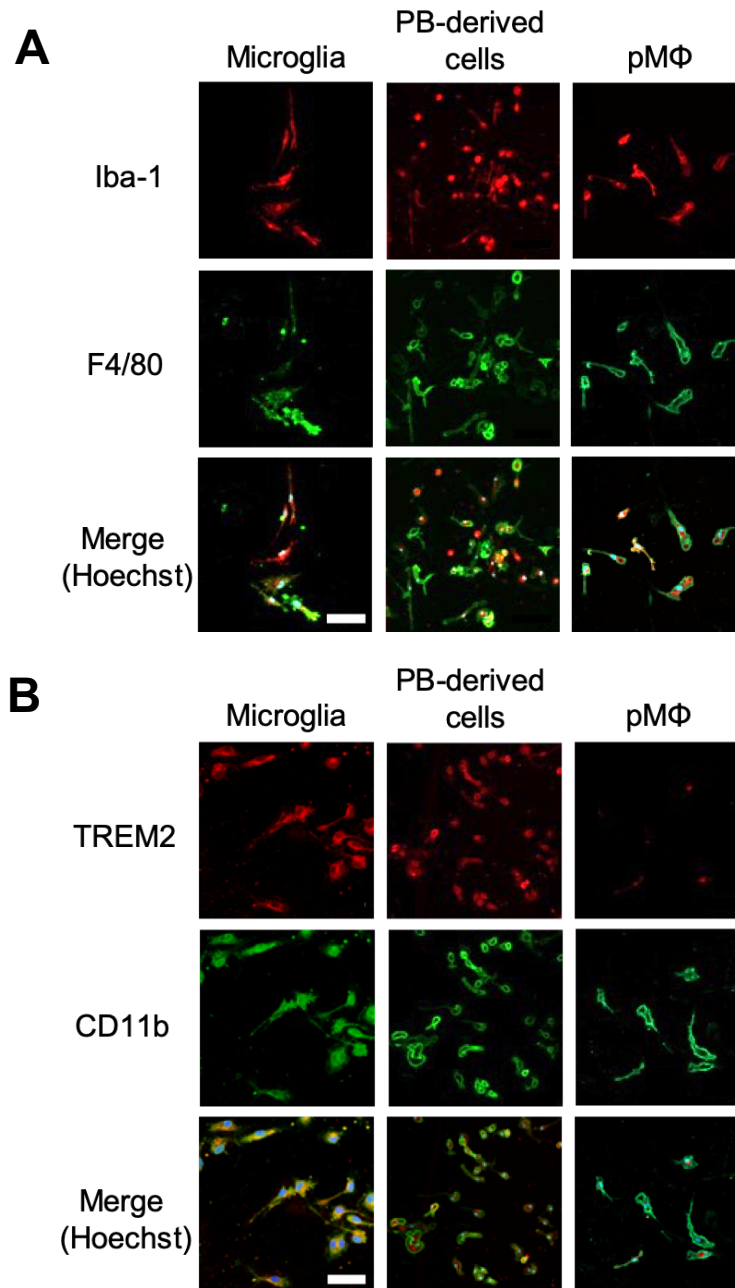


Figure 3. Expression of cell surface markers for microglia in primary-cultured microglia, PB-derived cells, and peripheral macrophage (pMφ).

A and B, Expression of macrophage/microglia markers such as Iba1 (red), F4/80 (green) (**A**), TREM2 (red), and CD11b (green) (**B**) were analyzed by immunocytochemistry in primary-cultured mouse microglia, PB-derived cells, and pMφ. Nuclei were counter-stained with Hoechst 33258 (blue). Scale bar = 50 μm. pMφ; peritoneal macrophage. These figures are cited from Fig. 1 in *J. Alzheimers Dis.*, **2020**, 73, 413–429, and Fig. 3A and B are modified.

1-3-4. 末梢血造血幹細胞由来細胞におけるミクログリア/マクロファージマーカー発現のフローサイトメトリーによる解析

他のミクログリア/マクロファージマーカーも含め、より詳細に各マーカーの発現強度をフローサイトメトリーを用いて比較した。発現強度の指標として、未染色サンプルの蛍光強度の中央値である陰性 MFI と蛍光標識抗体で染色したサンプルの中央値である陽性 MFI の比をとった MFI 比を用いた。その結果、細胞染色の結果と同様に、末梢血造血幹細胞由来細胞においてミクログリアマーカーの発現が検出され (Fig. 4A and B)、特に TREM2、Tmem119(35)、P2Y12R(36)および CX3CR1(37)の発現量は、腹腔マクロファージと比べて、ミクログリアの場合と同等であった (TREM2 : F(2,12)=35.89, P=0.0080、Tmem119 : F(2,12)=20.17, P=0.0182、P2Y12R : F(2,12)=16.85, P=0.0234、CX3CR1 : F(2,12)=12.99, P=0.0333)。一方で、CD45 や CD11b の発現強度は、それぞれミクログリアの約 3.3 倍、約 4.0 倍であり、ミクログリアとは類似性は低かった (CD45 : F(2,12)=21.45, P=0.001、CD11b : F(2,12)=380.7, P<0.001)。また、F4/80 は末梢血造血幹細胞、ミクログリアおよび腹腔マクロファージで発現量に差は見られなかった (F4/80 : F(2,12)=6.269, P=0.0848)。

これらの結果から、末梢血造血幹細胞由来細胞は、腹腔マクロファージよりもミクログリアに類似した性質の細胞であることが示唆された。

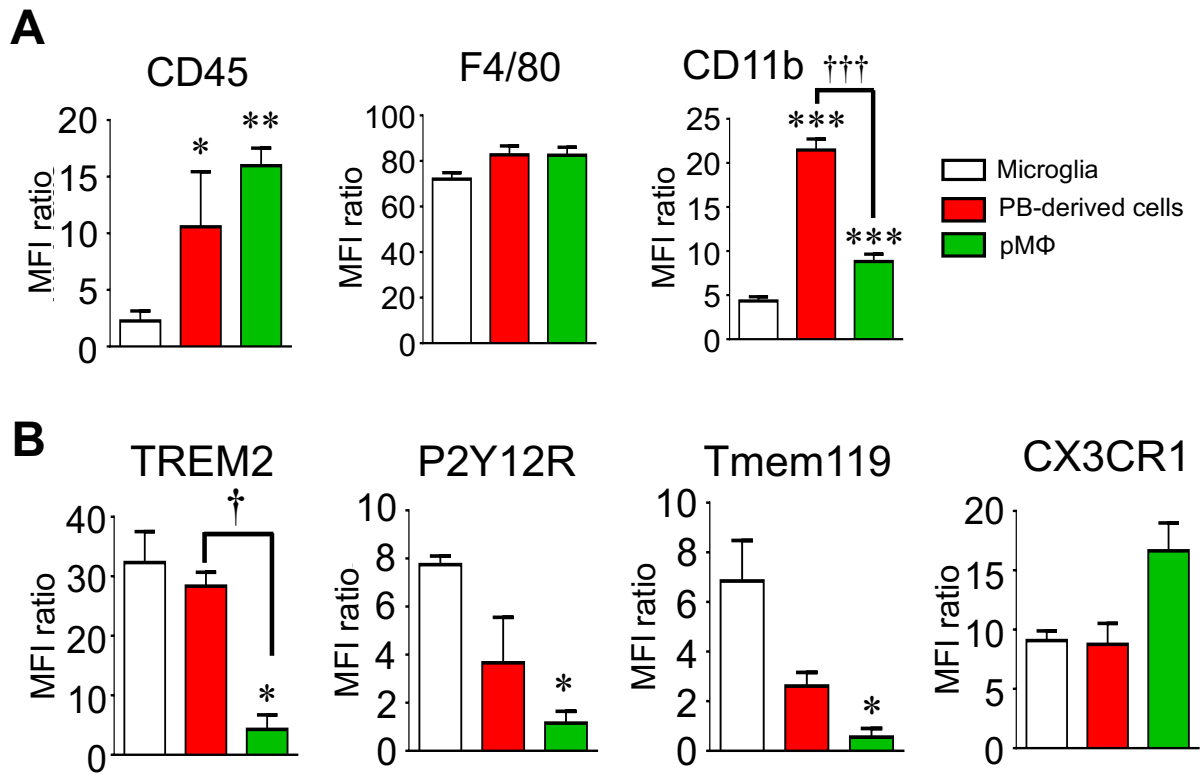


Figure 4. Flow cytometric analysis for expression of cell surface markers for microglia in primary-cultured microglia, PB-derived cells, and pMφ.

A and B, Expressions of cell surface markers of CD45, F4/80, CD11b, TREM2, P2Y12R, Tmem119 and CX3CR1 on primary-cultured microglia, PB-derived cells, and pMφ, were detected by a flow cytometry. An MFI ratio was calculated from the ratio of the levels in stained vs. unstained samples. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. primary-cultured microglia. †P < 0.05, †††P < 0.001 vs. PB-derived cells. These figures are cited from Fig.1 in *J. Alzheimers Dis.*, **2020**, 73, 413–429, and Fig. 4A is modified.

1-3-5. 末梢血造血幹細胞由来細胞における酸化鉄貪食能の解析

分化誘導した末梢血造血幹細胞由来細胞が異物の貪食能を有しているか否かを評価するために、カルボキシデキストランで被覆された酸化鉄粒子 (Resovist[®]) を用いて、末梢血造血幹細胞由来細胞の貪食能を評価した。Resovist[®]は肝 MRI 造影剤であり、MRI の際、肝臓の組織マクロファージであるクッパー細胞に貪食される試薬である。各細胞に 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の鉄濃度に調製した Resovist[®]を 12 時間処置した後、細胞内に取り込まれた鉄粒子をプルシアンブルー染色により染色し、取り込まれた酸化鉄粒子を可視化した (Fig. 5A)。1 視野における細胞数と酸化鉄を貪食した細胞をカウントし、1 視野あたりの貪食活性を示す細胞の割合 (貪食細胞数/総細胞数) を計算した (Fig. 5B)。ミクログリアおよび末梢血造血幹細胞由来細胞のいずれにおいても細胞内への鉄の取り込み、すなわち貪食能が確認され (Fig. 5A)、それらの鉄の貪食細胞の割合はそれぞれ $78.9 \pm 2.39\%$ および $81.0 \pm 7.06\%$ であり、ほぼ同等の Resovist[®]に対する貪食能を示すことがわかった ($t = 1.797, P = 0.1467$) (Fig. 5B)。

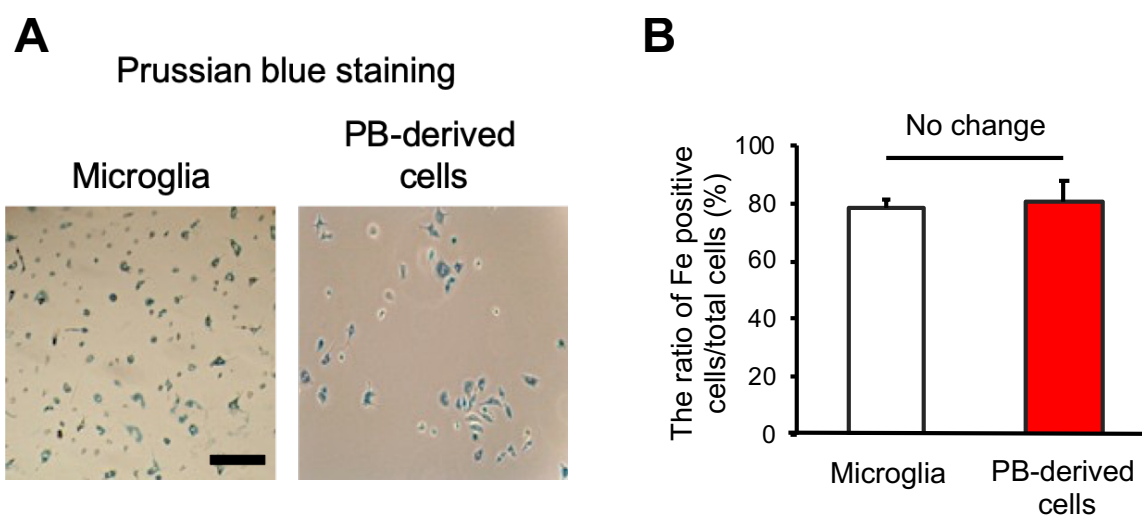


Figure 5. PB-derived cells have phagocytosis ability of iron particles.

A, Primary-cultured microglia and PB-derived cells from 6-week-old mice were treated with iron particles. The iron particles phagocytosed by cells were stained using the Prussian blue method. Scale bar = 50 μm . **B**, Graph shows the ratio of blue-colored phagocytic cells to total cells. Data represent means \pm SEM of three images of fields per group. Student's t-test was used for statistical analysis. Data represent means \pm SEM from three independent experiments.

1-3-6. 末梢血造血幹細胞由来細胞における A β 貪食能の解析

次に、ミクログリア、末梢血造血幹細胞由来細胞および腹腔マクロファージにおける A β に対する貪食機能を解析した。各細胞に A β (1 μ M) を 12 時間処置した後、細胞内に取り込まれた A β を免疫細胞化学的手法により解析した。その結果、ミクログリアと末梢血造血幹細胞由来細胞において A β の取り込みが観察された (Fig. 6A)。また、1 視野におけるミクログリアマーカーである Iba1 免疫反応陽性領域あたりの A β 免疫反応陽性領域を、画像解析ソフトにより定量し、各細胞への A β の取り込みの指標を算出した (Fig. 6B)。その結果、ミクログリアおよび末梢血造血幹細胞由来細胞はそれぞれ $85.9 \pm 2.56\%$ 、 $84.0 \pm 6.37\%$ であり、ほぼ同程度の A β 量を貪食していたのに対し、腹腔マクロファージの A β 貪食能はそれらの約 27% であった ($F(2,12) = 131.5$, $P < 0.001$) (Fig. 6B)。

以上の結果より、末梢血造血幹細胞から分化誘導した細胞は細胞表面マーカータンパク質の発現や貪食能がミクログリアに類似した細胞であることが示された。以降本論文では、分化誘導した末梢血造血幹細胞由来細胞を末梢血造血幹細胞由来ミクログリア様 (peripheral blood-derived microglia-like ; PBDML) 細胞と定義する。

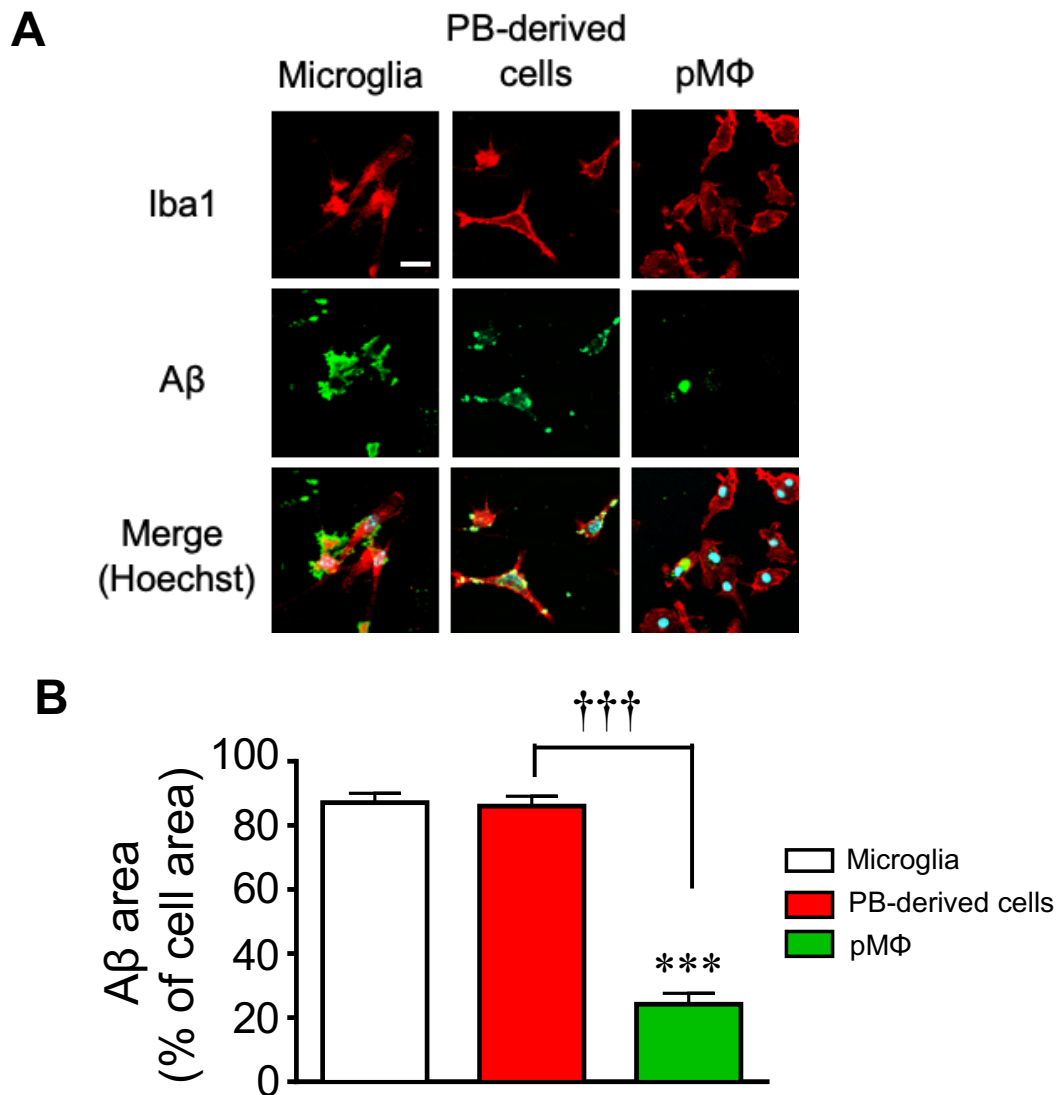


Figure 6. Comparison of A β phagocytic ability among microglia, PB-derived cells, and pM Φ .

A, Primary-cultured mouse microglia, PB-derived cells, and pM Φ were treated with A β for 12 h. Cells were stained with anti-Iba1 antibodies (red), anti-A β antibodies (green), and Hoechst 33258 (blue). Scale bar = 20 μ m. **B**, A β -immunoreactive area and cell area were measured using the Image J software. Data represent means \pm SEM of the percentage of A β -immunoreactive area in the total cell area from three independent experiments. Statistical significance of the differences among groups was determined by one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. ***P < 0.001 vs. primary-cultured microglia. †††P < 0.001 vs. PB-derived cells. These figures are cited from Fig. 2 in *J. Alzheimers Dis.*, **2020**, 73, 413–429.

1-3-7. PBDML 細胞、骨髓由来ミクログリア様細胞および末梢血単球由来マクロファージにおける A β 貪食能の比較

ミクログリアの代替となる細胞ソースとして、末梢血造血幹細胞の他に末梢血単球が考えられる。末梢血単球はマクロファージの前駆細胞であり、造血幹細胞と比べて末梢血中に存在する数が多く、末梢血造血幹細胞の採取時のような末梢血中の数を増やすための薬剤を投与する必要がない。末梢血単球を用いてミクログリア様細胞を分化誘導することができれば、末梢血造血幹細胞よりも容易に細胞が調製できる可能性がある。また、我々はこれまでに骨髓細胞から A β 貪食能を有するミクログリア様細胞 (BMDML 細胞) へと分化誘導することに成功している。そこで、PBDML 細胞、BMDML 細胞および末梢血単球 (Ly6c⁺細胞) 由来マクロファージにおいて、免疫細胞化学的染色および画像解析により A β 貪食能を評価した (Fig. 7)。1 視野におけるミクログリアマーカである Iba1 免疫反応陽性領域あたりの A β 免疫反応陽性領域を、画像解析ソフトにより定量し、各細胞への A β の取り込み、つまり A β 貪食能の指標としてグラフ化した。その結果、PBDML 細胞および BMDML 細胞の A β 貪食能は同程度であったが、末梢血単球由来マクロファージの A β 貪食能は、他の 2 細胞の場合の約 30%であった ($F(2,12) = 147.4, P < 0.001$)。以上より、末梢血単球由来マクロファージは、造血幹細胞由来の細胞と比べて A β 貪食能が低いことから、AD 細胞治療に用いるミクログリア代替細胞として、PBDML 細胞の方が適していることが示唆された。

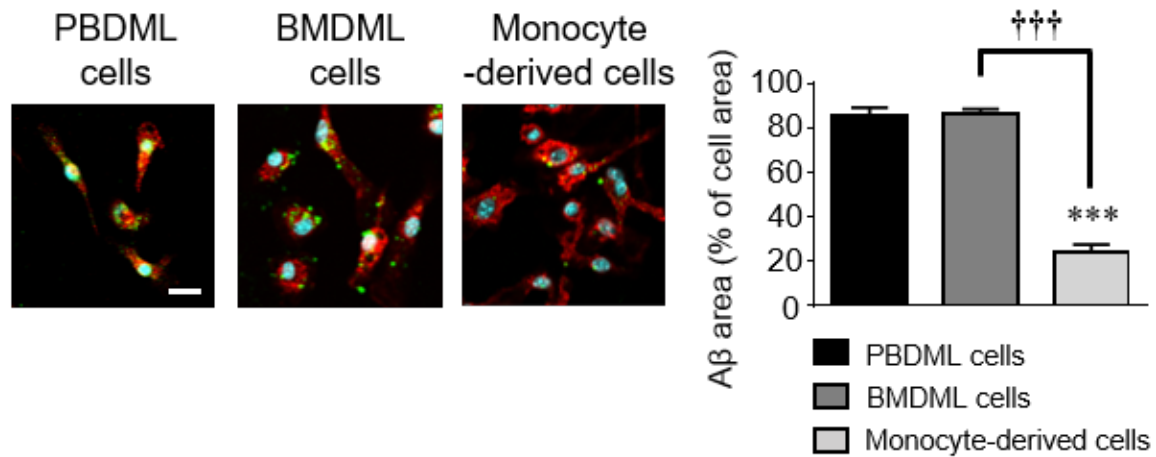


Figure 7. Comparison of A β phagocytic ability among PBDML cells, BMDML cells, and monocyte-derived cells.

Monocytes (Ly6c⁺ cells) were collected from mouse peripheral blood in mice and differentiated into macrophages with CSF-1 treatment. PBDML cells, BMDML cells, and monocyte-derived cells were treated with A β for 12 h. Cells were stained with anti-Iba1 antibodies (red), anti-A β antibodies (green), and Hoechst 33258 (blue). Scale bar = 50 μ m. Cell area and A β -immunoreactive area were measured using the Image J software. Data represent means \pm SEM of percentages of A β -immunoreactive area to cell area from three independent experiments. Statistical significance of the differences among groups was determined by one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. *** P < 0.001 vs. PBDML cells. ††† P < 0.001 vs. BMDML cells. These figures are cited from Supplementary Fig. S4 in J. Alzheimers Dis., 2020, 73, 413–429.

1-3-8. 炎症刺激に対する PBDML 細胞のサイトカイン遺伝子の発現解析

ミクログリアには炎症型 (M1 型) と抗炎症型 (M2 型) の 2 つの表現型が存在している。定常状態では M2 型をとっているが、lipopolysaccharide (LPS) などの炎症性刺激により M1 型の表現型へシフトすることが知られている(38)。そこで、LPS 処置による PBDML 細胞の炎症刺激に対する応答性を、炎症性サイトカインである *Il-1 β* 、*Il-6* および *Tnf- α* (Fig. 8A) ならびに抗炎症性サイトカインである *Tgf- β 1* や抗炎症型の M2 型マーカーである *Arg1* および *Cd163* (Fig. 8B) の mRNA 発現をその指標として RT-qPCR 法により解析した。その結果、未処置群において PBDML 細胞では、ミクログリアおよび腹腔マクロファージに比べ、*Il-1 β* の mRNA 発現量がそれぞれ約 10% および約 8.2%、*Il-6* では約 51% および約 52% まで減少していた (Fig. 8A)。一方で、抗炎症性サイトカインである *Tgf- β 1* の mRNA 発現量はそれぞれ約 1.1 倍 および約 1.0 倍、M2 マーカーである *Arg1* の mRNA 発現量はそれぞれ約 1.2 倍 および約 4.0 倍、*Cd163* では約 21 倍 および約 19 倍増加していることがわかった (Fig. 8B)。また LPS 処置群において、PBDML 細胞は未処置群と比べて炎症性サイトカインの mRNA 発現量が、それぞれ約 1000 倍 (*Il-1 β*)、約 455 倍 (*Il-6*)、約 77 倍増加しており、ミクログリアおよび腹腔マクロファージの場合と同様の傾向が見られた (Fig. 8A)。一方で、LPS 処置群における PBDML 細胞の抗炎症性サイトカインの発現量は無処置の場合とほぼ同等であった (Fig. 8B)

(*IL-1 β* (No treatment) : $F(2,12) = 22.93$, $P = 0.0015$ 、*IL-1 β* (LPS) : $F(2,12) = 11.87$, $P = 0.0126$ 、*IL-6* (No treatment) : $F(2,12) = 1.388$, $P = 0.3485$ 、*IL-6* (LPS) : $F(2,12) = 3.197$, $P = 0.1481$ 、*TNF- α* (No treatment) : $F(2,12) = 7.911$, $P = 0.0407$ 、*TNF- α* (LPS) : $F(2,12) = 0.7748$, $P = 0.5020$ 、*TGF- β 1* (No treatment) : $F(2,12) = 5.357$, $P = 0.0739$ 、*TGF- β 1* (LPS) : $F(2,12) = 0.4959$, $P = 0.6421$ 、*Arg1* (No treatment) : $F(2,12) = 5.260$, $P = 0.0589$ 、*Arg1* (LPS) : $F(2,12) = 3.201$, $P = 0.1479$ 、*CD163* (No treatment) : $F(2,12) = 714.0$, $P < 0.001$ 、*CD163* (LPS) : $F(2,12) = 6.3890$, $P = 0.7076$)。

これらのことから、PBDML 細胞は無刺激状態では M2 様の性質を有しており、炎症刺激に対してはミクログリアや腹腔マクロファージと同様にサイトカイン産性能を有する M1 様の細胞であることが示唆された。

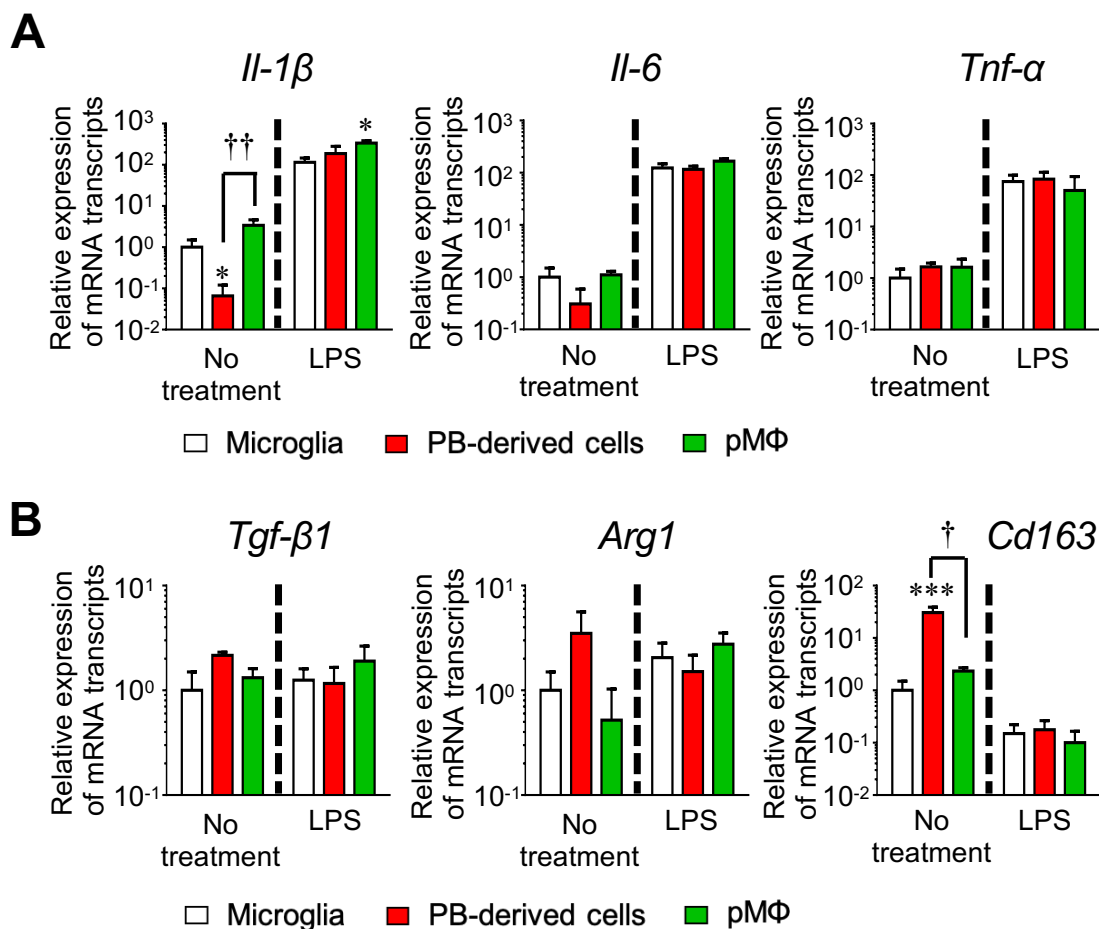


Figure 8. mRNA expression levels of cytokines in primary-cultured mouse microglia, PBDML cells, and pM ϕ under pro-inflammatory and inflammatory conditions.

A and B, mRNA expression levels of pro-inflammatory such as *Il-1 β* , *Il-6*, and *Tnf- α* (**A**) and anti-inflammatory factors such as *Tgf- β 1*, *Arg1*, and *Cd163* (**B**) with or without LPS stimulation in primary-cultured microglia (white), PB-derived cells (red), and pM ϕ (green), as determined by RT-qPCR. Data represent means \pm SEM from three independent experiments. Statistical significance of the differences among groups was determined by one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. primary-cultured microglia. † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs. PB-derived cells. These figures are cited from Fig. 2 in J. Alzheimers Dis., **2020**, 73, 413–429.

1-3-9. 老齢マウスにおける末梢血造血幹細胞の採取数およびPBDML細胞への分化効率

AD患者には高齢者が多いことから、高齢AD患者が自己の末梢血造血幹細胞を用いて細胞治療を実施することが可能であるかを評価するため、老齢マウス（20ヶ月齢）から末梢血造血幹細胞を採取し、それらから分化誘導したPBDML細胞の機能を評価した。その結果、1-3-1と同様の条件でG-CSFおよびAMD3100を前投与した老齢マウス（20ヶ月齢）から採取した末梢血造血幹細胞数は、若齢マウス（6週齢）の約35%であった（ $t=7.346, P<0.0001$ ）

（Fig. 9A）。一方で、フローサイトメトリーを用いて、分化誘導10日目におけるミクログリアマーカー陽性（ $CD11b^+/F4/80^+$ ）細胞集団の割合を調べたところ、ミクログリア様細胞への分化効率は、老齢マウス由来PBDML細胞では約 $92.7 \pm 6.55\%$ 、若齢マウス由来PBDML細胞では約 $96.9 \pm 4.22\%$ であり、同程度であった（ $t=1.587, P=0.4441$ ）（Fig. 9B）。以上より、老齢マウス由来末梢血造血幹細胞は採取数は若齢マウスより少ないものの、PBDML細胞への分化能は若齢マウスと同程度であり、細胞の機能は維持されている可能性がある。

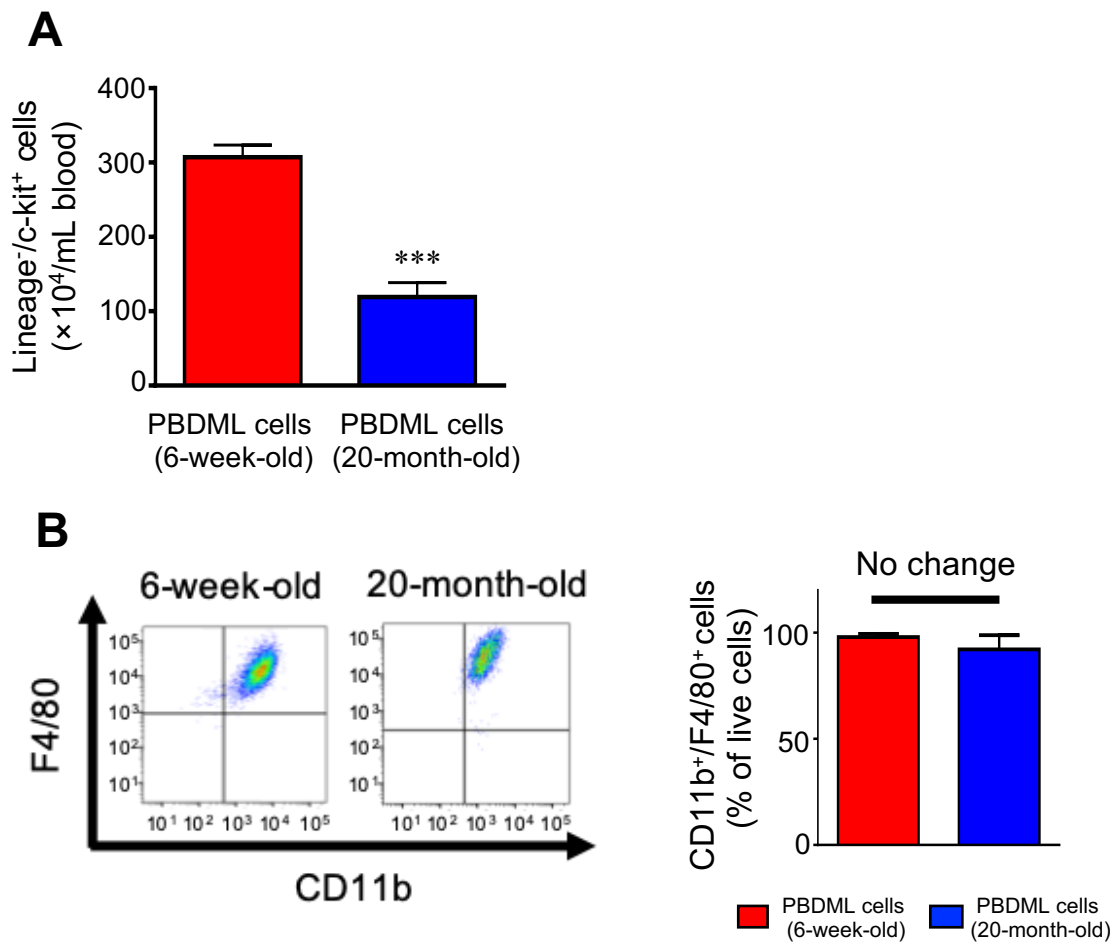


Figure 9. Comparison of the numbers and differentiation rates of PBDML cells from young and aged mice.

A, Comparison of the number of lineage⁻/c-kit⁺ cells in 6-week-old and 20-month-old mice. Student's *t*-test was used for statistical analysis. Data represent means ± SEM from three independent experiments. ****P* < 0.001 vs. lineage⁻/c-kit⁺ cells from 6-week-old mice. **B**, PBDML cells from 6-week-old and 20-month-old mice treated with CSF-1 and IL-34 for 10 days expressed the microglial markers CD11b and F4/80. A comparison of the proportion of CD11b⁺/F4/80⁺ cells among live cells is shown. Student's *t*-test was used for statistical analysis. Data represent means ± SEM from three independent experiments. These figures are cited from Fig. 3 in J. Alzheimers Dis., **2020**, 73, 413–429.

1-3-10. 老齡マウス由来 PBDML 細胞のミクログリア/マクロファージマーカー発現強度の解析

次に、フローサイトメトリーを用いてミクログリア/マクロファージマーカーの発現強度を解析したところ、老齡マウスから調製した PBDML 細胞では若齡マウスとは異なる発現パターンを示した (Fig. 10A and B)。若齡マウスから得た PBDML 細胞と比較して、TREM2 の発現強度は老齡マウスから得た PBDML 細胞で有意に低く、CD45 および CX3CR1 に関しても減少傾向にあった。一方で、CD11b の発現強度は若齡マウス由来 PBDML 細胞と比べて、老齡マウス由来 PBDML 細胞において約 1.3 倍有意に高く、P2Y12R および Tmem119 の発現強度も高い傾向にあった (CD45 : $t = 1.501$, $P = 0.2078$ 、F4/80 : $t = 2.828$, $P = 0.1056$ 、CD11b : $t = 4.706$, $P = 0.0423$ 、CX3CR1 : $t = 3.087$, $P = 0.0909$ 、TREM2 : $t = 7.101$, $P = 0.0193$ 、P2Y12R : $t = 4.029$, $P = 0.0564$ 、Tmem119 : $t = 1.971$, $P = 0.1875$)。

以上の結果から、若齡マウス由来細胞と老齡マウス由来細胞ではある程度表現型の異なる細胞が分化誘導されることがわかった。

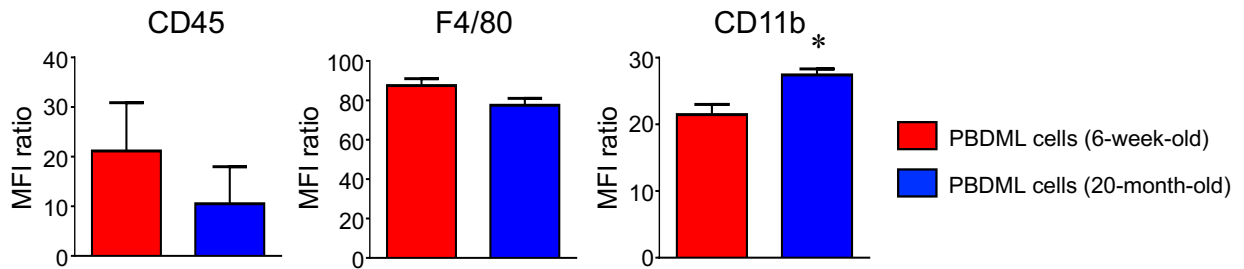
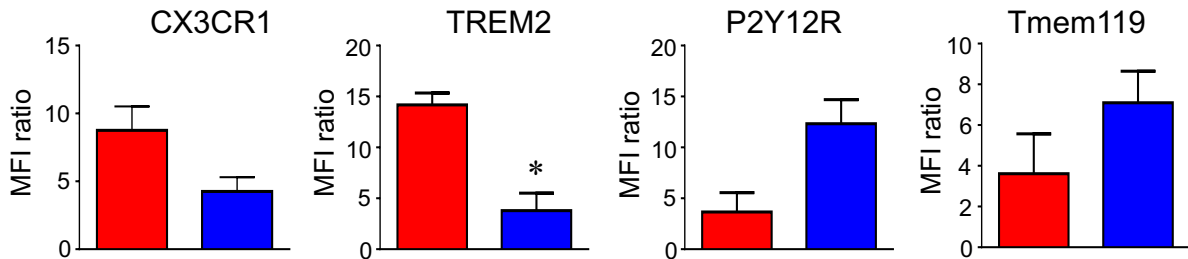
A**B**

Figure 10. Comparison of characteristics of PBDML cells from young and aged mice in flow cytometric analysis.

A and B, Flow cytometric analysis of CD45, CX3CR1, TREM2, P2Y12R, and Tmem119 in PBDML cells from 6-week-old and 20-month-week old mice. MFI ratio was calculated from the ratio of the levels in stained vs. unstained samples. Student's *t*-test was used for statistical analysis. Data represent means \pm SEM from three independent experiments. * $P < 0.05$ vs. PBDML cells from 6-week-old mice. These figures are cited from Fig. 3 in *J. Alzheimers Dis.*, **2020**, 73, 413–429, and Fig. 10A is modified.

1-3-11. 老齡マウス由来 PBDML 細胞における A β 貪食機能の解析

6 週齢および 20 ヶ月齢の末梢血造血幹細胞から分化誘導した PBDML 細胞ならびに 7 週齢のマウスから得た腹腔マクロファージにおける A β に対する貪食能の解析を 1-3-6 と同様の手法を用いて行った。その結果、20 ヶ月齢の老齡マウス由来 PBDML 細胞は 6 週齢の若齡マウス由来 PBDML 細胞に比べ、A β の貪食能は約 66%と低かったものの、7 週齢のマウスから調製した腹腔マクロファージの場合の約 2.3 倍と顕著に高かった ($F(2,12)=38.91, P=0.0004$) (Fig. 11A and B)。

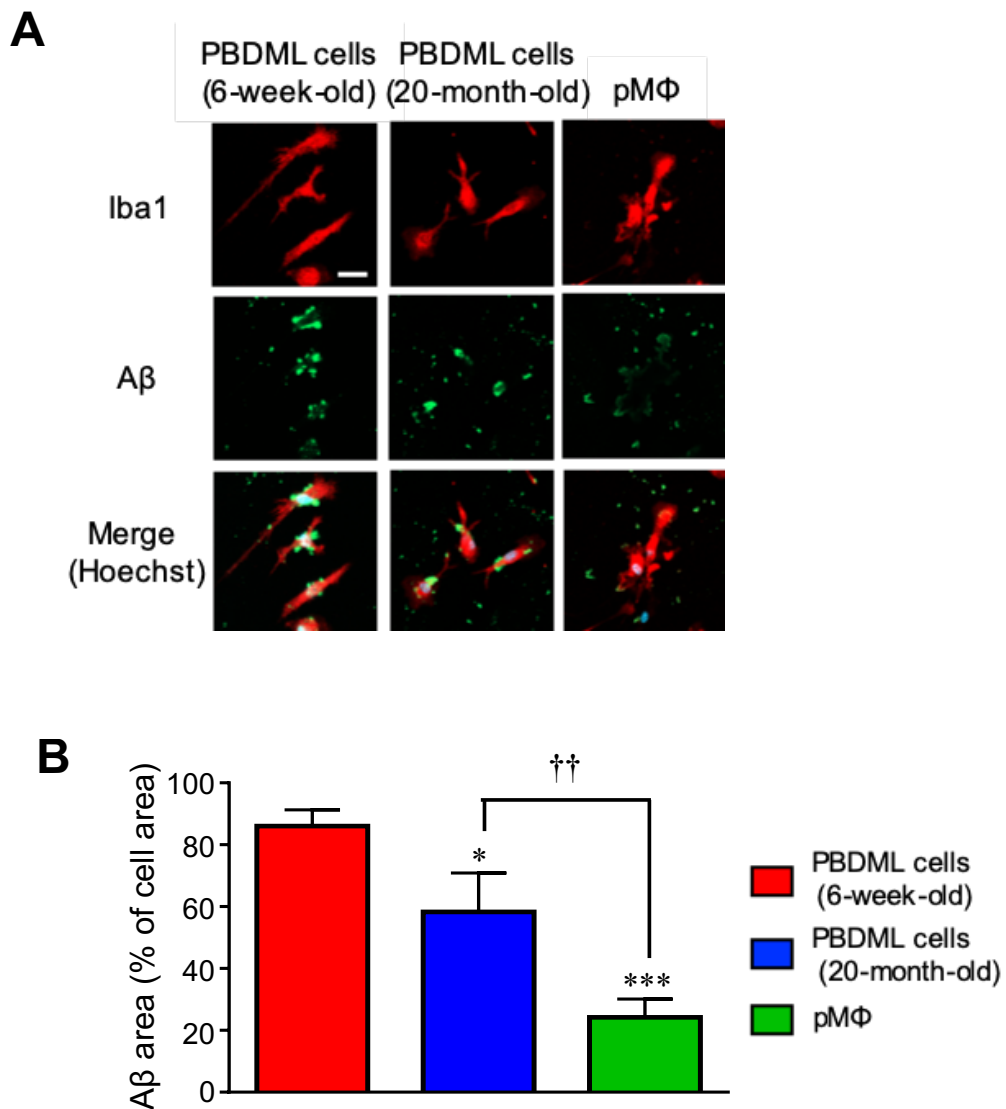


Figure 11. Aβ phagocytosis ability of PBDML cells declines with aging but has higher than that of pMΦ prepared from young mice.

A, PBDML cells prepared from 6-week-old and 20-month-old mice and pMΦ prepared from 7-week-old mice were treated with Aβ for 12 h, and then stained with anti-Iba1 antibodies (red), anti-Aβ antibodies (green), and Hoechst 33258 (blue). Scale bar = 20 μm. **B**, Aβ-immunoreactive area and cell area were measured using the Image J software. Data represent means ± SEM of the percentage of Aβ-immunoreactive area in total cell area from three independent experiments. Statistical significance of differences among groups was determined by one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. PBDML cells from 6-week-old mice. †† $P < 0.01$ vs. PBDML cells from 20-month-old mice. These figures are cited from Fig. 3 in *J. Alzheimers Dis.*, **2020**, 73, 413–429.

1-4. 考察

本章では、AD 患者の多くが高齢者であることを考慮し、低侵襲性に採取できる末梢血に着目し、ミクログリアの代替となる細胞を末梢血中に含まれる造血幹細胞から効率良く分化誘導する手法を開発することを目的とし、*in vitro* 系において解析を行った。

末梢血中に含まれる造血幹細胞の数は 0.002%以下と言われており、本解析においても骨髓造血幹細胞の場合と比べて、末梢血から得られるその数は極めて少ないことが確認された。ミクログリアの代替細胞を調製するにあたり、この問題は克服すべき課題である。造血幹細胞を骨髓から末梢血へと動員する薬剤として G-CSF(39)や CXCR4 阻害剤(40)が知られている。そこで本研究では、この 2 種類の薬剤を用いて末梢血中の造血幹細胞の採取数の変化を検討した。その結果、G-CSF (5 日間) および CXCR4 阻害剤 (AMD3100) (1 日間) をマウスに処置したところ、末梢血から採取できる造血幹細胞数を増やすことができた。

G-CSF 製剤は、1980 年代から発熱性好中球減少症の発症抑制、造血幹細胞移植における末梢血細胞の動員など、がん化学療法における臨床現場で広く使用されている。一方で、CXCR4 阻害剤は、本邦では 2016 年に製造販売が承認された新薬であり、G-CSF 製剤との併用使用により「自己末梢血幹細胞移植のための造血幹細胞の末梢血中への動員促進」に適応されている(41,42)。多発性骨髄腫や非ホジキンリンパ腫などの治療においては、シクロホスファミドなどを用いた骨髓抑制または骨髓破壊を行い、その後に骨髓の再構築を目的として患者自身の細胞由来である造血幹細胞の移植が行われる。自家移植では、移植する造血幹細胞の採取が簡便で、腫瘍細胞が混入する可能性が低い末梢血造血幹細胞が優先されている。自家末梢血造血幹細胞の採取には、患者の静脈より「血液分離装置」を用いて血液を体外循環させ、目的の造血幹細胞 (CD34⁺細胞) を選択的に採取するアフエレーシスを行う。従来の G-CSF 単独投与では、十分に末梢血幹細胞を得ることができない動員不良の患者も存在し、また動員が良好な患者であっても目標の細胞数達成までに頻回のアフエレーシスを行う必要があり、患者の負担が大きいという課題があった。

G-CSF 製剤と CXCR4 阻害剤の併用使用により、1 回のアフエレーシスで採取できる造血幹細胞数が増加し、繰り返し実施する必要がなくなり、患者の身体にかかる負担が少なくなる。この自己造血幹細胞移植では、患者に G-CSF および CXCR4 阻害剤を投与し、その 4~5 日目の末梢血中の造血幹細胞が増えている時期にアフエレーシスを行い、1 回 150~250 mL/kg (体重) の血液量を処理し、末梢血造血幹細胞 (CD34⁺細胞) を選択的に採取する。これを 1~2 回行うことで、自己造血幹細胞移植に必要な造血幹細胞 (CD34⁺細胞) 数を確保する。本邦のガイドラインでは、 2.0×10^6 個/kg (体重) の CD34⁺細胞が造血幹細胞移植に必要とされており、ヒトの体重を 60 kg として換算すると、ヒト 1 人あたり 1.2×10^8 個の CD34⁺細胞がアフエレーシスにより採取される。今回確立した方法により、G-CSF および CXCR4 阻害剤を併用投与したマウスの末梢血約 1 mL から 1.0×10^6 個の造血幹細胞が得られることがわかった。さらに、マウス末梢血造血幹細胞からほぼ 100%がミクログリア様細胞 (PBDML 細胞)

に分化することから、この細胞を海馬内へ移植する場合、マウスでは 2.0×10^5 個の PBDML 細胞を移植に用いたが（第 2 章）、ヒトの海馬がマウス海馬の体積の約 1,000 倍と換算すると、ヒトでは 2.0×10^8 個の PBDML 細胞が必要と考えられる。ヒト末梢血造血幹細胞がマウスと同様にほぼ 100%がミクログリア様細胞へと分化誘導できるとすると、海馬内移植に必要な造血幹細胞数は 2.0×10^8 個である。ヒト 1 人（60 kg）にアフェレーシスを 1~2 回実施することで 1.2×10^8 個の CD34⁺細胞が得られることから、本移植療法に必要な造血幹細胞数（ 2.0×10^8 個）はアフェレーシスを行う回数を数回増やすことで確保できる細胞数だと考えられ、本移植療法はヒトへと臨床応用できることが示唆された。

以上のように、末梢血から効率良く造血幹細胞を得ることに成功したが、骨髄から得られる造血幹細胞と比較すると、その数は少なく、移植に必要なミクログリア様細胞数を調製するには、ミクログリア様細胞への分化効率を上げる必要がある。今回、分化誘導に用いるサイトカインとして、CSF-1 だけでなく、新たに IL-34 を用いることで、末梢血造血幹細胞からミクログリア様細胞へと効率良く分化誘導できることを見出した。成体の造血系において、CSF-1 は転写因子である PU.1 や Irf8 を介して造血幹細胞から単球やマクロファージへの分化を促進する(43-45)。一方、ミクログリアは胎生期に卵黄嚢で原始マクロファージとして発生し、CSF-1 のシグナルを介して PU.1 および Irf8 の活性化によりミクログリアに分化し、脳が形成される発生初期段階で脳に生着することが報告されている(46,47)。一方で、IL-34 は CSF-1 と同じ CSF-1 受容体のリガンドであり、骨髄由来マクロファージの増殖を促進する作用があることが報告されている(48)。近年、脳のミクログリアや皮膚のランゲルハンス細胞など、組織マクロファージの分化、増殖、生存維持に IL-34 が関与していることが示唆されている(30,49,50)。さらに、IL-34 を用いてヒト末梢血単球からミクログリアの定常状態であるラミファイド型の形態をとるミクログリア様細胞への分化誘導に成功したことも報告されている(51)。これらの報告から、本研究では、CSF-1 に加えて新たに IL-34 を用いて、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法を検討した。CSF-1 単独処置群と比べて、CSF-1 および IL-34 併用処置群ではミクログリア様細胞 (CD11b⁺F4/80⁺細胞) への分化効率が高く、また、各サイトカイン処置後 10 日目の接着細胞数を比較すると、CSF-1 および IL-34 処置群における接着細胞数の方が多かった。以上の結果より、この 2 種類のサイトカインを併用処置することで、末梢血造血幹細胞から PBDML 細胞が最も効率良く分化誘導できることを見出した。同じ CSF-1 受容体を共有する CSF-1 と IL-34 であるが、CSF-1 はミクログリアの成熟、増殖に、IL-34 は成熟後の脳内でのミクログリア数の維持に寄与していることが示唆されており(30,49,50)、両サイトカインを併用処置することで、より成熟したミクログリア様の細胞へと分化誘導できたと考えられる。また、CSF-1 および IL-34 処置により作製した PBDML 細胞は、TREM2 および F4/80 をミクログリアと同程度で発現しており、さらに、近年報告されたミクログリアへの特異的マーカーである Tmem119 (35)や P2Y12R (36)、CX3CR1 (37)の発現強度も、腹腔マクロファージと比べるとミクログリアに似た発現パターンを示していた。特に、PBDML 細胞において TREM2 の発現強度がミクログリアと同程度であったが、TREM2

はミクログリアの貪食能を制御している分子であることから(34)、今回の解析において PBDML 細胞はミクログリアと同等の A β 貪食能を示したと考えられる。

ミクログリアは脳内環境に応じてその形態を変化させており、古典的には炎症型である M1 型と抗炎症型である M2 型に大別される(52)。M1 型は炎症性サイトカインや活性酸素種を産生し、炎症反応を惹起するのに対し、M2 型は IL-4、IL-10、TGF- β 1 など保護因子を産生し、組織修復や抗炎症に働くと考えられている(38)。本解析において、無刺激状態の PBDML 細胞は、ミクログリアや腹腔マクロファージと比べて、炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6) の発現量が低く、抗炎症性サイトカイン (TGF- β 1) および M2 マーカー (Arg1、CD163) の発現量が高かったことから、抗炎症型である M2 様の性質を持つ細胞であることが示唆された。一方、細菌感染を模倣した LPS による強力な炎症性刺激に対しては、IL-1 β 、IL-6 および *Tnf- α* の mRNA の発現上昇を引き起こした。このことから、M2 型様の性質をもつ PBDML 細胞は、感染時などの炎症刺激に対してはミクログリアと同様に M1 型の炎症型免疫細胞としての機能を発揮することができると考えられる。

ヒトにおいて、加齢に伴いミクログリアの形態異常が生じること(53)や、加齢マウスから採取した初代培養ミクログリアでは A β 貪食能が低下していることが報告されており(54–57)、加齢によりミクログリアの機能が低下することが示唆されている。そこで、AD 患者の多くが高齢者であることを考慮し、老齢マウスから採取した造血幹細胞の分化能、PBDML 細胞の A β 貪食能について評価した。その結果、末梢血から採取できる造血幹細胞数は若齢マウスと比較して減少したが、ミクログリア様細胞への分化能は同程度であった。骨髄中の造血を行う赤色骨髄は、加齢に伴い、機能を失って減少することが知られており、老齢マウスにおける血中の造血幹細胞数の減少はこれを反映していると考えられる。一方で、A β 貪食能については、老齢マウス由来の PBDML 細胞は若齢マウスより調製した PBDML 細胞より低かったものの、若齢マウス由来の腹腔マクロファージに比べて高く、老齢マウス由来の末梢血造血幹細胞由来細胞においても A β に対する貪食能が十分に維持されていることが判明した。このことは、高齢 AD 患者の自己の末梢血造血幹細胞でも移植療法に利用できる可能性を示唆する。しかしながら、加齢に伴い機能が低下することを鑑みて、高齢者の自己末梢血造血幹細胞を用いて治療を行う場合は、薬剤などによる移植細胞機能の賦活化が今後の検討課題と考えられる。これまでにガラントミンやニコチン受容体刺激薬がミクログリアに発現しているニコチン受容体を介してミクログリアの A β 貪食能を促進することが報告されている(58,59)。骨髄由来ミクログリア様細胞においてもニコチン受容体が発現している(60)ことから、PBDML 細胞においてもニコチン受容体を発現している可能性があり、これを介して細胞機能の賦活化ができることが考えられる。また、IL-4、IL-13 ならびに TGF- β 1 などの神経細胞やアストロサイトから分泌される液性因子により内在性ミクログリアの貪食能が賦活化されることが報告されており(61–63)、PBDML 細胞から分泌される液性因子が内在性ミクログリアの A β 貪食能の促進にも利用できると思われる。

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

2-1. 緒言

ミクログリアは通常、多数に分岐した長い突起をもつラミファイド型で脳内に存在しており、神経細胞のシナプスに直接接することによって脳内の環境を監視し、不要なシナプスを貪食により除去することで神経回路形成に関わっている(15,16)。また、脳障害時には、ミクログリアが異常を察知してアメボイド型と呼ばれる形態へと変化し、障害部位へ遊走し集積することが報告されている(15,16)。このように、ミクログリアは環境に応じて形態を変化させ機能していることから、ミクログリアの細胞形態は活性化状態の指標となる。さらに、AD病態下において、ミクログリアはA β プラークへ遊走し、貪食除去する機能を有しており、ADにおいて重要な役割を果たしている。本章では、第1章で作製したPBDML細胞が脳内に移植した際、どのくらい脳内へ生着できるのか、また脳内においてもA β を貪食することができるのかを明らかにするため、野生型マウスおよびADモデルであるAPdE9マウスの海馬内にenhanced green fluorescent protein (EGFP) 遺伝子導入マウスから採取、分化誘導したPBDML細胞を移植し、脳内動態ならびにA β 病態への影響を調べた。さらに、ADにおいて、作業記憶障害と空間認知記憶障害はそれぞれ重要な所見であるため、新規物体認識試験およびモーリス水迷路により細胞移植による各認知機能障害に対する治療効果を評価した。本実験で用いたAPdE9マウスは、家族性AD原因遺伝子であるAPPおよびPSEN1の変異遺伝子を導入したADモデルマウスで、脳内A β 蓄積および認知機能障害がみられる9~10ヵ月齢のマウスを用いて解析を行った。

1990年に、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)を長期に服用しているリウマチ患者ではAD発症リスクが6分の1であることが報告され(64)、ADにおける脳炎症の重要性が指摘された。しかしながら、その後、NSAIDsのADに対する効果は、抗炎症作用の発現に必要なシクロオキシゲナーゼ抑制作用ではなく、APPのC末切断に関与する γ -セクレターゼに対する抑制作用に基づくことが示唆され(65)、ADの「脳炎症説」は一時、否定的な風潮となった。その中、2016年、慢性脳炎症を抑える化学物質がアルツハイマー病モデルマウスにおける学習・記憶障害を予防する可能性が報告され、「脳炎症説」が再び注目されることとなった(66)。この報告では、AD患者と正常者の脳組織におけるミクログリアを比較すると、CSF1Rなどミクログリアの増殖に関連する分子の発現が増大しており、増殖活性が高まっていることがわかった。また、ADモデルマウスにCSF1Rキナーゼ阻害薬を経口投与したところ、脳内A β の蓄積には影響を全く及ぼしていないにもかかわらず、学習・記憶障害が有意に改善された。また、CSF1RならびにKitチロシンキナーゼ阻害薬のPLX3397(67)やKitキナーゼ阻害作用のないPLX5622(68)のADモデルマウスへの経口投与でも同様の現象が確認されている。これらのことから、慢性的脳炎症がADの結果に起こるものではなく、ADの原因となることが示

唆されている。本研究では、海馬内の炎症性サイトカインの発現量を解析し、PBDML 細胞移植が AD 脳における炎症状態に及ぼす影響を評価した。

オリゴデンドロサイトはグリア細胞の一つで、神経細胞に付随する構造物である髄鞘の形成を担う。オリゴデンドロサイトは、髄鞘形成により跳躍伝導を誘導し、活動電位の伝達速度を高めることが主な機能である。AD では、発症初期にオリゴデンドロサイトおよび髄鞘の脱落が認められることが知られており(69–71)、本解析において、PBDML 細胞移植による海馬におけるオリゴデンドロサイトへの影響を調べた。さらに、造血幹細胞由来マイクログリア様細胞が脳の常在細胞に及ぼす影響を調べるため、骨髄造血幹細胞由来マイクログリア様細胞が分泌する液性因子に着目し、内在性マイクログリアに及ぼす作用も併せて解析した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 実験動物

使用した動物とその入手先は次の通りである。末梢血採取には EGFP 遺伝子導入マウス (C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) マウス) (6 週齢; Jackson Lab., Bar Harbor, ME, USA) (72) を使用した。野生型マウスとして C57BL/6 マウス (9-10 ヶ月齢、清水実験材料)、また AD モデルマウスとして APdE9 マウス (9-10 ヶ月齢、Jackson Lab.) を使用した。APdE9 マウスは、ヒト APP の変異遺伝子 (Swedish mutation, K595N/M596L) と PSEN1 の変異遺伝子 (PS1-dE9) を導入したマウスである (73)。これら 2 つの変異型遺伝子は AD の早期発症を引き起こす原因遺伝子として同定されている。APdE9 マウスの雄性マウスを C57BL/6 の雌性マウスと交配して系統を維持し実験に用いた。動物は 25°C の恒温において飼育し、水や餌は自由に摂取させた。照明は 12 時間サイクルとした (8:00~19:59: 照明あり、20:00~7:59: 照明なし)。動物実験は「動物実験に関する指針 (日本実験動物学会)」および「京都薬科大学動物実験に関する指針」に従った。なお、本研究の動物実験は京都薬科大学動物実験委員会 (承認番号: DIPS -19-001、DIPS -19-005) ならびに遺伝子組換え実験安全委員会 (承認番号: 393、441) の承認を得ており、「動物実験に関する指針 (日本実験動物学会)」に従い実施した。

2-2-2. 細胞培養

第 1 章 (1-2-2) と同様の方法で、G-CSF および AMD3100 を前投与した生後 6 週齢の EGFP マウスから末梢血を採取し、GFP 陽性末梢血造血幹細胞を分取した。細胞培養も第 1 章 (1-2-2) と同様の方法で行い、末梢血造血幹細胞を CSF-1 および IL-34 処置後、10 日間培養することで分化誘導した。

生後 10 週齢の EGFP マウスから骨髄を採取し、第 1 章 (1-2-2) と同様の方法で GFP 陽性骨髄細胞を分取した。細胞培養も第 1 章 (1-2-2) と同様の方法で行い、骨髄細胞を CSF-1 処置後、7 日間培養することで分化誘導した。

マウス混合グリア細胞 (ミクログリアおよびアストロサイト) は、第 1 章 (1-2-2) と同様の方法で 0-2 日齢の C57BL/6 系マウス (清水実験材料) の新生仔脳より調製した。

2-2-3. 海馬マイクロインジェクションによる PBDML 細胞の移植

マウスに三種混合麻酔 (塩酸メドミジン: 0.3 mg/kg (共立製薬、東京、日本)、ミダゾラム: 4 mg/kg (アステラス製薬、東京、日本)、酒石酸塩ブトルフェール: 5 mg/kg (Meiji Seika ファルマ、東京、日本)) を腹腔内投与した後、深麻酔下で脳固定装置に固定した。PBS (-) 投与群を対照群とし、EGFP マウスから調製した PBDML 細胞を 2.0×10^5 cells/2 μ L PBS (-) となるように調製し、脳定位固定装置 (Stoelting, Chicago, IL, USA) を用いて 9-10 ヶ

月齢の APdE9 および C57BL/6 マウスの左右両方の海馬（冠矢交差から尾側へ 2.00 mm、外側へ 1.75 mm、硬膜下 1.75 mm）へマイクロシリンジ（Hamilton、Reno、NV、USA）を用いて、1 μ L/分の速度で移植した。移植後 2 分間移植に用いた針を静置し、その後ゆっくりと針を引き上げた。開頭部は金属クリップを用いて狭窄した。投与後、麻酔から覚醒するまで監視を行った。

2-2-4. 新規物体認識試験

移植細胞による作業記憶の機能障害改善効果を評価するため、細胞移植前、移植後 7 および 28 日目の 3 回、新規物体認識試験を行った。本試験では、20 lx の照明下でオープンフィールド（縦 x 横 x 高さ、40 cm x 40 cm x 30 cm）を用いて行った。行動解析には EthoVision XT 11.5（Noldus Information Technology、Leesburg、VA、USA）を用いてマウスが物体に接触する回数を計測した。行動試験は以下のタイムテーブルに従って行った（Fig.12）。まず、マウスをオープンフィールドに入れて 10 分間探索させることで、実験環境に馴化させた。30 分後にオープンフィールドにおける対角の 2 つの角に色と形の異なる 2 つの物体 O1 および O2 を配置し、10 分間 2 つの物体を探索させた（Familiarization trial）。その後、30 分の休憩を挟み、2 つの物体のうち 1 つの物体を新規物体に入れ替えて（O2→O3）配置し、マウスを探索させた（Recognition test）。既存物体（Familiar object）O1 を F、新規物体（Novel object）O2 と O3 を N とし、記憶成績を以下の式により計算した。

$$\text{物体指向指数 (Object preference index)} = N/(N+F) \times 100 (\%)$$

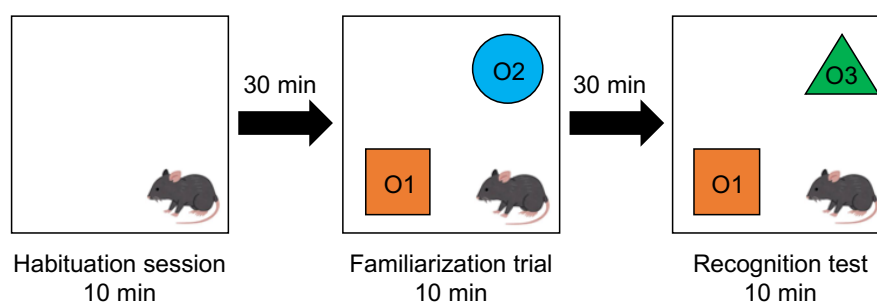


Figure 12. The schema of novel object recognition test.

The novel object recognition test (NORT) was conducted to evaluate the cognitive function in wild-type and APdE9 mice before and after the intrahippocampal injection of PBS and PBDML cells. A large square represents the square open field. Mice were first individually habituated with the open field for 10 min. After the 30 min intersession interval, mice explored objects in the open field during the object familiarization trial for 10 min and recognition test for 10 min with intersession interval of 30 min. Two

identical objects (O1) and (O2) were placed in the familiarization trial, and one object (O2) was replaced by a novel object (O3) in the recognition test.

2-2-5. モーリス水迷路

マウスの空間認知機能を調べるため、新規物体認識試験の終了後、1日空け、移植後30日目からモーリス水迷路を行った。本試験では、100 lxの照明下で、4方向に異なる目印をつけたプール（直径100 cm、高さ30 cm）に水をはり、マウスを泳がせた（水温：22.0±1.0°C）（Fig.13）。丸い透明のプラットホーム（直径10 cm）を水面から約1 cm下になるように決められた場所に設置し、プラットホームの位置がわからないよう、水を水溶性の絵の具で白く濁らせた。はじめの5日間は、マウスにプラットホームの位置を覚えさせるためのトレーニングを行った。プールにマウスを入れて泳がせ、1分たってもプラットホームに辿り着かなかった場合はプラットホームまでマウスを誘導し、20秒間留まらせ位置を記憶させた。これを1匹につき1日4回行った（4回とも異なる位置からマウスをプールに入れた）。このマウスがプラットホームに着くまでにかかる時間を EthoVision XT 11.5（Noldus Information Technology）により計測した。その後、6日目に、プラットホームを取り除き、プローブテストを行った。このテストは1匹につき1回のみで、マウスを1分間泳がせ、プール内を四分割し作成した領域の中で、プラットホームの存在した領域にマウスがどれだけ滞在したかを上述と同様に計測した。

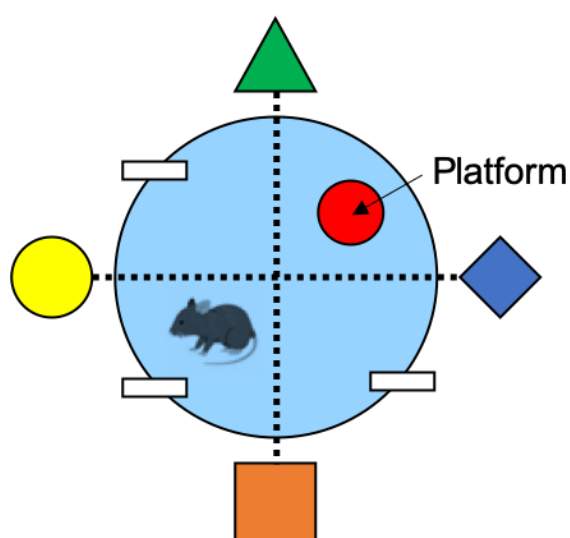


Figure 13. The schema of Morris water maze.

In the training phase, the mice were subjected to four trials each day for five consecutive days. In each of the four trials, the mouse was placed in the water at four different starting positions equally spaced around the perimeter of the pool and given 60 sec to swim to find the platform. If the mouse did not find the platform within 60 sec, it was guided to the platform and allowed to remain there for 20 sec. The

time the mouse spent to find the platform was measured as the escape latency. On day 6, the platform was removed from the pool in the probe trial. Each animal was subjected to one trial. The number of times the mouse crossed the previous location of the platform and the time spent in the target quadrant area in 60 sec was recorded.

2-2-6. マウスの脳摘出および薄切切片の作製

細胞移植前ならびに、細胞移植後の新規物体試験およびモーリス水迷路の終了後（移植後 0、8 および 36 日目）に、マウスに三種混合麻酔を腹腔内投与した後、深麻酔下で開胸し、左心室に翼状針を挿入し、流速 5 mL/分で 5 分間 PBS (-) により灌流した。灌流後すみやかに脳を摘出し、4% PFA を含む 100 mM phosphate buffer (PB) 固定液中にて 3 日間浸潤固定を行った。その後、30% ショ糖液を含む 100 mM PB 中にて脱水し、脳が PB 中に沈むまでクライオプロテクションを行った。脱水後、ドライアイスと optimal cutting temperature compound (Sakura Finetek、東京、日本) を用いて凍結包埋し、クライオスタット (Leica Instruments、Nussloch、Germany) を用いて厚さ 20 μ m の凍結切片を作製した。切片は 0.3% Triton X-100 を含む 100 mM PBS (-) 中で使用まで 4°C で保存した。

2-2-7. 免疫組織化学的染色法

免疫組織化学的実験は、フリーフローティング法で行い、蛍光染色は間接免疫蛍光法で行った。非特異的結合を防止するため、0.1% Triton X-100 (ナカライ) 含有 PBS (-) で 1% に希釈した bovine serum albumin (BSA) を室温で 15 分間反応させた。その後、一次抗体としてチキン抗 GFP 抗体 (1 : 1,000 ; Abcam ; cat# ab13970) およびマウス抗 A β 抗体 (1 : 1,000 ; 免疫生物研究所)、ラット抗 Myelin Basic Protein (MBP) 抗体 (1 : 1,000 ; Abcam ; cat# ab7349) を 4°C、overnight で反応させた。蛍光染色には Alexa Fluor 488 標識抗チキン IgG 抗体、Alexa Fluor 546 標識抗マウス IgG 抗体、Alexa Fluor 546 標識抗ラット IgG 抗体 (1 : 500) を用いて室温・遮光で 2 時間反応させた。核染色には、Hoechst 33258 (1 : 5,000) を用いた。それぞれの工程の間では、組織切片を 0.3% Triton X-100 を含む 100 mM PBS (-) 中で 3 回洗浄した。また、蛍光染色の組織画像は、LSM800 (Carl Zeiss) を用いて撮影した。

2-2-8. 画像解析による移植 PBDML 細胞の細胞間距離の解析

移植細胞の脳内動態を画像解析により解析した。最近隣距離法を用いて、Image J により細胞間距離を計測し、定量化した。GFP 陽性細胞移植後 0、8 および 36 日目の野生型および APdE9 マウスにおいて、海馬周辺に存在する GFP 陽性移植細胞を含む領域を LSM800 で撮影し、この画像を用いて各移植細胞の座標を Image J により測定し、各細胞間の距離を算出した。移植細胞間の距離は以下の式より計算した。

(x_1, y_1) および (x_2, y_2) は各移植細胞の座標を表している。

$$\text{移植細胞間距離} = \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2}$$

2-2-9. ステレオロジーによる移植した PBDML 細胞数ならびに海馬内 A β プラークの体積および数の定量解析

移植した PBDML 細胞の生存率や移植細胞の A β 病態への影響を調べるため、海馬内の PBDML 細胞数ならびに、A β プラークの体積および数をステレオロジーを用いて定量解析した。冠状面で切った海馬の切片（厚さ：20 μm ）を 6 枚ごとに計 12 枚使用し、各切片を蛍光免疫染色した。一次抗体としてチキン抗 GFP 抗体（1：1,000；Abcam）およびマウス抗 A β 抗体（1：1,000；免疫生物研究所）を 4°C、overnight で反応させた。蛍光染色には Alexa Fluor 488 標識抗チキン IgG 抗体、Alexa Fluor 546 標識抗マウス IgG 抗体（1：500）を用いて室温・遮光で 2 時間反応させた。また、蛍光染色の組織画像は、LSM800（Carl Zeiss）を用いて Z-stack 画像を撮影し、StereoInvestigator（MBF Bioscience、Williston、VT、USA）を用いて三次元的に解析した。

2-2-10. RT-qPCR 法によるマウス海馬におけるサイトカイン遺伝子発現の解析

移植後 36 日目の PBS を投与した野生型マウス、PBDML 細胞を投与した野生型マウス、PBS を投与した APdE9 マウス、PBDML 細胞を投与した APdE9 マウスの各群において、細胞移植による脳内環境への影響を調べるため、海馬の炎症性サイトカイン遺伝子の発現量を RT-qPCR 法を用いて解析した。マウスに三種混合麻酔を腹腔内投与した後、深麻酔下で開胸し、左心室に翼状針を挿入し、流速 5 mL/分で 5 分間 PBS (-) により灌流した。灌流後すみやかに脳を摘出し、海馬部位を分けてドライアイスで瞬間凍結した。その後、1-2-6 と同様の手法を用いて RNA 抽出および cDNA 合成を行い、*Gapdh*、*Il-1 β* 、*Il-6*、*Tnf- α* および *Mbp* のプライマーを用いて PCR 反応を行った。プライマーの配列は Table 2 に示した。mRNA 発現量は *Gapdh* 遺伝子を内部標準に用いて $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法により各遺伝子の発現量を相対的に定量した。

Table 2. Specific primer sets used for RT-qPCR amplification.

<i>Gapdh</i>	NM_008084.2	Forward	5'-aacgacccttcattgacctc-3'
		Reverse	5'-actgtgccgttgaatttggc-3'
<i>Il-1β</i>	NM_008361.4	Forward	5'-aagttgacggaccccaaaag-3'
		Reverse	5'-tggctgcgagatttgaagctg-3'
<i>Il-6</i>	NM_031168.2	Forward	5'-acaaagccagagtccttcagag-3'
		Reverse	5'-tggaaattgggtaggaaggac-3'
<i>Tnf-α</i>	NM_013693.3	Forward	5'-tcgtagcaaaccaccaagtg-3'
		Reverse	5'-tttgatccatgccgttgg-3'
<i>Mbp</i>	NM_001025251	Forward	5'-atatgtgtggccgcaaatg-3'
		Reverse	5'-tgggctctgagaggaaacag-3'

2-2-11. ELISA-based Cytokine Array

骨髄由来ミクログリア様細胞をそれぞれ 3.0×10^5 、 7.5×10^5 、 1.5×10^6 、 3.0×10^6 cells/well の濃度で 6 穴プレートに播種し、CSF-1 製剤および FBS 不含の MEM- α で 24 時間培養した。その後、得た培養上清中に含まれるサイトカインの種類と相対量を、Multi-Analyte ELISA Array Kit (QIAGEN、Hilden、Germany) を用い、付属のプロトコールに従い解析した。

2-2-12. ELISA

初代培養マウスミクログリアによる A β の食食量を、ELISA により測定した。96 穴プレートに回収したマウスミクログリアを 5×10^4 cells/well に調製して播種し、37°C で 10 時間以上培養した。培養したミクログリアを FBS 不含の MEM- α で丁寧に 3 回洗浄した後、A β (1 μ M; Anaspec) とマウス骨髄由来ミクログリア様細胞培養上清または SB525334 (1 μ M; R&D Systems) をミクログリアにそれぞれ 12 時間処置した。その後、培養液を回収し、細胞を PBS (-) で 3 回洗浄後、0.1% Triton X-100 含有 PBS (-) 100 μ L を加えて細胞を回収し、サンプルとした。細胞中の A β 量をヒト A β (1-x) ELISA キット (免疫生物研究所) を用い、付属のプロトコールに従い測定を行った。

2-2-13. Western blotting

ミクログリア (3.0×10^6 cells/well) を 48 穴プレートに播種し、12 時間以上培養した。培

養したミクログリアを FBS 不含の MEM- α で丁寧に 3 回洗浄した後、マウス骨髄由来ミクログリア様細胞培養上清または SB525334 (1 μ M ; R&D Systems) を処置し、12 時間後にミクログリアを PBS (-) で 3 回洗浄し、protease inhibitor cocktail (P8340 ; Sigma) 、NaF (1 mM ; 富士フィルム和光) および酸化バナデート (1 mM ; Sigma) を添加した radio-immunoprecipitation assay buffer (富士フィルム和光) を加えて溶解し、細胞液を回収した。この細胞液を、遠心し (12000 rpm、20 min、4°C) 、その上清をサンプルとして回収した。回収したサンプルは Qubit Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific) 、Quantus Fluorometer (Promega, Madison, WI, USA) を用いてタンパク定量を行い、3 μ g/ μ L になるように Sample Buffer Solution (富士フィルム和光) と滅菌処理をした超純水を混合し、5 分間煮沸し調製した。

この調製したサンプルを用い、タンパク質の発現を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 電気泳動法を行い解析した。試料を電気泳動 (10% polyacrylamide gel、0.04 A) により分離し、polyvinylidene difluoride 膜 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) に転写 (100 V、90 min) した。一次抗体として、ウサギ抗 Smad2/3 抗体 (1 : 1,000 ; Cell Signaling, Danvers, MA, USA ; cat# 5678) 、ウサギ抗 Phospho-Smad2 抗体 (1 : 1,000 ; Cell Signaling ; cat# 18338) 、ウサギ抗 Phospho-Smad3 抗体 (1 : 1,000 ; Cell Signaling ; cat# 9520) 、マウス抗 β -actin 抗体 (1 : 1,000 ; Sigma ; cat# A2228) 、二次抗体として、horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare) 、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare) を使用した。化学発光は X 線フィルム (Kodak, Rochester, NY, USA) を感光させることでバンドとして検出した。ブロッキング剤として、BSA (富士フィルム和光) を使用した。発色試薬には、ECL Western Blotting Detection System (GE Healthcare) を使用した。

2-2-14. 統計解析

3 群以上の比較での統計学的解析は分散分析法 ANOVA を用い、検定には Bonferroni/Dunn の検定を用いた。2 群間の平均値の比較には Student t 検定を用いた。モーリス水迷路試験における「プラットホームに着くまでの時間」については、二元配置分散分析を用いて、遺伝子型と試験日、または細胞投与群と試験日を変動因子として分析した。4 群 (野生型および APdE9 マウスの PBS 投与群および PBDML 細胞投与群) 間の比較の検定には Fisher's protected least significant difference (PLSD) の検定を用いた。

2-3. 実験結果

2-3-1. PBDML 細胞の脳への生着

EGFP マウス由来末梢血造血幹細胞より作製した PBDML 細胞を、APdE9 雄性 (9-10 ヲ月齡) および野生型 C57BL/6 雄性マウス (9-10 ヲ月齡) の海馬内へ移植し、マウス脳内でミクログリア様細胞としてどのくらいの期間、脳内で生存できるかを、細胞投与後 8 および 36 日目の脳組織切片 (矢状面で切った切片を使用) を用いて免疫組織化学的手法により解析した。その結果、移植後 8 および 36 日目のどちらにおいても、移植した GFP 陽性 PBDML 細胞が確認されたが、移植後 36 日目の PBDML 細胞は、移植後 8 日目と比べて細胞が拡散している傾向にあった (Fig. 14A)。また、移植 36 日目における PBDML 細胞の形態を観察したところ (Fig. 14B)、ミクログリアに典型的なラミファイド型やアメボイド型を呈していた。このことから、移植細胞はマウス脳内において移動し、少なくとも移植後 36 日目ではミクログリア様細胞として生存することが明らかとなった。

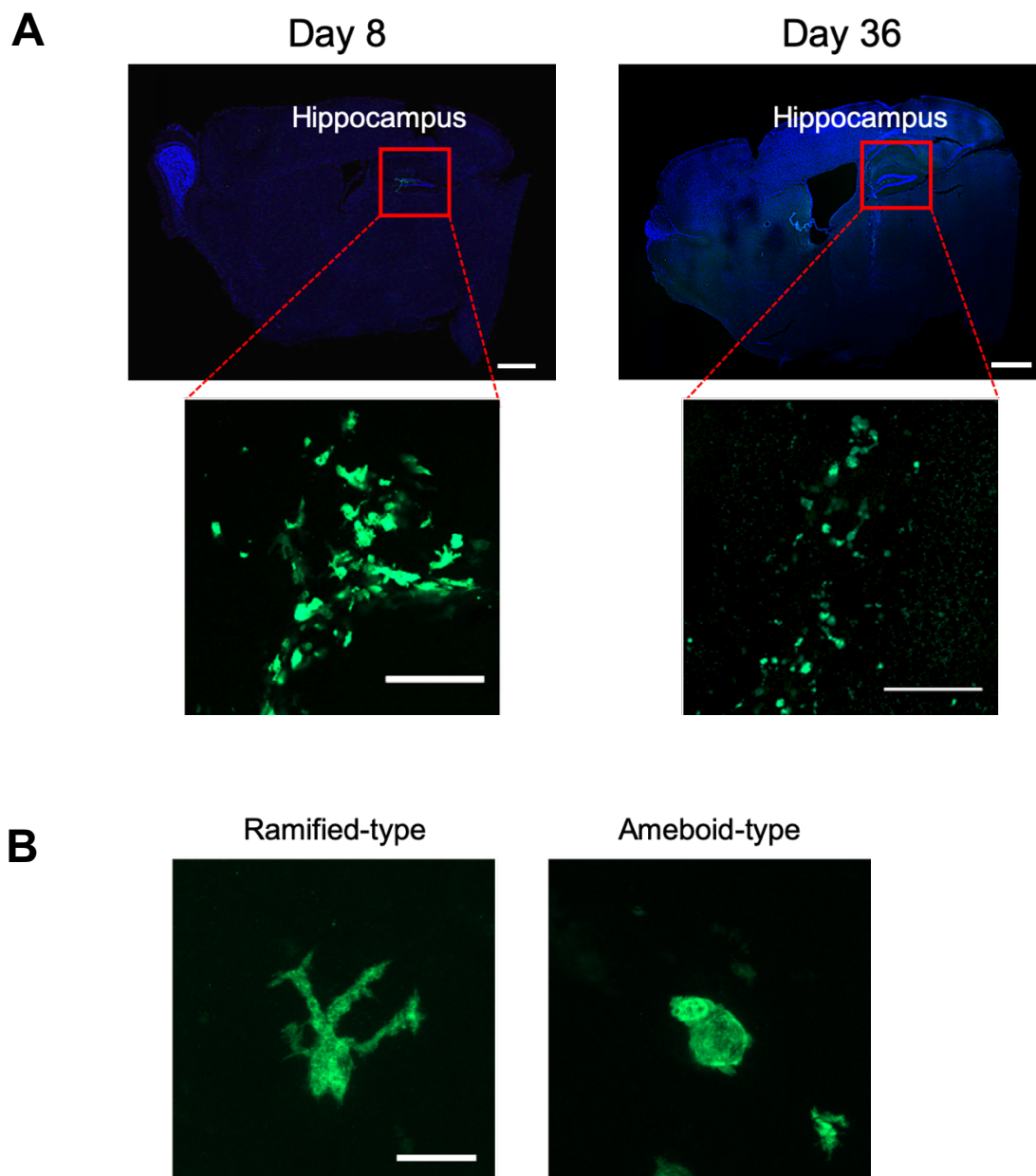


Figure 14. Morphological and engraftment analysis of PBDML cells 8 and 36 days after transplantation in brains of wild-type mice.

A, EGFP mouse-derived PBDML cells in hippocampi of wild-type mice 8 days and 36 days after the transplantation were stained with anti-GFP (green) antibodies and Hoechst 33258 (blue). Scale bars = 1000 μm (upper panels), 100 μm (lower panels). **B**, EGFP mouse-derived PBDML cells were stained with anti-GFP (green) antibody. PBDML cells engrafted in the brain parenchyma formed ramified-type and amoeboid-type morphology resembling of resident microglia in the brain. Scale bar = 20 μm . These figures are cited from Fig. 4 in *J. Alzheimers Dis.*, **2020**, 73, 413–429, and Fig. 14A is modified.

2-3-2. AD モデルマウスにおける移植 PBDML 細胞の脳内動態の解析

野生型および APdE9 マウスのいずれにおいても、細胞移植直後は PBDML 細胞は投与部位に密集していたが、移植後 8 および 36 日目では日数依存的に細胞が拡散していることがわかった (Fig. 15A)。そこで、これら隣接する各細胞間の距離を算出した結果 (Fig. 15B)、移植直後と比べて、移植後 8 日目では野生型マウスは約 1.9 倍、APdE9 マウスは約 1.2 倍、移植 36 日目では野生型マウスは約 3.2 倍、APdE9 マウスは約 5.4 倍移植細胞間距離が増大していた。また移植後 36 日目において、野生型マウスと比べて、APdE9 マウス脳内における最近隣細胞間距離が約 1.6 倍増大しており、AD 病態脳的环境下では移植細胞の移動距離が大きくなることが示された ($F(5,260)=27.02, P<0.001$)。我々の以前の解析から、AD モデルマウスに移植した細胞は A β プラークへ指向性を持って移動していることが示唆されており (25)、今回の結果もそれを支持するものと考えられる。

一方、移植細胞の生存率をステレオロジーを用いて解析したところ、野生型および APdE9 マウスにおいて、移植直後の細胞数を 100%としたとき、移植後 8 日目ではそれぞれ約 26%、約 33%まで減少しているのに対し、移植後 8 日目と比べて 36 日目ではそれぞれ約 68%、約 50%まで減少しており、日数依存的に細胞生存率が減少することがわかった ($F(5,60)=30.18, P=0.0007$) (Fig. 15C)。このことから、脳内に移植された PBDML 細胞は、その生着率は経時的に減少するものの長期的に脳内で生存することが明らかとなった。

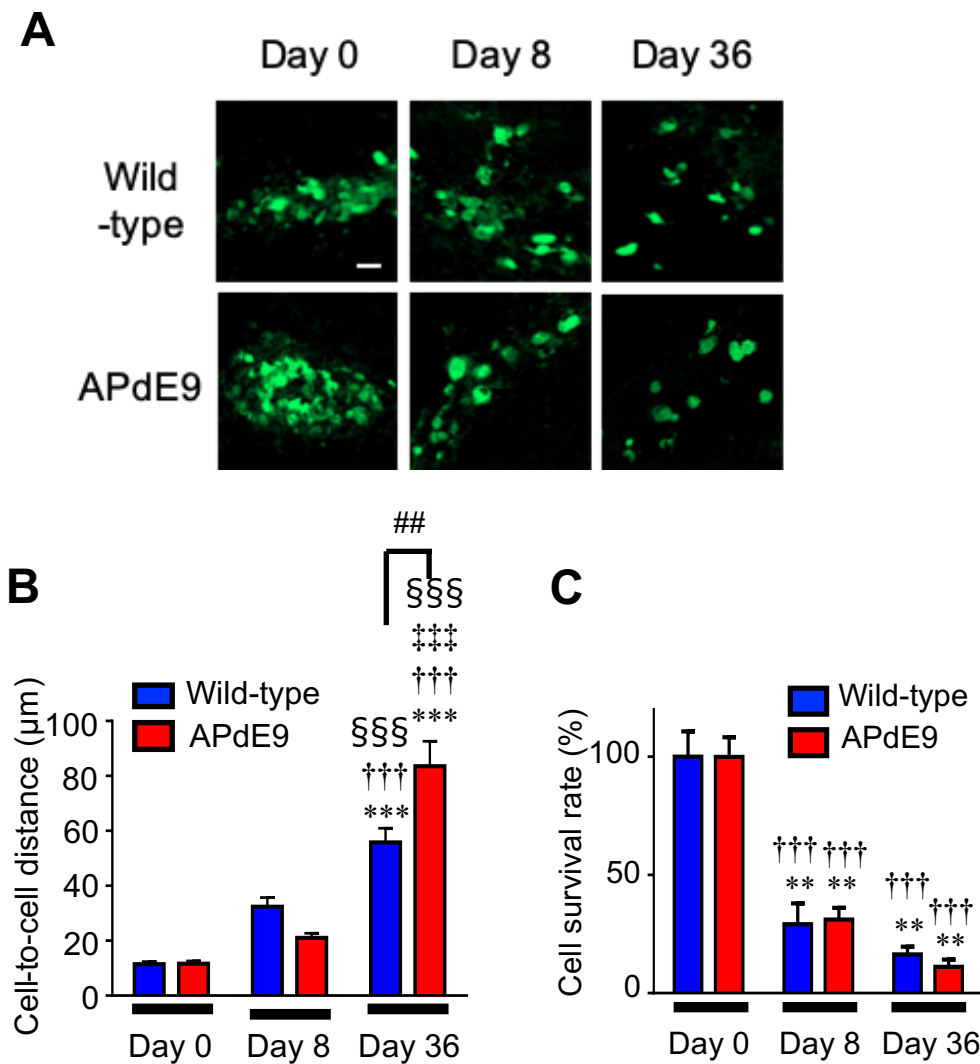


Figure 15. Distribution of PBDML cells in the hippocampus of mice after transplantation.

A, PBDML cells injected in hippocampi of wild-type and APdE9 mice on days 0, 8, and 36 were immunohistochemically analyzed with anti-GFP antibodies (green). Scale bar = 20 µm. **B and C**, Distances between nearest PBDML cells injected into brains on days 0, 8, and 36 were measured by image analysis (**B**). Stereological analysis of cell survival rate in wild-type and APdE9 mice on days 0, 8, and 36 after transplantation (**C**). Data represent means ± SEM in three brain sections per mouse from six different mice in each group. Statistical significance of differences among groups was determined by one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. day 0 post-transplantation of wild-type mice. ††P < 0.01, †††P < 0.001 vs. day 0 post-transplantation of APdE9 mice. ‡‡‡P < 0.001 vs. day 8 post-transplantation of wild-type mice. §§§P < 0.001 vs. day 8 post-transplantation of APdE9 mice. ##P < 0.01 vs. day 36 post-transplantation of wild-type mice. These figures are cited from Fig. 4 in *J. Alzheimers Dis.*, **2020**, 73, 413–429.

2-3-3. 移植 PBDML 細胞の A β 貪食能の解析

脳内に移植された PBDML 細胞の A β 貪食能を、免疫組織化学的染色により解析した。移植後 8 日目では A β プラークの周囲に集積する PBDML 細胞が多く認められた。一方、移植後 36 日目では PBDML 細胞は丸いアメボイド型の形態となり、A β を貪食する細胞が多かった (Fig. 16A)。また、移植直後、移植後 8 および 36 日目において、海馬に存在する A β を免疫組織化学的染色により解析したところ、A β 陽性領域が日数依存的に減少していた (Fig. 16B)。そこで、ステレオロジーを用いて、海馬領域における A β プラークの体積および数を定量的に解析した。その結果、PBS を投与した APdE9 マウスでは、移植後 36 日目において A β プラークの体積および数に変化はなかったものの、PBDML 細胞を移植した APdE9 マウスでは A β プラーク体積および数が日数依存的に有意に減少し、移植後 36 日目においては、移植直後のそれと比較して、それぞれ約 36% および約 35% にまで減少していた (Fig. 16C and D) (APdE9 mice injected with PBS : volume : $F(2,12) = 0.07610$, $P = 0.9276$, number : $F(2,12) = 0.7307$, $P = 0.5200$; APdE9 mice injected with PBDML cells : volume : $F(2,12) = 33.26$, $P = 0.0006$, number : $F(2,12) = 10.72$, $P = 0.0105$)。

これらの結果から、PBDML 細胞は脳内においても A β を貪食し、脳内 A β を除去できることが明らかとなった。

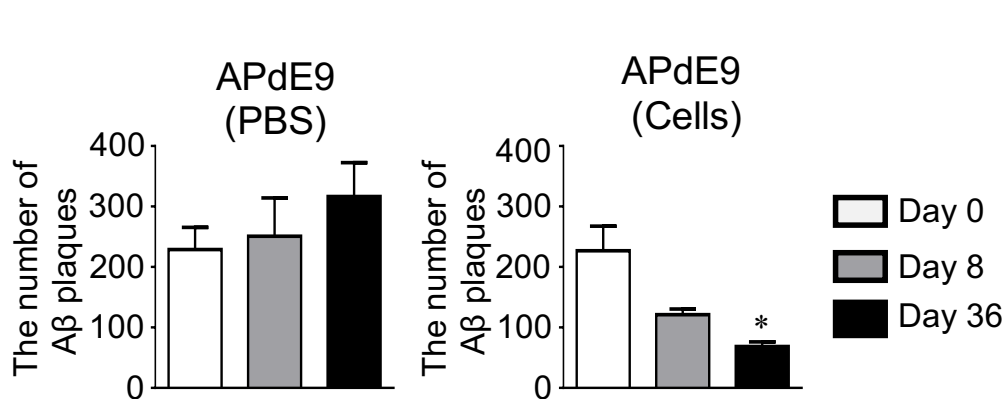
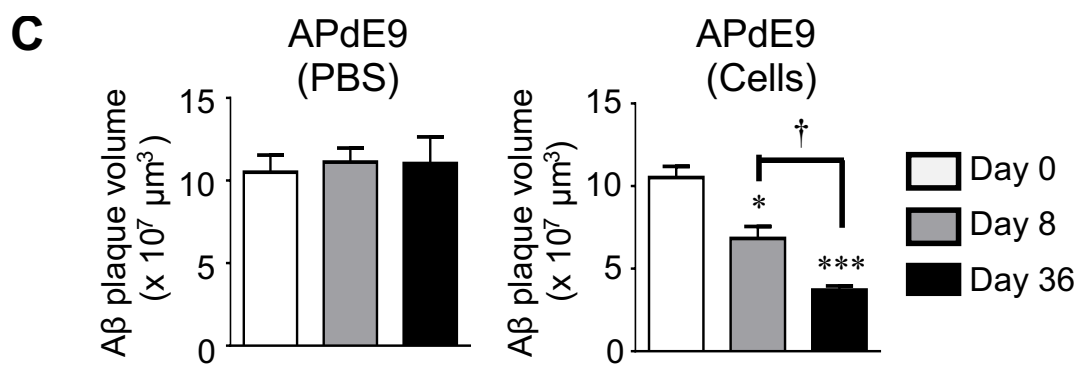
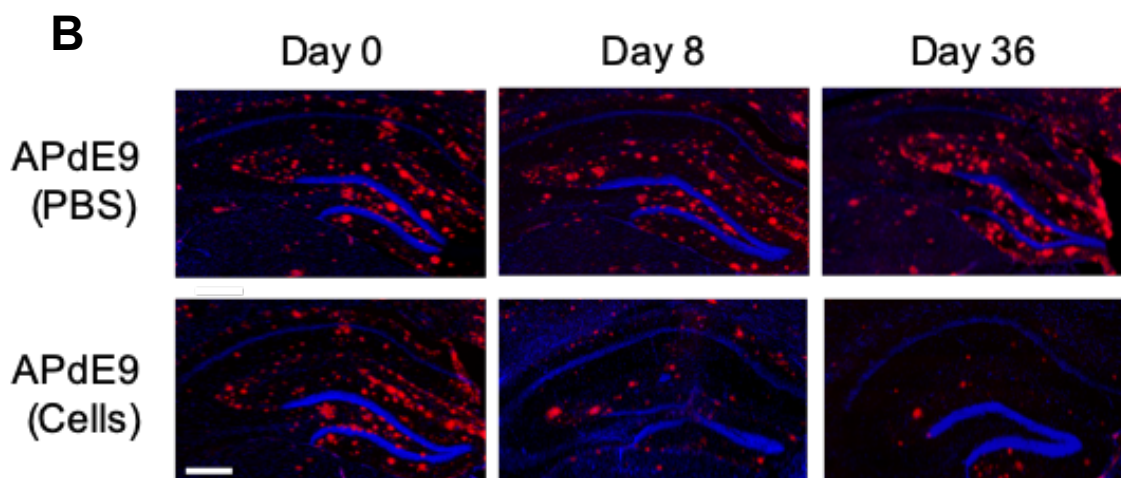
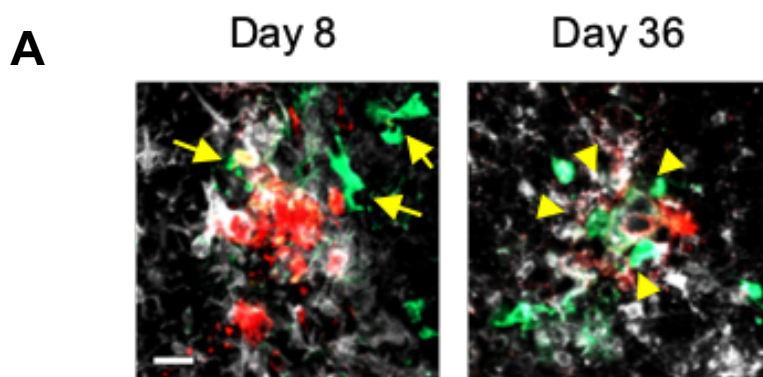


Figure 16. Transplanted PBDML cells phagocytose A β and ameliorate the A β burden in brains of APdE9 mice.

A, Brain sections from APdE9 mice on days 8 and 36 were stained with anti-A β antibodies (red), anti-GFP antibodies (green), anti-Iba-1 antibodies (white), and Hoechst 33258 (blue). GFP⁺ cells that exist in the vicinity of and accumulated on A β plaques are indicated with arrows and arrow heads, respectively. Scale bar = 20 μ m. **B**, Brain sections of APdE9 mice injected with PBS (upper panels) and PBDML cells (lower panels), harvested on days 0, 8, or 36, were stained with anti-A β antibodies (red) and Hoechst 33258 (blue). Scale bar = 200 μ m. **C and D**, Volume (**C**) and number (**D**) of A β plaques in hemisphere of APdE9 mice on days 0, 8, and 36, as determined by stereological analysis. Data represent means \pm SEM in six different mice in each group. Statistical significance of differences among groups was determined by one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. day 0. †P < 0.05 vs. day 8. These figures are cited from Fig. 4 in *J. Alzheimers Dis.*, **2020**, 73, 413–429.

2-3-4. PBDML 細胞移植による作業記憶障害の改善効果の解析

細胞移植による認知機能障害改善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試験を実施した。まず、移植前、移植後 7 および 28 日目において、新規物体認識試験を行った (Fig. 17A)。この試験はマウスが新規物体に興味を示すというげっ歯類の特性を利用した認知機能試験で、作業記憶を評価することができる試験である(74)。予めオープンフィールドに入れ、馴化させておいたマウスを 2 個の物体 (O1 と O2) を配置したオープンフィールドに入れ、2 個の物体を自由に探索させると、マウスにとって 2 個の物体は新規の物体であるため、同じ程度の頻度でそれぞれの物体に興味を示し、約 50%の確率でそれぞれの物体に近づく (familiarization trial)。30 分後に一方だけ物体を入れ替え (O2→O3)、同じように試験を行う (recognition test) とマウスは以前確認した物体を覚えていれば新しい物体により興味を示して近づき、確率として 50%以上の確率で新規物体に近づくと考えられる。もし覚えていなければ、新規物体と既知の物体へ接近する確率は 50%近くになる。野生型マウスに PBS を投与した群では、投与前から投与後 28 日目までにおいて、一貫して新規物体である O3 に近づく頻度が高く、投与後 28 日目における物体指向指数が $67.8 \pm 4.09\%$ であったことから、認知機能は正常に保持されていることがわかった (Fig. 17B-D)。また、APdE9 マウスに PBS を投与した群では、細胞移植前から投与後 28 日目までにおいて、一貫して O1 と O3 のそれぞれの物体に近づく頻度に差がなく、投与後 28 日目では物体指向指数は $51.4 \pm 9.21\%$ で認知機能障害を呈していた (Fig. 17C and D)。これらのことから、本試験によりマウスの認知機能の評価できることが示された。移植後 7 日目では、APdE9 マウスに PBDML 細胞を移植した群の物体指向指数は $51.6 \pm 10.8\%$ であり、familiarization trial のときの $48.7 \pm 9.12\%$ とほぼ同値であったことから認知機能障害を呈していたが、移植後 28 日目において O3 に近づく頻度が増加し、その物体指向指数は familiarization trial の $52.1 \pm 9.25\%$ に比べ、recognition test で $69.4 \pm 5.81\%$ と有意に高く、認知機能障害の改善が認められた (Fig. 17D)。一方、野生型マウスの PBDML 細胞を移植した群では、移植後 7 および 28 日目のどちらの時点でも既知の物体と新規物体の区別がついておらず、認知機能障害が認められたことから、正常なマウスでは PBDML 細胞の移植が有害事象を引き起こすことが示唆された (Fig. 17C and D) (Day 0 : wild-type mice : $t = 2.778$, $P = 0.0129$ 、APdE9 mice : $t = 1.644$, $P = 0.1144$; Day 7 : wild-type mice injected with PBS : $t = 2.831$, $P = 0.0221$ 、wild-type mice injected with PBDML cells : $t = 0.1099$, $P = 0.9139$ 、APdE9 mice injected with PBS : $t = 1.211$, $P = 0.2434$ 、APdE9 mice injected with PBDML cells : $t = 0.6041$, $P = 0.5554$; Day 28 : wild-type mice injected with PBS : $t = 2.808$, $P = 0.0484$ 、wild-type mice injected with PBDML cells : $t = 0.02487$, $P = 0.9806$ 、APdE9 mice injected with PBS : $t = 0.6879$, $P = 0.5221$ 、APdE9 mice injected with PBDML cells : $t = 2.473$, $P = 0.0483$)。

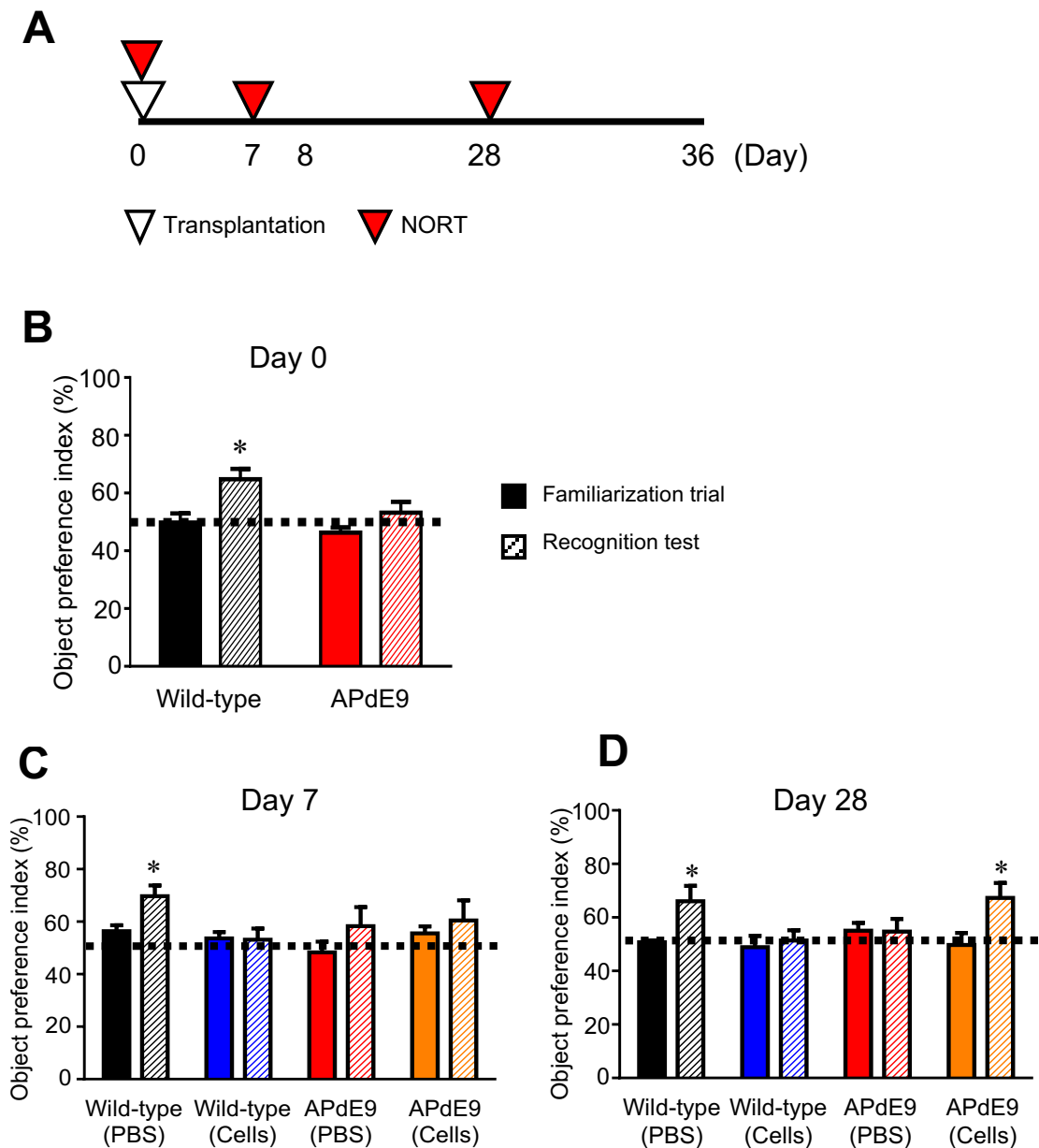


Figure 17. PBDML cell transplantation ameliorates short-term memory impairment in APdE9 mice.

A, Schedule of transplantation and cognitive function tests. **B-D**, NORT was conducted to evaluate cognitive function in wild-type and APdE9 mice on days 0, 7, and 28 after transplantation. Wild-type and APdE9 mice were hippocampally injected with PBS or PBDML cells, respectively. Filled bars indicate the object preference index values during the familiarization trials, whereas diagonal lined bars indicate the indexes during the recognition test. Data represent means \pm SEM of object preference indexes from six mice in each group. Student's t-test was used for statistical analysis. * $P < 0.05$ vs. familiarization trial. These figures are cited from Fig. 5 in *J. Alzheimers Dis.*, **2020**, 73, 413–429.

2-3-5. PBDML 細胞移植による空間認知記憶障害の改善効果の解析

さらに、マウスの空間認知機能を評価するため、移植後 36 日目にモーリス水迷路試験を行った (Fig. 18A)。トレーニング期間である初めの 5 日間は、日数依存的にプラットホームにたどり着くまでの時間が減少し、全ての群のマウスがプラットホームの位置を覚え、その記憶力に差異のないことがわかった ($F(12,80) = 0.4553, P = 0.9339$) (Fig. 18B)。

その後 6 日目に、プラットホームを取り除いた状態でのプローブテストにおいて、細胞を移植した APdE9 マウスでは、PBS を投与した場合と比較してプラットホーム領域に滞在する時間の割合が約 1.6 倍有意に大きく、PBDML 細胞の移植が認知機能障害の改善に効果があることが示唆された ($F(3,60) = 5.835, P = 0.0030$) (Fig. 18C and D)。一方、細胞を移植した野生型マウスのプラットホーム領域の滞在時間の割合は、PBS を投与した野生型マウスより約 71%と有意に小さく、認知機能障害が認められたことから、正常なマウスでは PBDML 細胞の移植が有害事象を引き起こすことが示唆された (Fig. 18C and D)。

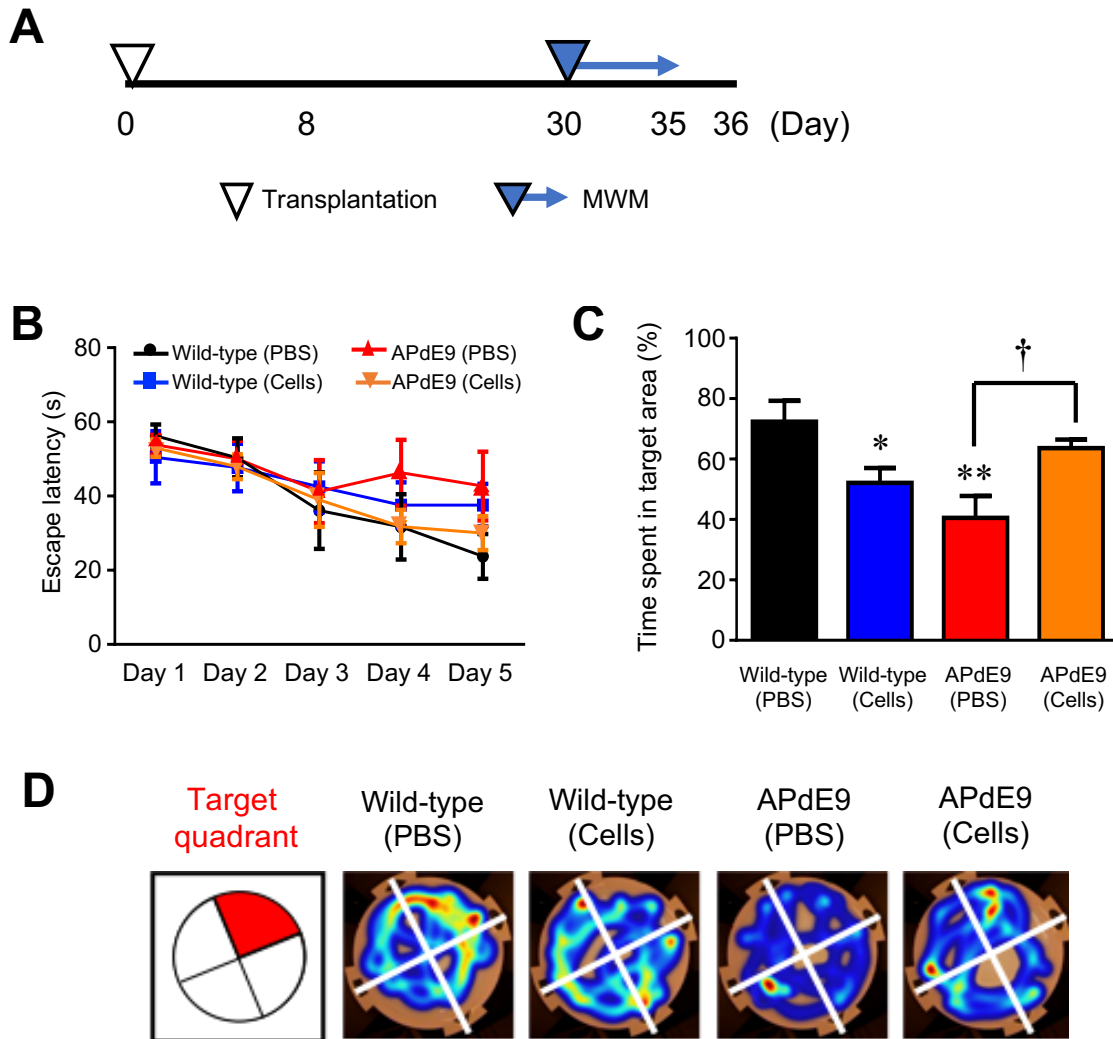


Figure 18. PBDML cell transplantation ameliorates long-term memory impairment in APdE9 mice.

A, Schedule of transplantation and cognitive function tests. **B**, Morris water maze test was conducted to evaluate spatial learning and memory on days 30–35. Escape latency to reach the hidden platform was determined on 5 successive days for wild-type and APdE9 mice injected with PBS or PBDML cells. For each day of training, the mean of four trials per day is presented. Data represent means \pm SEM of object preference indexes from six mice in each group. Statistical significance of differences among groups was determined by repeated measures two-way ANOVA with a post-hoc Fisher's PLSD test. **C**, In the probe test, the time spent in target area was estimated. Data represent means \pm SEM of object preference indexes from six mice in each group. Statistical significance of differences among groups was determined by one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. wild-type mice injected with PBS. † $P < 0.05$ vs. APdE9 mice injected with PBS. **D**, The red area indicates the target quadrant, and the heat maps indicate typical swimming trajectories in the last probe test. These figures are cited from Fig. 5 in *J. Alzheimers Dis.*, **2020**, 73, 413–429.

2-3-6. PBDML 細胞移植による脳内炎症状態の変化

AD の一般的な病的特徴として、 $A\beta$ の細胞外沈着と細胞内過剰リン酸化タウタンパク質の凝集が挙げられる。ミクログリアの活性化と炎症性サイトカインの放出により、続いて起こる神経炎症もまた、AD の病変として示唆されている(75,76)。そこで、細胞移植が脳内環境に及ぼす影響を調べるため、PBS または PBDML 細胞を投与した野生型および APdE9 マウス海馬における炎症性サイトカイン遺伝子 (*Il-1 β* 、*Il-6* および *Tnf- α*) の発現量を RT-qPCR 法を用いて解析した。その結果、PBS を投与した APdE9 マウスでは、PBS を投与した野生型マウスと比べて、いずれのサイトカインの mRNA 発現量もそれぞれ約 1.2 倍、約 1.3 倍および約 1.1 倍と増加傾向にあり、脳内炎症状態であることが示唆された (*IL-1 β* : $F(3,36)=0.9025$, $P=0.4684$ 、*IL-6* : $F(3,36)=1.436$, $P=0.2810$ 、*TNF- α* : $F(3,36)=0.8449$, $P=0.4954$) (Fig. 19)。一方、PBDML 細胞を移植した APdE9 マウスでは、PBS を投与した APdE9 マウスと比較して、それらの mRNA 発現量がそれぞれ約 70%、約 75%および約 81%と減少傾向にあり、脳内炎症の緩和がみられた (Fig. 19)。一方で、PBDML 細胞を移植した野生型マウスにおける各サイトカインの mRNA 発現量は 4 群の中で最も高く、PBS を投与した野生型マウスと比較してそれぞれ約 1.8 倍、約 1.5 倍および約 1.5 倍であった (Fig. 19)。このことから、 $A\beta$ 病態のない状態で PBDML 細胞を移植すると、脳内炎症を惹起する可能性が示唆された。

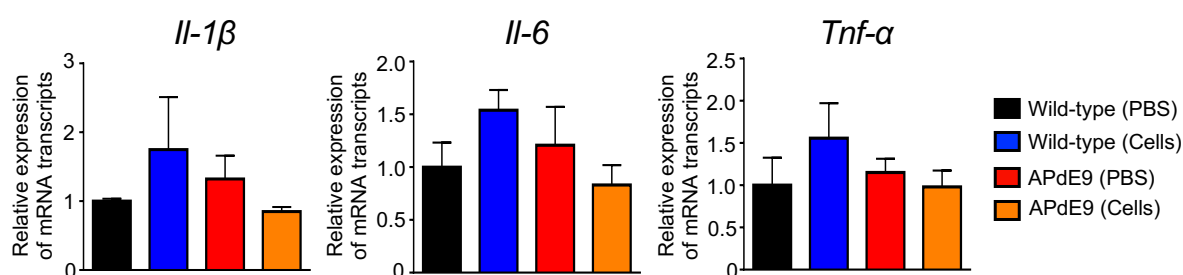


Figure 19. Effect of transplantation of PBDML cells on brain inflammation.

The mRNA expression levels of pro-inflammatory cytokines, *IL-1 β* , *IL-6*, and *TNF- α* in the hippocampi of wild-type and APdE9 mice injected with PBS or PBDML cells on day 36 by RT-qPCR. Data represent means \pm SEM from four mice in each group. Statistical significance of the differences among groups was determined by one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. These figures are cited from Supplementary Fig. S3 in *J. Alzheimers Dis.*, **2020**, 73, 413–429.

2-3-7. PBDML 細胞移植による海馬内オリゴデンドロサイトの発現変化

ADにおいて、早期の段階でオリゴデンドロサイトの機能異常が生じており疾患の発症や進行に関与することが示唆されている(69-71)。オリゴデンドロサイトは髄鞘形成を行うことから、髄鞘タンパク質や髄鞘に含まれる脂質を特異的に発現する。MBPはオリゴデンドロサイトのマーカーとして知られており、主要な髄鞘タンパク質の一つである(77)。そこで、MBPを指標として、細胞移植部位である海馬におけるオリゴデンドロサイトの発現を解析した。RT-qPCR法により、MBPのmRNAの発現を解析したところ、PBS投与したAPdE9マウスでは、PBS投与した野生型マウスと同程度の発現量であった。一方、PBDML細胞を移植したAPdE9マウスでは、PBSを投与したAPdE9マウスと比べて、オリゴデンドロサイト遺伝子(*Mbp*)の発現量が約1.2倍増加していた($F(3,36) = 5.871, P = 0.0105$) (Fig. 20A)。また、PBDML細胞を移植した野生型マウスにおけるMBPのmRNA発現量は4群の中で最も低く、PBSを投与した野生型マウスと比較して約61%減少していた (Fig. 20A)。

さらに、免疫組織化学的手法による解析でも、PBS投与したAPdE9マウスでのMBP発現量は、PBS投与した野生型マウスの約54%まで減少していた。PBDML細胞を移植したAPdE9マウスでは、PBSを投与したAPdE9マウスと比較してMBPの発現が約1.4倍増加していた($F(3,32) = 22.13, P = 0.0003$) (Fig. 20B and C)。また、PBDML細胞を移植した野生型マウスでは他の3群と比べて、MBPの発現の低下がみられた。

これらの結果から、APdE9マウスでは、野生型マウスと比べてオリゴデンドロサイトの発現が低下しているが、PBDML細胞移植によって海馬内のオリゴデンドロサイトの発現の増加、つまり髄鞘の再形成が引き起こされたと考えられる。一方、A β 病態のない状態でPBDML細胞を移植すると海馬内のオリゴデンドロサイトの脱落を引き起こしてしまう可能性が示唆された。

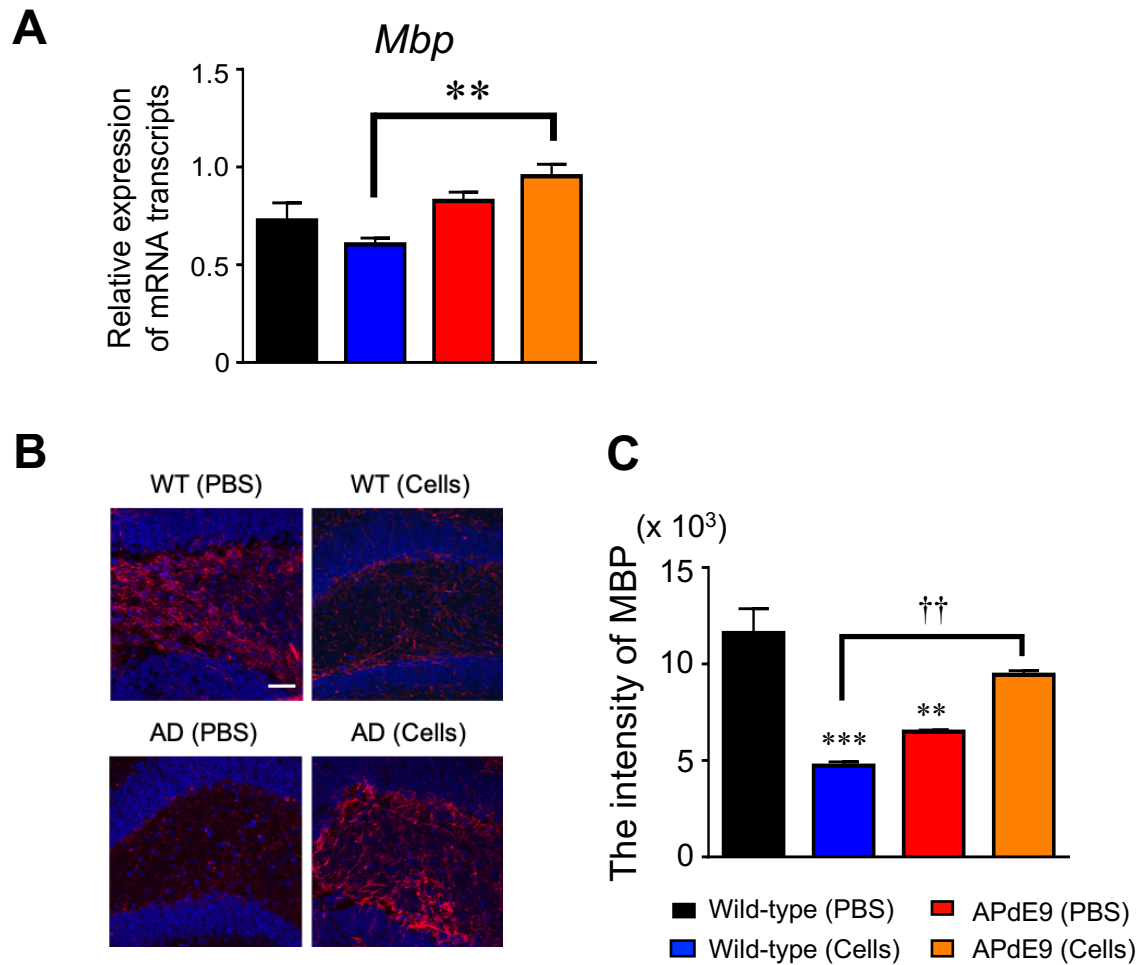


Figure 20. Effect of transplantation of PBDML cells on expression of oligodendrocytes.

A, The mRNA expression levels of oligodendrocyte marker, MBP in the hippocampi of wild-type and APdE9 mice injected with PBS or PBDML cells on day 36 by RT-qPCR. Data represent means \pm SEM from four mice in each group. Statistical significance of the differences among groups was determined by one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. $**P < 0.01$ vs. wild-type mice injected with PBS. **B and C**, Brain sections from wild-type and APdE9 mice injected with PBS or PBDML cells on days 36 were stained with anti-MBP antibodies (red) and Hoechst 33258 (blue) (**B**). Scale bar = 20 μ m. The intensity of MBP-immunoreactive area was measured using the Image J software (**C**). Data represent means \pm SEM of the intensity of MBP-immunoreactive area in one field from three independent samples. Statistical significance of the differences among groups was determined by one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs. wild-type mice injected with PBS. $\dagger\dagger P < 0.01$ vs. wild-type mice injected with PBDML cells.

2-3-8. 造血幹細胞由来マイクログリア様細胞の内在性マイクログリアに対する作用の解析

これまでの結果より、PBDML 細胞の脳内移植が AD モデルマウスの認知機能障害の改善に効果があることが明らかになったが、この移植療法のさらなる臨床応用のため、マイクログリア様細胞の移植が脳内環境へ与える影響を評価した。本実験では、末梢血造血幹細胞よりも骨髄細胞の方が採取できる細胞数が多く (1-3-1)、マイクログリア様細胞の調製が容易であることから、BMDML 細胞を用いて、BMDML 細胞が分泌する液性因子に着目し、内在性マイクログリアへの作用を解析した。

In vitro 系において、Multi-Analyte ELISArray Kit を用いた解析により、BMDML 細胞培養上清では TGF- β 1 の発現増加がみられ、BMDML 細胞が TGF- β 1 を産生していることがわかった (Fig. 21A)。また、ELISA を用いて初代培養マイクログリアの A β 貪食量を解析したところ、BMDML 細胞培養上清処置群では、非処置群と比べて A β 貪食量が約 1.5 倍に増加しており、一方、BMDML 細胞培養上清および SB525334 (TGF- β 1 阻害剤) を処置した群では、BMDML 細胞培養上清処置群と比べて約 80% の A β 貪食量低下がみられた ($F(2,30) = 14.22, P = 0.0003$) (Fig. 21B)。

TGF- β 1 は、TGF- β receptor (TGF- β R) 2 と結合し、その後 TGF- β R2 は TGF- β R1 と複合体を形成して、その複合体が転写因子である Smad 分子をリン酸化することで細胞の機能変化が誘導される(78)。そこで、マイクログリアの A β 貪食機能に対して BMDML 細胞培養上清が TGF- β 1 を介して促進的に作用しているのかどうか、細胞内シグナルである Smad2 および Smad3 のリン酸化状態をウエスタンブロット法を用いて解析した。また、TGF- β 1 が誘導する A β 貪食促進に対する、TGF- β R1 阻害による影響についても解析を行った。その結果、初代培養マイクログリアに BMDML 細胞培養上清を処置した群では、リン酸化 Smad2 および Smad3 の発現が増加したのに対し、BMDML 細胞培養上清および SB525334 を処置した群では発現の低下がみられた (Smad2 : $F(2,12) = 0.5241, P = 0.6169$ 、Smad3 : $F(2,12) = 0.02291, P = 0.9774$ 、p-Smad2 : $F(2,12) = 6.135, P = 0.0354$ 、p-Smad3 : $F(2,12) = 9.239, P = 0.0147$) (Fig. 21C and D)。これらの結果から、*in vitro* 系において BMDML 細胞は TGF β 1 を産生し、マイクログリアの A β 貪食機能促進に働いていることが示唆された。

さらに、*in vivo* 脳内でも BMDML 細胞が同様の機能を有しているのか確認するため、AD モデルマウスへ BMDML 細胞を移植し、移植後 14 日目における脳内 A β 量を免疫組織化学染色法およびステレオロジーを用いて解析した。その結果、BMDML 細胞移植群では、PBS 投与群と比べて海馬内 A β 量が約 42% にまで減少していた (Fig. 21E)。一方、BMDML 細胞および SB525334 を処置した群では、BMDML 細胞移植群と比べて海馬内 A β 量が約 1.5 倍多く、BMDML 細胞は *in vivo* 脳内においても TGF β 1 産生能を有しており、BMDML 細胞自身の A β 貪食作用に加えて内在性マイクログリアの A β 貪食促進にも作用している可能性が考えられる ($F(2,12) = 18.15, P = 0.0029$) (Fig. 21E)。以上の結果より、*in vitro* および *in vivo* 実験系において BMDML 細胞は TGF- β 1 を産生しており、自身の A β 貪食能に加えて内在性マイクログリアの A β 貪食能を促進する働きがある可能性がある。

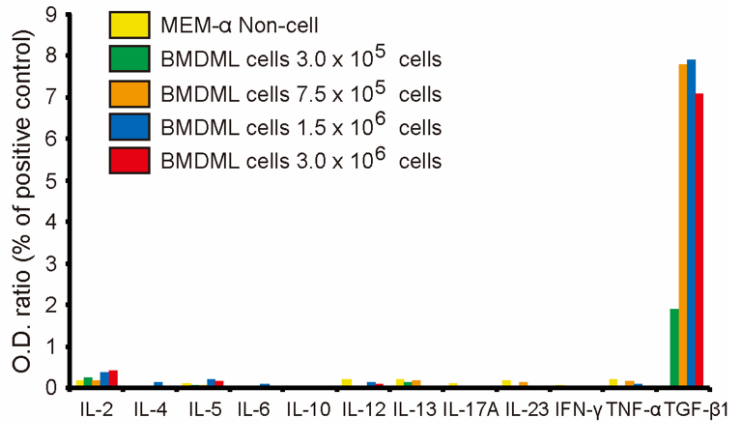
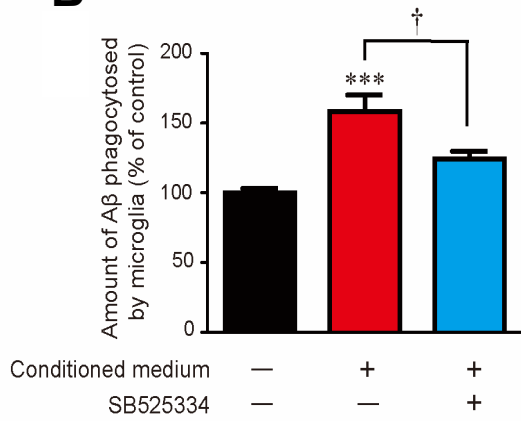
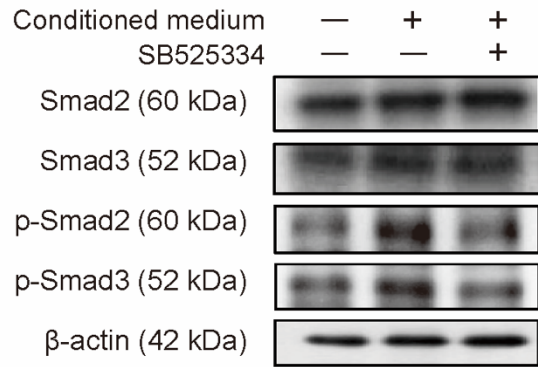
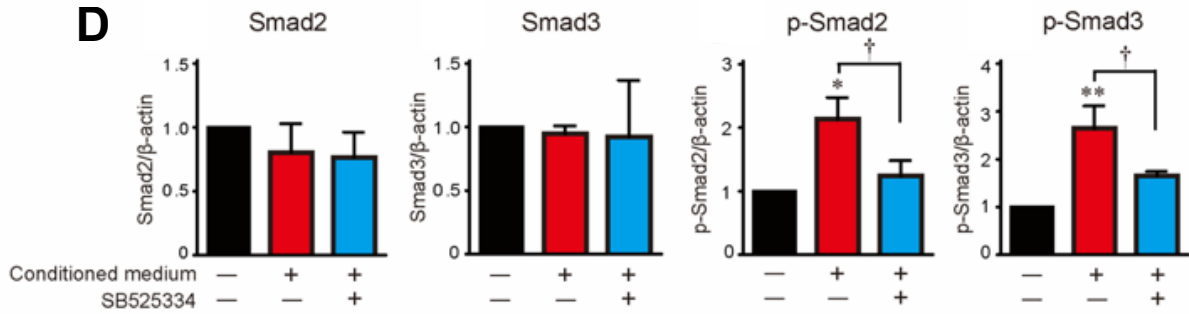
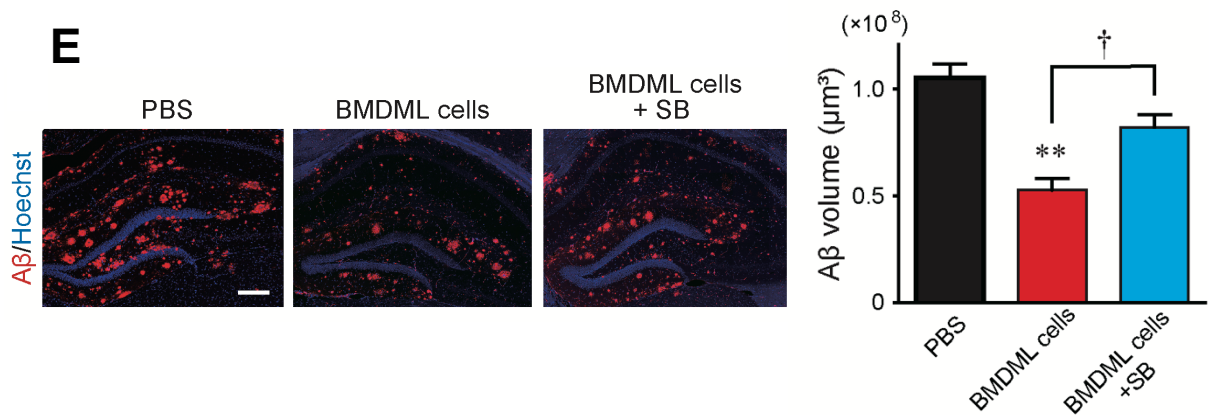
A**B****C****D****E**

Figure 21. The effect of BMDML cells on A β phagocytic function in mouse microglia.

A, To identify humoral factors secreted from mouse BMDML cells, ELISA-based cytokine array in the conditioned medium of various number of BMDML cells (3.0×10^5 - 3.0×10^6) was conducted. The O.D. value of the positive control included in the kit was set as 100%. **B**, Semiquantitative analysis of the amount of A β phagocytosed by the microglia measured by ELISA. Cultured microglia were treated with A β (1.0 μ M) and conditioned medium derived from BMDML cells (3.0×10^6 cells) in the presence or absence of SB525334 (1.0 μ M). Data represent means \pm SEMs from six samples in each group. Significance (Bonferroni/Dunn test): ***P < 0.001 vs. control. †P < 0.05 vs. conditioned medium. **C**, Western blot analysis of total Smad2/3 and phospho-Smad2/3. Cultured microglia were treated with conditioned medium derived from BMDML cells (3.0×10^6 cells) in the presence or absence of SB525334 (1.0 μ M), an inhibitor of TGF- β R1. **D**, Protein levels of total Smad2, total Smad3, phospho-Smad2, and phospho-Smad3 were semiquantitatively measured by densitometry. Data represent means \pm SEMs from three samples in each group. Significance (Fisher's PLSD): *P < 0.05, **P < 0.01 vs. control. †P < 0.05 vs. conditioned medium. **E**, Immunohistochemical analysis of A β (red) and Hoechst 33258 (blue) in the hippocampi of APdE9 mice 14 days after PBS or BMDML cell injection with or without SB525334 (30 μ M). Scale bar = 200 μ m. The volume of A β plaques inside regions of interest at the injection sites of one hemisphere from each APdE9 mouse was stereologically analyzed. Data represent means \pm SEMs from three different mice in each group. Significance (Bonferroni/Dunn test): **P < 0.01 vs PBS. †P < 0.05 vs BMDML cells.

2-4. 考察

本章では、第1章で作製した PBDML 細胞が *in vivo* 脳内においても機能を発現するか否かを評価するため、AD モデルマウスを用いて移植実験を行った。ミクログリアは脳内環境に応じてその形態を変化させることが知られている。定常状態では、分岐して突起を伸ばした形態であるラミファイド型をとり、神経細胞のシナプスに接触し、脳内環境を監視している(15,16)。一方、AD 病態脳では、ミクログリアは丸いアメーバ様の形態であるアメボイド型をとり、A β の貪食除去に働く(79,80)。本研究において、脳内に移植した PBDML 細胞はラミファイド型を呈する細胞や、A β プラーク周囲ではアメボイド型を呈する細胞が観察され、内在性ミクログリアと同様に脳内環境に応じた形態をとって生着していることが示された。

次に、移植した PBDML 細胞が生着に際して脳内でどのような動きをしているのか調べた。その結果、PBDML 細胞は日数依存的に細胞間距離が増大しており、我々の以前の解析から A β に指向性を持って脳内を遊走していることが示唆された。神経細胞では脳への移植後、脳内での細胞の移動がほとんど起こらないことが報告されており(81)、PBDML 細胞が脳内を A β に指向性をもって遊走できるということは、極めて興味深い現象であり、この機序としては、TREM2(82)や CD36(83)などによる A β の認識を介していると考えられるが、詳しいメカニズムは今後の検討課題である。今回の解析では、移植後 36 日目において、アメボイド型を呈した PBDML 細胞が A β プラーク周囲に集積し、A β を貪食している様子が観察された。第1章で、PBDML 細胞は、炎症性サイトカインである *Il-1 β* 、*Il-6* および *Tnf- α* mRNA の発現量が低く、抗炎症性サイトカインである *Tgf- β 1* mRNA の発現量が高かったことから、移植直後も抗炎症型の細胞として機能すると考えられるが、PBDML 細胞の表現型が脳内でどのように変化していくのかについては今後さらなる解析が必要である。さらに今回の解析では、PBDML 細胞を移植した AD モデルマウスの海馬領域の A β 量が減少したが、投与部位から離れた部位では A β 量の減少は認められなかった。これは、本解析が移植後 36 日目までしか行っていないことに起因すると考えられる。移植した PBDML 細胞の生存率をみると、移植後 8 日目と比較して 36 日目では大きく減少しなかったことから、少ないながらも一定数の細胞が脳内に生着し、内在性ミクログリアと同様に増殖とアポトーシスを繰り返し続ける可能性が考えられる(84)。このことから、移植後 36 日目以降においてより広範囲に PBDML 細胞が遊走し、投与部位から離れた部位の A β を減少させることができる可能性もあり、より長期での移植細胞の脳内動態を調べることは今後の検討課題である。

本研究では、アミロイドカスケード仮説をもとに、脳内 A β の除去が AD の根本的治療につながるという概念で実験を行ってきた。その結果、末梢血造血幹細胞からミクログリア様細胞を分化誘導することができ、さらにこのミクログリア様細胞を AD モデルマウスの海馬内へ移植することにより、*in vivo* 脳内においても A β 貪食能を示し、認知機能障害の改善効

果が認められた。今回の解析では、短期記憶および作業記憶を評価することのできる新規物体認識試験(74)と、長期記憶および空間認知記憶を評価することのできるモーリス水迷路試験(85)の2種類の記憶試験を実施した。その結果、いずれの試験でも、PBDML細胞を移植したADモデルマウスでは、PBS投与群と比べて認知機能障害の改善が見られた。この細胞移植療法においてAD所見に対する治療効果が認められたメカニズムとして、まず第一に、ADの原因物質である脳内A β の減少が考えられるが、AD病態下ではミクログリアが活性化しており、それが周囲のアストロサイトの活性化を引き起こし、脳内環境が炎症状態に導かれることが知られている(86)。今回の解析でも、PBS投与したADモデルマウスでは、PBS投与した野生型マウスと比較して炎症性サイトカイン (*Il-1 β* 、*Il-6* および *Tnf- α*) 遺伝子の発現量が増加傾向にあった。一方、PBDML細胞を移植したADモデルマウスの海馬では、PBS投与群と比べて、炎症性サイトカイン (*Il-1 β* 、*Il-6* および *Tnf- α*) 遺伝子の発現量が減少しており、細胞移植により脳内炎症が抑制されることが示唆された。

その他にも、治療効果の機序として移植による脳内環境への作用が考えられる。TGF- β 1は、当初、線維芽細胞の形質転換を促進する因子として見出され命名されたが、現在では細胞の増殖・分化・細胞外マトリックスの生成や炎症・免疫、癌の浸潤・転移などの制御に重要な役割を担う、多機能性サイトカインであるとされている(87,88)。またTGF- β 1は脳の外傷時にも、アストロサイトやミクログリアから産生され、神経成長因子の合成を促進することで神経細胞の再生にも機能することが報告されている(89,90)。また、多発性硬化症モデルマウスにおいて、TGF- β 1は髄鞘の再形成を行い、神経機能の回復に寄与していることが報告されている(91)。第1章での解析から、PBDML細胞はミクログリアと比べてTGF- β 1のmRNA発現量が高く、TGF- β 1を産生している可能性が示唆された。一方では、PBDML細胞を移植したADモデルマウスにおいて、PBSを投与したADモデルマウスと比較して、オリゴデンドロサイトのマーカーであるMBPの発現が高かったことから、オリゴデンドロサイトで形成される髄鞘の修復がみられた。このことは、PBDML細胞からのTGF- β 1分泌が髄鞘の回復を示したと考えられる。TGF- β 1にはミクログリアのA β 貪食を促進する作用があり(92)、今回の解析では、骨髄由来ミクログリア様細胞がTGF- β 1を産生し、Smad2/3シグナル経路を介して内在性ミクログリアのA β 貪食促進に作用することを明らかにした。この結果はまた、脳実質への細胞移植ではなく、末梢血中への細胞の輸注であっても、TGF- β 1のような液性因子の脳内への移行による治療効果が期待できる可能性を示唆する。今回の解析はBMDML細胞を用いた解析であったが、本効果は、PBDML細胞移植にも期待できる効果であることが予想される。以上より、PBDML細胞の移植は、PBDML細胞自身のA β 病態だけでなく、脳内炎症環境および脳内の周囲の細胞にも影響を及ぼしており、多機能的に作用して認知機能障害の改善に寄与することが分かった。今後より詳細なメカニズムの解明が望まれる。

本移植療法の臨床応用を考慮した場合、その安全性は非常に重要な問題である。今回の解析において、細胞移植した野生型マウスでは認知機能の低下がみられた。この詳しいメカニズムは不明だが、野生型マウスの脳内にはA β などのPBDML細胞の標的となる異物が存

在しないことが原因の一つと考えられる。また、細胞移植した野生型マウスの海馬では、PBSを投与した野生型マウスと比べて、炎症性サイトカイン (*Il-1 β* 、*Il-6* および *Tnf- α*) の mRNA 発現量の増加およびオリゴデンドロサイトの発現低下がみられた。このことから、PBDML 細胞は、正常脳では異物として認識され、脳内免疫恒常性のバランスを破綻させたことにより、認知機能の低下が誘導された可能性が推察される。したがって、PBDML 細胞を AD 患者に移植するときの AD 病態のステージや脳内炎症環境を考慮することの重要性が、本研究により新たに示唆された。

PBDML 細胞移植による野生型マウスの認知機能低下のその他の原因として、PBDML 細胞とミクログリアの発生起源の違いが考えられる。ミクログリアは、胎生 7.5 日目に卵黄嚢で発生する一次造血で産生される原始マクロファージが起源であり、この細胞が血液脳関門が形成される胎生 9.25-9.5 日目までに脳へ遊走し、CSF-1 シグナルを介してミエロイド系転写因子である PU.1 や Irf8 が活性化され、ミクログリアに成熟する(46,47)。一方で、成体のマクロファージは二次造血の造血幹細胞から発生し、CSF-1 シグナルを介した PU.1 や Irf8、さらに Myb の活性化により、単球を経てマクロファージがつくられる(43-45)。これらの報告から、PBDML 細胞は二次造血の造血幹細胞由来であり、ミクログリアとは発生起源および分化経路が異なることから、正常な脳内においては異物として認識され、有害事象を起こした可能性がある。近年、induced pluripotent stem (iPS) 細胞から胎生期の一次造血を再現した原始マクロファージを作製できることが報告されており(93,94)、実際のミクログリアに非常に近い細胞へと分化誘導することが可能である(93-97)。この iPS 細胞由来原始マクロファージ (iMacs) を移植に用いれば、脳内において内在性ミクログリアと同じように生着できる可能性があり、野生型マウスにみられた有害事象が回避できると考えられる。iMacs を用いた AD の新規細胞移植療法の治療効果の検討は今後の課題である。

本研究では、海馬へ直接 PBDML 細胞を投与することにより、AD 治療に用いる細胞として有用性を評価した。しかしながら、この移植療法の臨床応用を考えると、細胞の投与経路として脳内への直接的投与は、侵襲性が高く患者の身体にかかる負担も大きい。そこで、末梢からの投与により脳内へと移植細胞を到達させ治療を行うことができれば、より有用な治療法となり得る。放射線照射したマウスや CSF-1 受容体阻害剤の経口投与により脳ミクログリアを枯渇させた AD モデルマウスにおいて、単球由来マクロファージが末梢から脳へ移行することが報告されている(98,99)。この手法を用いれば、末梢から投与した PBDML 細胞が脳へと送達され、より低侵襲的に AD 細胞移植療法を実施することができると考えられる。しかし、放射線照射は副作用として疲労感、食欲不振、易感染性、易出血性などの急性期および晩期障害が起こる可能性があり、高齢者にとっては健康状態の損失を招き、身体に大きな負担を伴うリスクが高まる(100)。また、CSF-1 受容体は脳ミクログリアだけでなく、末梢の組織マクロファージにも発現しており、CSF-1 受容体阻害剤の使用は全身の各臓器に影響を与えることが考えられる。さらに、CSF-1 受容体阻害剤による脳ミクログリアの枯渇により、末梢血単球由来マクロファージの浸潤およびミクログリアの再増殖が起こるが

(84,101,102)、これらの細胞の A β プラークへの集積はミクログリアの枯渇を行う前と比べて弱いことも報告されている(103,104)。また、本研究により、末梢血単球 (Ly6c⁺細胞) 由来マクロファージと PBDML 細胞の A β 貪食能を比較したところ、末梢血単球由来マクロファージの方が A β 貪食能が低かった。以上のことから、より未熟な幹細胞、すなわち加齢や病態環境下にエピジェネティック修飾を受けていない造血幹細胞などから A β 貪食細胞に働くフレッシュなミクログリア様細胞を作り出し、治療に用いることが意義が高いことが予想される。さらに、安全かつ簡便な末梢から中枢への細胞送達方法のない現況においては、本解析で実施した PBDML 細胞を直接脳内へ移植する手法は、現時点では最も有用な手段の一つであることが示唆された。

当研究室ではこれまでに、骨髄細胞からミクログリア様細胞 (BMDML 細胞) を分化誘導する手法を確立している。本研究における PBDML 細胞とこの BMDML 細胞の性質を比較すると、表面抗原の発現パターン、LPS 処置によるサイトカイン産性能、A β 貪食能などにおいて同じような結果が得られている。分化効率を上げるため、分化誘導に用いたサイトカインは異なるものの、両細胞は起源となる細胞が同じであることから、性質の似通った細胞が作製できたと考えられる。さらに、今回新しく明らかとなった知見として、PBDML 細胞は移植後 36 日間というより長期でも脳内で生存していること、短期記憶および作業記憶を評価する新規物体認識試験だけでなく、長期記憶および空間認知記憶を評価するモーリス水迷路試験でも認知機能障害の改善が見られたこと、またそのメカニズムとして、脳内 A β 量減少だけでなく、移植細胞による脳内炎症の抑制や髄鞘の再構築化、移植細胞が分泌する液性因子の内在性ミクログリアへの作用が示唆されたことが挙げられる。以上より、AD 患者の多くが高齢者であることを考慮すると、PBDML 細胞は BMDML 細胞と比べて低侵襲性に採取できるという点から臨床指向性が高い細胞であり、AD 新規細胞療法に用いるのに有用な細胞であると考えられる。

総括

本研究ではミクログリアの代替となる細胞ソースとして、骨髄細胞よりも低侵襲性に採取できる末梢血に着目し、その中に含まれる造血幹細胞の効率的な採取方法とミクログリア様細胞への効率的分化誘導方法を新たに確立し、その機能について *in vitro* ならびに *in vivo* において評価を行った。

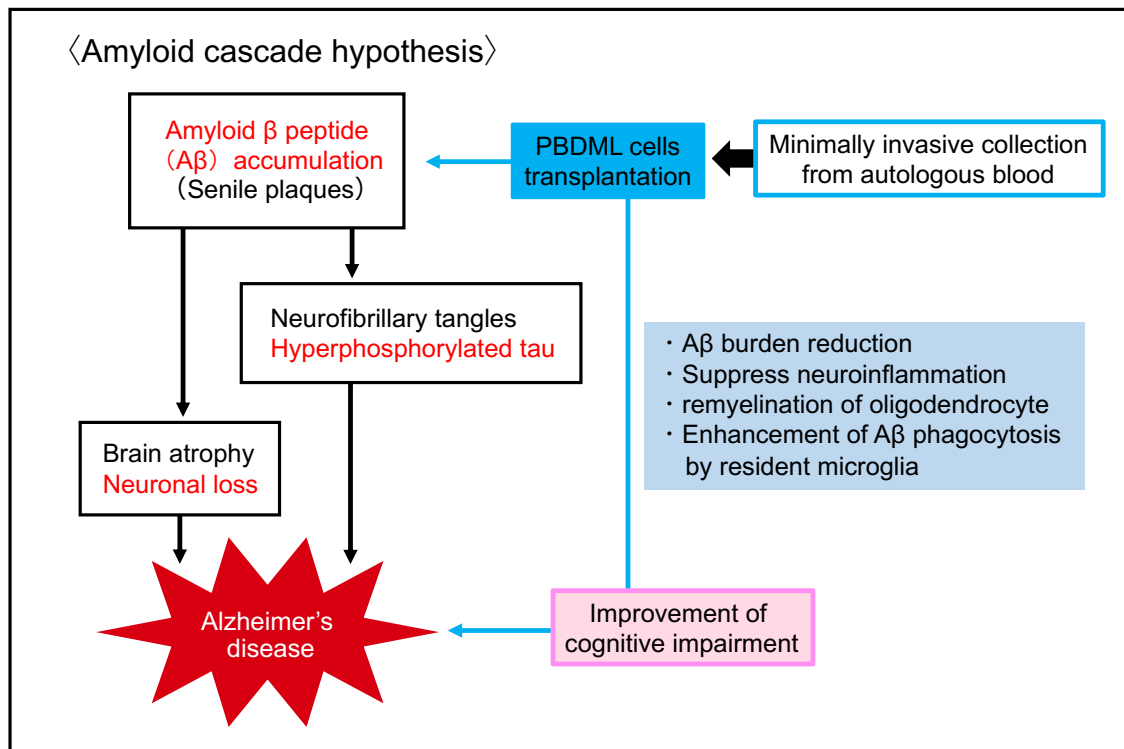
第1章では、まず、G-CSF および CXCR4 阻害剤の併用投与により末梢血中に含まれる造血幹細胞数を増やすことに成功した。この採取した末梢血造血幹細胞に CSF-1 に加えて IL-34 により 10 日間刺激することで、さらに効率良くミクログリア様細胞 (PBDML 細胞) が分化誘導できることを見出した。また、この PBDML 細胞はミクログリアと同様に、 $A\beta$ に対する貪食能および炎症性刺激に対する各種サイトカイン産性能を有していた。また、AD 患者の多くが高齢者であることを考慮し、老齢マウス由来 PBDML 細胞の機能評価を行ったところ、末梢血造血幹細胞の採取数は減少するものの、若齢マウスと同程度の PBDML 細胞への分化能を示し、 $A\beta$ 貪食能を維持していることが明らかとなった。

第2章では、この PBDML 細胞を AD モデルマウス海馬内に移植し、その脳内動態や脳内環境へ及ぼす影響を解析し、さらに認知機能障害改善効果についてもその機序を含めてより詳細に評価した。その結果、移植した PBDML 細胞は内在性ミクログリアと同様に脳内に生着していることが確認された。また、移植細胞は経日的に脳内に拡散し、特に AD モデルマウスにおいて PBDML 細胞は $A\beta$ プラークへ指向性を持って遊走しており、その貪食機能により、脳内 $A\beta$ の除去に機能することが示唆された。さらに、移植細胞は投与した最初の一週間で数は減少するが、その後は比較的、安定して脳内に生着することが分かった。AD モデルマウスの海馬では、PBDML 細胞の移植により炎症状態の緩和および髄鞘の再形成を認めた。また、骨髄造血幹細胞由来ミクログリア様細胞を用いた解析では、TGF- β 1 の産生を介して内在性ミクログリアの $A\beta$ 貪食も促進することを発見し、PBDML 細胞もこのような作用を有する可能性が示唆された。このことから上記のすべてが多角的に PBDML 細胞移植による AD モデルマウスの認知機能障害改善効果に寄与していることを本研究により新たに見出した。また血中の単球から分化誘導したミクログリア様細胞との比較において、より未熟な幹細胞からミクログリア様細胞を作製することで、 $A\beta$ 貪食作用などより高い治療効果を得られることが示唆された。しかしながら、野生型マウス脳への PBDML 細胞移植の結果から、移植を行う AD 病態のステージや脳内炎症環境については慎重にならないといけないことがわかった。

現在、AD 発症の引き金は $A\beta$ であることが示唆されており、脳内から $A\beta$ を除去することが根本的治療法になると期待されている。しかし、その他にも様々な脳内環境変化が AD では引き起こされており、今回の解析で示唆されたように、PBDML 細胞を移植することで、AD の根本的な治療につながる可能性が期待される (Schema 2)。本研究より、低侵襲性に採取できる末梢血造血幹細胞は、AD の新規細胞治療戦略において有用な細胞であり、今後の臨床応

用に向けた更なる研究の発展が期待される。本研究は、血液内科学と脳神経科学という異分野領域からの研究アプローチの融合により得られた研究成果であり、今後もこのような統合的学術領域からの新たな研究が、様々な疾患に対する新しい治療の可能性を切り開くことができます。ますます期待される。

Schema 2. The effect of PBDML cells transplantation in AD pathology.



謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学病態生理学分野 芦原英司 教授ならびに立命館大学薬効解析科学研究室 北村佳久 教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、直接の懇切丁寧なご指導と激励を賜りました京都薬科大学統合薬科学系 高田和幸 教授に謹んで深く感謝の意を表します。

さらに本研究を遂行するにあたり、実験にご協力、ご助言、ご指導を賜りました京都薬科大学臨床腫瘍学分野 中田晋 准教授に深厚なる謝意を表します。

また、本論文の作成にあたり、ご助言とご高閲を賜りました京都薬科大学衛生化学分野 長澤一樹 教授ならびに細胞生物学分野 藤室雅弘 教授に厚く御礼申し上げます。

また、種々の貴重なご助言を賜りました京都薬科大学統合薬科学系 西村周泰 助教ならびに京都薬科大学病態生理学分野 細木誠之 准教授、戸田侑紀 助教、学生実習支援センター 高田哲也 助教に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、分化誘導因子として CSF-1 製剤（ミリモスチム）および G-CSF 製剤（フィルグラスチム）をご供与頂きました協和キリン株式会社に深く感謝致します。また、在学中の経済的援助を賜りました日本薬学会長井記念薬学研究奨励金および学術振興会特別研究員（DC2）に採用いただいた日本学術振興会に心より感謝いたします。

そして、京都薬科大学病態生理学分野および同卒業生の諸氏、特に実験にご協力頂いた岡輝氏、藍谷真由氏、好田充志氏、また、京都薬科大学統合薬科学系の諸氏、特に実験にご協力頂いた佐竹志穂氏、島千晶氏に深く御礼申し上げます。

また末筆ながら、大学院生活を送るにあたり、ご指導、ご鞭撻、激励を頂きました先生方、他分野大学院生の皆様に感謝の意を表すると共に益々のご活躍を祈念致します。

最後に、4年間の長きにわたり陰ながら生活面ならびに精神面で支えてくれた家族、執筆中に永眠した祖父に深く感謝の念を表します。

参考文献

1. Hippus H, Neundörfer G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues. Clin. Neurosci.* **2003**, 5, 101-108.
2. Davis KL, Mohs RC, Marin D, Purohit DP, Perl DP, Lantz M, et al. Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *J. Am. Med. Assoc.* **1999**, 281, 1401-1406.
3. Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. Alzheimer's disease and senile dementia: Loss of neurons in the basal forebrain. *Science* **1982**, 215, 1237-1239.
4. Shimohama S, Taniguchi T, Fujiwara M, Kameyama M. Changes in Nicotinic and Muscarinic Cholinergic Receptors in Alzheimer-Type Dementia. *J. Neurochem.* **1986**, 46, 288-293.
5. Masliah E, Alford M, DeTeresa R, Mallory M, Hansen L. Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **1996**, 40, 759-766.
6. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol.* **2010**, 9, 119-128.
7. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **1991**, 349, 704-706.
8. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **1995**, 375, 754-760.
9. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* **2016**, 8, 595-608.
10. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, 297, 353-356.
11. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim J V., Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* **2005**, 8, 752-758.
12. Prinz M, Priller J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: From origin to neuropsychiatric disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2014**, 15, 300-312.
13. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, et al. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* **2007**, 446, 1091-1095.
14. Glezer I, Simard AR, Rivest S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neurosci.* **2007**, 147, 867-883.
15. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, et al. Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* **2012**, 74, 691-705.

16. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J. Neurosci.* **2009**, 29, 3974-3980.
17. Cserép C, Pósfai B, Lénárt N, Fekete R, László ZI, Lele Z, et al. Microglia monitor and protect neuronal function via specialized somatic purinergic junctions. *Science* **2019**, 367, 528-537.
18. Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **2013**, 45, 1452-1458.
19. Ryu JC, Zimmer ER, Rosa-Neto P, Yoon SO. Consequences of Metabolic Disruption in Alzheimer's Disease Pathology. *Neurotherapeutics* **2019**, 16, 600-610.
20. Baik SH, Kang S, Lee W, Choi H, Chung S, Kim J Il, et al. A Breakdown in Metabolic Reprogramming Causes Microglia Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Cell Metab.* **2019**, 30, 493-507.
21. Noda M, Doi Y, Liang J, Kawanokuchi J, Sonobe Y, Takeuchi H, et al. Fractalkine attenuates excitotoxicity via microglial clearance of damaged neurons and antioxidant enzyme heme oxygenase-1 expression. *J. Biol. Chem.* **2011**, 2308-2319.
22. Takata K, Kitamura Y, Yanagisawa D, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, et al. Microglial transplantation increases amyloid- β clearance in Alzheimer model rats. *FEBS Lett.* **2007**, 581, 475-478.
23. Goldmann T, Wieghofer P, Jordão MJC, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K, et al. Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat. Immunol.* **2016**, 17, 797-805.
24. Hoeffel G, Ginhoux F. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell Immunol.* **2018**, 330, 5-15.
25. Kawanishi S, Takata K, Itzono S, Nagayama H, Konoya S, Chisaki Y, et al. Bone-Marrow-Derived Microglia-Like Cells Ameliorate Brain Amyloid Pathology and Cognitive Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2018**, 64, 563-585.
26. Allen ES, Conry-Cantilena C. Mobilization and collection of cells in the hematologic compartment for cellular therapies: Stem cell collection with G-CSF/plerixafor, collecting lymphocytes/monocytes. *Semin. Hematol.* **2019**, 56, 248-256.
27. Lévesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, Haylock DN, Simmons PJ. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **2001**, 98, 1289-1297.
28. Petit I, Ponomaryov T, Zipori D, Tsvee L. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat. Immunol.* **2002**, 3, 687-694.

29. Winkler IG, Pettit AR, Raggatt LJ, Jacobsen RN, Forristal CE, Barbier V, et al. Hematopoietic stem cell mobilizing agents G-CSF, cyclophosphamide or AMD3100 have distinct mechanisms of action on bone marrow HSC niches and bone formation. *Leukemia* **2012**, 26, 1594-1601.
30. Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, et al. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* **2012**, 13, 753-760.
31. Boulakirba S, Pfeifer A, Mhaidly R, Obba S, Goulard M, Schmitt T, et al. IL-34 and CSF-1 display an equivalent macrophage differentiation ability but a different polarization potential. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 256.
32. Chitu V, Gokhan Ş, Nandi S, Mehler MF, Stanley ER. Emerging Roles for CSF-1 Receptor and its Ligands in the Nervous System. *Trends Neurosci.* **2016**, 39, 378-393.
33. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC. Bioinformatics.* **2017**, 18, 529.
34. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, et al. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat. Neurosci.* **2014**, 17, 131-143.
35. Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, 113, 1738-1746.
36. Mildner A, Huang H, Radke J, Stenzel W, Priller J. P2Y12 receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia* **2017**, 65, 375-387.
37. Bolós M, Llorens-Martín M, Perea JR, Jurado-Arjona J, Rábano A, Hernández F, et al. Absence of CX3CR1 impairs the internalization of Tau by microglia. *Mol. Neurodegener.* **2017**, 12, 59.
38. Satoh JI. Gene expression profiles of M1 and M2 microglia characterized by comparative analysis of public datasets. *Clin. Exp. Neuroimmunol.* **2018**, 9, 124-138.
39. Sudo Y, Shimazaki C, Ashihara E, Kikuta T, Hirai H, Sumikuma T, et al. Synergistic effect of FLT-3 ligand on the granulocyte colony-stimulating factor-induced mobilization of hematopoietic stem cells and progenitor cells into blood in mice. *Blood* **1997**, 89, 3186–3191.
40. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J. Exp. Med.* **2005**, 201, 1307-1318.
41. Duan XZ, Liu FF, Tong JJ, Yang HZ, Chen J, Liu XY, et al. Granulocyte-colony stimulating factor therapy improves survival in patients with hepatitis B virus-associated acute-on-chronic liver failure. *World J. Gastroenterol.* **2013**, 19, 1104-1110.

42. Pantin J, Purev E, Tian X, Cook L, Donohue-Jerussi T, Cho E, et al. Effect of high-dose plerixafor on CD34+ cell mobilization in healthy stem cell donors: Results of a randomized crossover trial. *Haematologica* **2017**, 102, 600-609.
43. Tamura T, Ozato K. ICSBP/IRF-8: Its regulatory roles in the development of myeloid cells. *J. Interferon and Cytokine Res.* **2002**, 22, 145-152.
44. Mossadegh-Keller N, Sarrazin S, Kandalla PK, Espinosa L, Richard Stanley E, Nutt SL, et al. M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells. *Nature* **2013**, 497, 239-243.
45. Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* **2014**, 159, 1312-1326.
46. Schultze JL, Ringelhan M, Kierdorf K, Knolle PA, Ulas T, Costa Jordão MJ, et al. Transcriptome-based profiling of yolk sac-derived macrophages reveals a role for Irf8 in macrophage maturation. *EMBO J.* **2016**, 35, 1730-1744.
47. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, et al. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1-and Irf8-dependent pathways. *Nat. Neurosci.* **2013**, 16, 273-280.
48. Ségaliny AI, Brion R, Brulin B, Maillason M, Charrier C, Téletchéa S, et al. IL-34 and M-CSF form a novel heteromeric cytokine and regulate the M-CSF receptor activation and localization. *Cytokine* **2015**, 76, 170-181.
49. Barve RA, Zack MD, Weiss D, Song RH, Beidler D, Head RD. Transcriptional profiling and pathway analysis of CSF-1 and IL-34 effects on human monocyte differentiation. *Cytokine* **2013**, 63, 10-17.
50. Walker DG, Tang TM, Lue LF. Studies on colony stimulating factor receptor-1 and ligands colony stimulating factor-1 and interleukin-34 in Alzheimer's disease brains and human microglia. *Front. Aging Neurosci.* **2017**, 9:244.
51. Ohgidani M, Kato TA, Setoyama D, Sagata N, Hashimoto R, Shigenobu K, et al. Direct induction of ramified microglia-like cells from human monocytes: Dynamic microglial dysfunction in Nasu-Hakola disease. *Sci. Rep.* **2014**, 4, 1-7.
52. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.* **2016**, 53, 1181-1194.
53. Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, Sparks DL. Dystrophic Microglia in the Aging Human Brain. *Glia* **2004**, 45, 208-212.
54. Njise MG, Boelen E, Stassen FR, Steinbusch HWM, Borchelt DR, Streit WJ. Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol. Aging.* **2012**, 33, 195, e1-12.

55. Shi P, Wei Y, Zhang J, Gal J, Zhu H. Mitochondrial dysfunction is a converging point of multiple pathological pathways in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, 20, S311-324.
56. Harry GJ. Microglia during development and aging. *Pharmacol. Ther.* **2013**, 139, 313-326.
57. Mosher KI, Wyss-Coray T. Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, 88, 594-604.
58. Takata K, Amamiya T, Mizoguchi H, Kawanishi S, Kuroda E, Kitamura R, et al. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-specific agonist DMXBBA (GTS-21) attenuates A β accumulation through suppression of neuronal γ -secretase activity and promotion of microglial amyloid- β phagocytosis and ameliorates cognitive impairment in a mouse model. *Neurobiol. Aging.* **2018**, 62, 197-209.
59. Takata K, Kitamura Y, Saeki M, Terada M, Kagitani S, Kitamura R, et al. Galantamine-induced amyloid- β clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 40180-40191.
60. St-Pierre S, Jiang W, Roy P, Champigny C, LeBlanc É, Morley BJ, et al. Nicotinic acetylcholine receptors modulate bone marrow-derived pro-inflammatory monocyte production and survival. *PLoS One* **2016**, 11, e0150230.
61. Shimizu E, Kawahara K, Kajizono M, Sawada M, Nakayama H. IL-4-Induced Selective Clearance of Oligomeric β -Amyloid Peptide 1–42 by Rat Primary Type 2 Microglia. *J. Immunol.* **2008**, 181, 6503-6513.
62. Kawahara K, Suenobu M, Yoshida A, Koga K, Hyodo A, Ohtsuka H, et al. Intracerebral microinjection of interleukin-4/interleukin-13 reduces β -amyloid accumulation in the ipsilateral side and improves cognitive deficits in young amyloid precursor protein 23 mice. *Neuroscience* **2012**, 207, 243-260.
63. Wyss-Coray T, Lin C, Yan F, Yu GQ, Rohde M, Mconlogue L, et al. TGF- β 1 promotes microglial amyloid- β clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat. Med.* **2001**, 7, 612-618.
64. Mcgeer PL, Mcgeer E, Rogers J, Sibley J. Anti-inflammatory drugs and Alzheimer disease. *Lancet* **1990**, 335, 1037.
65. Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R, Pietrzik CU, et al. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* **2001**, 414, 212-216.
66. Olmos-Alonso A, Schetters STT, Sri S, Askew K, Mancuso R, Vargas-Caballero M, et al. Pharmacological targeting of CSF1R inhibits microglial proliferation and prevents the progression of Alzheimer's-like pathology. *Brain* **2016**, 139, 891-907.
67. Elmore MRP, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, et al. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* **2014**, 82, 380-397.

68. Spangenberg EE, Lee RJ, Najafi AR, Rice RA, Elmore MRP, Blurton-Jones M, et al. Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- β pathology. *Brain* **2016**, 139, 1265-1281.
69. Cai Z, Xiao M. Oligodendrocytes and Alzheimer's disease. *Int. J. Neurosci.* **2016**, 97-104.
70. Roth AD, Ramírez G, Alarcón R, Von Bernhardi R. Oligodendrocytes damage in Alzheimer's disease: Beta amyloid toxicity and inflammation. *Biol. Res.* **2005**, 38, 381-388.
71. Bartzokis G. Alzheimer's disease as homeostatic responses to age-related myelin breakdown. *Neurobiol. Aging.* **2011**, 32, 1341-1371.
72. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. "Green mice" as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* **1997**, 407, 313-319.
73. Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: Evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Hum. Mol. Genet.* **2004**, 13, 159-170.
74. Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE. Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn Mem.* **2010**, 17, 5-11.
75. Selles MC, Oliveira MM, Ferreira ST. Brain Inflammation Connects Cognitive and Non-Cognitive Symptoms in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2018**, 64, S313-S327.
76. Torika N, Asraf K, Apte RN, Fleisher-Berkovich S. Candesartan ameliorates brain inflammation associated with Alzheimer's disease. *CNS Neurosci. Ther.* **2018**, 24, 231-242.
77. Mikoshiba K, Okano H, Tamura TA, Ikenaka K. Structure and Function of Myelin Protein Genes. *Annu Rev Neurosci.* **1991**, 14, 201-217.
78. Bran GM, Sommer UJ, Goessler UR, Hörmann K, Riedel F, Sadick H. TGF- β 1 antisense impacts the SMAD signalling system in fibroblasts from keloid scars. *Anticancer Res.* **2010**, 30, 3459-3463.
79. Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J. Neuroimmunol.* **1989**, 24, 173-182.
80. Kreutzberg GW. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* **1996**, 19, 312-318.
81. Nishimura K, Murayama S, Takahashi J. Identification of Neurexophilin 3 as a Novel Supportive Factor for Survival of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Dopaminergic Progenitors. *Stem Cells Transl. Med.* **2015**, 4, 932-944.
82. Wang Y, Ulland TK, Ulrich JD, Song W, Tzaferis JA, Hole JT, et al. TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J. Exp. Med.* **2016**, 213, 667-675.

83. Moore KJ, El Khoury J, Medeiros LA, Terada K, Geula C, Luster AD, et al. A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of β -amyloid. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 47373-47379.
84. Askew K, Li K, Olmos-Alonso A, Garcia-Moreno F, Liang Y, Richardson P, et al. Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Rep.* **2017**, 18, 391-405.
85. Vorhees C V., Williams MT. Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 848-858.
86. Peterson TC, Buckwalter MS, Panicker N, Kumar M, Dawson TM, Bennett FC, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* **2017**, 541, 481–487.
87. Jennings MT, Pietenpol JA. The role of transforming growth factor β in glioma progression. *J. Neurooncol.* **1998**, 36, 123-140.
88. Ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF- β -Smad signalling. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, 29, 265-273.
89. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor- β signaling through the Smad pathway: Role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J. Invest. Dermatol.* **2002**, 118, 211-215.
90. Lindholm D, Castren E, Kiefer R, Zafra F, Thoenen H. Transforming growth factor- β 1 in the rat brain: Increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J. Cell Biol.* **1992**, 117, 395-400.
91. Hamaguchi M, Muramatsu R, Fujimura H, Mochizuki H, Kataoka H, Yamashita T. Circulating transforming growth factor- β 1 facilitates remyelination in the adult central nervous system. *Elife* **2019**, 8, e41869.
92. Tichauer JE, Flores B, Soler B, Eugén-von Bernhardt L, Ramírez G, Von Bernhardt R. Age-dependent changes on TGF β 1 Smad3 pathway modify the pattern of microglial cell activation. *Brain Behav. Immun.* **2014**, 37, 187-196.
93. Jaenisch R, Tsai L-H, Corcoran S, Omer A, Yuan B, Muffat J, et al. Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Med.* **2016**, 22, 1358–1367.
94. Gul A, Park DS, Thion MS, Garel S, Newell E, Chakarov S, et al. Induced-Pluripotent-Stem-Cell-Derived Primitive Macrophages Provide a Platform for Modeling Tissue-Resident Macrophage Differentiation and Function. *Immunity* **2017**, 47, 183-198. e6.
95. Antel JP, Healy LM, Gylys KH, Caraway CA, Blurton-Jones M, Martinez ES, et al. iPSC-Derived Human Microglia-like Cells to Study Neurological Diseases. *Neuron* **2017**, 94, 278-293.e9.

96. Brown MA, Elkahloun AG, Shen MJ, Sedlock AB, Sweeney CL, Maric D, et al. Differentiation of human and murine induced pluripotent stem cells to microglia-like cells. *Nat. Neurosci.* **2017**, 20, 753–759.
97. Douvaras P, Sun B, Wang M, Kruglikov I, Lallou G, Zimmer M, et al. Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells to Microglia. *Stem Cell Reports* **2017**, 8, 1516-1524.
98. Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* **2006**, 49, 489-502.
99. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM V. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* **2007**, 10, 1538-1543.
100. Yang Y, Jorstad NL, Shiao C, Cherne MK, Khademi SB, Montine KS, et al. Perivascular, but not parenchymal, cerebral engraftment of donor cells after non-myeloablative bone marrow transplantation. *Exp. Mol. Pathol.* **2013**, 95, 7.
101. Cronk JC, Filiano AJ, Louveau A, Marin I, Marsh R, Ji E, et al. Peripherally derived macrophages can engraft the brain independent of irradiation and maintain an identity distinct from microglia. *J. Exp. Med.* **2018**, 215, 1627-1647.
102. Huang Y, Xu Z, Xiong S, Sun F, Qin G, Hu G, et al. Repopulated microglia are solely derived from the proliferation of residual microglia after acute depletion. *Nat. Neurosci.* **2018**, 21, 530-540.
103. Varvel NH, Grathwohl SA, Degenhardt K, Resch C, Bosch A, Jucker M, et al. Replacement of brain-resident myeloid cells does not alter cerebral amyloid- β deposition in mouse models of Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* **2015**, 212, 1803-1809.
104. Prokop S, Miller KR, Drost N, Handrick S, Mathur V, Luo J, et al. Impact of peripheral myeloid cells on amyloid- β pathology in Alzheimer's disease-Like mice. *J. Exp. Med.* **2015**, 212, 1811-1818.