

マウス骨髄由来ミクログリア様細胞の機能解析およびアルツハイマー病  
モデルマウスへの移植による認知機能改善効果の解析

2018 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

河西 翔平



## 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) : 河西翔平 (Shohei Kawanishi)

学位論文題目 : マウス骨髄由来ミクログリア様細胞の機能解析およびアルツハイマー病モデルマウスへの移植による認知機能改善効果の解析

### 序章

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease ; AD) は、物忘れなどの記憶障害から始まり、徐々に認知機能全般が低下する疾患である。超高齢化社会を迎えた本邦において AD 患者数は増加の一途を辿っている。AD の発症機序については未だ不明な点が多く、AD に対する根本的な治療薬や治療法は現在のところ確立されていない。現在最も有力な AD 発症機序の仮説として、脳内でのアミロイド  $\beta$  タンパク質 (amyloid  $\beta$  ; A $\beta$ ) の増加・蓄積が AD 発症の引き金となるとされる“アミロイドカスケード仮説”が支持されている。

ミクログリアは、脳内で死細胞や病原体の貪食やサイトカインの産生により脳内免疫に働く組織マクロファージの一種であり、神経細胞のシナプスの剪定によって神経回路形成に関与するなど、中枢において極めて重要な役割も担う。ミクログリアの起源は、胎生期初期の造血細胞から分化することが近年確認された。これまでに、AD モデルラット脳室内に外来性のラット初代培養ミクログリアを移植すると、移植したミクログリアが A $\beta$  を貪食し、脳内 A $\beta$  量を減少させるという報告があり、ミクログリアの移植が AD 治療に有効である可能性が提唱されている。しかしながら、この移植療法の臨床応用を想定した場合、ヒトミクログリアの調製が必須であるが、倫理的・技術的な面からヒトミクログリアの採取は困難である。

そこで、本研究ではミクログリアの代替となるミクログリア様細胞の細胞ソースを探索する目的で、骨髄に含まれる造血幹細胞から分化させた細胞が、ミクログリアの代替細胞となり得るのか、ミクログリア様細胞の機能を評価した。さらに、この骨髄由来細胞の AD モデルマウス海馬内への移植による脳内 A $\beta$  量の変化、移植細胞の脳内動態および認知機能改善効果についても解析を行った。

### 第 1 章 骨髄細胞からミクログリア様 A $\beta$ 貪食細胞への分化誘導および機能解析

生後 7 週齢の C57BL/6 マウスより骨髄細胞を採取し、colony stimulating factor-1 (CSF-1) を処置し 7 日間培養した。この細胞について、ミクログリア/マクロファージマーカーの発現ならびに A $\beta$  貪食機能および炎症刺激に対する応答性について解析した。その結果、骨髄由来細胞において CSF-1 の処置により、ionized calcium-binding adaptor molecule 1、CD11b、triggering receptor expressing on myeloid 2 (TREM2) などの発現が確認できた。また、この細胞は、比較細胞として用いた腹腔マクロファージよりも約 5.2 倍高い A $\beta$  貪食能を有していた。さらに、炎症を惹起する interferon (IFN)- $\gamma$  と interleukin (IL)-1 $\beta$  の同時処置や lipopolysaccharide (LPS) 処置において、骨髄由来細胞は炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  (IFN $\gamma$ +IL-1 $\beta$  処置: 約 4.2 倍、LPS 処置: 約 79 倍)、IL-6 (IFN $\gamma$ +IL-1 $\beta$  処置: 約 9.2 倍、LPS 処置: 約 20000 倍)、*tumor*

*necrosis factor- $\alpha$*  (IFN $\gamma$ +IL-1 $\beta$  処置: 約 11 倍、LPS 処置: 約 36 倍) の mRNA の発現上昇を引き起こし、抗炎症性サイトカインである *transforming growth factor- $\beta$ 1* の mRNA の発現量を IFN $\gamma$ +IL-1 $\beta$  処置で 47%、LPS 処置で 2.1%まで減少させる応答を示した。さらに、加齢に伴う骨髄細胞の分化能や A $\beta$  貪食機能の変化についても解析を行った。10 週齢および 24 ヶ月齢のマウスから得た骨髄由来細胞を比較した結果、接着細胞数は 51%、貪食能は 58%と低かった。また、前者の場合と比較して後者の貪食能は約 1.7 倍高かった。以上より、若齢および加齢したマウスの骨髄細胞からミクログリアに類似した A $\beta$  貪食細胞へと分化誘導できることが明らかとなった。

## 第 2 章 AD モデルマウス海馬内へのミクログリア様細胞の移植および移植効果の解析

第 1 章で作製した骨髄由来ミクログリア様 A $\beta$  貪食細胞が *in vivo* 脳内においても A $\beta$  を貪食し、認知機能障害を改善できるのかを解析するために、AD モデルマウスを用いて移植実験を実施した。

生後 7 週齢の green fluorescent protein (GFP) 陽性マウスより採取した骨髄細胞を CSF-1 で刺激し、GFP 陽性ミクログリア様細胞へ分化誘導した。その後、得られた細胞を野生型および A $\beta$  が脳内に蓄積する AD モデルマウスの海馬内に移植し、移植細胞の脳への生着や脳内動態、A $\beta$  病態への移植細胞の影響ならびに認知機能の改善効果を解析した。

その結果、脳へ移植したミクログリア様細胞は、脳内でも TREM2 を発現し、定常型の形態を呈して生着していた。一方、移植細胞の脳内での動態を解析したところ、AD モデルマウス脳内では、移植細胞間距離が野生型マウス脳内に比べ、移植後 14 日目において約 1.4 倍増大することから、AD 病態脳の環境下では移植細胞の移動が大きくなることが明らかになった。さらに、数理モデルで計算したランダムに移植細胞が移動した場合に A $\beta$  プラークに偶然集積する確率と、実際に A $\beta$  プラークに移植細胞が集積した実測値の確率を比較した結果、移植後 14 日目において計算値よりも実測値の確率が約 1.3 倍高かったことから、移植細胞は A $\beta$  に指向性をもって移動することが示唆された。また、移植後 14 日目において AD モデルマウス脳内の A $\beta$  プラークの数や A $\beta$  免疫反応陽性面積は、それぞれ 45%および 24%まで減少していた。最後に、新規物体認識試験により、ミクログリア様細胞移植による AD モデルマウスの認知機能障害の改善効果について解析した結果、その改善効果が細胞移植後 14 日目において確認できた。以上の結果より、骨髄由来細胞は *in vivo* 脳内でもミクログリア様 A $\beta$  貪食細胞として機能することで、認知機能を改善することが示された。

## 総括

本研究より、骨髄細胞からミクログリアの性質に近い A $\beta$  貪食細胞が調製でき、マウス個体の加齢後も比較的高い貪食機能を保ったミクログリア様細胞へと分化できることが分かった。これは、高齢の AD 患者の自己骨髄からも A $\beta$  貪食機能を高く保持した細胞が確保できる可能性を強く示唆している。さらに、本細胞はマウス脳内においてもミクログリア様の細胞として生着し、A $\beta$  プラークへの指向性をもった移動能とその貪食により、脳内 A $\beta$  の除去に働くことで認知機能を改善することが分かった。以上より、本研究は、未だ根本的な治療法のない AD に対して、新たな治療法の開発に大きく貢献できる研究であると考えられる。

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。

1. Shohei Kawanishi, Kazuyuki Takata, Shouma Itezono, Hiroko Nagayama, Sayaka Konoya, Yugo Chisaki, Yuki Toda, Susumu Nakata, Yoshitaka Yano, Yoshihisa Kitamura, Eishi Ashihara. 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. [第 1 章, 第 2 章]

Copyright (2019), with permission from IOS Press. The publication is available at IOS Press through <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-170994>



## 目次

序論 .....	1
第1章 骨髄細胞からミクログリア様 A $\beta$ 貪食細胞への分化誘導および機能解析	
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. ギムザ染色 .....	8
1-2-4. 酸化鉄の貪食と A $\beta$ 貪食の解析 .....	8
1-2-5. ELISA による A $\beta$ 貪食量の解析 .....	8
1-2-6. 免疫細胞化学的染色 .....	9
1-2-7. フローサイトメトリー .....	9
1-2-8. RT-qPCR 法によるサイトカイン遺伝子発現の解析 .....	10
1-2-9. 統計解析 .....	11
1-3. 実験結果 .....	12
1-3-1. CSF-1 処置による骨髄細胞の形態変化と接着細胞数の変化 .....	12
1-3-2. 骨髄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比較 .....	14
1-3-3. 骨髄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強度の解析 ...	16
1-3-4. 骨髄由来細胞における酸化鉄貪食能の解析 .....	18
1-3-5. 骨髄由来細胞における A $\beta$ 貪食能の解析 .....	20
1-3-6. BMDML 細胞におけるサイトカイン遺伝子の発現解析 .....	22
1-3-7. 加齢に伴う骨髄細胞から BMDML 細胞への分化能の変化の解析 .....	24
1-3-8. 加齢に伴う BMDML 細胞のミクログリア/マクロファージマーカー発現の比較 ..	26
1-3-9. 加齢に伴う BMDML 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強度 の解析 .....	28
1-3-10. 加齢に伴う BMDML 細胞の A $\beta$ 貪食能の変化の解析 .....	30
1-4. 考察 .....	32
第2章 AD モデルマウス海馬内へのミクログリア様細胞の移植および移植効果の解析	
2-1. 緒言 .....	34
2-2. 実験方法 .....	35
2-2-1. 実験動物 .....	35
2-2-2. 細胞培養 .....	35
2-2-3. 海馬マイクロインジェクションによる BMDML 細胞の移植 .....	35
2-2-4. マウスの脳摘出および薄切切片の作製 .....	36
2-2-5. 免疫組織化学的染色法 .....	36

2-2-6. 画像解析による A $\beta$ プラーク数および A $\beta$ 面積の定量と移植細胞間距離の解析 .....	36
2-2-7. シミュレーション解析 .....	37
2-2-8. 新規物体認識試験 .....	37
2-2-9. 統計解析 .....	39
2-3. 実験結果 .....	40
2-3-1. BMDML 細胞の脳への生着 .....	40
2-3-2. BMDML 細胞の脳内動態の解析 .....	42
2-3-3. 脳内における BMDML 細胞の A $\beta$ 貪食能の解析 .....	45
2-3-4. コンピュータシミュレーションによる BMDML 細胞の A $\beta$ への指向性の解析 .....	46
2-3-5. BMDML 細胞移植による認知機能障害改善効果の解析 .....	48
2-4. 考察 .....	50
総括 .....	53
謝辞 .....	54
参考文献 .....	55



## 略語一覽表

AD	Alzheimer's disease
AGM	aorta-gonad-mesonephros
ANOVA	analysis of variance
APC	allophycocyanin
APP	amyloid precursor protein
A $\beta$	amyloid $\beta$
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
ES	embryonic stem
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
IFN- $\gamma$	interferon- $\gamma$
IGF-1	insulin growth factor-1
IL	interleukin
Iba1	ionized calcium-binding adaptor molecule 1
Irf8	interferon regulatory factor 8
LPS	lipopolysaccharide
MEM- $\alpha$	minimum essential medium- $\alpha$
MFI	median fluorescence intensity
PB	phosphate buffer
PBS (-)	Ca <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup> free phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyde
PSEN	presenilin
RT-qPCR	reverse transcript-quantitative polymerase chain reaction
SEM	standard error of the mean
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor- $\beta$ 1
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$

TREM2	triggering receptor expressing on myeloid 2
Tmem119	transmembrane protein 119
iPS	induced pluripotent stem

## 序論

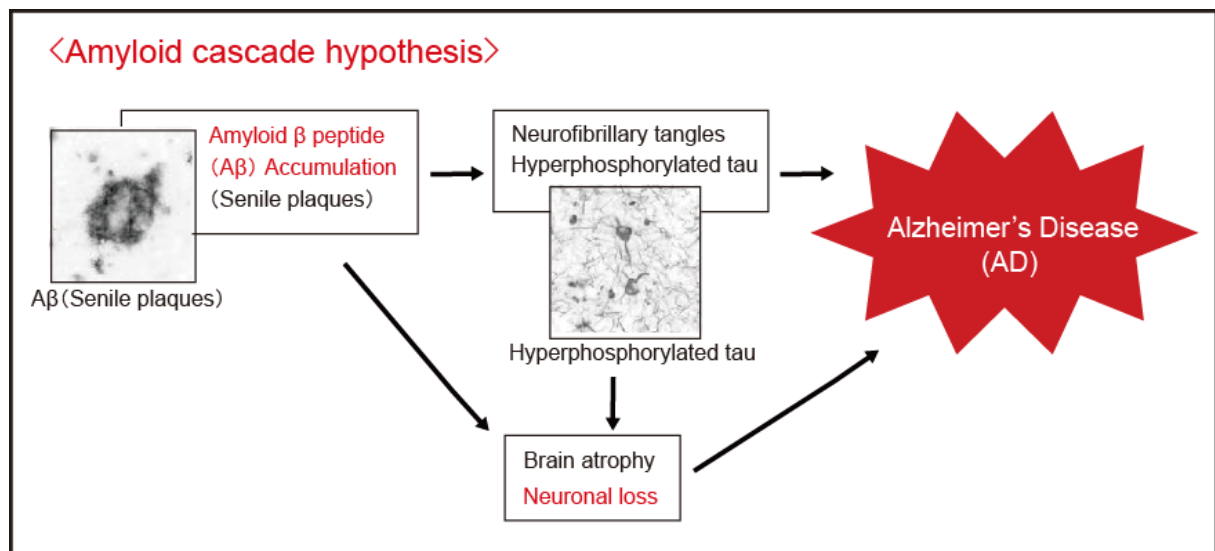
現在本邦では、少子高齢化社会が急速に進んでおり、総人口は減少している。しかしながら、65歳以上の高齢者人口の割合は一貫して増加し続けており、平成28年10月時点での総務省統計局「人口推計」において、その割合は28.8%であった。今後も高齢者人口割合の上昇が予測されている。このような急速な高齢化に伴い、認知症に罹患している患者の数も急激に増加しており、認知症患者の家族への介護負担や認知症に関わる医療費などの社会的コストも増大している（本邦2014年において14.5兆円）<sup>(1)</sup>ことから、認知症は大きな社会問題となっている。アルツハイマー病（Alzheimer's disease ; 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り、認知症のうち約6割がADと考えられている。ADは今からおよそ100年前の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<sup>(2)</sup>。AD患者剖検脳では脳内でのアミロイド $\beta$ タンパク質（amyloid  $\beta$  ; A $\beta$ ）の集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。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N-methyl-D-aspartate 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、これらの薬剤はいずれもADの症状を軽減または進行を遅らせる対症療法薬であり、ADに対する根本的な治療薬や治療法は未だ確立されていない。したがって、ADの発症メカニズムに基づいた根本的治療薬や治療法の開発が望まれている。

AD発症メカニズムは、A $\beta$ 産生に関与する家族性AD原因遺伝子であるアミロイド前駆体タンパク質（amyloid precursor protein ; APP）遺伝子<sup>(3)</sup>とAPPからA $\beta$ 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遺伝子の発見<sup>(4)</sup>を契機に、アミロイドカスケード仮説<sup>(5,6)</sup>が提唱され支持されている。アミロイドカスケード仮説とは、脳内で産生されたA $\beta$ の凝集や沈着が引き金となってADが発症するという仮説である。A $\beta$ が沈着、凝集することによりタウタンパク質が過剰にリン酸化され、その結果、脳内に神経原線維変化を生じ、神経細胞死がもたらされることでADが発症する（Schema 1）。現在、この仮説を基に脳内からA $\beta$ を除去することがADの治療ターゲットとして期待されている。

ミクログリアは、その食食機能により脳内で死細胞や病原体の食食<sup>(7-9)</sup>や、サイトカインの産生<sup>(10)</sup>により脳内免疫に働く細胞であり、また、神経細胞のシナプスの剪定によって神経回路形成に関与する<sup>(11,12)</sup>など、中枢において極めて重要な役割を担う組織マクロファージである。近年、ADモデルマウスやAD患者脳サンプルでの単一細胞でのRNA-seq解析で、健常脳に比べAD病態脳ではミクログリアの食食や脂質代謝に関わる遺伝子の発現が増加していることが報告されており、健常脳とAD脳ではミクログリアの表現型が異なることが示唆されている<sup>(13)</sup>。さらに、ミクログリアにおけるtriggering receptor expressing on myeloid 2（TREM2）遺伝子の変異がAD発症のリスクファクターとなることも報告されてお

り (14, 15)、ミクログリアの AD 病態に対する役割が注目されている (16)。また、AD 患者剖検脳や AD モデルマウスにおいて、ミクログリアが A $\beta$  に集積し (17)、貪食していることが報告されている (18, 19)。さらに、AD モデルラット脳室内に外来性のラット初代培養ミクログリアを移植すると、移植したミクログリアが A $\beta$  を貪食し、脳内 A $\beta$  量を減少させるということが報告されている (20)。これらのことから、ミクログリアの移植が AD 治療に有効である可能性が示唆されている。しかしながら、この移植療法の臨床応用を想定した場合、ヒトミクログリアの調製が必須であるが、倫理的・技術的な面からヒトミクログリアの採取は困難である。そのため、AD 治療に用いるミクログリアの代替となる細胞を調製することが肝要である。

**Schema 1. Schematic diagram for amyloid cascade hypothesis.**

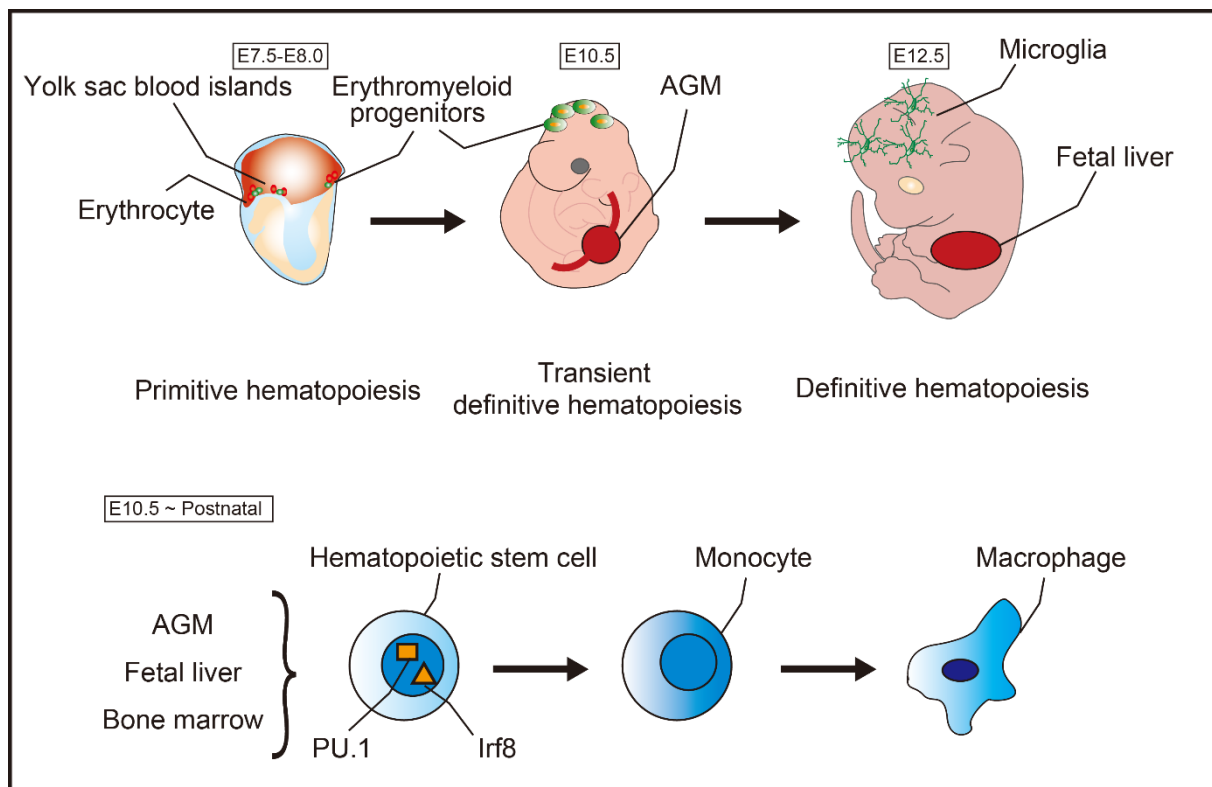


The amyloid cascade hypothesis is believed the cause mechanism of AD. This hypothesis proposes that the deposition and accumulation of A $\beta$  is the initial pathological event of AD. A $\beta$  deposition leads to the neurofibrillary tangle, hyperphosphorylated tau and neuronal loss. These pathological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

ミクログリアは、マウスを用いた fate mapping 解析により胎生 7.5 日目に胚体外組織である卵黄嚢で発生する一次造血に由来する血液細胞であることが、近年確認された (21-26)。この細胞は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、colony stimulating factor-1 (CSF-1) のシグナルにより細胞内の extracellular signal-regulated kinase 1/2 がリン酸化され、ミエロイド系マスター転写因子である PU.1 や interferon regulatory factor 8 (Irf8) の発現上昇を介してミクログリアに成熟する (27, 28)。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する。二次造血は、マウスでは胎生 10.5 日目頃に胎仔体内の大動脈

-生殖原基-中腎（aorta-gonad-mesonephros ; AGM）領域と呼ばれる部位で造血幹細胞が発生することで始まり、胎生 12.5 日目頃に造血の場合は胎仔肝へと移行する (29,30)。さらに生後は、造血の場合は骨髄へと移る。このような二次造血において成体のマクロファージは、造血幹細胞から CSF-1 のシグナルを介して PU.1 や Irf8 が活性化され、単球を経てマクロファージがつくられる。(Schema 2) (31-33)。この分化過程はマウスと同じ哺乳動物であるヒトでも共通と考えられている。これらの報告から、ミクログリアと骨髄由来マクロファージは、発生の起源の細胞は異なるが、その分化プロセスは同様のシグナル経路により、同じ転写因子を介して分化することがわかる。このことから、成体のマクロファージの供給源である骨髄細胞中に存在する造血幹細胞からミクログリアの代替となる細胞へ分化誘導することができればADの細胞治療に用いる細胞ソースとして、骨髄細胞が利用できるのではないかと考えた。

**Schema 2. Embryonic and postnatal development of microglia and macrophage in mice.**



Primitive, transient definitive and definitive waves of fetal hematopoiesis sequentially generate progenitors of macrophage. Microglia are derived from erythromyeloid progenitor cells at embryonic day 7.5 (E7.5)-E8.0 in the yolk sac in mice. These cells infiltrated the brain rudiment of E9.25-E9.5 and differentiate into microglia. These early microglia reside in the brain throughout life and microglia are thought to sustain the local proliferation. By contrast, definitive hematopoiesis starts at E10.5 first in the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region or later at E12.5 in the fetal liver. Postnatally, hematopoietic stem cells generate monocyte in the bone marrow and monocyte differentiate into macrophage.

本研究では、ミクログリアの代替となるミクログリア様細胞の細胞ソースを探索する目的で、骨髄に含まれる造血幹細胞から分化誘導した細胞が、ミクログリアの代替細胞となり得るのか機能評価した。第1章では、*in vitro* 系において骨髄由来細胞に発現している表面抗原マーカーの発現解析や、貪食能および炎症性刺激に対するサイトカイン遺伝子の発現量の変化を解析した。さらに、高齢 AD 患者が自己の骨髄細胞を用いて治療を行うことができるのか評価するために、加齢したマウスから得た骨髄細胞を用いて、加齢に伴う骨髄由来細胞の増殖能、分化能や A $\beta$  貪食能についても解析した。第2章では、第1章で作製した骨髄由来細胞を AD モデルマウスの脳内へ移植し、*in vivo* 脳内での移植細胞の生着と脳内動態、A $\beta$  病態への影響について解析した。さらに、新規物体認識試験により、移植細胞による認知機能障害改善効果について解析した。

## 第 1 章

### 骨髄細胞からミクログリア様 A $\beta$ 貪食細胞への分化誘導および機能解析

#### 1-1. 緒言

AD は進行性の認知機能障害を主徴とする認知症の一種であり、超高齢社会を迎えた日本において AD の治療法を開発することは喫緊の課題である。現在、AD 発症メカニズムとしてアミロイドカスケード仮説 (5, 6) が支持されており、脳内から A $\beta$  を除去することが AD の治療ターゲットとして期待されている。これまでにラット初代培養ミクログリアにおいてミクログリアが A $\beta$  貪食能を有しており (17, 34-36)、ミクログリアの移植が脳内 A $\beta$  除去に有効であることが報告されている (20)。このことから、ミクログリアの脳内への移植が AD 治療に有効である可能性が示唆されている。しかしながら、この移植療法の臨床応用を想定した場合、ヒト由来ミクログリアの調製が必須であるが、その調製・調達は困難である。そのため、AD 治療に用いるミクログリアの代替となる細胞を調製することが肝要である。

ミクログリアを含むマクロファージは造血系の血液細胞に由来する。哺乳動物の造血発生は、大きく一次造血と二次造血の 2 つのステージに分けることができ、マクロファージを含む血液細胞の産生はまず、一次造血と呼ばれる初期造血によって開始される (37)。ミクログリアは、この一次造血でつくられたマクロファージに由来する (21-26)。この一次造血は一過性であり、その後続く骨髄での二次造血に置き換わる。生後は骨髄に存在する造血幹細胞から単球を経て、それぞれの組織にマクロファージが供給される (38-40)。以上のように、哺乳動物におけるマクロファージの発生には一次造血と二次造血の二つの起源が存在しともに異なる起源細胞からマクロファージがつくられる。しかしながら、一次造血と二次造血から発生するマクロファージはともに、CSF-1 のシグナルを介して extracellular signal-regulated kinase 1/2 がリン酸化され、PU.1 および Irf8 が活性化されるという共通の分化プロセスを辿る (27, 28, 31-33)。そこで、ミクログリアと成体のマクロファージでは細胞起源が異なるが、成体のマクロファージの供給源である骨髄細胞中に存在する造血幹細胞がミクログリアの代替となる細胞ソースとして利用できる可能性を考えた。骨髄造血幹細胞はさらに、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いることや、骨髄バンクも整備されており、細胞の入手も可能であることから、ミクログリアの代替となる細胞ソースとして骨髄細胞が有用な細胞ソースになり得るのではないかと考えた。

そこで、第 1 章では、骨髄細胞からミクログリアの代替となる細胞への分化誘導を行った。さらに、骨髄細胞から分化誘導した細胞がミクログリアの代替となる細胞として利用可能な細胞であるのか、*in vitro* 系においてミクログリアに発現している表面抗原マーカーの発現解析や、貪食能および炎症性刺激に対するサイトカイン遺伝子の発現量の変化の解析を行

った。また、AD 患者のほとんどが高齢者であることから、自己の骨髄細胞を用いて治療を行うことができるのか評価するために、加齢したマウスから得た骨髄細胞を用いて、加齢に伴う骨髄由来細胞の増殖能、分化能や A $\beta$  貪食能についても解析した。



## 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 7-10 週齢、12 ヶ月齢、24 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。

### 1-2-2. 細胞培養

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）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 × 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 NH<sub>4</sub>Cl、1.0 mM KHCO<sub>3</sub>、0.1 mM Na<sub>2</sub>C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>、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、Billerica、MA）に通した。再度、300 × 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%ウシ胎児血清（fetal bovine serum；FBS：Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA）を加えた minimum essential medium-α（MEM-α；和光純薬、大阪）を基本培地とし、添加因子としてヒト CSF-1 製剤（Leukoprol®；協和発酵キリン、東京）の存在または非存在下において 37°C、5% CO<sub>2</sub> 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 × 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% CO<sub>2</sub> の環境下で、10%ウシ胎児血清、抗生物質（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）を含む Dulbecco's modified eagle medium（DMEM；Thermo Fisher Scientific）で培養した。2 週間後、コンフルエントに達した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回収した。

腹腔マクロファージは 10 週齢の C57BL/6 系マウスより調製した。マウスに 2% thioglycolate medium brewer modified（BD Biosciences）を腹腔内投与し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 × g、10 分間遠心分離を行い、腹腔マクロファージを回収し 10% FBS 含有 MEM-α で 37°C、5% CO<sub>2</sub> の環境下で培養した。

### 1-2-3. ギムザ染色

骨髓細胞および骨髓由来細胞においてギムザ染色を行った。それぞれの細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ L で PBS (-) 中に懸濁し、サイトスピン™ 4 集細胞遠心装置 (Thermo Fisher Scientific) を用いて  $15 \times g$ 、3 分間遠心することによりスライドガラス (松浪硝子、大阪) に細胞を張り付け固定し、メタノールで 2 分間固定した。ギムザ染色液 (和光純薬) と純水を 1 : 20 に希釈し、希釈したギムザ染色液で細胞を 10 分間染色した。流水で染色液を水洗したのち乾燥させ、生物顕微鏡 (BX50 ; Olympus、東京) により観察し、顕微鏡用デジタルカメラ (DP72 ; Olympus) を用いて写真撮影した。

### 1-2-4. 酸化鉄の貪食と A $\beta$ 貪食の解析

初代培養ミクログリア、骨髓由来細胞および腹腔マクロファージをそれぞれ  $3.0 \times 10^5$  cells/well で 24 穴プレートに播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の環境下で培養しプレートに細胞を接着させた後、10  $\mu\text{g/mL}$  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) を 12 時間処置し、その後、PBS (-) で 3 回洗浄した。その後、4% paraformaldehyde (PFA ; ナカライテスク、京都) 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を 2% potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate (ナカライ) および 2% 塩酸 (和光純薬) を等量混合した試薬を処置 (プルシアンブルー染色) し、倒立型顕微鏡 (IX70 ; Olympus) により観察して、写真撮影した。

A $\beta$  貪食能の解析は画像解析により行った。マウスとヒトでは A $\beta$  のアミノ酸配列が 3 残基異なっている (41) が、第二章で用いた AD モデルマウスはヒト型の APP 遺伝子が導入されたマウスであり、ヒト型の A $\beta$  を産生するため、本研究では *in vitro* 系においてもヒト A $\beta$  を使用した。 $3.0 \times 10^5$  cells/well で 24 穴プレートに播種したミクログリア、骨髓由来細胞および腹腔マクロファージに対して、1  $\mu\text{M}$  に調製した合成 human A $\beta$ 1-42 塩酸塩 (A $\beta$  ; AnaSpec、San Jose、CA) を 12 時間処置した。その後、免疫細胞化学的染色を行い、画像解析ソフト (WinRoof、三谷商事、福井) を用いて細胞内をエリア化し、それぞれの A $\beta$  免疫反応陽性領域の免疫活性を蛍光強度として半定量化して A $\beta$  量を測定した。

### 1-2-5. ELISA による A $\beta$ 貪食量の解析

10 週齢、12 ヶ月齢および 24 ヶ月齢のマウスから得た骨髓由来細胞、10 週齢のマウスから得た腹腔マクロファージを  $3.0 \times 10^5$  cells/well に調製して 24 穴プレートに播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の環境下で培養しプレートに細胞を接着させた後、A $\beta$  (1  $\mu\text{M}$ ) をそれぞれの細胞に 12 時間処置した。A $\beta$  処置 12 時間後にサンプルを回収した。サンプル回収は培養液を回収後、細胞を PBS (-) で 3 回洗浄し、0.1% Triton X-100 (ナカライ) 含有 PBS (-) 100  $\mu\text{L}$  を加えて細胞を溶解することにより回収した。得られたサンプルの細胞中の A $\beta$  量はヒト A $\beta$ 1-x enzyme

linked-immunosorbent assay (ELISA) キット（免疫生物研究所、群馬）を用い、付属のプロトコルに従い測定を行った。

#### 1-2-6. 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% PFA 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 ; 和光純薬)、ラット抗 CD11b 抗体 (1 : 1,000 ; Thermo Fisher Scientific)、ラット抗 Mac-2 抗体 (Galectine-3) (1 : 1,000 ; R&D Systems、McKinley)、ヒツジ抗 TREM2 抗体 (1 : 500 ; R&D Systems、Minneapolis、MN)、マウス抗 A $\beta$  モノクローナル抗体 (1 : 1,000 ; clone 82E1 ; 免疫生物研究所、群馬) を処置し、室温で over night 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 標識ヤギ抗マウス抗体、Alexa488 標識ヤギ抗ラット抗体、Alexa488 標識ヤギ抗ウサギ抗体 (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 33342 (1 : 10,000 ; 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、Jena) を用いて観察した。

#### 1-2-7. 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  $\mu$ L の PBS (-) に各細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/mL になるように調製し、1.5 mL チューブに回収した。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) を処置し 10 分間反応させブロッキングを行った。300  $\times$  g、5 分間の遠心分離を行って細胞を PBS (-) で 1 回洗浄後、以下の抗体と反応させた。抗 CD11b-fluorescein isothiocyanate (FITC) 抗体 (1 : 100 ; eBioscience)、抗 TREM2-allophycocyanin (APC) 抗体 (1 : 50 ; R&D Systems)、抗 CD45-FITC 抗体 (1 : 100 ; BD Biosciences)、ウサギ抗 Iba1 抗体 (1 : 100 ; 和光純薬)、ラット抗 Mac-2 抗体 (1 : 100 ; R&D Systems)、ウサギ抗 transmembrane protein 119 (Tmem119) 抗体 (1 : 100 ; abcam、Cambridge)、ウサギ抗 P2Y12R 抗体 (1 : 100 ; alomone labs、Jerusalem)、ビオチン化抗 F4/80 抗体 (1 : 1000 ; clone BM8 ; Biolegend、San Diego、CA) を処置し、20 分間、4°C で反応させた。300  $\times$  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 Alexa488 標識ヤギ抗ウサギ抗体、Alexa633 標識ヤギ抗ラット抗体 (1 : 500 ; Thermo Fisher Scientific)、APC 標識ストレプトアビジン (1 : 500、Biolegend) で 20 分間、4°C で反応させた。その後 300  $\times$  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 (Thermo Fisher Scientific) により染色し、細胞懸濁液を 70  $\mu$ m 径のナイロンメッシュに通した後、FACS Calibur (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 (BD Biosciences) により実施した。

#### 1-2-8. RT-qPCR 法によるサイトカイン遺伝子発現の解析

$3.0 \times 10^5$  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、腹腔マクロファージに lipopolysaccharide (LPS) (500 ng/mL, Sigma) もしくは interferon (IFN)  $\gamma$  (10 ng/mL、和光純薬) および interleukin (IL)  $-1\beta$  (10 ng/mL、和光純薬) を 4 時間処置した。その後、全 RNA を illustra RNAspin mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare、Amersham) を用いて抽出し、NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific、東京) を用いて定量した。各サンプルの RNA 量を 400 ng に揃え High Capacity Transcription Kit (Applied Biosystems、Foster、CA) と、Takara PCR Thermal Cycler MP (タカラバイオ、草津) 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 FastStart Essential DNA Probes Master (Roche、Basel)、Universal Probe Library Probe (Roche) を使用し、*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*Gapdh*)、*Il-1 $\beta$* 、*tumor necrosis factor* (*Tnf*)  $-\alpha$ 、*Il-6*、*transforming growth factor- $\beta$ 1* (*Tgf- $\beta$ 1*) 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* 遺伝子を内標準に用いて  $\Delta\Delta C_t$  法により各遺伝子の発現量を相対的に定量した。

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

<i>Gapdh</i>	NM_008084.2	Forward Reverse	5'-caatgaatacggctacagcaac-3' 5'-ttactccttgaggccatgt-3'
<i>Il-1<math>\beta</math></i>	NM_008361.4	Forward Reverse	5'-ttgacggaccccaaaagat-3' 5'-gatgtgctgctgcgagatt-3'
<i>Tnf-<math>\alpha</math></i>	NM_013693.3	Forward Reverse	5'-tcttctcattcctgcttggtg-3' 5'-gaggccatttggaacttct-3'
<i>Il-6</i>	NM_031168.2	Forward Reverse	5'-gctaccaaactggatataatcagga-3' 5'-ccaggtagctatggtactccagaa-3'
<i>Tgf-<math>\beta</math>1</i>	NM_011577.2	Forward Reverse	5'-caacatgtggaactctaccag-3' 5'-cagccactcaggcgtatca-3'

#### 1-2-9. 統計解析

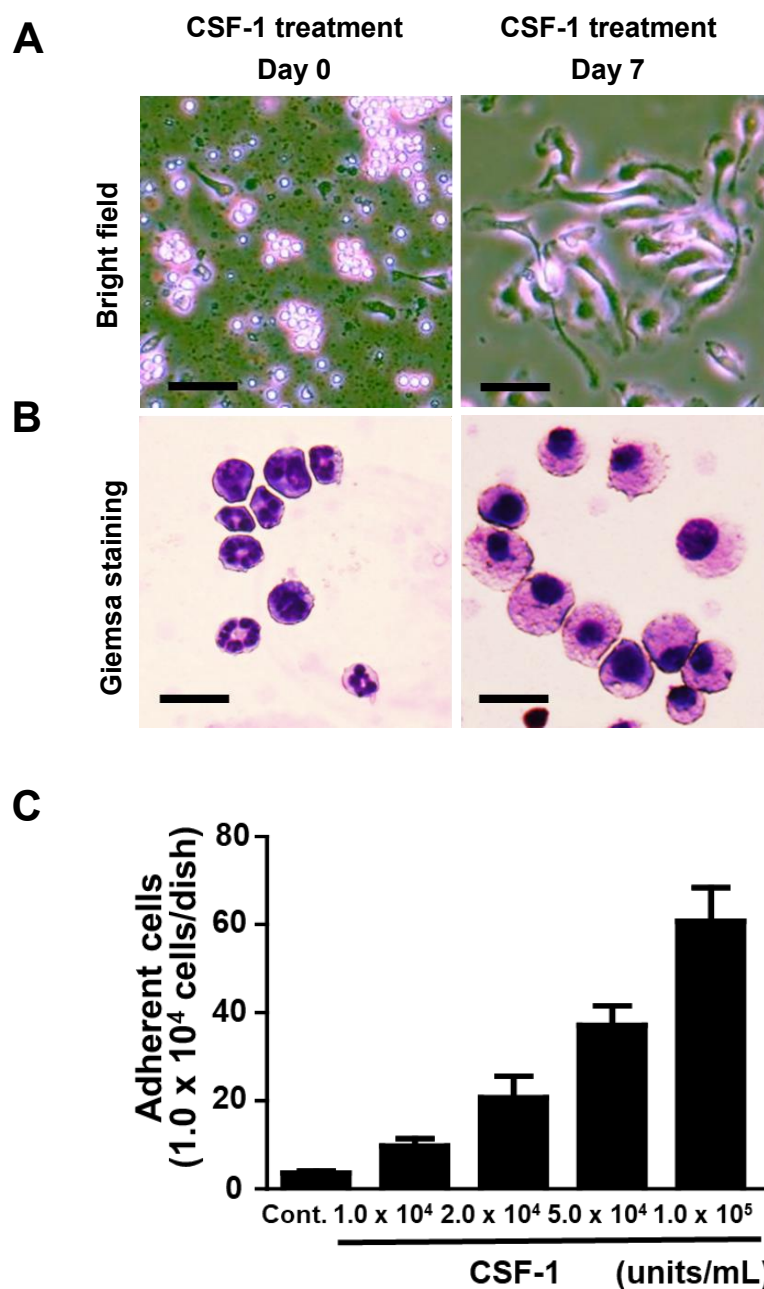
3 群以上の比較での統計学的解析は分散分析法 (analysis of variance ; ANOVA) を用い、検定には Bonferroni/Dunn の検定を用いた。統計解析ソフトは GraphPad Prism5 (エムデーエフ、東京) を使用した。得られた実験結果は、平均値±標準誤差 (standard error of the mean ; SEM) で表示した。危険率 5%以下を統計学的に有意差があると判定した。

### 1-3. 実験結果

#### 1-3-1. CSF-1 処置による骨髄細胞の形態変化と接着細胞数の変化

骨髄細胞に CSF-1 を処置することで分化誘導した細胞にどのような形態的な変化がみられるのか解析した。骨髄採取直後 (Day 0) ではディッシュに接着する細胞がほとんど観察されなかった (Fig. 1A)。CSF-1 処置後 7 日目においては、ロッド型の形態で接着する細胞が多数観察された。次に、ギムザ染色により、骨髄細胞における細胞のポピュレーションを観察した。その結果、Day 0 の骨髄細胞中には核が分葉した形態である好中球が多く観察され、核の形態が単核である単球は、ほとんど観察されなかったのに対し、CSF-1 処置後 7 日目においては、ほぼ単球の細胞となり純度よく単球のみの集団を得られることがわかった (Fig. 1B)。

さらに、 $0 \sim 1.0 \times 10^5$  units/mL の濃度の CSF-1 を 7 日間処置することにより分化誘導後の骨髄由来細胞の接着細胞数がどのように変化するか解析した。その結果、濃度依存的に骨髄由来細胞の接着細胞数の増加がみられ、接着細胞の数は  $1.0 \times 10^5$  units/mL の濃度の CSF-1 処置により最大となった (Fig. 1C)。この結果より、以降の実験では CSF-1 を  $1.0 \times 10^5$  units/mL の濃度で使用し、骨髄細胞の分化誘導に使用することとした。



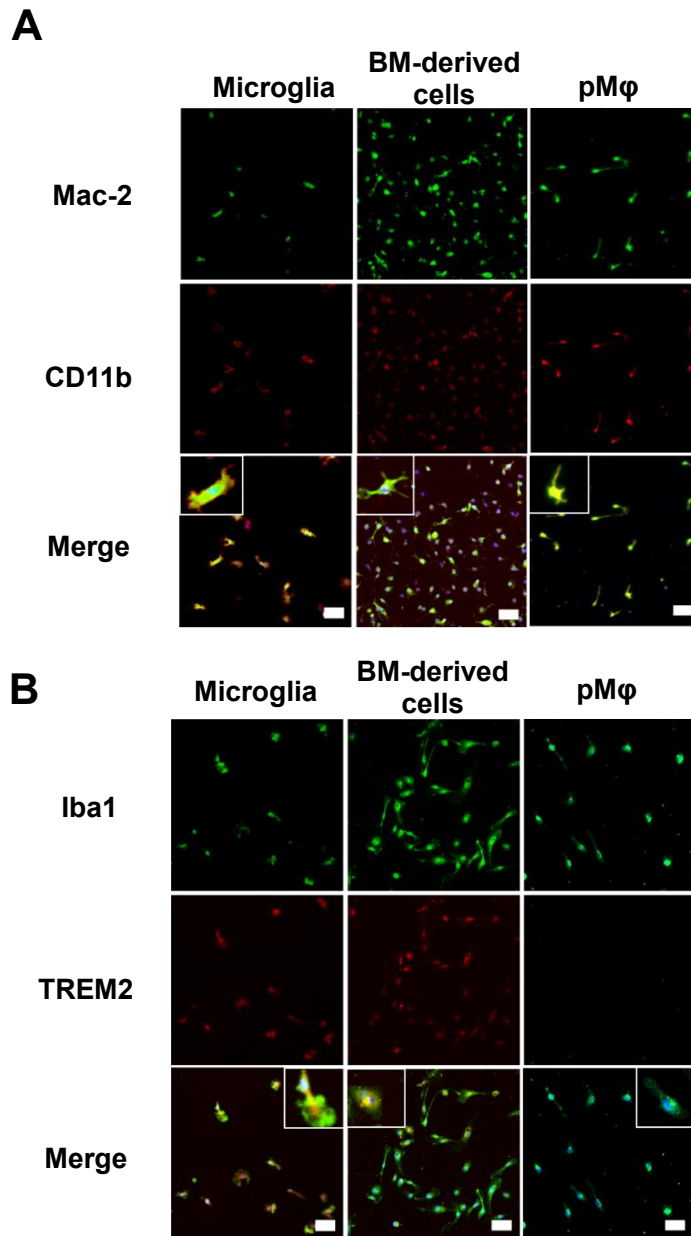
**Figure 1. BM-derived cells cultured with CSF-1.**

**A**, BM-derived cells were observed by a bright-field microscopy. Left and right panels show BM-derived cells after cultivation with CSF-1 for 0 and 7 days, respectively. Scale bars = 25  $\mu$ m. **B**, Morphological analysis of BM-derived cells was performed by Giemsa staining. Left and right panels show BM cells after cultivation with CSF-1 for 0 and 7 days, respectively. Scale bars = 25  $\mu$ m. **C**, Number of adherent cells that arose in cultures 7 days after stimulation with various concentrations of CSF-1. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 12 samples per group. BM; bone marrow. These figures are cited from Fig.1 in J. Alzheimers Dis., **2018**, 64, 563–585., and Fig. 1C is modified.

### 1-3-2. 骨髄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比較

次に、CSF-1 を処置し分化誘導した骨髄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の免疫細胞化学的染色により解析した。ミクログリアはマクロファージと表面抗原マーカーの発現が共通している。そこで、本解析ではミクログリアやマクロファージに発現している様々なミクログリア／マクロファージマーカーを用いて、初代培養ミクログリア、分化誘導した骨髄由来細胞、腹腔マクロファージにおけるそれらの発現を解析し比較した。その結果、各細胞において Mac-2、CD11b および Iba1 の発現が確認された (Fig. 2. A and B)。ミクログリアに比較的特異性の高い発現が知られる TREM2 (42) は、ミクログリアおよび骨髄由来細胞において高い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. 2B)。



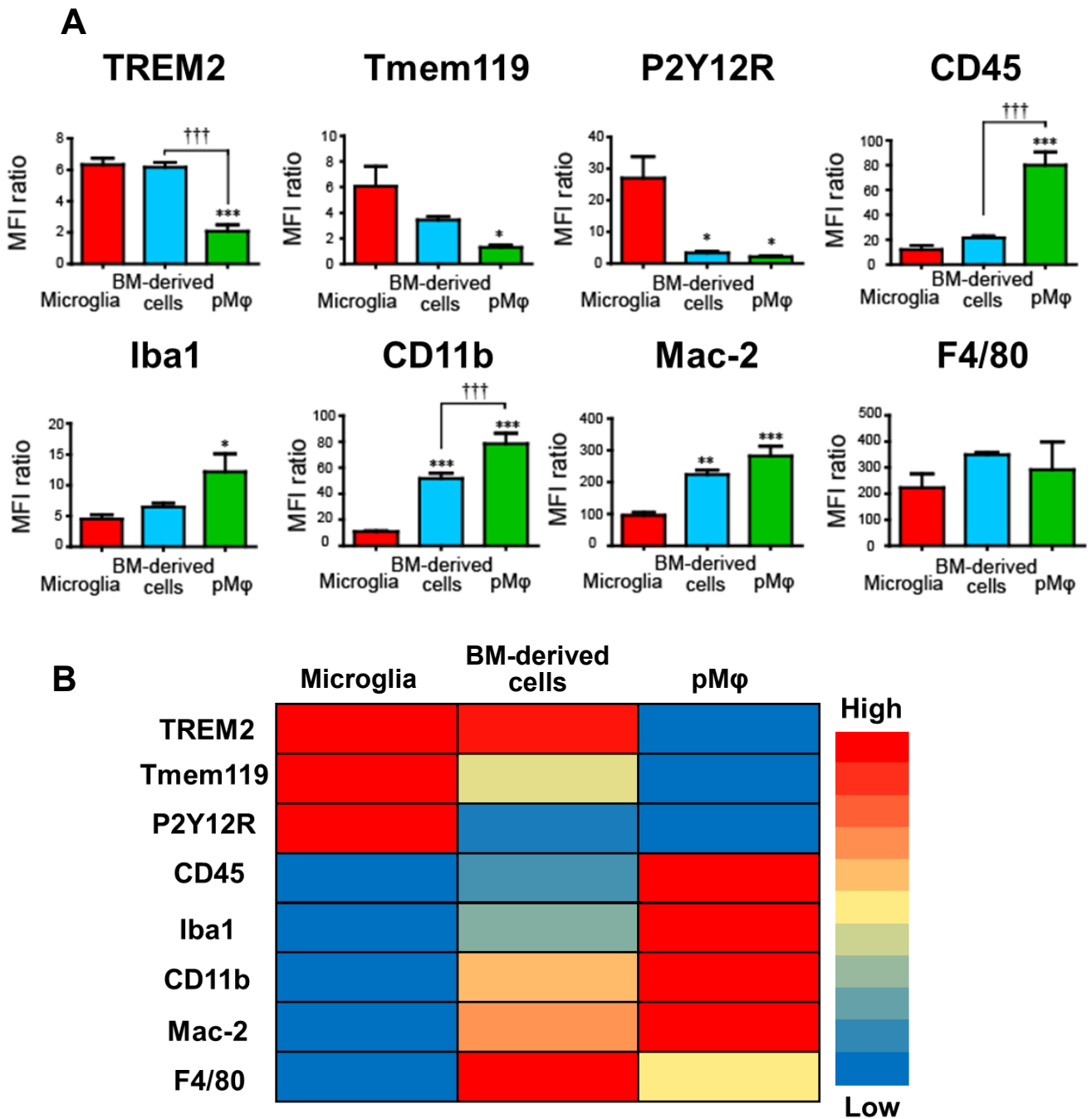


**Figure 2. Expressions of cell surface markers in primary-cultured mouse microglia, BM-derived cells, and pMφ.**

**A**, Expression of microglia/macrophage markers such as Mac-2 (green) and CD11b (red) were analyzed by a laser confocal microscopy in primary-cultured mouse microglia, BM-derived cells from 10-week-old mice, and pMφ from 10-week-old mice. Nuclei were counter-stained with Hoechst 33258 (blue). Scale bars = 50 μm. **B**, Expression of macrophage/microglia markers such as Iba1 (green) and TREM2 (red) were analyzed by a laser confocal microscopy in primary-cultured mouse microglia, BM-derived cells, and pMφ. Nuclei were counter-stained with Hoechst 33258 (blue). Scale bars = 50 μm. BM; bone marrow, pMφ; peritoneal macrophage. These figures are cited from Fig. 2 in *J. Alzheimers Dis.*, **2018**, 64, 563–585.

### 1-3-3. 骨髄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強度の解析

さらに他のミクログリア／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により比較した。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 比を用いてグラフを作製し、さらにその値からヒートマップを作製した。その結果、細胞染色の結果と同様に、骨髄由来細胞におけるミクログリアマーカーの発現が検出された (Fig. 3. A and B)。とくに、ミクログリアに特異的な指標として、TREM2 や Tmem119 (43) および P2Y12R (44) の発現量がミクログリアにおいて高いことが知られているが、骨髄由来細胞においても TREM2 や Tmem119 の発現が認められた。また、CD45 の発現量はマクロファージに比べ、ミクログリアにおいて低く保たれていることも知られている (45, 46)。骨髄由来細胞についても、CD45 の発現量が腹腔マクロファージと比べ、ミクログリアと同様に低かった。しかし、P2Y12R や CD11b、Mac-2 の発現量はミクログリアとは類似性はなかった。これらの結果から、骨髄由来細胞は、腹腔マクロファージに比べるとミクログリアに類似した細胞へ分化していることが示唆された。

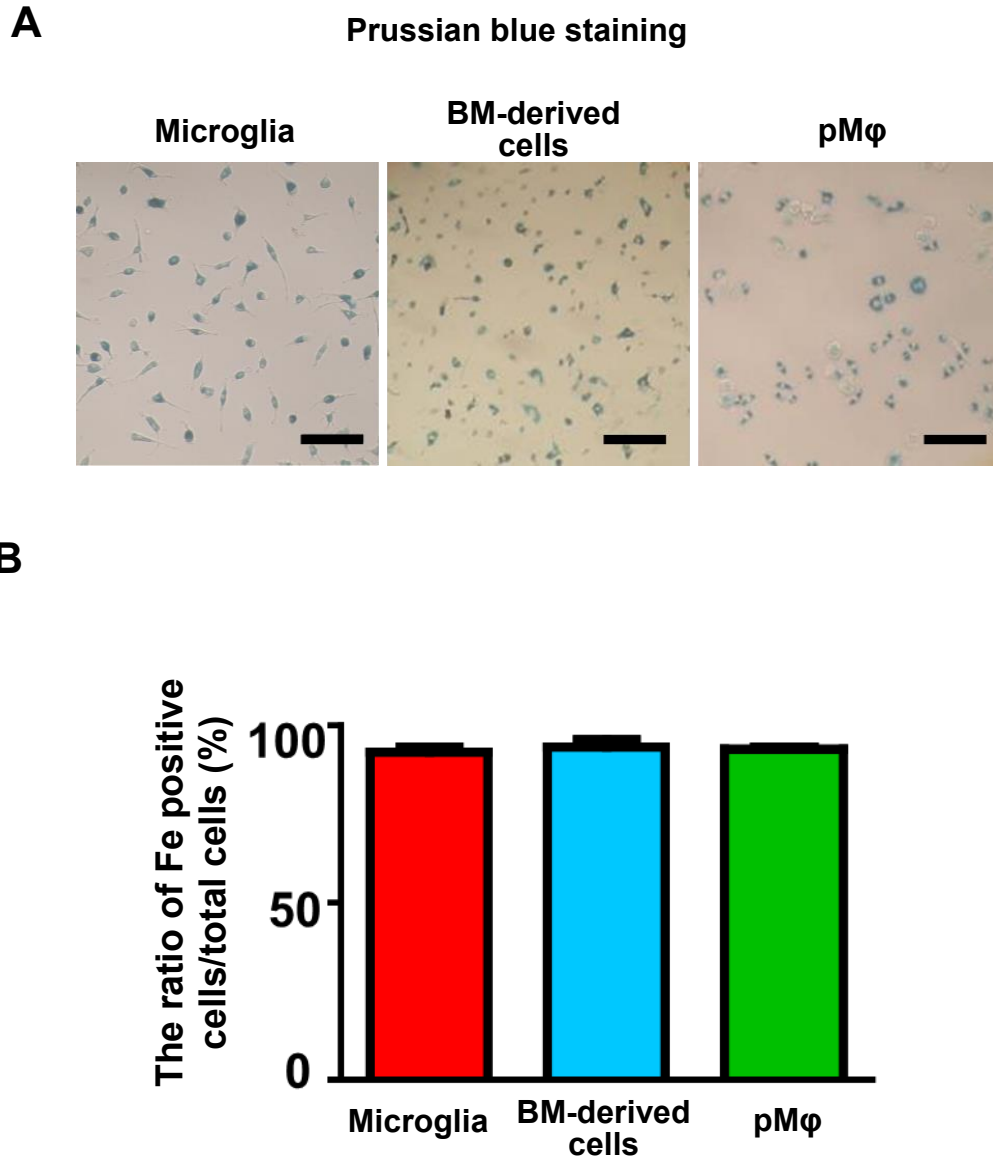


**Figure 3.** Flow cytometric analysis in primary-cultured mouse microglia, BM-derived cells, and pMφ.

**A and B,** Expressions of cell surface markers of TREM2, Tmem119, P2Y12R, CD45, Iba1, CD11b, Mac-2 and F4/80 on primary-cultured mouse microglia, BM-derived cells, and pMφ, respectively, were detected by a flow cytometry. An MFI ratio was calculated from the ratio of the levels in stained vs. unstained samples. The heat map indicates high expression (red) and low expression (blue) of each cell surface marker. BM; bone marrow, pMφ; peritoneal macrophage. These figures are cited from Fig. 2 in *J. Alzheimers Dis.*, **2018**, 64, 563–585.

#### 1-3-4. 骨髄由来細胞における酸化鉄貪食能の解析

分化誘導した骨髄由来細胞が貪食能を有しているのか評価するために、カルボキシデキストランで被覆された酸化鉄粒子 (Resovist®) や A $\beta$  を用いて、骨髄由来細胞の貪食能を評価した。各細胞に 10  $\mu\text{g/mL}$  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. 4A)。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 視野あたりの貪食細胞率 (貪食細胞数/総細胞数) を計算しグラフ化した (Fig. 4B)。各細胞において細胞内への鉄の取り込み、すなわち貪食能が確認された (Fig. 4A)。これらの細胞の鉄の貪食細胞率はそれぞれ、 $93.3\pm0.96\%$  : ミクログリア、 $94.5\pm1.88\%$  : 骨髄由来細胞、 $91.06\pm0.77\%$  : 腹腔マクロファージであった (Fig. 4B)。



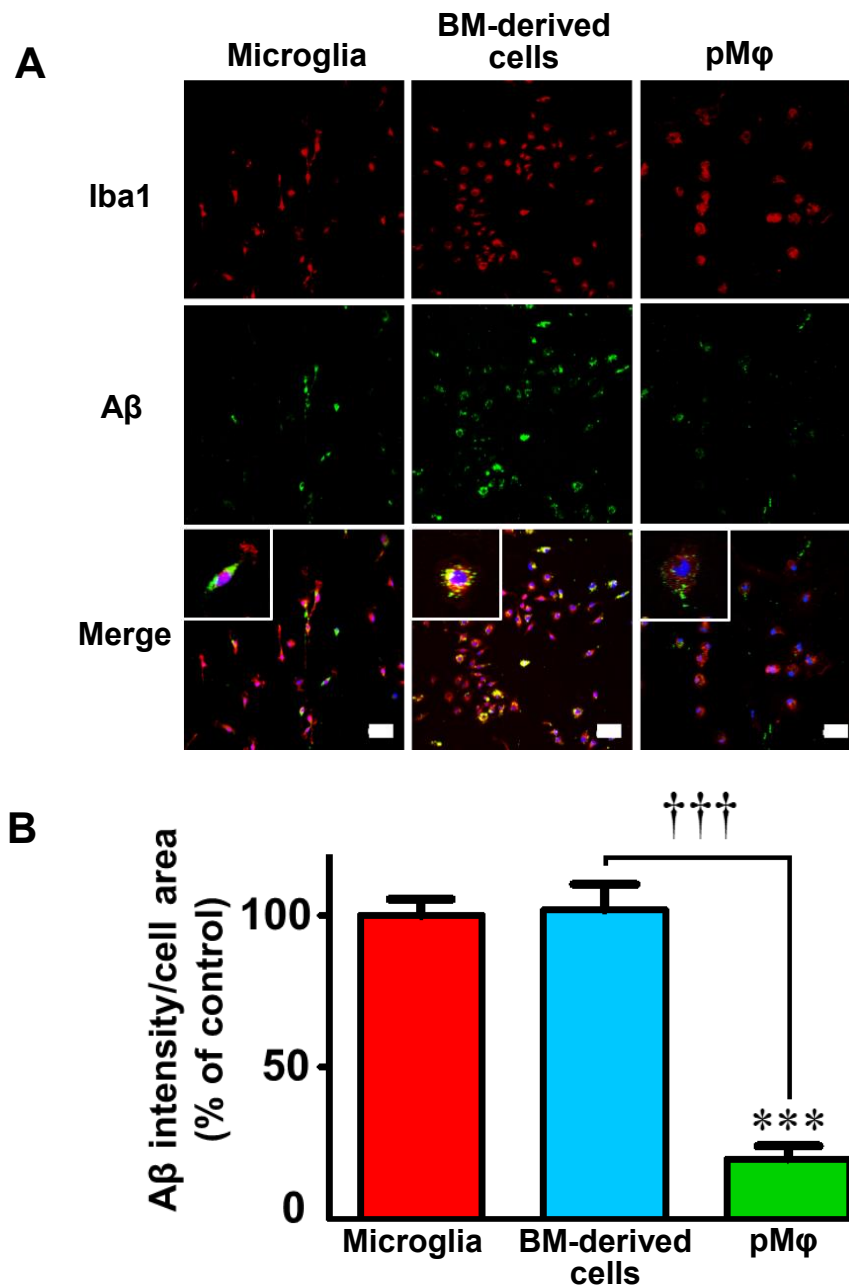
**Figure 4. BM-derived cells have phagocytosis ability of iron particles.**

**A**, Primary-cultured mouse microglia, BM-derived cells from 10-week-old mice, and pMφ from 10-week-old mice were treated with iron particles. The iron particles phagocytosed by cells were stained using the Prussian blue method. Scale bars = 50 μm. **B**, Graph shows the ratio of blue-colored phagocytic cells to total cells. Data represent means ± SEM of three images of fields per group. Statistical significance of differences among groups was determined by ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. BM; bone marrow, pMφ; peritoneal macrophage. These figures are cited from Fig. 3 in *J. Alzheimers Dis.*, **2018**, 64, 563–585.

#### 1-3-5. 骨髄由来細胞における A $\beta$ 貪食能の解析

次に、ミクログリア、CSF-1 を処置し分化誘導した骨髄細胞および腹腔マクロファージにおける A $\beta$  に対する貪食機能を解析した。各細胞に A $\beta$  (1  $\mu$ M) を 12 時間処置した後、細胞内に取り込まれた A $\beta$  を免疫細胞化学的解析により解析した。その結果、ミクログリアと骨髄由来細胞において A $\beta$  の取り込みが観察された (Fig. 5A)。また、1 視野における Iba1 陽性細胞領域あたりの A $\beta$  免疫反応陽性領域の蛍光強度を、画像解析ソフトにより定量し、グラフ化した (Fig. 5B)。その結果、ミクログリアおよび骨髄由来細胞は同程度の A $\beta$  量を貪食しており、腹腔マクロファージに比べ約 5.2 倍高い A $\beta$  貪食能を有していた (Fig. 5B)。

ここまでの結果より、骨髄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、分化誘導した骨髄由来細胞を骨髄由来ミクログリア様 (bone marrow-derived microglia-like; BMDML) 細胞と定義する。



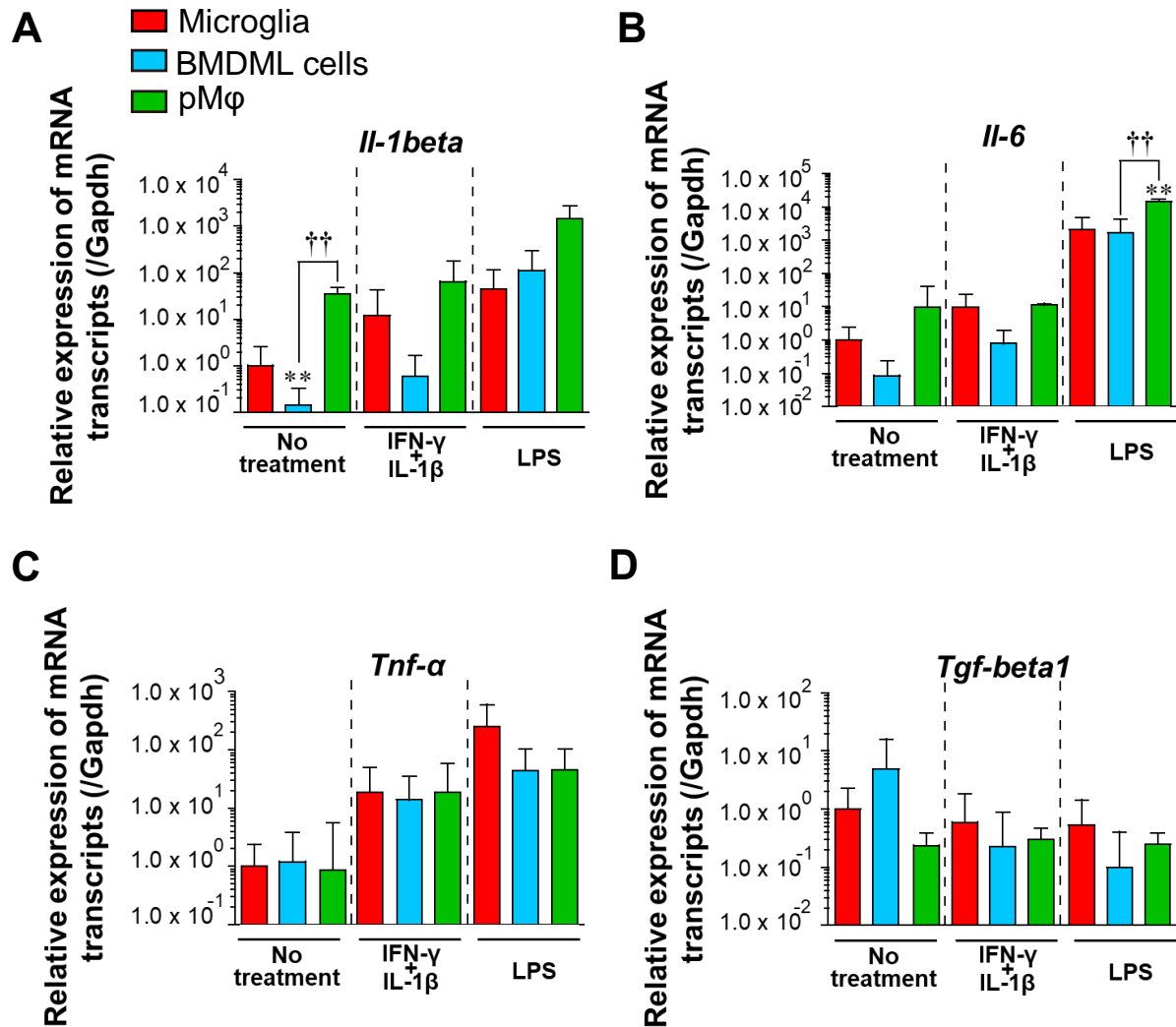
**Figure 5. BM-derived cells have phagocytosis ability of Aβ.**

**A**, Primary-cultured mouse microglia, BM-derived cells, and pMφ were treated with Aβ for 12 h. Cells were stained with anti-Iba1 antibody (red), anti-Aβ antibody (green), and Hoechst 33258 (blue). Scale bars = 50 μm. **B**, Intensities of Aβ immunoreactivities were measured using an image analysis software. The intensity of Aβ phagocytosed by microglia was set as control and indicated their averages as 100%. Data represent means ± SEM of three images of fields per group. Statistical significance of differences among groups was determined by ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. \*\*\*P < 0.001 vs. primary-cultured microglia. †††P < 0.001 vs. BM-derived cells. BM; bone marrow, pMφ; peritoneal macrophage. These figures are cited from Fig. 3 in *J. Alzheimers Dis.*, **2018**, 64, 563–585.

#### 1-3-6. BMDML 細胞におけるサイトカイン遺伝子の発現解析

AD 患者脳内では IL-1 $\beta$  や IFN- $\gamma$  の発現量が増加していることが報告されている (47-50)。また、ミクログリアには炎症型 (M1 型) と抗炎症型 (M2 型) の 2 つの表現型が存在すると考えられており、IL-1 $\beta$  や IFN- $\gamma$  などの炎症性の刺激により、M2 型のミクログリアの割合が減少し、ミクログリアが M1 型の表現型に変化することも知られている (51)。そこで、IL-1 $\beta$  と IFN- $\gamma$  の同時処置により AD 患者脳病態を模倣し、BMDML 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 $\beta$*  (Fig. 6A)、*Il-6* (Fig. 6B) および *Tnf- $\alpha$*  (Fig. 6C) ならびに抗炎症性サイトカインである *Tgf- $\beta$ 1* (Fig. 6D) の mRNA 発現を指標として RT-qPCR 法により解析した。またポジティブコントロールとして、細菌感染時に炎症反応を引き起こす物質である LPS を使用し、同様にサイトカインの mRNA 発現量を調べた。その結果、未処置群の BMDML 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、炎症性サイトカインである *Il-1 $\beta$*  および *Il-6* の mRNA 発現量が低く (Fig. 6. A and B)、抗炎症性サイトカインである *Tgf- $\beta$ 1* mRNA の発現は高いことがわかった (Fig. 6D)。さらに、IL-1 $\beta$  および IFN- $\gamma$  による刺激に対しては、BMDML 細胞の *Il-1 $\beta$*  や *Il-6* mRNA の発現上昇がミクログリアや腹腔マクロファージに比べ緩徐であった (Fig. 6. A and B)。これらのことから、BMDML 細胞は M2 様の表現型であり、炎症性サイトカインによる刺激に対しても、ほとんど M1 型に変化しないことが示唆された。一方、LPS による炎症刺激に対しては、BMDML 細胞はミクログリアと同様に *Il-1 $\beta$* 、*Il-6* および *Tnf- $\alpha$*  の mRNA の発現が増加し、炎症型免疫細胞としての機能を発揮できることが示唆された (Fig. 6. A-C)。



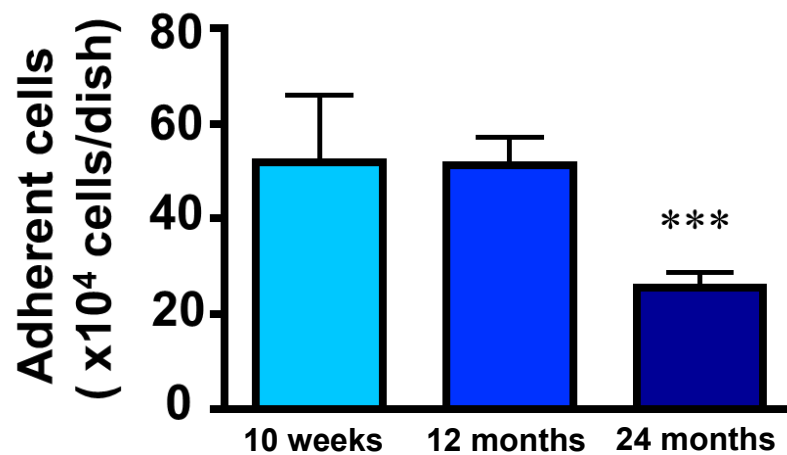


**Figure 6. mRNA expression levels of cytokines under pro-inflammatory and infectious conditions in primary-cultured mouse microglia, BMDML cells, and pMφ.**

**A-D**, mRNA levels of pro-inflammatory cytokines such as *Il-1β* (**A**), *Il-6* (**B**), and *Tnf-α* (**C**), and anti-inflammatory cytokine such as *Tgf-β1* (**D**) in primary-cultured mouse microglia (red), BMDML cells (blue), and pMφ (green) were determined by RT-qPCR. The mRNA expression level of no treatment is set as a control and indicated their averages as 1.0. Data represent means  $\pm$  SEM from three independent experiments. Statistical significance of differences among groups was determined by ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. \*\* $P < 0.01$  vs. primary-cultured microglia. †† $P < 0.01$  vs. BMDML cells. BMDML cells; bone marrow-derived microglia-like cells, pMφ; peritoneal macrophage. These figures are cited from Fig. 4 in J. Alzheimers Dis., **2018**, 64, 563–585.

#### 1-3-7. 加齢に伴う骨髓細胞から BMDML 細胞への分化能の変化の解析

AD 患者は高齢者に多いため、高齢 AD 患者が自己の骨髓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、加齢に伴う BMDML 細胞の分化能の変化の有無について解析した。生後 10 週齢、12 ヶ月齢および 24 ヶ月齢の骨髓細胞を  $5.0 \times 10^4$  cells/mL に調製し、 $1.0 \times 10^5$  units/mL の濃度の CSF-1 で 7 日間刺激することで分化誘導した。培養 7 日後に接着した BMDML 細胞の数を血球計算盤を用いて算出した。その結果、(Fig. 1C) と同様に 10 週齢のマウスの骨髓細胞から分化誘導した BMDML 細胞が初期濃度 5 万個/well から約 50 万個/well までの増加が認められた。一方、10 週齢の若齢マウスの骨髓細胞から分化誘導した BMDML 細胞に比べ、24 ヶ月齢のマウスから得た BMDML 細胞の接着細胞数は  $51 \pm 1.6\%$  まで低下していた。しかしながら、加齢したマウスから得られた骨髓細胞においても産生能が検出された (Fig. 7)。

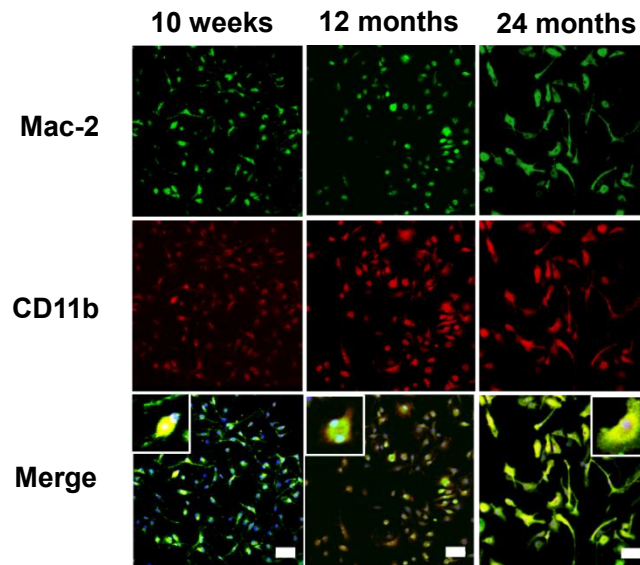
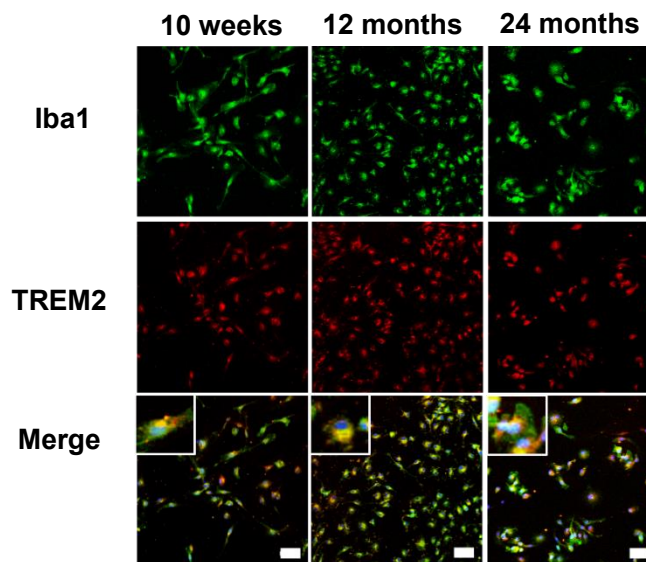


**Figure 7. Effect of host aging on the differentiation number of BMDML cells.**

BMDML cells from 10-week-old, 12-month-old, and 24-month-old mice were treated with CSF-1 for 7 days, and the adherent cells were counted. Data represent means  $\pm$  SEM from three independent experiments. Statistical significance of differences among groups was determined by ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. \*\*\* $P < 0.001$  vs. BMDML cells from 10-week-old mice. BMDML cells; bone marrow-derived microglia-like cells. These figures are cited from Fig. 5 in *J. Alzheimers Dis.*, **2018**, 64, 563–585.

#### 1-3-8. 加齢に伴う BMDML 細胞のミクログリア／マクロファージマーカー発現の比較

加齢によるミクログリア／マクロファージマーカーの発現変化について、免疫細胞化学的解析により解析した。生後 10 週齢、12 ヶ月齢および 24 ヶ月齢の骨髄細胞に CSF-1 を処置して分化誘導した若齢期から老齢期の BMDML 細胞を、ミクログリア／マクロファージマーカータンパク質を染色した。その結果、10 週齢の骨髄細胞から得られた BMDML 細胞と同様に、12 ヶ月齢や 24 ヶ月齢のマウスより得られた BMDML 細胞においても Mac-2、CD11b、Iba1 および TREM2 の発現が確認された (Fig. 8. A and B)。

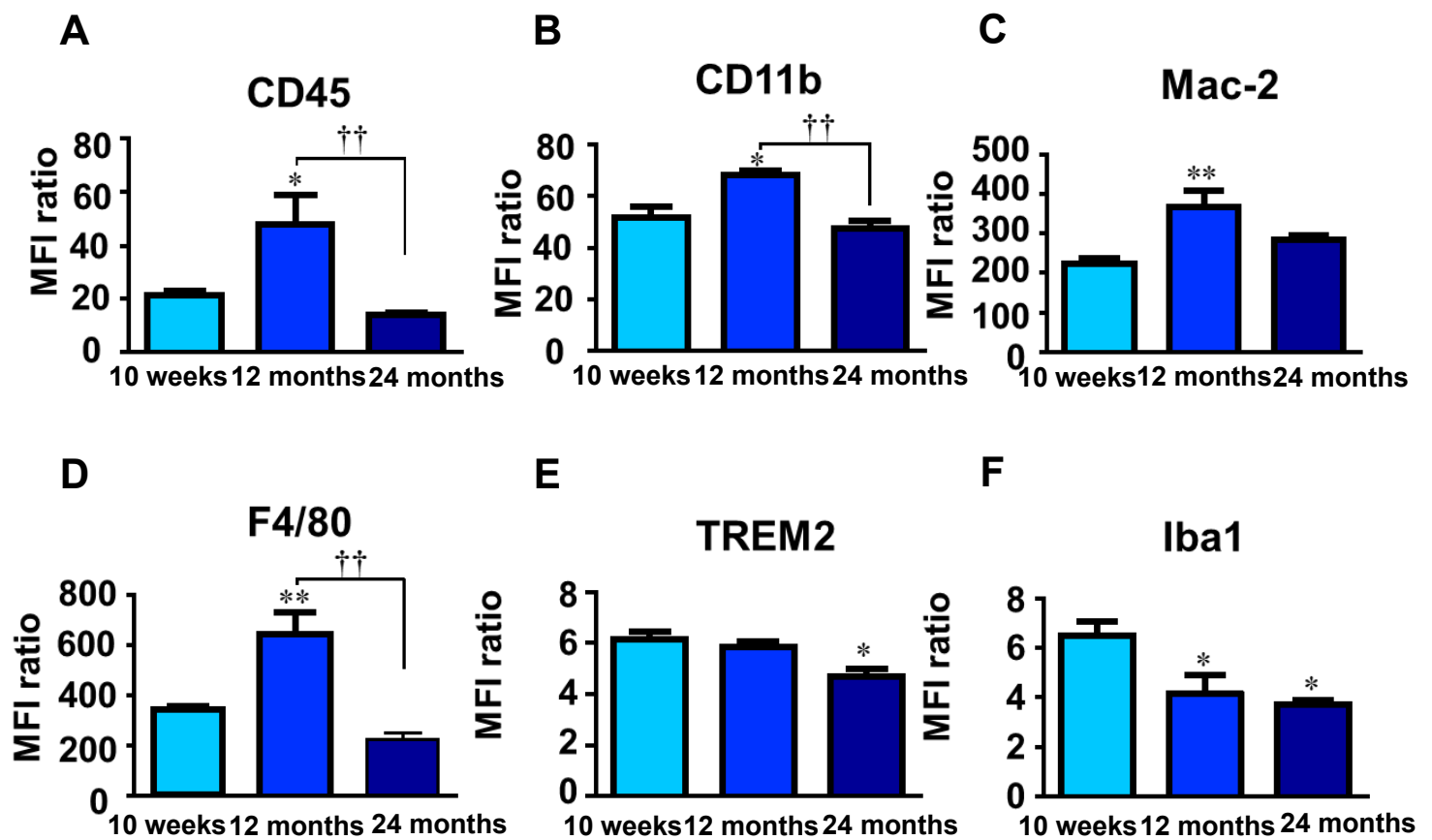
**A****B**

**Figure 8. Effect of host aging on the expression levels of macrophage/microglia markers of BMDML cells.**

**A**, BMDML cells from 10-week-old, 12-month-old, and 24-month-old mice were immunocytochemically analyzed with macrophage/microglia markers such as Mac-2 (green) and CD11b (red). Nuclei were counter-stained with Hoechst 33258 (blue). Scale bars = 50  $\mu$ m. **B**, BMDML cells were immunocytochemically analyzed with macrophage/microglia markers such as TREM2 (red) and Iba1 (green). Nuclei were counter-stained with Hoechst 33258 (blue). Scale bars = 50  $\mu$ m. BMDML cells; bone marrow-derived microglia-like cells. These figures are cited from Fig. 5 in *J. Alzheimers Dis.*, **2018**, 64, 563–585.

#### 1-3-9. 加齢に伴う BMDML 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強度の解析

さらに、フローサイトメトリーにより詳細にミクログリア／マクロファージマーカーの発現強度を解析した。その結果、10 週齢のマウスおよび 24 ヶ月齢のマウスから得た BMDML 細胞に比べ、12 ヶ月齢のマウスから得た BMDML 細胞において CD45、CD11b、Mac-2 および F4/80 の発現強度が高かった (Fig. 9. A-D)。10 週齢のマウスから得た骨髓細胞の場合と比較して TREM2 の発現強度は 12 ヶ月齢のマウスから得た BMDML 細胞でわずかに減少し、24 ヶ月齢のマウスから得た BMDML 細胞において有意に減少していた (Fig. 9E)。Iba1 の発現強度は、若齢の 10 週齢のマウスから得た BMDML 細胞に比べて、12 ヶ月齢、24 ヶ月齢のマウスから得た BMDML 細胞において減少していた (Fig. 9F)。



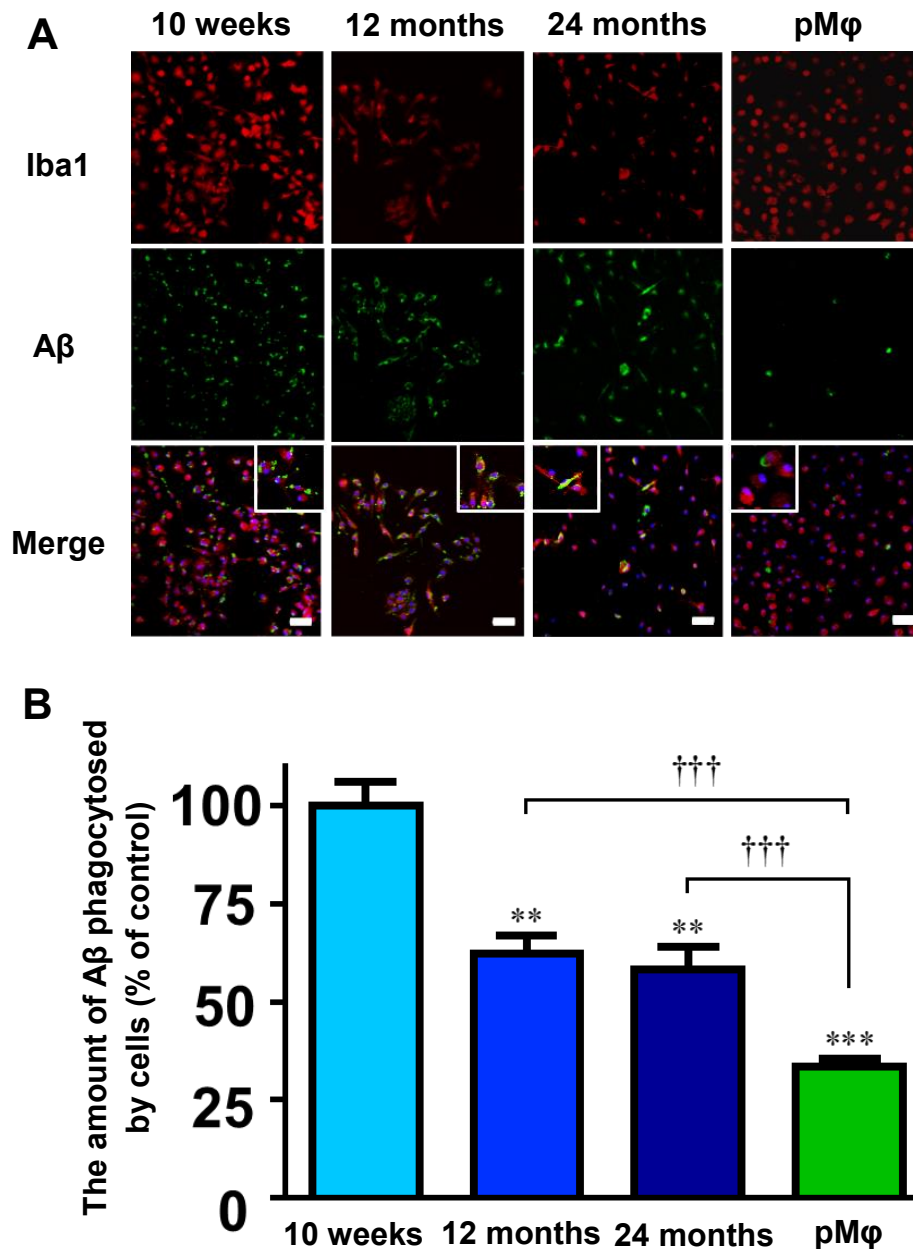
**Figure 9. Flow cytometric analysis in BMDML cells with host aging.**

A-F, Expressions of cell surface markers of CD45 (A), CD11b (B), Mac-2 (C), TREM2 (D), F4/80 (E), and Iba1 (F) on BMDML cells prepared from 10-week-old, 12-month-old, and 24-month-old mice. An MFI ratio was calculated from the ratio of the levels in stained vs. unstained samples. Data represent means  $\pm$  SEM from three independent experiments. Statistical significance of differences among groups was determined by ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. BMDML cells from 10-week-old mice, †† $P < 0.01$  vs. BMDML cells from 12-month-old mice. BMDML cells; bone marrow-derived microglia-like cells. These figures are cited from Fig. 5 in *J. Alzheimers Dis.*, **2018**, 64, 563–585.

#### 1-3-10. 加齢に伴う BMDML 細胞の A $\beta$ 貪食能の変化の解析

加齢に伴う BMDML 細胞の A $\beta$  貪食能の変化の解析のために、10 週齢、12 ヶ月齢および 24 ヶ月齢の骨髓細胞から分化誘導した BMDML 細胞ならびに 10 週齢のマウスから得た腹腔マクロファージにおける A $\beta$  に対する貪食能の解析を行った。各細胞に A $\beta$  (1  $\mu$ M) を 12 時間処置した後、抗 Iba1 抗体と抗 A $\beta$  抗体で免疫細胞化学的手法により染色した (Fig. 10A)。さらに、A $\beta$  貪食量を ELISA 法により定量した (Fig. 10B)。その結果、12 ヶ月齢および 24 ヶ月齢の加齢したマウスの骨髓細胞から分化誘導した細胞は 10 週齢の骨髓細胞から分化誘導した細胞に比べ、A $\beta$  の貪食能は  $58 \pm 5.7\%$  と低かったものの、10 週齢の若いマウスから調製した腹腔マクロファージよりも約 1.7 倍高い A $\beta$  貪食能を有していることが明らかとなった。





**Figure 10. Aβ phagocytosis ability of BMDML cells declines with aging but has higher than that of pMφ prepared from young mice.**

**A**, BMDML cells prepared from 10-week-old, 12-month-old, and 24-month-old mice and pMφ prepared from 7-week-old mice were treated with Aβ for 12 h, and then stained with anti-Iba1 antibody (red), anti-Aβ antibody (green), and Hoechst 33258 (blue). Scale bars = 50 μm. **B**, Amounts of Aβ phagocytosed by cells were measured by ELISA. The amount of Aβ phagocytosed by BMDML cells from 10-week-old mice is set as control and indicated their averages as 100%. Data represent means ± SEM from three independent experiments. \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs. BMDML cells from 10-week-old mice. †††P < 0.001 vs. pMφ. BMDML cells; bone marrow-derived microglia-like cells, pMφ; peritoneal macrophage. These figures are cited from Fig. 6 in *J. Alzheimers Dis.*, **2018**, 64, 563–585.

#### 1-4. 考察

本章では、骨髄細胞から分化誘導した細胞がミクログリアの代替となる細胞として利用可能な細胞であるのか、*in vitro* 系において分化誘導した細胞の機能評価を行った。その結果、CSF-1 の処置により、効率的に骨髄細胞から A $\beta$  貪食能を有したミクログリア様の細胞へ分化誘導することができた。成体の造血系において、CSF-1 は 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 (31, 32)。一方、ミクログリアは胎生初期の卵黄嚢で原始マクロファージとして発生し (21-25, 52)、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 (28)。これらの報告から、ミクログリアと骨髄由来マクロファージは、発生の起源の細胞は異なるが、その分化プロセスは同様のシグナル経路により同じ転写因子を介して分化することがわかる。また、CSF-1 の処置により分化誘導した BMDML 細胞は TREM2、F4/80、CD45 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 (43) の発現も認められた。特に、BMDML 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ことは興味深い。TREM2 はミクログリアに特異性の高いマーカーの一つであり、ミクログリアの貪食能や炎症反応を制御している分子であることが報告されている (42)。また、TREM2 の R47H 変異による TREM2 の機能欠損は強力な AD のリスクファクターとなることが報告されており (14, 15)、TREM2 は、ミクログリアにおいて A $\beta$  や死細胞で細胞外に露出するホスファチジルセリンなどを認識するセンサーとして働くことが示唆されている (53)。さらに、TREM2 欠損 AD モデルマウスを用いた実験で、TREM2 の機能不全により、ミクログリアが A $\beta$  へ集積する数や A $\beta$  の貪食量が減少することも報告されている (54-56)。これらのことから TREM2 が A $\beta$  貪食に関わる分子の一つであると推察される。今回の解析で認められた BMDML 細胞のミクログリアと同等の A $\beta$  に対する貪食機能も、TREM2 の発現強度がミクログリアと BMDML 細胞で同程度であったことに起因すると考えられる。

ミクログリアは脳内の環境に応じて、炎症型である M1 型と抗炎症型である M2 型に大別され、機能的に異なる表現型に変化することが示唆されている (51)。M1 型は炎症性サイトカインや活性酸素種を放出することにより炎症を惹起するが、M2 型は TGF- $\beta$ 1 の作用により組織修復や抗炎症に働くと考えられている (51, 57)。本解析において、炎症性刺激未処置群でのサイトカイン遺伝子の発現は、ミクログリアや腹腔マクロファージに比べ BMDML 細胞において、炎症性サイトカインである *Il-1 $\beta$*  および *Il-6* の mRNA 発現量が低く、抗炎症性サイトカインである *Tgf- $\beta$ 1* が高かった。このことから、BMDML 細胞は抗炎症型である M2 型に近い細胞であることが示唆された。さらに、AD 患者脳内や AD 患者脳脊髄液中で発現量が亢進している IL-1 $\beta$  や IFN- $\gamma$  (47-50) の同時処置により、AD 患者病態を模倣し、BMDML

細胞の炎症性刺激に対する応答性を解析した結果、BMDML 細胞の *Il-1 $\beta$*  や *Il-6* mRNA の発現上昇がミクログリアや腹腔マクロファージに比べ緩徐である傾向がみられた。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 $\beta$* 、*Il-6* および *Tnf- $\alpha$*  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 BMDML 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炎症型免疫細胞としての機能を発揮することができるが、AD 病態下の環境に移植してもすぐに炎症型である M1 型の細胞へ変化する可能性は低いと考えられる。

ヒトにおいて、加齢に伴いミクログリアの形態に異常が生じること (58) や、加齢したマウスから調製したマウス初代培養ミクログリアの貪食能が低下することが報告されている (59-62)。すなわち、加齢に伴い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、骨髄細胞の分化能や BMDML 細胞の A $\beta$  貪食能に対する加齢の影響を評価するために、若齢マウスや加齢したマウスから得られた骨髄細胞を CSF-1 処置により分化誘導し、加齢に伴う骨髄細胞の機能変化について解析した。その結果、加齢に伴い骨髄細胞の増殖能の低下などの機能低下が示された。しかしながら、A $\beta$  貪食能については、若齢マウスより調製した腹腔マクロファージに比べて高い貪食能を有しており、加齢したマウス由来の骨髄由来細胞においても A $\beta$  に対する貪食能が維持されていた。このことから、高齢 AD 患者の自己の骨髄細胞でも移植療法に利用できる可能性が示唆される。しかしながら、加齢に伴い機能が低下することを鑑みて、高齢者の自己骨髄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 $\beta$  貪食能を促進することが報告されている (63, 64)。骨髄由来細胞においてもニコチン受容体が発現している (65) ことから、BMDML 細胞においてもニコチン受容体を介した細胞機能の賦活化ができる可能性がある。

さらに近年、マウス脳組織培養系での研究で、加齢により貪食能が低下したミクログリアに新生仔マウス脳から調製したミクログリアの培養上清を添加することで、低下した貪食能が回復し、加齢したマウスから調製したミクログリアの機能を賦活化できることが報告されている (66)。このことから、若い骨髄細胞から分化誘導した BMDML 細胞による液性因子が脳内のミクログリアの機能を回復させることで内在性のミクログリアの機能をも賦活化できる可能性が考えられる。例えば、TGF- $\beta$ 1 はミクログリアの A $\beta$  貪食を促進することが報告されている (67, 68) が、本研究においても、BMDML 細胞での *Tgf- $\beta$ 1* mRNA の発現量が比較的高かったことから、BMDML 細胞から放出される TGF- $\beta$ 1 による内在性ミクログリアの貪食能亢進作用や脳内炎症を抑える抗炎症作用が期待できるものと考えられる。TGF- $\beta$ 1 以外にも IL-4 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を賦活化できることが報告されており (69)、BMDML 細胞から分泌される液性因子による内在性ミクログリアへの影響も今後解析する必要があると考えられる。

## 第2章

### AD モデルマウス海馬内へのミクログリア様細胞の移植および移植効果の解析

#### 2-1. 緒言

ミクログリアは正常脳では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 (70, 71)、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 (11, 72-75)。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 (76, 77)。このように、ミクログリアは環境に応じてダイナミックに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、ミクログリアが TREM2 を介して A $\beta$  を認識し、A $\beta$  へ遊走することで集積し A $\beta$  貪食除去に働くことが報告されており (53-56, 78)、細胞の遊走能と脳内 A $\beta$  除去能は、ミクログリアとして重要な機能である。これまでに、骨髄由来細胞の脳内への移植 (79) や末梢から脳内への骨髄由来細胞や単球の動員による脳内 A $\beta$  除去 (80-85) についてはいくつかの報告があるが、移植細胞の脳内での遊走や A $\beta$  への指向性に着目した研究は行われていない。

第1章では、骨髄細胞を CSF-1 で7日間刺激することでミクログリアと類似した表面抗原マーカーの発現パターンを有したミクログリア様の細胞へ分化誘導でき、分化誘導した細胞は A $\beta$  貪食能を有することを明らかにした。本章では、第1章で作製したミクログリア様細胞が脳内に移植した後に生着し、脳内においても A $\beta$  を貪食することができるのかを明らかにするため、野生型マウスと AD モデルである APdE9 マウス海馬内に BMDML 細胞を移植し、免疫組織化学的染色法により解析した。また、移植した細胞の脳内動態を明らかにすることを目的に以下の実験を行った。まず、野生型マウス脳内と AD モデルマウス脳内における移植細胞の移動度を比較した。次に、数理モデルを用いたシミュレーション解析により、移植細胞の A $\beta$  プラークへの指向性をもつ遊走能および移植細胞による A $\beta$  病態への影響について精査した。最後に、新規物体認識試験により、移植細胞による認知機能障害改善効果についても検討を行った。

## 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。骨髄採取には C57BL/6 マウス (12 ヶ月齢、清水実験材料) および enhanced green fluorescent protein (EGFP) 遺伝子導入マウス (7 週齢 ; Jackson Lab., Bar Harbor, ME) (86) を使用した。また AD モデルマウスとして APdE9 マウス (12 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 (87)。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)。なお、本研究の動物実験は京都薬科大学動物実験委員会ならびに遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得ており、「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

生後 7 週齢の EGFP マウスの大腿骨および脛骨より GFP 陽性骨髄細胞を採取した。細胞培養は第 1 章と同様の方法で行い、骨髄細胞を CSF-1 で刺激し 7 日間培養することで分化誘導した。

### 2-2-3. 海馬マイクロインジェクションによる BMDML 細胞の移植

マウスに三種混合麻酔 (塩酸メデトミジン : 0.3 mg/kg (共立製薬、東京)、ミダゾラム : 4 mg/kg (アステラス製薬、東京)、酒石酸塩ブトルファール : 5 mg/kg (Meiji Seika ファルマ、東京)) 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 BMDML 細胞を  $2.0 \times 10^5$  cells/2  $\mu$ L PBS (-) となるように調製し、脳定位固定装置 (Stoelting, Chicago, IL) を用いてレシピエント APdE9 マウスおよび 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, Nevada) を用いて移植した。移植後 1 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. マウスの脳摘出および薄切切片の作製

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、流速 5 mL/分で 5 分間 4% PFA 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 2 日間浸潤固定を行った。その後、15% 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) を用いて凍結包埋し、クライオスタット (Leica Instruments、Nussloch) を用いて厚さ 20  $\mu$ 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。

#### 2-2-5. 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。脳の組織切片をスライドガラス (松浪硝子) に貼り付けた後、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、一次抗体として抗 GFP 抗体 (1 : 1,000 ; 医学生物研究所) およびマウス抗 A $\beta$  抗体 (1,000 倍希釈 ; 免疫生物研究所) およびヒツジ抗 TREM-2 抗体 (1 : 1,000 ; R&D Systems)、ウサギ抗 Iba1 抗体 (1 : 1,000 ; 和光純薬) を 4°C、overnight で反応させた。蛍光染色には Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体、Alexa Fluor 546 標識抗マウス IgG 抗体、Alexa Fluor 546 標識ヒツジ抗 IgG 抗体および Alexa546 標識抗ウサギ Ig G 抗体 (1 : 500 ; Thermo Fisher Scientific) を用いて室温・遮光で 2 時間反応させた。核染色には、Hoechst 33342 (1 : 5,000 ; Thermo Fisher Scientific) 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。

#### 2-2-6. 画像解析による A $\beta$ プラーク数および A $\beta$ 面積の定量と移植細胞間距離の解析

細胞移植による A $\beta$  病態への影響および移植細胞の脳内動態を画像解析により解析した。半径 30  $\mu$ m 以上の A $\beta$  プラークの数と A $\beta$  免疫反応陽性領域の面積を Image J (ver. 1.50i ; National Institute of Health ; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) (88) により計測し、定量化した。移植細胞の脳内動態を明らかにするために、最近隣距離法を用いて細胞間距離を測定した。GFP 陽性細胞移植後 0、7 および 14 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 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。その細胞間距離から、縦軸を頻度、横軸を各細胞間の距離として、ヒストグラムを作成した。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。

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

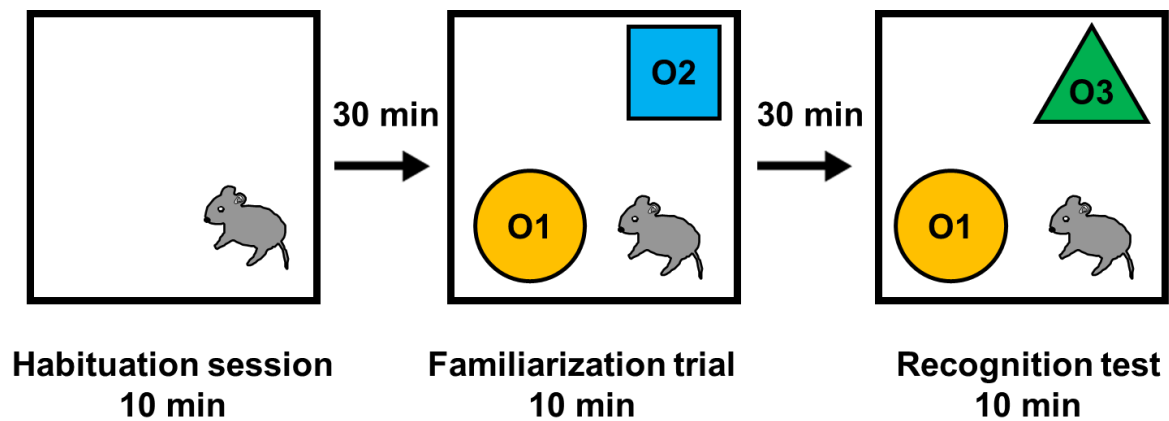
#### 2-2-7. シミュレーション解析

移植細胞の A $\beta$  への指向性を数理モデルであるモンテカルロシミュレーション (89) によりシミュレートし、移植細胞が半径 30  $\mu\text{m}$  の A $\beta$  と共局在する確率を計算した。数理モデルのパラメータとして、画像解析により得られた移植後 7 および 14 日目の海馬領域  $447 \times 447 \mu\text{m}^2$  の範囲に存在する GFP 陽性移植細胞の数と A $\beta$  プラークの実測値を使用した。海馬領域を仮定した  $447 \times 447 \mu\text{m}^2$  の範囲内で実測値と同じ数の移植細胞および A $\beta$  プラークをランダムに配置させ、A $\beta$  プラーク半径 30  $\mu\text{m}$  範囲内に移植細胞が入る確率を数理モデルにより 1000 回繰り返して計算した。計算により得られたランダムに移植細胞と A $\beta$  が共局在する確率と、実際に海馬領域内で移植細胞と A $\beta$  が共局在する確率を比較し、移植細胞の A $\beta$  への指向性を解析した。モンテカルロシミュレーションの計算には、R software (<http://www.r-project.org>) (90) を使用した。

#### 2-2-8. 新規物体認識試験

移植細胞による認知機能障害改善効果を新規物体認識試験により解析した (Fig. 11)。本試験では、20 lx の照明下でオープンフィールド (縦×横×高さ、 $40 \times 40 \times 30$ ) を用いて行った。行動解析には EthoVision XT 11.5 (Noldus Information Technology, Leesburg, VA) 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. 11)。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 分間、間隔をあけ 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 11. The schema of novel object recognition test.**

The novel object recognition test was conducted to evaluate the cognitive function in wild-type mice and APdE9 mice before and after the intrahippocampal injection. The wild-type mice and APdE9 mice were hippocampally injected with PBS and BMDML 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. This figure is cited from Fig. 9 in *J. Alzheimers Dis.*, **2018**, 64, 563–585.



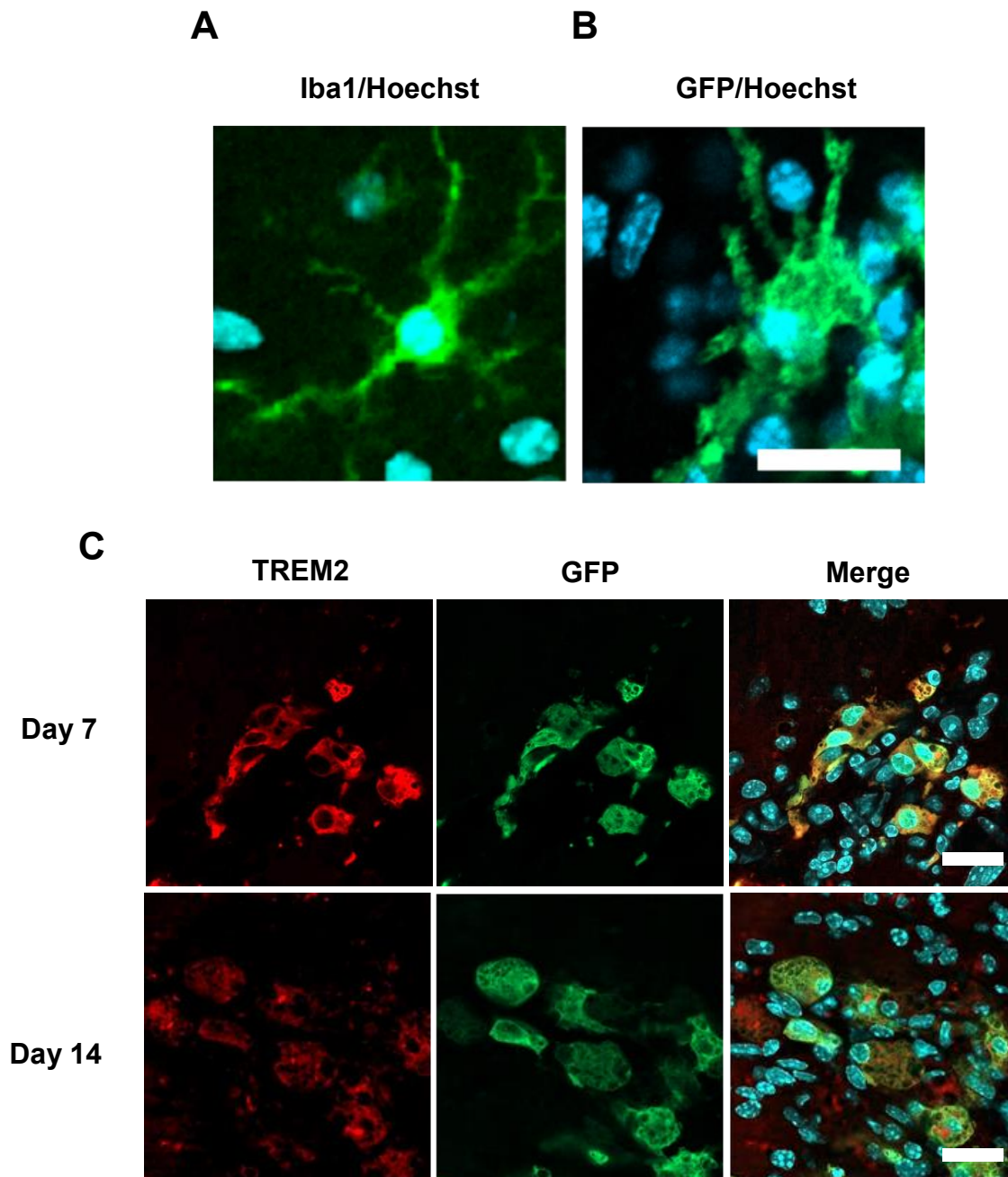
#### 2-2-9. 統計解析

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 の t 検定を 2 群間の中央値の比較には Mann-Whitney の U 検定を用いた。得られた実験結果は、平均値±標準誤差（SEM）で表示した。危険率 5%以下を統計学的に有意差があると判定した。

## 2-3. 実験結果

### 2-3-1. BMDML 細胞の脳への生着

EGFP マウス由来骨髄細胞より作製した骨髄由来細胞を、脳定位固定装置を用いて APdE9 雄性（12 ヶ月齢）および野生型 C57BL/6 雄性マウス（12 ヶ月齢）の海馬内へ移植した。その結果、定常型のミクログリア（Fig. 12A）と同様にラミファイド型を呈する移植細胞が観察された（Fig. 12B）。また、海馬内に移植した BMDML 細胞がマウス脳内でミクログリア様細胞として生着しているのかを調べるため、ミクログリアに比較的、特異的な細胞表面マーカーである TREM2 を用いて免疫組織化学的に解析した。その結果、細胞投与 7 および 14 日後いずれの脳組織切片においても移植した GFP 陽性の BMDML 細胞が TREM2 陽性であることが確認された（Fig. 12C）。このことから、移植細胞はマウス脳内においてミクログリア様細胞として生着していることが明らかとなった。

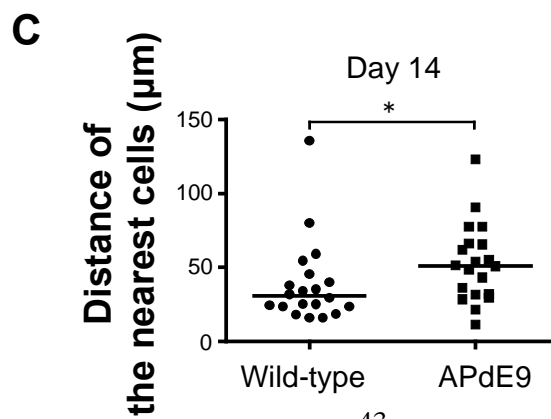
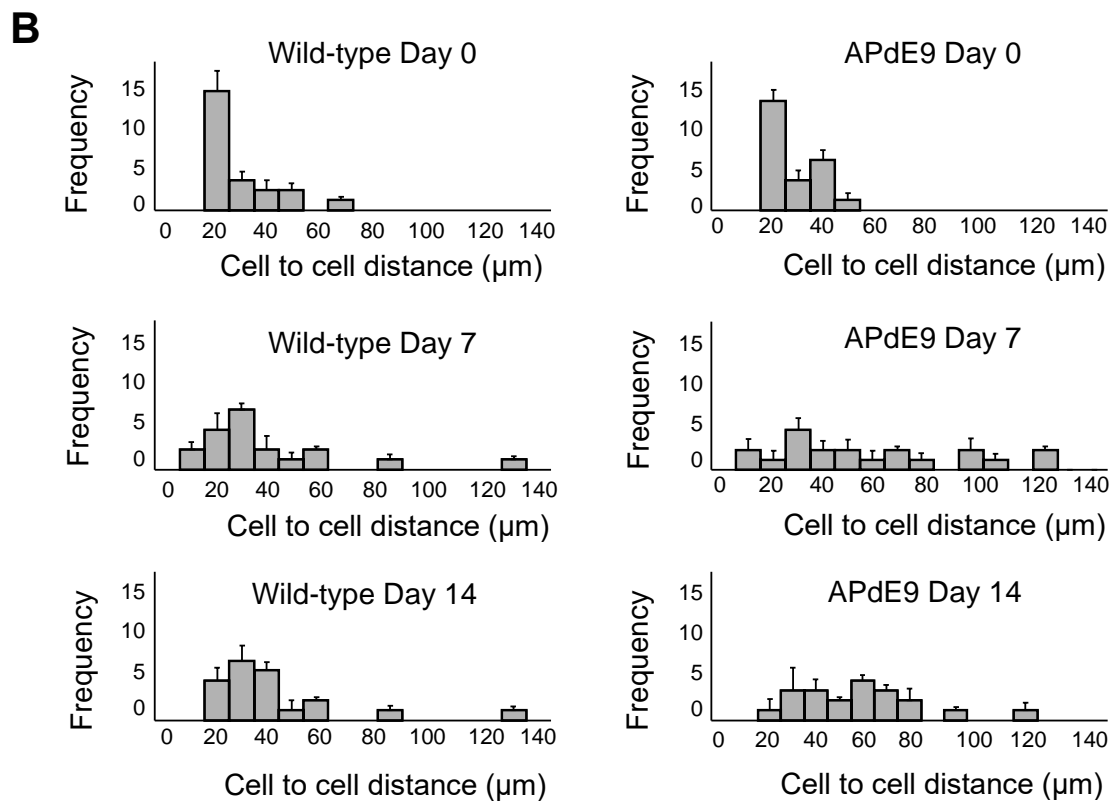
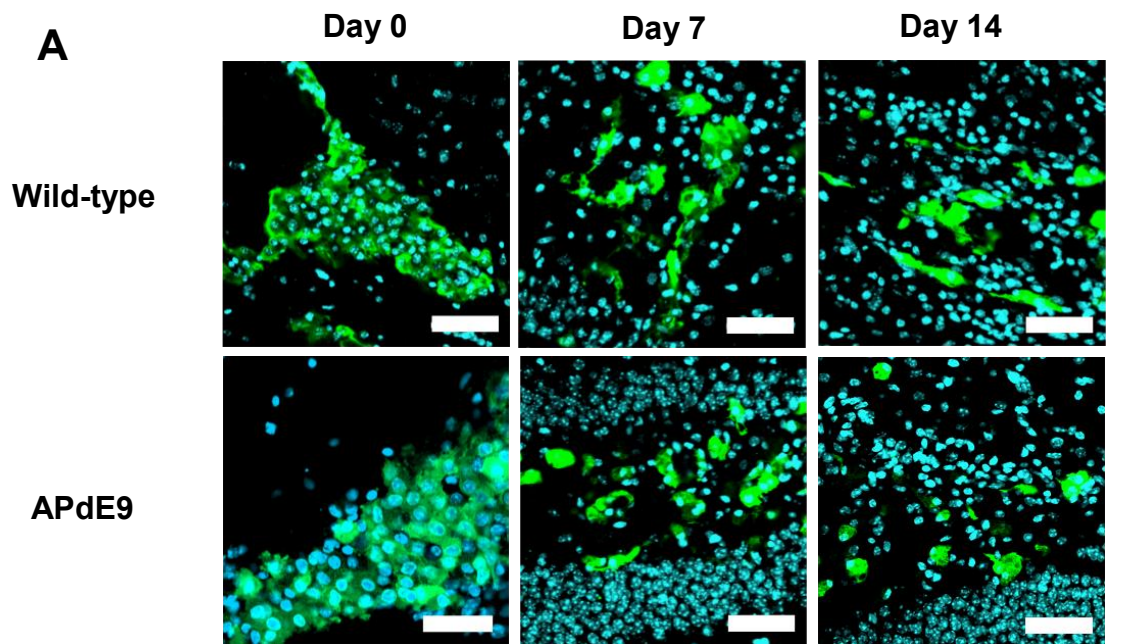


**Figure 12. Morphological analysis of residential microglia (left panel) and BMDML cells 7 days after transplantation (right panel) in brains of wild-type mice.**

**A and B**, Residential microglia and BMDML cells were stained with anti-Iba1 (green) and anti-GFP (green) antibody, respectively. Nuclei were counter-stained with Hoechst 33258 (blue). BMDML cells engrafted in brain parenchyma formed ramified-type morphology resembling of resident microglia in the brain. Scale bar = 25  $\mu$ m. **C**, BMDML cells in brains of wild-type mice 7 days and 14 days after the transplantation were stained with anti-TREM2 (red), anti-GFP (green) antibody and Hoechst 33258 (blue). Scale bars = 25  $\mu$ m. BMDML cells; bone marrow-derived microglia-like cells. This figure is cited from Fig. 7 in *J. Alzheimers Dis.*, **2018**, 64, 563–585.

### 2-3-2. BMDML 細胞の脳内動態の解析

移植細胞の脳内局在を免疫細胞化学的手法により解析した。細胞移植直後、移植細胞は投与部位に密集していたが、移植後 7 および 14 日目において時間の経過とともに分散することがわかった (Fig. 13A)。さらに詳細に海馬領域における移植細胞の脳内動態を解析するために、Image J を用いて移植細胞の座標データを抽出し、得られた座標データから、隣接している各細胞間の距離を算出してヒストグラムを作製した (Fig. 13B、Table 2)。その結果、野生型マウス脳内で時間依存的に移植細胞間距離は増大した。さらに、移植後 14 日目において、野生型マウスと APdE9 マウス脳内における移植細胞間距離を比較した結果、移植後 14 日目において APdE9 マウス脳内では野生型マウス脳内の場合と比較して移植細胞間距離が約 1.4 倍大きく、AD 病態脳の環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 (Fig. 13C)。



**Figure 13. Distribution of BMDML cells in the hippocampus of mice after transplantation.**

**A**, BMDML cells after the transplantation in hippocampi of wild-type mice (upper panels) and APdE9 mice (bottom panels) were immunohistochemically analyzed with anti-GFP antibody (green) and Hoechst 33258 (blue). Transplanted cells migrated in the brains of wild-type and APdE9 mice. Scale bars = 50  $\mu$ m. **B**, Graphs show frequency (y-axis) plotted against distance between nearest cells (x-axis). The plots indicate that distances increased in a time-dependent manner. Data represent means  $\pm$  SEM of three brain sections from three different mice in each group. **C**, Median distance between nearest BMDML cells 14 days after the injection was significantly higher in brains of APdE9 mice than in brains of wild-type mice. Round (wild-type mice) and square (APdE9 mice) dots indicate distances between the nearest cells. Bars show the median of dots from three brain sections from three different mice in each group. Statistical significance of differences among groups was determined by Mann–Whitney U-test. \* $P < 0.05$  vs. wild-type mice. BMDML cells; bone marrow-derived microglia-like cells. These figures are cited from Fig.7 in J. Alzheimers Dis., **2018**, 64, 563–585.

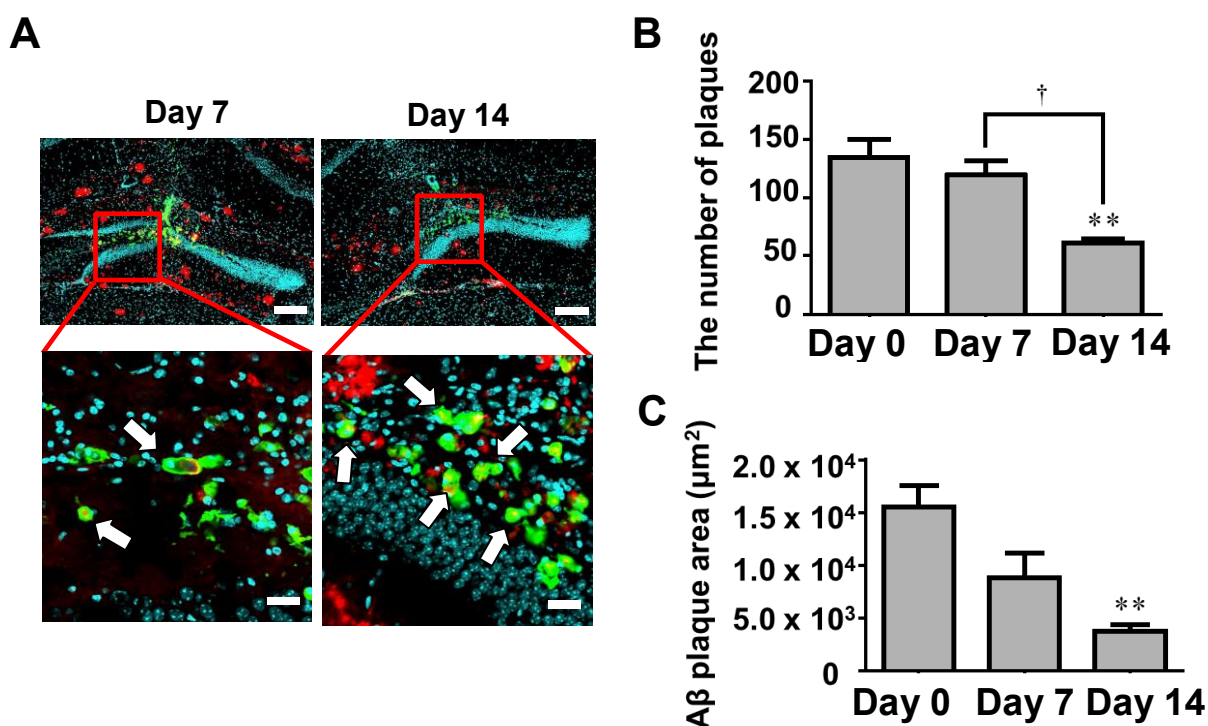
**Table 2. Median distances between nearest BMDML cells**

	Wild-Type			APdE9		
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 0	Day 7	Day 14
Median ( $\mu$ m)	16.83	28.01	42.36	17.48	30.61	51.04*
Standard deviation	14.60	44.90	36.70	10.15	28.07	26.35

Twenty GFP-immunoreactive BMDML cells were randomly selected from an image of a brain tissue. Median of distances between nearest BMDML cells at days 0, 7, and 14 after transplantation in wild-type and APdE9 mice were quantified by image analysis. Three independent images from each group were analyzed. Statistical significance of differences among groups was determined by Mann–Whitney U-test. \* $P < 0.05$  vs. wild-type on day 14. BMDML cells; bone marrow-derived microglia-like cells. This table is cited from Table 1 in J. Alzheimers Dis., **2018**, 64, 563–585.

### 2-3-3. 脳内における BMDML 細胞の A $\beta$ 貪食能の解析

脳内での移植細胞の A $\beta$  貪食能を、免疫組織化学的染色により解析した。その結果、一部の細胞は丸いアメボイド型の形態となり、移植後 7 および 14 日目において A $\beta$  を貪食していた (Fig. 14A)。また、A $\beta$  プラーク数および A $\beta$  免疫反応陽性面積は時間依存的に減少し、移植後 14 日目においては、移植 0 日目の場合と比較してそれぞれ  $45 \pm 2.5\%$  および  $24 \pm 3.7\%$  であった (Fig. 14. B and C)。これらの結果から、BMDML 細胞は脳内においても A $\beta$  を貪食し、脳内 A $\beta$  を除去できることが明らかとなった。



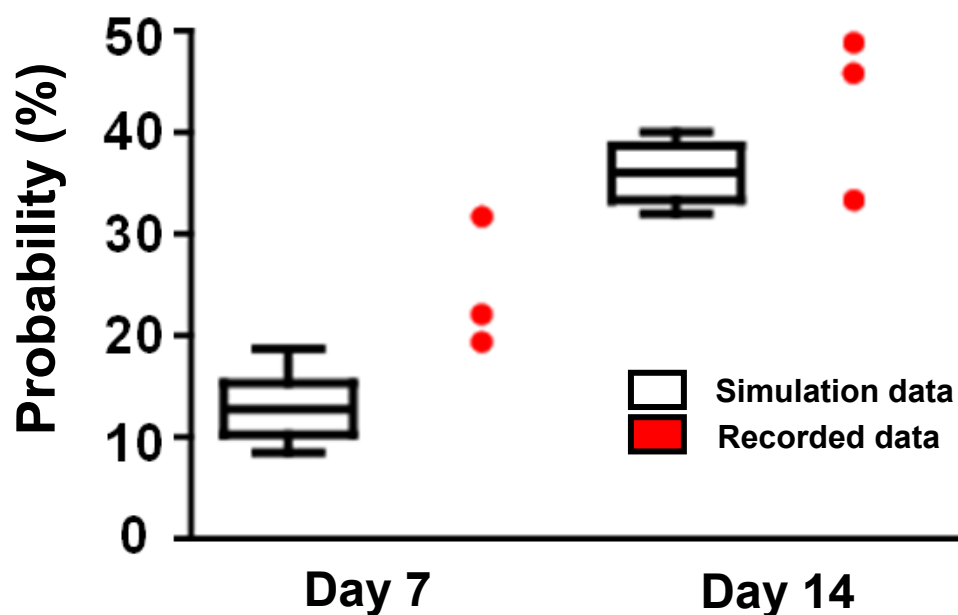
**Figure 14. BMDML cells move toward A $\beta$  plaques, phagocytose A $\beta$ , and ameliorate the A $\beta$  burden in brains of APdE9 mice.**

**A**, Brain sections from APdE9 mice receiving transplantation were stained with anti-A $\beta$  (red) and anti-GFP (green) antibody, and Hoechst 33258 (blue). White arrows indicate BMDML cells that phagocytosed A $\beta$ . Scale bars = 200  $\mu\text{m}$  (upper panels) and 25  $\mu\text{m}$  (bottom panels). **B and C**, the number (**B**) and area (**C**) of A $\beta$  plaques over 20  $\mu\text{m}$  in diameters in brains of APdE9 mice on days 0, 7 and 14 after transplantation, as determined by image analysis. Data represent means  $\pm$  SEM of five to seven right hippocampal sections from four different mice in each group. Statistical significance of differences among groups was determined by ANOVA with a post-hoc Bonferroni/Dunn test. \*\* $P < 0.01$  vs. Day 0. † $P < 0.05$  vs. Day 7. BMDML cells; bone marrow-derived microglia-like cells. These figures are cited from Fig. 8 in *J. Alzheimers Dis.*, **2018**, 64, 563–585.

#### 2-3-4. コンピュータシミュレーションによる BMDML 細胞の A $\beta$ への指向性の解析

さらに、BMDML 細胞の A $\beta$  への指向性を数理モデルであるモンテカルロシミュレーションにより、移植した BMDML 細胞が半径 30  $\mu\text{m}$  の A $\beta$  と共局在する確率を計算した。数理モデルのパラメータには、画像解析により得られた移植後 7 および 14 日目の海馬領域に存在する GFP 陽性移植細胞の数と A $\beta$  プラークの実測値を使用し計算した確率と実測値の確率を比較した。移植細胞が脳内をランダムに移動した場合に、A $\beta$  プラークに偶然集積する確率と、A $\beta$  プラークに移植細胞が集積した実測値の確率を比較したところ、シミュレートした計算値の確率よりも実測値の確率が約 1.3 倍高かったことから (Fig. 15)、移植細胞は A $\beta$  に指向性をもって遊走することが示唆された。



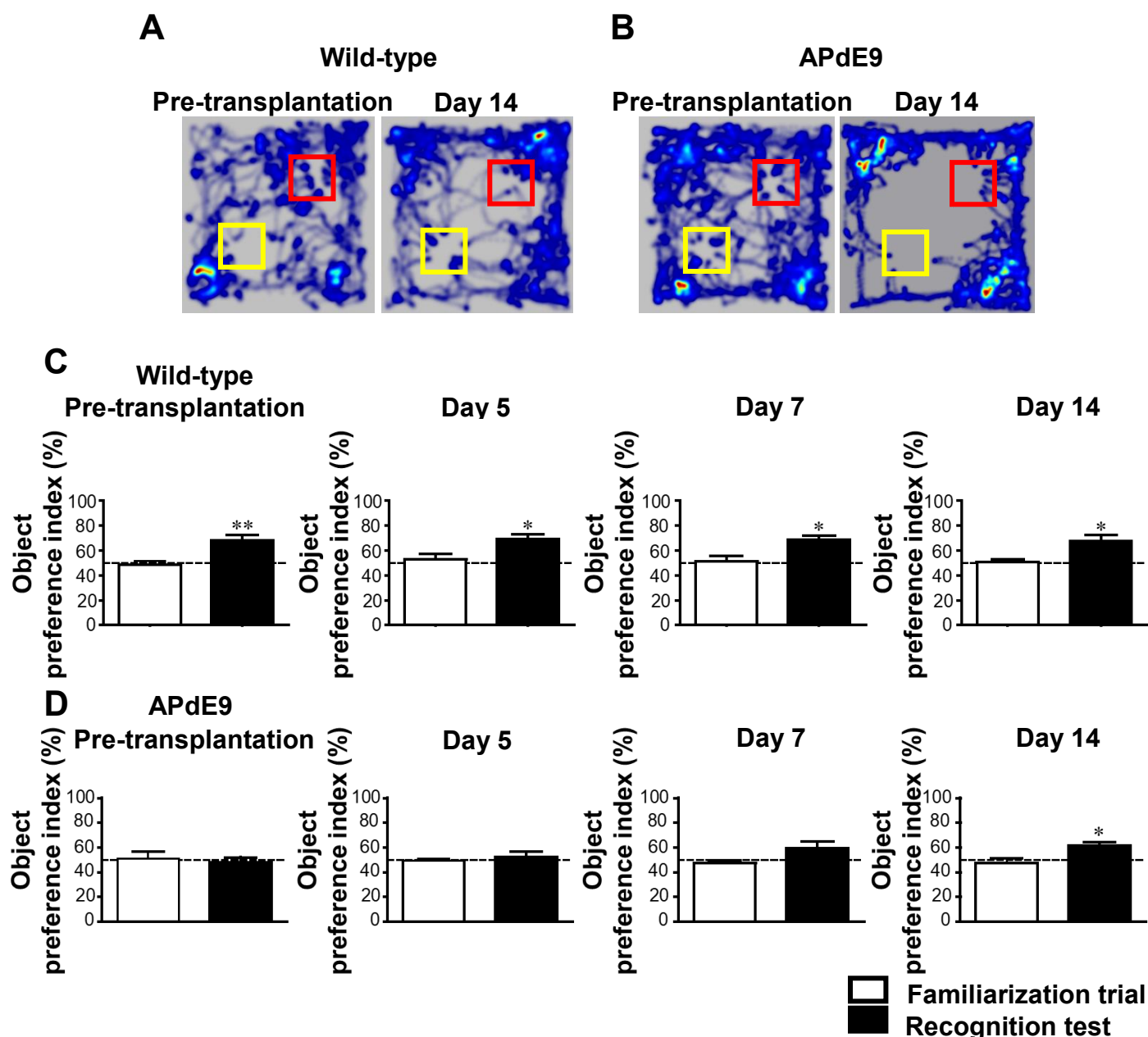


**Figure 15. Mathematically estimated probability of co-localization of A $\beta$  plaques with BMDML cells.**

A Monte Carlo simulation run 1000 times to determine the probabilities of co-localization of A $\beta$  plaques with BMDML cells with which a given number of BMDML cells would present within a 30- $\mu$ m radius of an A $\beta$  plaque on day 7 and 14. The black box plots represent the simulated probability: 25%, 50% (median) and 75% percentiles (boxes) and 10th-90th percentiles (whiskers). Red dots represent the recorded data of probabilities of A $\beta$  plaques with BMDML cells from three brain sections from three different mice in each group (i.e., days 7 and 14 after transplantation). BMDML cells; bone marrow-derived microglia-like cells. This figure is cited from Fig.8 in J. Alzheimers Dis., **2018**, 64, 563–585., and Fig. 8C is modified.

#### 2-3-5. BMDML 細胞移植による認知機能障害改善効果の解析

最後に、新規物体認識試験により移植細胞による認知機能障害改善効果について解析を実施した。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ある (91)。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ので同じ程度の頻度でそれぞれの物体に興味を示し、確率として約 50%ずつそれぞれの物体に近づく。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く、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 (Fig. 11)。野生型マウス脳内に PBS を投与した群では、投与前から 14 日目までにおいて O3 に近づく頻度が高く、PBS 投与後、14 日目における物体指向指数が約  $67.8 \pm 4.6\%$ 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. 16. A and C)。APdE9 マウスにおいて、細胞移植前では、O1 と O3 のそれぞれの物体に近づく頻度に差がなく、物体指向指数は  $48.0 \pm 4.1\%$ で認知機能障害を呈していた (Fig. 16. B and D)。APdE9 マウスに骨髄由来細胞を移植した群では、移植後 7 日目において、物体指向指数が  $59.3 \pm 5.4\%$ であり (Fig. 16. B and D)、認知機能障害が改善傾向にあったが、移植後 14 日目において O3 に近づく頻度が増加し、物体指向指数が familiarization trial の  $50.64 \pm 2.3\%$ に比べ、recognition test で  $61.8 \pm 2.3\%$ と有意に高かったことから、認知機能障害の改善が認められた。



**Figure 16. Effect of intrahippocampal transplantation of BMDML cells in APdE9 mice.**

**A and B**, Wild-type (**A**) and APdE9 (**B**) were hippocampally injected with PBS and BMDML cells. Blue line and red region indicate trajectory of mice movement and long-term stay, respectively at the field. Yellow and red squares indicate familial object (O1) and novel object (O3), respectively. **C and D**, Object preference indexes in a novel object recognition test are indicated in the bar graphs. White bars indicate the object preference indexes in the familiarization trials whereas black ones show those in the recognition test. Data represent means  $\pm$  SEM of object preference indexes from four mice in each group. Student's t-test was used for statistical analysis. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. familiarization session. BMDML cells; bone marrow-derived microglia-like cells. These figures are cited from Fig. 9 in J. *Alzheimers Dis.*, **2018**, 64, 563–585.

## 2-4. 考察

本章では、第1章で作製した骨髄由来ミクログリア様 A $\beta$  貪食細胞が *in vivo* 脳内においても機能するかを評価するため、AD モデルマウスを用いて移植実験を実施した。ミクログリアは脳内の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。定常状態のミクログリアは分岐して突起を伸ばした形態であるラミファイド型で神経細胞のシナプスに接触し、脳内環境を監視している (11, 74)。AD 病態脳においてミクログリアは活性化状態となり、活性化した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と呼ばれる形態に変化し、死細胞や A $\beta$  の貪食除去に働く (76, 77)。すなわち、ミクログリアの形態変化はミクログリアの活性化状態の指標となる。脳内に認めた BMDML 細胞は、ミクログリアと同様にラミファイド型を呈しており、移植後、脳内に生着していることが確認された。また、A $\beta$  プラーク周囲では活性化したアメボイド型を呈する細胞も確認された。これらのことから、移植した BMDML 細胞はミクログリアと同様に脳内の環境に応答し、その形態を変化させ生着できることが示唆された。

次に、AD モデルマウスの脳内の A $\beta$  に対する貪食能を検討した。移植した BMDML 細胞は脳内でもミクログリアの A $\beta$  認識に関わる分子である TREM2 (54-56) を発現しており、A $\beta$  を貪食することができた。さらに移植した細胞は脳内を遊走することができ、シミュレーション解析の結果より、その遊走は A $\beta$  に対して指向性を持ったものであることが示唆された。神経細胞においては、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知られている (92) が、BMDML 細胞が脳内を A $\beta$  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る。この A $\beta$  に指向性をもった遊走は TREM2 による A $\beta$  の認識を介していると考えられる。しかしながら、BMDML 細胞が A $\beta$  を認識する受容体として、CD36 受容体 (93) や receptor for advanced glycation end products 受容体 (94) などの受容体の関与も知られており、今後の検討課題である。今回の解析では、A $\beta$  に集積した BMDML 細胞はミクログリアが活性化した際の形態と同様のアメボイド型の形態となり、A $\beta$  を貪食していた。第1章で、炎症性サイトカインである *Il-1 $\beta$* 、*Il-6* および *Tnf- $\alpha$*  mRNA の発現量が低く、抗炎症性サイトカインである *Tgf- $\beta$ 1* mRNA の発現量が高かったことから、移植した細胞も抗炎症型の細胞と考えられるが、生着後の BMDML 細胞が脳内で時間依存的にどのように変化するのかについては今後の解析が必要である。さらに、今回の解析では移植部位である海馬局所では A $\beta$  の減少が確認されたが、投与部位から離れた部位の A $\beta$  量は減少していなかった。しかしながら、今回の解析では14日目までしか移植細胞の機能を確認しておらず、移植後14日以上でさらに脳内を広範囲に遊走することで、投与部位から離れた部位での A $\beta$  を減少させることができる可能性も考えられる。また、今回は、記憶獲得に重要な海馬に直接移植を実施したが、脳室は脳脊髄液を介して脳全体に繋がっていることから、脳室内投与などの投与部

位の工夫により脳全体に移植細胞を行き渡らせる (20) ことで脳全体的に A $\beta$  量を減少できる可能性もあり、今後の検討課題である。

アミロイドカスケード仮説においては、脳内での A $\beta$  の蓄積が AD 病態の引き金となると考えられている (5, 6)。本研究により、骨髓細胞を CSF-1 で刺激することでミクログリア様の細胞へと分化誘導することができ、さらに BMDML 細胞は *in vitro* および *in vivo* において A $\beta$  を貪食することができた。さらに BMDML 細胞の移植により、APdE9 マウスにおいて認知機能障害の改善効果が認められた。本解析では、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新規物体認識試験により認知機能の評価を行った。動物の記憶を評価する試験系としては、モリス水迷路試験や恐怖条件付け学習などの記憶試験が広く用いられているが、これらの記憶試験では嫌悪刺激を記憶の強化因子として用いており、一度獲得された記憶は長期間に渡って持続する記憶である (95, 96)。新規物体認識試験では、強化因子を用いないので、低い情動レベル下での記憶を形成することができ、時間経過に伴う忘却を再現することができる記憶試験系である (91)。このことから、新規物体認識試験は AD 患者での認知機能障害による短期記憶の欠落を再現できる認知記憶課題であると考え、新規物体認識試験による評価を行った。その結果、APdE9 マウスにおける認知機能障害が検出されさらに、細胞移植後、14 日目において認知記憶障害が有意に改善した。認知機能障害が改善された理由として、以下のことが考えられる。本研究に用いた APdE9 マウスは脳内での A $\beta$  凝集を誘導する AD モデルマウスであり、特にシナプス間隙に A $\beta$  が蓄積する (97)。移植した BMDML 細胞が海馬神経細胞のシナプス間隙の A $\beta$  を貪食することにより、シナプス間に蓄積した A $\beta$  が除去されシナプス伝達効率が回復することにより、認知機能障害が改善されたと考えられる。また、本研究では解析できていないが、BMDML 細胞から分泌される insulin growth factor-1 (IGF-1) などの神経栄養因子による神経保護作用も考えられる。IGF-1 は、中枢神経系において神経保護的に作用し、神経細胞の生存や神経細胞の機能維持には不可欠な役割を果たす (98, 99)。その他にも、様々な液性因子を BMDML 細胞が分泌している可能性があり、BMDML 細胞から分泌される液性因子については、今後の検討課題である。

本研究では、海馬へ直接 BMDML 細胞を投与することにより、AD 治療に用いる細胞として、BMDML 細胞の有用性を評価した。しかしながら、ヒトでの臨床応用を考えた場合、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、より有用な移植細胞として利用できる。マウスにおける研究で、放射線照射による血液脳関門破壊モデル (80) や脳内のミクログリアを枯渇させた AD モデル (81)、中大脳動脈閉塞モデルマウス (82) において、尾静脈から投与した BMDML 細胞が脳内へ移行することが報告されており、AD モデルマウスを用いた実験では、放射線照射による血液脳関門の破壊なしに CD11b 陽性単球 (84) や CD115 陽性単球 (85) が脳へ移行することが報告されている。このような病態下では、移植細胞の血液脳関門機能低下により、細胞が通過しやすくなることが推測される。したがって、AD 病態下においては、造血幹細胞から分化誘導した BMDML 細胞が末梢血中

から血液脳関門を通過し、脳内のミクログリアを補填できる可能性が示唆される。さらに、末梢から CSF-1 を直接投与することにより、BMDML 細胞の数を増加させることで、A $\beta$  除去や認知機能障害改善効果が得られるという報告もある (100, 101)。しかしながら、AD のリスクファクターである TREM2 の機能不全は CSF-1 への感受性を低下させ、ミクログリアの生存数も減少させる (53)。このことは、CSF-1 の直接投与による治療が困難であることを示唆する。しかし、TREM2 変異を有していない健常人の骨髄細胞を骨髄バンクから入手できれば、その骨髄細胞を用いて分化誘導し移植に用いることで TREM2 変異をもつ AD 患者への治療が行える可能性があると考ええる。

近年、embryonic stem (ES) 細胞や induced pluripotent stem (iPS) 細胞から胎生期の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いる (102, 103)。さらに、これらの原始マクロファージから分化誘導したミクログリアを、実際のミクログリアに非常に近い細胞に分化誘導することが可能である (45, 102-105)。しかしながら、ヒト治療において必要となる細胞数や純度、また移植による認知機能障害の改善効果が現時点では不明である。さらに、移植後の出血痕が原因で起こるてんかんの発生の可能性を精査する必要があるなど、臨床応用においてはいくつかの課題が残されている。本邦において 2018 年 11 月より、iPS 細胞由来神経前駆細胞の脳への直接移植によるパーキンソン病治療の臨床研究が始まった。上記の脳内移植に対する疑問点や問題点に関して、本臨床研究が一つの参考になると考えられる。今後、さらなる基礎研究により、骨髄細胞、ES 細胞や iPS 細胞のどの細胞ソースから作製したミクログリア様細胞が臨床的に有用性の高い細胞であるのか検討する必要もある。

## 総括

本研究ではミクログリアの代替となるミクログリア様細胞の細胞ソースを探索する目的で、骨髄に含まれる造血幹細胞から分化させた細胞がミクログリアの代替細胞となり得るのか機能評価した。

第1章では、骨髄細胞を CSF-1 で7日間刺激することでミクログリアと類似した表面抗原マーカーの発現パターンを有したミクログリア様の細胞へ分化誘導できることを明らかにした。また、BMDML 細胞はミクログリアと同様に A $\beta$  に対する貪食能を有しており、炎症性刺激に対しても各種サイトカイン産生能を有していた。また、AD 病態を模倣した炎症性サイトカイン処置への反応性は腹腔マクロファージと比べて緩徐な傾向であることが示された。さらに、加齢に伴い、骨髄細胞の分化能や BMDML 細胞の貪食能は低下するものの若齢マウスから調製した腹腔マクロファージに比べ高い貪食能を有していることが明らかとなった。

第2章では、この BMDML 細胞の AD モデルマウス海馬内への移植による脳内 A $\beta$  量の変化、移植細胞の脳内動態および認知機能改善効果について解析を行った。その結果、移植した BMDML 細胞はマウス脳内においてもミクログリア様の細胞としてラミファイド型やアメボイド型の形態で生着することが確認された。さらに、A $\beta$  プラークへの指向性をもった遊走能とその貪食機能により、脳内 A $\beta$  の除去に働くことで認知機能障害を改善することが示唆された。

アミロイドカスケード仮説においては A $\beta$  が AD の根本的原因として考えられており、現在では、より早期に介入し、脳内から A $\beta$  を除去することが治療戦略として期待されている。そこで、今回の解析で示唆されたように、骨髄由来のミクログリア様細胞を早い段階で移植、または末梢血から脳内へ導引することができれば、AD の根本的な治療につながる可能性が期待される。本研究より、AD に対する骨髄細胞を用いた新規細胞治療戦略の有用性が示され、今後の臨床応用を目指したさらなる研究への発展が期待される。

## 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、実験の一部にご協力、ご助言、ご指導を賜りました京都薬科大学臨床薬学教育研究センター 矢野義孝 教授ならびに地寄悠吾 助教、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 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ロイコプロール®をご供与頂きました協和発酵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射手園将真学士、長山紘子学士、國府谷彩香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。



## 参考文献

- 1) Hurd MD.; Martorell P.; Delavande A.; Mullen KJ.; Langa KM. Monetary costs of dementia in the United States. *N. Engl. J. Med.* **2013**, 368, 1326–1334.
- 2) Hippus H.; Neundörfer G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* **2003**, 5, 101–108.
- 3) Goate A.; Chartier-Harlin M-C.; Mullan M.; Brown J.; Crawford F.; Fidani L.; Giuffra L.; Haynes A.; Irving N.; James L.; Mant R.; Newton P.; Rooke K.; Roques P.; Talbot C.; Pericak-Vance M.; Roses A.; Williamson R.; Rossor M.; Owen M.; Hardy J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **1991**, 349, 704–706.
- 4) Sherrington R.; Rogaev EI.; Liang Y.; Rogaeva EA.; Levesque G.; Ikeda M.; Chi H.; Lin C.; Li G.; Holman K.; Tsuda T.; Mar L.; Foncin J-F.; Bruni AC.; Montesi MP.; Sorbi S.; Rainero I.; Pinessi L.; Nee L.; Chumakov I.; Pollen D.; Brookes A.; Sanseau P.; Polinsky RJ.; Wasco W.; Da Silva HAR.; Haines JL.; Pericak-Vance MA.; Tanzi RE.; Roses AD.; Fraser PE.; Rommens JM.; St George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **1995**, 375, 754–760.
- 5) Selkoe DJ.; Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* **2016**, 8, 595–608.
- 6) Hardy J.; Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, 297, 353–356.
- 7) Davalos D.; Grutzendler J.; Yang G.; Kim J V.; Zuo Y.; Jung S.; Littman DR.; Dustin ML.; Gan W-B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* **2005**, 8, 752–758.
- 8) Prinz M.; Priller J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2014**, 15, 300–312.
- 9) Koizumi S.; Shigemoto-Mogami Y.; Nasu-Tada K.; Shinozaki Y.; Ohsawa K.; Tsuda M.; Joshi B V.; Jacobson KA.; Kohsaka S.; Inoue K. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* **2007**, 446, 1091–1095.
- 10) Glezer I.; Simard AR.; Rivest S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* **2007**, 147, 867–883.
- 11) Schafer DPP.; Lehrman EKK.; Kautzman AGG.; Koyama R.; Mardinly ARR.; Yamasaki R.; Ransohoff RMM.; Greenberg MEE.; Barres BAA.; Stevens B. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* **2012**, 74, 691–705.
- 12) 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**, 13, 3974–3980.
- 13) Keren-Shaul H.; Spinrad A.; Weiner A.; Matcovitch-Natan O.; Dvir-Szternfeld R.; Ulland TK.;

- David E.; Baruch K.; Lara-Astaiso D.; Toth B.; Itzkovitz S.; Colonna M.; Schwartz M.; Amit I. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* **2017**, 169, 1276–1290.e17.
- 14) Karch CM.; Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol. Psychiatry* **2015**, 77, 43–51.
  - 15) Guerreiro R.; Wojtas A.; Bras J.; Carrasquillo M.; Rogaeva E.; Majounie E.; Cruchaga C.; Sassi C.; Kauwe JSKK.; Younkin S.; Hazrati L.; Collinge J.; Pocock J.; Lashley T.; Williams J.; Lambert J-C.; Amouyel P.; Goate A.; Rademakers R.; Morgan K.; Powell J.; St. George-Hyslop P.; Singleton A.; Hardy J.; St George-Hyslop P.; Singleton A.; Hardy J.; Alzheimer Genetic Analysis Group. TREM2 Variants in Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2013**, 368, 117–127.
  - 16) Perry VH.; Nicoll JAR.; Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2010**, 6, 193–201.
  - 17) Takata K.; Kitamura Y.; Saeki M.; Terada M.; Kagitani S.; Kitamura R.; Fujikawa Y.; Maelicke A.; Tomimoto H.; Taniguchi T.; Shimohama S. Galantamine-induced amyloid- $\beta$  clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 40180–40191.
  - 18) Fu H.; Liu B.; Frost JL.; Hong S.; Jin M.; Ostaszewski B.; Shankar GM.; Costantino IM.; Carroll MC.; Mayadas TN.; Lemere CA. Complement component C3 and complement receptor type 3 contribute to the phagocytosis and clearance of fibrillar A $\beta$  by microglia. *Glia* **2012**, 60, 993–1003.
  - 19) El Khoury J.; Luster AD. Mechanisms of microglia accumulation in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, 29, 626–632.
  - 20) Takata K.; Kitamura Y.; Yanagisawa D.; Morikawa S.; Morita M.; Inubushi T.; Tsuchiya D.; Chishiro S.; Saeki M.; Taniguchi T.; Shimohama S.; Tooyama I. Microglial transplantation increases amyloid-beta clearance in Alzheimer model rats. *FEBS Lett.* **2007**, 581, 475–478.
  - 21) Hoeffel G.; Chen J.; Lavin Y.; Low D.; Almeida FF.; See P.; Beaudin AE.; Lum J.; Low I.; Forsberg EC.; Poidinger M.; Zolezzi F.; Larbi A.; Ng LG.; Chan JKY.; Greter M.; Becher B.; Samokhvalov IM.; Merad M.; Ginhoux F. C-Myb<sup>+</sup> erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity* **2015**, 42, 665–678.
  - 22) Ginhoux F.; Greter M.; Leboeuf M.; Nandi S.; See P.; Gokhan S.; Mehler MF.; Conway SJ.; Ng LG.; Stanley ER.; Samokhvalov IM.; Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derived from primitive macrophages. *Science* **2010**, 330, 841–846.
  - 23) Schulz C.; Perdiguero EG.; Chorro L.; Szabo-Rogers H.; Cagnard N.; Kierdorf K.; Prinz M.; Wu B.; Jacobsen SEW.; Pollard JW.; Frampton J.; Liu KJ.; Geissmann F. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* **2012**, 335, 86–90.
  - 24) Hashimoto D.; Chow A.; Noizat C.; Teo P.; Beasley MB.; Leboeuf M.; Becker CD.; See P.; Price J.; Lucas D.; Greter M.; Mortha A.; Boyer SW.; Forsberg EC.; Tanaka M.; van Rooijen N.; García-Sastre A.; Stanley ER.; Ginhoux F.; Frenette PS.; Merad M. Tissue-resident macrophages

- self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* **2013**, 38, 792–804.
- 25) Gomez Perdiguero E.; Klapproth K.; Schulz C.; Busch K.; Azzoni E.; Crozet L.; Garner H.; Trouillet C.; de Bruijn MF.; Geissmann F.; Rodewald H-R. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* **2014**, 518, 547–551.
  - 26) Epelman S.; Lavine KJ.; Beaudin AE.; Sojka DK.; Carrero JA.; Calderon B.; Brija T.; Gautier EL.; Ivanov S.; Satpathy AT.; Schilling JD.; Schwendener R.; Sergin I.; Razani B.; Forsberg EC.; Yokoyama WM.; Unanue ER.; Colonna M.; Randolph GJ.; Mann DL. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* **2014**, 40, 91–104.
  - 27) Hagemeyer N.; Kierdorf K.; Frenzel K.; Xue J.; Ringelhan M.; Abdullah Z.; Godin I.; Wieghofer P.; Costa Jordão MJ.; Ulas T.; Yorgancioglu G.; Rosenbauer F.; Knolle PA.; Heikenwalder M.; Schultze JL.; Prinz M. Transcriptome-based profiling of yolk sac-derived macrophages reveals a role for Irf8 in macrophage maturation. *EMBO J.* **2016**, 35, 1730–1744.
  - 28) Kierdorf K.; Erny D.; Goldmann T.; Sander V.; Schulz C.; Gomez Perdiguero E.; Wieghofer P.; Heinrich A.; Riemke P.; Hölscher C.; Müller DN.; Luckow B.; Brouck T.; Debowski K.; Fritz G.; Opdenakker G.; Diefenbach A.; Biber K.; Heikenwalder M.; Geissmann F.; Rosenbauer F.; Prinz M.; Perdiguero EG.; Wieghofer P.; Heinrich A.; Riemke P.; Hölscher C.; Müller DN.; Luckow B.; Brouck T.; Debowski K.; Fritz G.; Opdenakker G.; Diefenbach A.; Biber K.; Heikenwalder M.; Geissmann F.; Rosenbauer F.; Prinz M. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat. Neurosci.* **2013**, 16, 273–280.
  - 29) Bertrand JY.; Jalil A.; Klaine M.; Jung S.; Cumano A.; Godin I. Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* **2005**, 106, 3004–3011.
  - 30) Cumano A.; Godin I. Ontogeny of the Hematopoietic System. *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, 25, 745–785.
  - 31) Tamura T.; Ozato K. Review: ICSBP/IRF-8: Its Regulatory Roles in the Development of Myeloid Cells. *J. Interf. Cytokine Res.* **2002**, 22, 145–152.
  - 32) Mossadegh-Keller N.; Sarrazin S.; Kandalla PK.; Espinosa L.; Stanley ER.; Nutt SL.; Moore J.; Sieweke MH. M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells. *Nature* **2013**, 497, 239–243.
  - 33) Lavin Y.; Winter D.; Blecher-Gonen R.; David E.; Keren-Shaul H.; Merad M.; Jung S.; Amit I. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* **2014**, 159, 1312–1326.
  - 34) Wilkinson K.; El Khoury J. Microglial Scavenger Receptors and Their Roles in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int. J. Alzheimers. Dis.* **2012**, 2012, 1–10.
  - 35) Baron R.; Babcock AA.; Nemirovsky A.; Finsen B.; Monsonego A. Accelerated microglial pathology is associated with A $\beta$  plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Aging Cell*

- 2014**, 13, 584–595.
- 36) El Khoury J.; Hickman SE.; Thomas CA.; Cao L.; Silverstein SC.; Loike JD. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* **1996**, 382, 716–719.
  - 37) Palis J.; Robertson S.; Kennedy M.; Wall C.; Keller G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* **1999**, 126, 5073–5084.
  - 38) Wynn TA.; Chawla A.; Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **2013**, 496, 445–455.
  - 39) Yona S.; Kim KW.; Wolf Y.; Mildner A.; Varol D.; Breker M.; Strauss-Ayali D.; Viukov S.; Guillemins M.; Misharin A.; Hume D a.; Perlman H.; Malissen B.; Zelzer E.; Jung S. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* **2013**, 38, 79–91.
  - 40) Hoeffel G.; Ginhoux F. Ontogeny of tissue-resident macrophages. *Front. Immunol.* **2015**, 6.
  - 41) Götz J.; Ittner LM. Animal models of Alzheimer’s disease and frontotemporal dementia. *Nat. Rev. Neurosci.* **2008**, 9, 532–544.
  - 42) Butovsky O.; Jedrychowski MP.; Moore CS.; Cialic R.; Lanser AJ.; Gabriely G.; Koeglspenger T.; Dake B.; Wu PM.; Doykan CE.; Fanek Z.; Liu L.; Chen Z.; Rothstein JD.; Ransohoff RM.; Gygi SP.; Antel JP.; Weiner HL. Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat. Neurosci.* **2014**, 17, 131–143.
  - 43) Bennett ML.; Bennett FC.; Liddelow SA.; Ajami B.; Zamanian JL.; Fernhoff NB.; Mulinyawe SB.; Bohlen CJ.; Adil A.; Tucker A.; Weissman IL.; Chang EF.; Li G.; Grant GA.; Hayden Gephart MG.; Barres BA. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, 113, E1738–E1746.
  - 44) Mildner A.; Huang H.; Radke J.; Stenzel W.; Priller J.; Bennett ML.; Bennett FC.; Liddelow SA.; Ajami B.; Zamanian JL.; Fernhoff NB.; Mulinyawe SB.; Bohlen CJ.; Adil A.; Tucker A.; Weissman IL.; Chang EF.; Li G.; Grant GA.; Hayden Gephart MG.; Barres BA. P2Y 12 receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia* **2017**, 65, 375–387.
  - 45) Abud EM.; Ramirez RN.; Martinez ES.; Healy LM.; Nguyen CHH.; Newman SA.; Yeromin A V.; Scarfone VM.; Marsh SE.; Fimbres C.; Caraway CA.; Fote GM.; Madany AM.; Agrawal A.; Kaye R.; Gyls KH.; Cahalan MD.; Cummings BJ.; Antel JP.; Mortazavi A.; Carson MJ.; Poon WW.; Blurton-Jones M. iPSC-derived human microglia-like cells to study neurological diseases. *Neuron* **2017**, 94, 278–293.e9.
  - 46) Sedgwick JD.; Schwender S.; Imrich H.; Dörries R.; Butcher GW.; ter Meulen V. Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88, 7438–7442.
  - 47) Belkhelfa M.; Rafa H.; Medjeber O.; Arroul-Lammali A.; Behairi N.; Abada-Bendib M.; Makrelouf M.; Belarbi S.; Masmoudi AN.; Tazir M.; Touil-Boukoffa C. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  are involved during Alzheimer disease progression and correlate with nitric oxide production: a

- study in algerian patients. *J. Interf. Cytokine Res.* **2014**, 34, 839–847.
- 48) Forlenza OV.; Diniz BS.; Talib LL.; Mendonça VA.; Ojopi EB.; Gattaz WF.; Teixeira AL. Increased serum IL-1 $\beta$  level in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2009**, 28, 507–512.
  - 49) Welser-Alves J V.; Milner R. Microglia are the major source of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 in postnatal glial cultures; Regulation by cytokines, lipopolysaccharide, and vitronectin. *Neurochem. Int.* **2013**, 63, 47–53.
  - 50) Abbas N.; Bednar I.; Mix E.; Marie S.; Paterson D.; Ljungberg A.; Morris C.; Winblad B.; Nordberg A.; Zhu J. Up-regulation of the inflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and IL-12 and down-regulation of IL-4 in cerebral cortex regions of APP(SWE) transgenic mice. *J. Neuroimmunol.* **2002**, 126, 50–57.
  - 51) Tang Y.; Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.* **2016**, 53, 1181–1194.
  - 52) Ginhoux F.; Lim S.; Hoeffel G.; Low D.; Huber T. Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, 7, 45.
  - 53) Wang Y.; Cella M.; Mallinson K.; Ulrich JD.; Young KL.; Robinette ML.; Gilfillan S.; Krishnan GM.; Sudhakar S.; Zinselmeyer BH.; Holtzman DM.; Cirrito JR.; Colonna M. TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell* **2015**, 160, 1061–1071.
  - 54) Yuan P.; Condello C.; Keene CD.; Wang Y.; Bird TD.; Paul SM.; Luo W.; Colonna M.; Baddeley D.; Grutzendler J. TREM2 haploinsufficiency in mice and humans impairs the microglia barrier function leading to decreased amyloid compaction and severe axonal dystrophy. *Neuron* **2016**, 92, 252–264.
  - 55) Xiang X.; Werner G.; Bohrmann B.; Liesz A.; Mazaheri F.; Capell A.; Feederle R.; Knuesel I.; Kleinberger G.; Haass C. TREM2 deficiency reduces the efficacy of immunotherapeutic amyloid clearance. *EMBO Mol. Med.* **2016**, 8, 992–1004.
  - 56) Hickman SE.; El Khoury J. TREM2 and the neuroimmunology of Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, 88, 495–498.
  - 57) Satoh JI. Gene expression profiles of M1 and M2 microglia characterized by comparative analysis of public datasets. *Clin. Exp. Neuroimmunol.* **2018**, 9, 124–138.
  - 58) Streit WJ.; Sammons NW.; Kuhns AJ.; Sparks DL.; Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ SD. Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia* **2004**, 15, 2.
  - 59) Njie EG.; 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.
  - 60) Hickman SE.; Allison EK.; El Khoury J. Microglial dysfunction and defective  $\gamma$ -amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J. Neurosci.* **2008**, 28, 8354–8360.
  - 61) Harry GJ. Microglia during development and aging. *Pharmacol. Ther.* **2013**, 139, 313–326.

- 62) Mosher KI.; Wyss-Coray T. Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, 88, 594–604.
- 63) Takata K.; Amamiya T.; Mizoguchi H.; Kawanishi S.; Kuroda E.; Kitamura R.; Ito A.; Saito Y.; Tawa M.; Nagasawa T.; Okamoto H.; Sugino Y.; Takegami S.; Kitade T.; Toda Y.; Kem WR.; Kitamura Y.; Shimohama S.; Ashihara E. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-specific agonist DMXBA (GTS-21) attenuates A $\beta$  accumulation through suppression of neuronal  $\gamma$ -secretase activity and promotion of microglial amyloid- $\beta$  phagocytosis and ameliorates cognitive impairment in a mouse model. *Neurobiol. Aging* **2018**, 62, 197–209.
- 64) Takata K.; Kitamura Y.; Saeki M.; Terada M.; Kagitani S.; Kitamura R.; Fujikawa Y.; Maelicke A.; Tomimoto H.; Taniguchi T.; Shimohama S. Galantamine-induced amyloid- $\beta$  clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 40180–40191.
- 65) St-Pierre S.; Jiang W.; Roy P.; Champigny C.; LeBlanc É.; Morley BJ.; Hao J.; Simard AR. Nicotinic Acetylcholine Receptors Modulate Bone Marrow-Derived Pro-Inflammatory Monocyte Production and Survival. *PLoS One* **2016**, 11, e0150230.
- 66) Daria A.; Colombo A.; Llovera G.; Hampel H.; Willem M.; Liesz A.; Haass C.; Tahirovic S. Young microglia restore amyloid plaque clearance of aged microglia. *EMBO J.* **2017**, 36, 583–603.
- 67) Wyss-Coray T.; Lin C.; Yan F.; Yu GQ.; Rohde M.; McConlogue L.; Masliah E.; Mucke L. TGF- $\beta$ 1 promotes microglial amyloid- $\beta$  clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat. Med.* **2001**, 7, 612–618.
- 68) von Bernhardi R.; Cornejo F.; Parada GE.; Eugén J. Role of TGF $\beta$  signaling in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci.* **2015**, 9, 1–21.
- 69) Shimizu E.; Kawahara K.; Kajizono M.; Sawada M.; Nakayama H. IL-4-induced selective clearance of oligomeric beta-amyloid peptide(1-42) by rat primary type 2 microglia. *J. Immunol.* **2008**, 181, 6503–6513.
- 70) Ford AL.; Goodsall AL.; Hickey WF.; Sedgwick JD. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4<sup>+</sup> T cells compared. *J. Immunol.* **1995**, 154, 4309–4321.
- 71) Derecki NC.; Katzmarski N.; Kipnis J.; Meyer-Luehmann M. Microglia as a critical player in both developmental and late-life CNS pathologies. *Acta Neuropathol.* **2014**, 128, 333–345.
- 72) Stevens B.; Allen NJ.; Vazquez LE.; Howell GR.; Christopherson KS.; Nouri N.; Micheva KD.; Mehalow AK.; Huberman AD.; Stafford B.; Sher A.; Litke AM.; Lambris JD.; Smith SJ.; John SWM.; Barres BA. The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* **2007**, 131, 1164–1178.
- 73) Paolicelli RC.; Bolasco G.; Pagani F.; Maggi L.; Scianni M.; Panzanelli P.; Giustetto M.; Ferreira TA.; Guiducci E.; Dumas L.; Ragozzino D.; Gross CT. Synaptic pruning by microglia is

- necessary for normal brain development. *Science* **2011**, 333, 1456–1458.
- 74) 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.
  - 75) Parkhurst CN.; Yang G.; Ninan I.; Savas JN.; Yates JR.; Lafaille JJ.; Hempstead BL.; Littman DR.; Gan WB. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* **2013**, 155, 1596–1609.
  - 76) 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.
  - 77) Kreutzberg GW. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* **1996**, 19, 312–318.
  - 78) Wang Y.; Ulland TK.; Ulrich JD.; Song W.; Tzaferis JA.; Hole JT.; Yuan P.; Mahan TE.; Shi Y.; Gilfillan S.; Cella M.; Grutzendler J.; DeMattos RB.; Cirrito JR.; Holtzman DM.; Colonna M. TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J. Exp. Med.* **2016**, 213, 667–675.
  - 79) Savchenko E.; Malm T.; Kontinen H.; Hämäläinen RH.; Guerrero-Toro C.; Wojciechowski S.; Giniatullin R.; Koistinaho J.; Magga J. A $\beta$  and Inflammatory Stimulus Activate Diverse Signaling Pathways in Monocytic Cells: Implications in Retaining Phagocytosis in A $\beta$ -Laden Environment. *Front. Cell. Neurosci.* **2016**, 10, 279.
  - 80) Simard AR.; Rivest S. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J.* **2004**, 18, 998–1000.
  - 81) Prokop S.; Miller KR.; Drost N.; Handrick S.; Mathur V.; Luo J.; Wegner A.; Wyss-Coray T.; Heppner FL. Impact of peripheral myeloid cells on amyloid- $\beta$  pathology in Alzheimer's disease-like mice. *J. Exp. Med.* **2015**, 212, 1811–1818.
  - 82) Hess DC.; Abe T.; Hill WD.; Studdard AM.; Carothers J.; Masuya M.; Fleming PA.; Drake CJ.; Ogawa M. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp. Neurol.* **2004**, 186, 134–144.
  - 83) Xu J.; Zhu L.; He S.; Wu Y.; Jin W.; Yu T.; Qu JY.; Wen Z. Temporal-Spatial Resolution Fate Mapping Reveals Distinct Origins for Embryonic and Adult Microglia in Zebrafish. *Dev. Cell* **2015**, 34, 632–641.
  - 84) Lebson L.; Nash K.; Kamath S.; Herber D.; Carty N.; Lee DC.; Li Q.; Szekeres K.; Jinwal U.; Koren J.; Dickey CA.; Gottschall PE.; Morgan D.; Gordon MN. Trafficking CD11b-positive blood cells deliver therapeutic genes to the brain of amyloid-depositing transgenic mice. *J. Neurosci.* **2010**, 30, 9651–9658.
  - 85) Koronyo Y.; Salumbides BC.; Sheyn J.; Pelissier L.; Li S.; Ljubimov V.; Moyseyev M.; Daley D.; Fuchs D-T.; Pham M.; Black KL.; Rentsendorj A.; Koronyo-Hamaoui M. Therapeutic effects of glatiramer acetate and grafted CD115 + monocytes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain* **2015**, 138, 2399–2422.

- 86) 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.
- 87) Jankowsky JL.; Fadale DJ.; Anderson J.; Xu GM.; Gonzales V.; Jenkins NA.; Copeland NG.; Lee MK.; Younkin LH.; Wagner SL.; Younkin SG.; Borchelt DR. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum. Mol. Genet.* **2004**, 13, 159–70.
- 88) Rueden CT.; Schindelin J.; Hiner MC.; DeZonia BE.; Walter AE.; Arena ET.; Eliceiri KW. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* **2017**, 18, 529.
- 89) Tay TL.; Mai D.; Dautzenberg J.; Fernández-Klett F.; Lin G.; Sagar.; Datta M.; Drougard A.; Stempf T.; Ardura-Fabregat A.; Staszewski O.; Margineanu A.; Sporbert A.; Steinmetz LM.; Pospisilik JA.; Jung S.; Priller J.; Grün D.; Ronneberger O.; Prinz M. A new fate mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia. *Nat. Neurosci.* **2017**, 20, 793–803.
- 90) Ihaka R.; Gentleman R. R: A Language for Data Analysis and Graphics. *J. Comput. Graph. Stat.* **1996**, 5, 299–314.
- 91) Broadbent NJ.; Gaskin S.; Squire LR.; Clark RE. Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn. Mem.* **2010**, 17, 5–11.
- 92) 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.
- 93) Moore KJ.; El Khoury J.; Medeiros LA.; Terada K.; Geula C.; Luster AD.; Freeman MW. A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 47373–47379.
- 94) Fang F.; Lue L-F.; Yan S.; Xu H.; Luddy JS.; Chen D.; Walker DG.; Stern DM.; Yan S.; Schmidt AM.; Chen JX.; Yan SS. RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, A $\beta$  accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer’s disease. *FASEB J.* **2010**, 24, 1043–1055.
- 95) Christian KM.; Thompson RF. Long-term storage of an associative memory trace in the cerebellum. *Behav. Neurosci.* **2005**, 119, 526–537.
- 96) Gale GD. Role of the Basolateral Amygdala in the Storage of Fear Memories across the Adult Lifetime of Rats. *J. Neurosci.* **2004**, 24, 3810–3815.
- 97) Palavicini JP.; Wang H.; Bianchi E.; Xu S.; Rao JS.; Kang DE.; Lakshmana MK. RanBP9 aggravates synaptic damage in the mouse brain and is inversely correlated to spinophilin levels in Alzheimer’s brain synaptosomes. *Cell Death Dis.* **2013**, 4, e667.
- 98) Zheng W-H.; Kar S.; Doré S.; Quirion R (2000) . Insulin-like growth factor-1 (IGF-1): a neuroprotective trophic factor acting via the Akt kinase pathway. In *Advances in Research on Neurodegeneration* Springer Vienna, Vienna, pp. 261–272.



- 99) Angelini A.; Bendini C.; Neviani F.; Bergamini L.; Manni B.; Trenti T.; Rovati R.; Neri M. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1): relation with cognitive functioning and neuroimaging marker of brain damage in a sample of hypertensive elderly subjects. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **2009**, 49, 5–12.
- 100) Naert G.; Rivest S. Age-related changes in synaptic markers and monocyte subsets link the cognitive decline of APPSwe/PS1 mice. *Front. Cell. Neurosci.* **2012**, 6, 51.
- 101) Boissonneault V.; Filali M.; Lessard M.; Relton J.; Wong G.; Rivest S. Powerful beneficial effects of macrophage colony-stimulating factor on  $\beta$ -amyloid deposition and cognitive impairment in Alzheimers disease. *Brain* **2009**, 132, 1078–1092.
- 102) Muffat J.; Li Y.; Yuan B.; Mitalipova M.; Omer A.; Corcoran S.; Bakiasi G.; Tsai L-H.; Aubourg P.; Ransohoff RM.; Jaenisch R. Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Med.* **2016**, 22, 1358–1367.
- 103) Takata K.; Kozaki T.; Lee CZW.; Thion MS.; Otsuka M.; Lim S.; Utami KH.; Fidan K.; Park DS.; Malleret B.; Chakarov S.; See P.; Low D.; Low G.; Garcia-Miralles M.; Zeng R.; Zhang J.; Goh CC.; Gul A.; Hubert S.; Lee B.; Chen J.; Low I.; Shadan NB.; Lum J.; Wei TS.; Mok E.; Kawanishi S.; Kitamura Y.; Larbi A.; Poidinger M.; Renia L.; Ng LG.; Wolf Y.; Jung S.; Önder T.; Newell E.; Huber T.; Ashihara E.; Garel S.; Pouladi MA.; Ginhoux F. Induced pluripotent stem cell derived primitive macrophages provide a platform for modeling tissue-resident macrophage differentiation and function. *Immunity* **2017**, 47, 183–198.
- 104) Pandya H.; Shen MJ.; Ichikawa DM.; Sedlock AB.; Choi Y.; Johnson KR.; Kim G.; Brown MA.; Elkahouloun AG.; Maric D.; Sweeney CL.; Gossa S.; Malech HL.; McGavern DB.; Park JK. Differentiation of human and murine induced pluripotent stem cells to microglia-like cells. *Nat. Neurosci.* **2017**, 20, 753–759.
- 105) Douvaras P.; Sun B.; Wang M.; Kruglikov I.; Lallous G.; Zimmer M.; Terrenoire C.; Zhang B.; Gandy S.; Schadt E.; Freytes DO.; Noggle S.; Fossati V. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to microglia. *Stem Cell Reports* **2017**, 89, 37–53.