

氏 名 (生年月日) <sup>かわ</sup> <sup>にし</sup> <sup>しょう</sup> <sup>へい</sup>  
**河 西 翔 平** (1990 年 7 月 16 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 博 薬 第 179 号

学位授与の日付 2019 年 3 月 16 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 マウス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

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 芦 原 英 司

(副査) 教 授 長 澤 一 樹

(副査) 教 授 藤 室 雅 弘

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 序章

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease ; AD) は、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。

## 審査の結果の要旨

### 《緒言》

アルツハイマー病 (AD) は進行性に認知機能が低下する神経変性疾患で、発症機序は不明な点が多く、さらに根本的な治療薬や治療法は未だ開発されていない。AD の発症機序の最も有力な仮説として、脳内でのアミロイド  $\beta$  タンパク質 ( $A\beta$ ) の増加・蓄積が AD 発症の引き金となる“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、脳内の免疫機能を維持する脳に常在する組織マクロファージ ( $M\Phi$ ) で、近年、胎生初期の造血細胞由来であることが示された。これまでの研究で、AD モデルラット脳室への移植されたラット初代培養ミクログリアが  $A\beta$  を貪食し、脳内  $A\beta$  量を減少させることが示され、ミクログリアの移植が AD に対する根治療法となる可能性が示唆されている。しかし臨床応用を鑑みた場合、倫理面や技術面からヒトミクログリアの使用は困難である。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、骨髄造血幹細胞から分化させた細胞の有効性を明らかにするため、その機能評価を行った。

### 《審査結果の要旨》

第1章では、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を解析した。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 を処置し7日間培養した。この骨髄由来細胞は、ionized calcium-binding adaptor molecule 1、CD11b、triggering receptor expressing on myeloid 2 (TREM2) などのミクログリア/ $M\Phi$  マーカーを発現し、腹腔  $M\Phi$  よりも約 5.2 倍高い  $A\beta$  貪食能を有していた。さらに抗炎症型の M2 様の表現型を示し、AD 脳内環境を模倣した IFN- $\gamma$  と IL-1 $\beta$  刺激においても、腹腔  $M\Phi$  ほど M1 型細胞への変化を認めなかった。また、24 ヶ月齢の高齢マウスから得た骨髄由来細胞が 10 週齢の若齢マウスの腹腔  $M\Phi$  より高い  $A\beta$  貪食能を有しており、AD 患者が多い高齢者の骨髄由来細胞を用いてもミクログリア様の  $A\beta$  貪食細胞へと分化誘導できることが示唆された。

第2章では AD モデルマウス海馬内へ骨髄由来ミクログリア様細胞を移植し、移植細胞の脳への生着、脳内動態、 $A\beta$  病態への移植細胞の影響および認知機能の改善効果を解析した。生後7週齢の GFP 陽性マウスより採取した骨髄細胞をミクログリア様細胞へ分化誘導し、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た。移植したミクログリア様細胞は脳内でも TREM2 を発現し、定常型および活性型、双方の形態を呈し、脳内の生着が確認できた。また移植後 14 日目の 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約 1.4 倍増大しており、AD 病態下では移植細胞の移動がより大きいことが示された。また数理モデル解析により、 $A\beta$  に指向性をもって移動していることが明らかとなった。さらに 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が、細胞移植後 14 日目に改善されたことを確認できた。以上より、骨髄由来細胞は AD 脳内でもミクログリア様  $A\beta$  貪食細胞として機能し、認知機能を改善することが示唆された。

### 《審査の結論》

本研究より、骨髄細胞からミクログリア様の  $A\beta$  貪食細胞が調製でき、高齢マウスから採取・誘導した細胞でも比較的高い貪食能を保つことが分かった。さらに、本細胞は AD マウス脳内でミクログリア様の細胞として生着し、 $A\beta$  プラークへ遊走し、かつ  $A\beta$  貪食により脳内  $A\beta$  を除去し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。

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