

「アルツハイマー型認知症の病態形成に果たす血管老化の役割の解明」

神戸薬科大学 医療薬学研究室 力武 良行

1 研究の背景と目的

近年、血管障害を引き起こす加齢や糖尿病、高血圧、脂質異常症がアルツハイマー型認知症 (AD) の発症リスクを高めることが明らかになり、血管障害が AD の病態形成に関わることを示唆する知見が集積されつつある。本研究の目的は、加齢に伴う血管障害である血管老化が AD の病態形成に果たす役割を明らかにし、血管老化を標的とした AD に対する効果的な創薬の実現に繋げることである。具体的には、①血管内皮細胞特異的の老化マウスを用いて血管老化が脳の老化や認知機能障害を生じうるか、②血管内皮細胞特異的の老化マウスを AD モデルマウスと交配した血管内皮細胞特異的の老化 AD モデルマウスを作成し、このマウスを用いて血管内皮細胞老化が AD の病態形成を促進するか、について明らかにし、③それぞれの分子機構を解明することを目的として研究を実施した。

2 研究方法・研究内容

① 血管内皮細胞老化が脳の老化や認知機能障害を生じうるか

● 血管内皮細胞特異的の老化マウスにおける脳血管内皮細胞の老化の確認

3ヶ月齢の血管内皮細胞特異的の老化マウス及び野生型マウス (C57B1/6) より脳を抽出し、MACS®テクノロジーを用いて、脳血管内皮細胞を単離した。単離した脳血管内皮細胞からキットを用いて mRNA を抽出し、real-time PCR 法を用いて遺伝子発現を解析した。

● 血管内皮細胞特異的の老化マウスにおけるグリア細胞の活性化

3ヶ月齢の血管内皮細胞特異的の老化マウス及び野生型マウス (C57B1/6) より脳を抽出し、MACS®テクノロジーを用いて、ミクログリアを単離した。単離したミクログリアからキットを用いて mRNA を抽出し、real-time PCR 法を用いて遺伝子発現を解析した。また、脳組織切片を作製し、アストロサイトのマーカーである GFAP に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

● 血管内皮細胞特異的の老化マウスにおける認知機能の評価

6、9、12ヶ月齢の血管内皮細胞特異的の老化マウス及び野生型マウス (C57B1/6) を用いて、Y 字迷路試験を用いて空間認知機能・短期記憶を、高架式十字迷路試験とモリス水迷路試験を用いて空間認知機能・長期記憶を評価した。

② 血管内皮細胞老化が AD の病態形成を促進するか

● 血管内皮細胞特異的の老化 AD モデルマウスの脳組織における β アミロイドおよびリン酸化 Tau 蛋白の沈着

血管内皮細胞特異的の老化マウスを AD モデルマウスと交配した血管内皮細胞特異的の老化 AD モデルマウスを作成し、6、9、12ヶ月齢において、血管内皮細胞特異的の老化 AD モデルマウス及び対照となる AD モデルマウスから脳組織切片を作製し、 β アミロイドおよびリン酸化 Tau 蛋白に対する特異的抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、アルツハイマーの特徴的な病理学的所見である β アミロイドおよびリン酸化 Tau 蛋白の沈着の有無を評価した。

- 血管内皮細胞特異的老化 AD モデルマウスにおける短期記憶と長期記憶の評価
6、9、12ヶ月齢において、Y字迷路試験を用いて空間認知機能・短期記憶を、高架式十字迷路試験とモリス水迷路試験を用いて空間認知機能・長期記憶を評価した。

③ 分子機構の解明

- 細胞老化関連分泌 (SASP) 現象によるミクログリアの活性化
3ヶ月齢の血管内皮細胞特異的老化マウス及び野生型マウス (C57B1/6) より脳を摘出し、MACS®テクノロジーを用いて、脳血管内皮細胞を単離し、培養した。野生型マウス (C57B1/6) より単離したミクログリアを単離した脳血管内皮細胞の培養上清を用いて 48 時間培養し、培養後のミクログリアからキットを用いて mRNA を抽出した。real-time PCR 法を用いて遺伝子発現を解析した。

3 研究成果

① 血管内皮細胞老化が脳の老化や認知機能障害を生じうるか

- 血管内皮細胞特異的老化マウスにおける脳血管内皮細胞の老化
血管内皮細胞特異的老化マウス (Tg, 3ヶ月齢) より単離した脳血管内皮細胞では、野生型マウス (C57B1/6, WT, 3ヶ月齢) より単離した脳血管内皮細胞に比べて、老化マーカー (p16、p21)、単球接着分子 (VCAM-1、ICAM-1)、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)、ケモカイン (CCL-2) の mRNA 発現が増加していた (図 1)。この結果から、血管内皮細胞特異的老化マウスでは、すでに 3ヶ月齢の若年齢時より、血管内皮細胞老化が促進されていることが明らかになった。

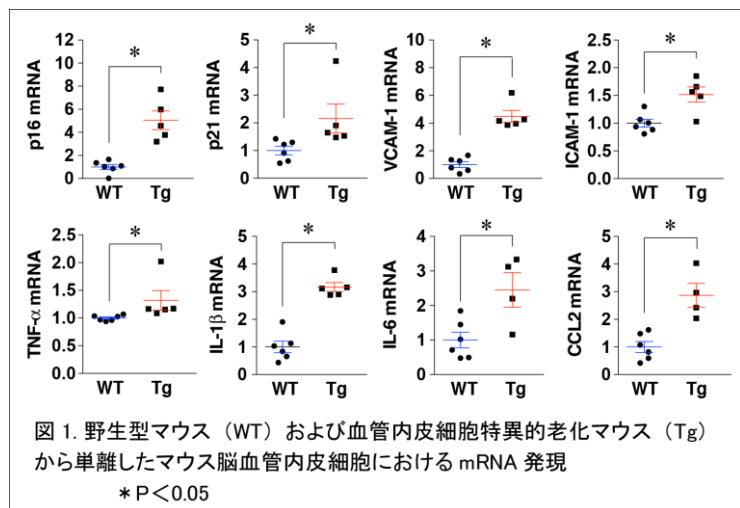


図 1. 野生型マウス (WT) および血管内皮細胞特異的老化マウス (Tg) から単離したマウス脳血管内皮細胞における mRNA 発現
* P < 0.05

- 血管内皮細胞特異的老化マウスにおけるグリア細胞の活性化
血管内皮細胞特異的老化マウス (Tg, 3ヶ月齢) より単離したミクログリアでは、野生型マウス (WT, 3ヶ月齢) より単離したミクログリアに比べて、老化マーカー (p16、p21) や抗炎症性ミクログリア (M2) マーカー (IL-10、arginase-1) の mRNA 発現は増加していなかったが、炎症性ミク

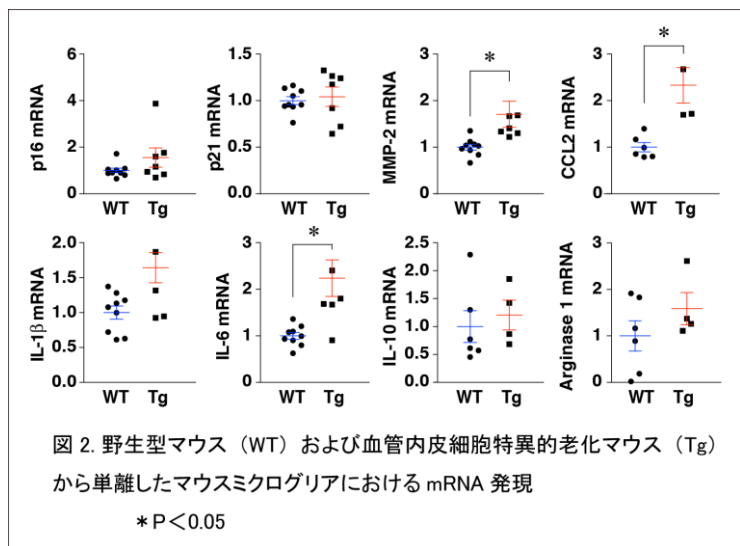


図 2. 野生型マウス (WT) および血管内皮細胞特異的老化マウス (Tg) から単離したマウスミクログリアにおける mRNA 発現
* P < 0.05

グリア (M1) マーカー (CCL-2, IL-6) の mRNA 発現が増加していた (図 2)。また、アストロサイトのマーカーである GFAP に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、突起が肥大化し、GFAP による染色性が亢進していた。これらの結果から、血管内皮特異的の老化マウスでは、グリア細胞の活性化が生じていることが明らかになった。

② 血管内皮細胞老化が AD の病態形成を促進するか

- 血管内皮細胞特異的の老化 AD モデルマウスの脳組織における β アミロイドおよびリン酸化 Tau 蛋白の沈着

6 ヶ月齢の血管内皮細胞特異的の老化 AD モデルマウス及び AD モデルマウスから脳組織切片を作製し、 β アミロイドおよびリン酸化 Tau 蛋白に対する特異的の抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。血管内皮細胞特異的の老化 AD モデルマウスでは、AD モデルマウスに比べて、 β アミロイドおよびリン酸化 Tau 蛋白の沈着が促進されていた。

- 血管内皮細胞特異的の老化 AD モデルマウスにおける短期記憶と長期記憶の評価

6、9、12 ヶ月齢の血管内皮細胞特異的の老化 AD モデルマウス (APP/PS1-TRF2-DN)、AD モデルマウス (APP/PS1)、血管内皮細胞特異的の老化マウス (TRF2-DN)、野生型マウス

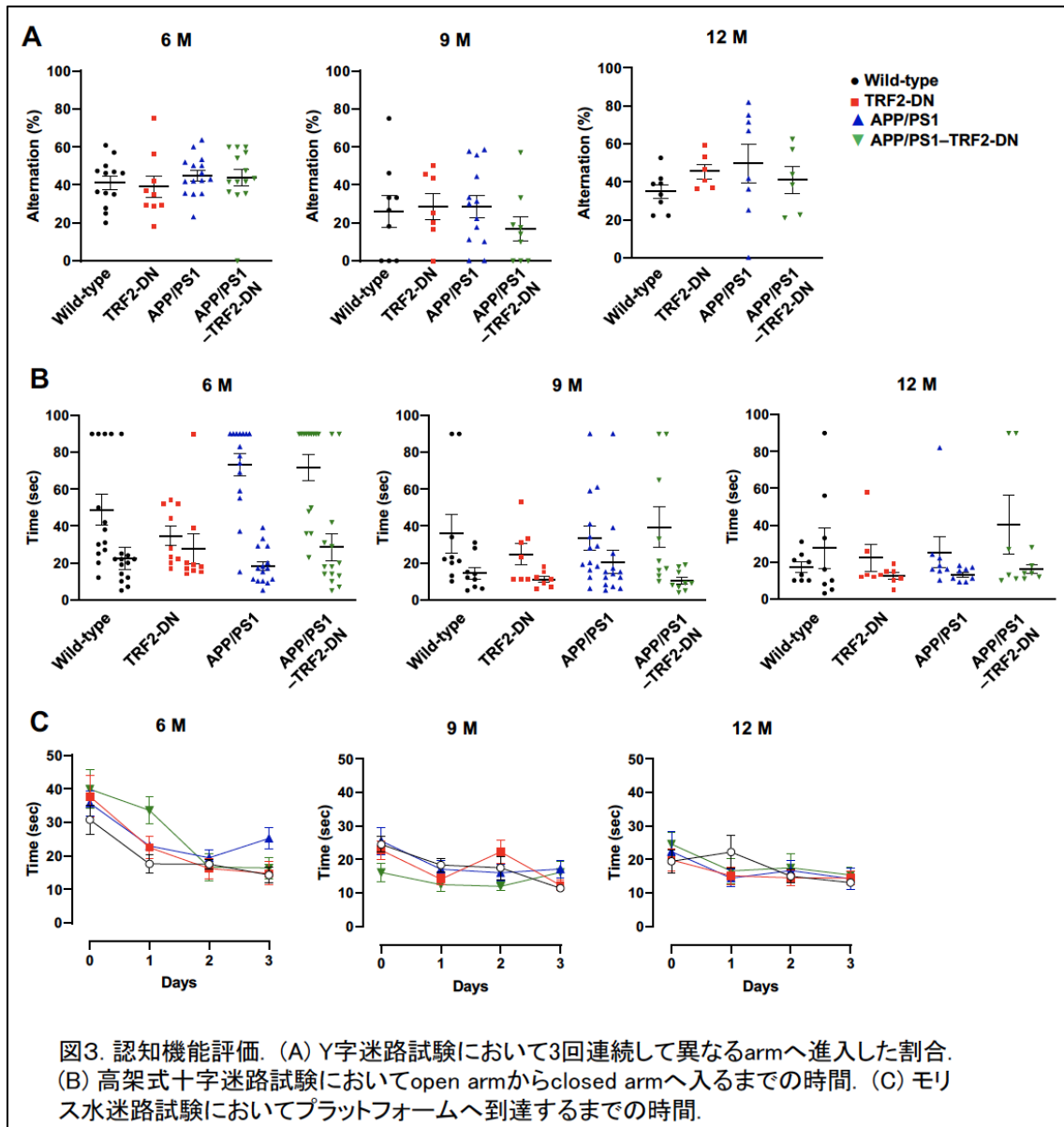


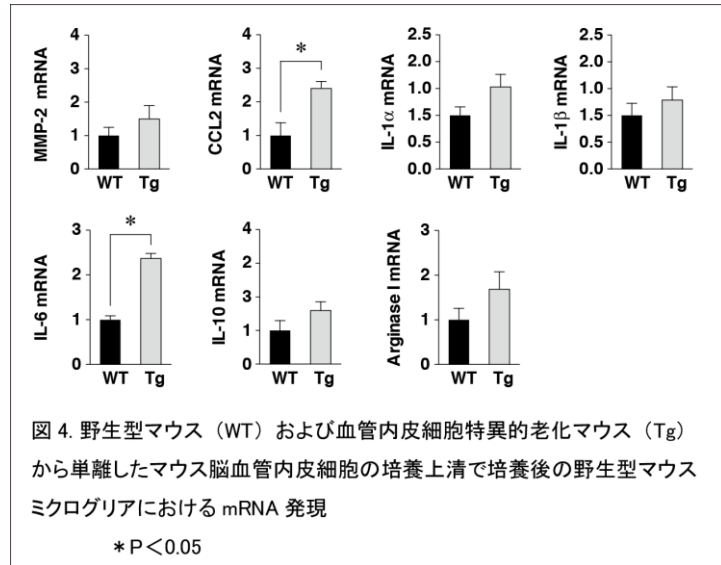
図3. 認知機能評価。(A) Y字迷路試験において3回連続して異なるarmへ進入した割合。(B) 高架式十字迷路試験においてopen armからclosed armへ入るまでの時間。(C) モリス水迷路試験においてプラットフォームへ到達するまでの時間。

ス (Wild-type) を用いて認知機能を評価した。Y 字迷路試験において 3 回連続して異なる arm へ進入した割合 (図 3A)、高架式十字迷路試験において open arm から closed arm へ入るまでの時間 (図 3B)、モリス水迷路試験においてプラットフォームへ到達するまでの時間 (図 3C) を測定した。検討した月齢及び個体数のマウスの間では、有意な差は見られなかった。

③ 分子機構の解明

● SASP 現象によるミクログリアの活性化

野生型マウスから調製した培養ミクログリアを、血管内皮細胞特異的の老化マウス (Tg、3 ヶ月齢) より単離した脳血管内皮細胞の培養上清で培養すると、野生型マウス (WT、3 ヶ月齢) より単離した脳血管内皮細胞の培養上清で培養した場合に比べて、脳から単離されたミクログリアの場合と同様に、CCL-2、IL-6 の mRNA 発現が増加した (図 4)。この結果から、血管内皮細胞特異的の老化マウスにおけるミクログリアの活性化には、老化した脳血管内皮細胞からの SASP 現象が関与していると考えられた。



4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究結果から、マウスにおいて、血管内皮細胞老化は SASP 現象によりグリア細胞の活性化を惹起し、 β アミロイドおよびリン酸化 Tau 蛋白の沈着を促進すると考えられた。しかしながら、認知機能の評価ではマウス個体によるばらつきが大きく、血管内皮細胞老化が β アミロイドおよびリン酸化 Tau 蛋白の沈着を促進した結果、認知機能の低下が促進されることは見出せなかった。AD の病態形成に果たす血管内皮細胞老化を含む血管老化の役割を解明した研究は未だ存在しないことから、今後も本研究を継続することで個体数を増加して解析を進め、血管内皮細胞老化が AD の病態形成に果たす役割を解明したい。将来的には、本研究を発展させ、血管内皮細胞老化が AD の病態形成を促進する機構を治療標的とする薬剤の探索が可能な評価系を構築し、効果的な AD 治療薬の創薬へと発展させたい。そうすれば、健康寿命の延伸に多大な貢献をもたらすと同時に、医療産業に絶大な波及効果をもたらすことが期待される。