57　酸化ストレスによるミクログリア活性化機構の解明	中別府　雄作

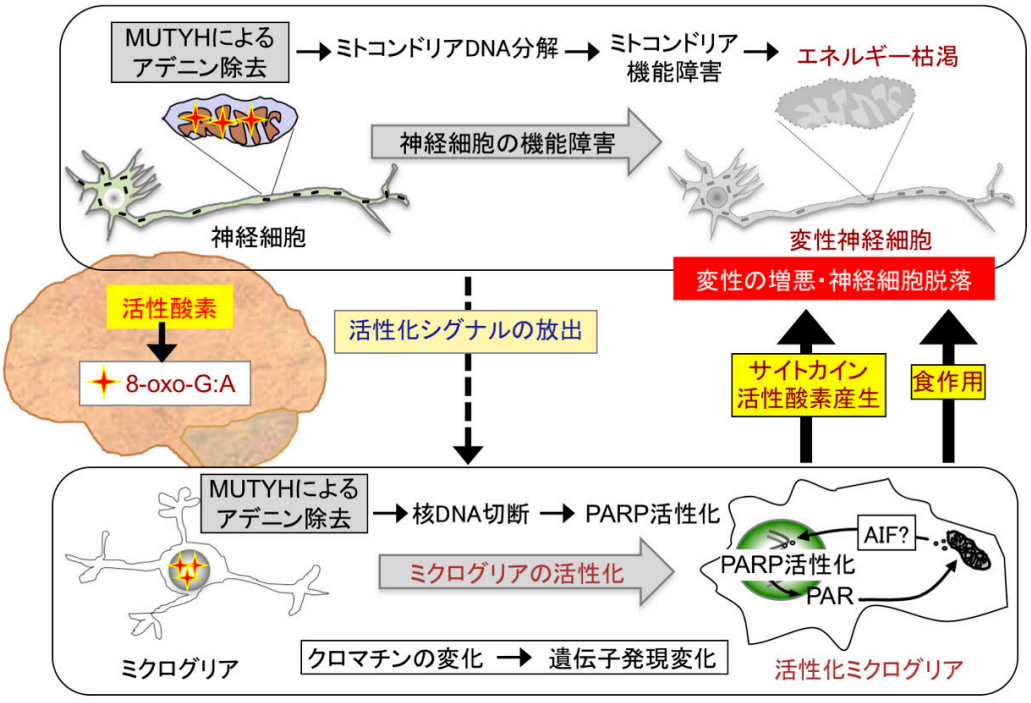
【目的】アルツハイマー病（AD）をはじめとする様々な神経変性疾患の発症と進行においてミクログリアの活性化が神経炎症応答の 1 つとして注目されている。酸化ストレスがミクログリアの活性化に重要な役割を果たすことから、レドックス制御を受ける AP-1 や NF-κB によるミクログリア特異的な遺伝子発現の誘導機構に注目した研究が展開されている。しかし、これまでの研究ではミクログリアの活性化に至る酸化ストレスに由来するシグナルは不明であり、ブラックボックスであった。我々は、炎症反応により生成される活性酸素がミクログリアのゲノム DNA の酸化を介して、ミクログリアの活性化を引き起こすという仮説を提唱している。

本研究では、この仮説を証明する目的で、活性酸素に由来するシグナル候補として DNA 中に蓄積した酸化塩基「8-オキソグアニン」に注目し、そのミクログリアの活性化への関与と活性化の分子機構を解明することを目指した。

【方法】本研究では、8-オキソグアニン（8-oxoG）のゲノム DNA 中への蓄積がミクログリアの活性化にどのような影響を及ぼすのか、8-oxoG のゲノム DNA 蓄積を抑制する 2 つの遺伝子（MTH1、OGG1）の欠損をアルツハイマー病モデルマウスに導入し、個体レベルでの行動・病態解析、脳組織の分子病理学的な解析を中心に行った。

【結果】ヒト由来の *APP*^{Swe} と *MAPT*^{P301L} トランスジーン、マウスの *Psen1*^{M146V} 変異を持つトリプルトランスジェニック AD モデル（3xTg-AD）マウスに MTH1 と OGG1 の二重欠損を導入すると、生後 4〜5 ヶ月齢で短期および長期記憶保持能の低下を認め、さらに顕著な学習能の低下を示した。また、ミクログリアの核ゲノム DNA 中の 8-oxoG の蓄積が顕著に増加し、その結果ポリ ADP リボース・ポリメラーゼ（PARP : poly［ADP ribose］polymerase）の活性化、核内タンパク質のポリ ADP リボシル化（PAR : poly ADP-ribosylation）をともなって、ミクログリアの慢性的な活性化と神経細胞の脱落を引き起こし、AD 病態の悪化を加速するということが明らかになった。ミクログリアの阻害剤、ミノサイクリンの長期投与によりミクログリアの活性化を抑制すると、8-oxoG の蓄積、核内タンパク質のポリ ADP リボシル化（PAR）が抑制され、神経細胞の脱落と認知機能の障害も改善した。

8-オキソグアニンのゲノム DNA 蓄積によるミクログリアの活性化と神経変性のモデル



57. 酸化ストレスによるミクログリア活性化機構の解明

中別府　雄作

九州大学 生体防御医学研究所 個体機能制御学部門 脳機能制御学分野

Key words：神経炎症応答，ミクログリア，活性酸素，8-オキソグアニン，DNA 修復

緒　言

細胞のゲノム DNA に酸化損傷が蓄積すると、突然変異誘発およびプログラムされた細胞死を引き起こすことが知られている。前者は発がんの原因となり、後者はしばしば変性疾患を引き起こす。加齢とともに発症頻度が上昇する神経変性疾患であるアルツハイマー病（AD）やパーキンソン病の発症に酸化ストレスが関与することが明らかにされてきた。AD は、病理学的にアミロイド斑（Aβプラーク）、神経原線維変化、神経細胞の脱落を特徴とし、認知症の 70%を占める。細胞内のアミロイドβ（Aβ）の蓄積は、ミトコンドリアの機能不全および活性酸素種（ROS）の生成を誘導することが知られている。一方で、老化に伴うミトコンドリアからの ROS 生成の増加は Aβの生成を亢進しその蓄積を加速することから、AD の発症と進展には ROS 生成と Aβ蓄積の悪循環が大きく関わっている。このような状況が継続すると、ミクログリアの活性化を特徴とする神経炎症応答が引き起こされ、神経細胞の脱落を引き起こすと考えられる［1］。

我々は、薬物性ハンチントン病モデルマウスと網膜色素変性症のモデルマウスを用いた研究から、神経細胞の変性脱落にともなって顕著になる活性化ミクログリアの核ゲノム DNA 中にグアニン塩基が酸化されて生じる 8-オキソグアニン（8-oxoG）が高度に蓄積することを見出した［2，3］。様々なタイプの核酸の酸化損傷の中で、グアニンの酸化体である 8-oxoG は、ヌクレオチドプールや DNA、RNA 中における主要な酸化損傷の 1 つである。DNA 中の 8-oxoG は、アデニンおよびシトシンと塩基対合を形成できるので、突然変異や細胞の機能障害などを引き起こす。このような 8-oxoG による悪影響から細胞を防御するために、ヒトをはじめとする哺乳動物細胞は DNA 中への 8-oxoG の蓄積を最小限に抑える 3 つの異なる防御酵素を備えている。MTH1 は、酸化されたデオキシグアノシン三リン酸（8-oxo-dGTP）を一リン酸型（8-oxo-dGMP）に加水分解し、8-oxo-dGTP の DNA への取り込みを回避する。 8-oxoG DNA グリコシラーゼ-1（OGG1）は、DNA 中のシトシンと対合した 8-oxoG を切除し、8-oxoG の除去修復を開始する。MUTYH は、DNA 中の 8-oxoG に誤って対合したアデニンを切除し、除去修復により 8-oxoG：シトシンの対合を維持する。生じた 8-oxoG：シトシンの対合から OGG1 が 8-oxoG を切除し、除去することで DNA 中の 8-oxoG の蓄積が最小限に抑えられる（図 1）［1］。

8-oxoG は AD 患者の脳に高度に蓄積することが報告されている。一方で我々は、MTH1 および OGG1 の発現が AD 脳で有意に減少することを報告している。さらに、OGG1 の DNA 修復活性の喪失または低下を引き起こす *OGG1* 遺伝子の変異が、AD 患者において見出されている［1］。MTH1 あるいは OGG1 欠損マウスは、脳内の酸化ストレスの亢進にともない高度の神経変性を引き起こすことから、我々は AD モデルマウスに MTH と OGG1 の二重欠損を導入し、ミクログリアの活性化と神経細胞脱落に及ぼす影響を解析するとともに、認知機能への影響を解析した。

方法および結果

1. ADモデルマウスにおけるMTH1とOGG1の欠損は、Aβ蓄積の増加をともない認知機能の低下を加速させる

ヒト由来の *APP*^{Swe} と *MAPT*^{P301L} トランスジーン、マウスの *Psen1*^{M146V} 変異を持つトリプルトランスジェニックADモデル（3xTg-AD）マウスにMTH1とOGG1の二重欠損を導入した。3xTg-ADマウスは、生後6ヵ月齢以降にモリス水迷路試験における短期記憶保持能および学習能の低下を示すことが報告されている［4］。MTH1とOGG1を欠損した3xTg-ADマウス（3xTg-AD/MO-DKO）は、生後4〜5ヶ月齢ですでに短期および長期記憶保持能の低下を認め、さらに顕著な学習能の低下を示した（図2）。

次に、MTH1とOGG1の欠損がAβの蓄積を加速するかどうかをヒトAβ-N末端特異的モノクローナル抗体（82E1）を用いたAβの免疫染色により検討した。3xTg-AD/MO-DKOマウスの脳では、特に大脳皮質の第4から第5層および海馬のCA1、CA2およびCA3領域で細胞内のAβ蓄積量が3xTg-ADマウス脳と比較して顕著に増加していた。なお、いずれのマウスにおいてもAβプラークは認められなかった。

8-oxoGの蓄積を免疫染色により検討したところ、特に3xTg-AD/MO-DKOマウスにおいてAβ蓄積量が顕著に増加していた脳の領域で核ゲノムDNA中に8-oxoGが高度に蓄積していることが明らかになった（図3）。また、これらの脳領域では神経細胞の脱落も観察された。

2. 3xTg-AD/MO-DKOマウスの脳内ミクログリアにおける8-オキソグアニン蓄積の増加とミクログリアの活性化

酸化ストレスにさらされた脳では、損傷を受けた神経細胞はミトコンドリアDNAに8-oxoGを蓄積し、活性化ミクログリアは主に核DNAに8-oxoGを蓄積する。前者はミトコンドリア機能障害およびカルパイン依存性神経細胞死を引き起こし、後者はPARPの活性化とミクログリオーシスの悪化をもたらす可能性が示唆されている［1〜3］。3xTg-AD/MO-DKO脳におけるミトコンドリア機能障害の程度をシトクロムcオキシダーゼ（COX）活性染色により調べたところ、3xTg-AD脳と比較して3xTg-AD/MO-DKOマウスの大脳皮質または海馬のいずれにおいてもCOX活性の低下は認められなかった。すなわち、ミトコンドリア機能障害はMTH1とOGG1の二重欠損によって増悪されないことを示している。対照的に、活性化ミクログリアのマーカーであるCD68を免疫染色により検出したところ、大脳皮質と海馬におけるCD68陽性の活性化ミクログリアの顕著な増加が観察された（図4）。また、8-oxoGは、3xTg-AD/MO-DKOマウスの大脳皮質におけるミクログリアの核ゲノムDNAのみに蓄積していることが確認された。

これらの結果は、3xTg-AD/MO-DKO脳におけるMTH1とOGG1の二重欠損がミクログリアの核ゲノムDNAにおける8-oxoGの蓄積を増加させ、その結果ミクログリアを慢性的に活性化し、神経細胞脱落を引き起こすことを示している。

3. ミクログリア活性化の阻害はミクログリアにおける8-オキソグアニンの核内蓄積とポリADPリボース・ポリメラーゼの活性化を抑制し、神経変性を改善する

ミクログリアの活性化が3xTg-AD/MO-DKO脳で観察された神経細胞の脱落にどのように関与するか調べるためにミクログリア活性化を阻害するミノサイクリンを3週間、3xTg-AD/MO-DKOマウスに対して飲水投与した。ミノサイクリン投与後の3xTg-AD/MO-DKOマウスの大脳皮質と海馬では、ミノサイクリンを投与していないコントロールの3xTg-AD/MO-DKO脳と比べてCD68陽性の活性化ミクログリアが顕著に減少しており、ミクログリアの活性化がミノサイクリンによって効果的に抑制されたことが示された（図5）。3xTg-AD/MO-DKOマウスにおける大脳皮質および海馬の核ゲノムDNAに蓄積した8-oxoGのレベルもミノサイクリンの投与後に著しく低下した（図6）。

ミノサイクリン投与は、3xTg-AD/MO-DKOマウスの大脳皮質および海馬における変性神経細胞の出現を有意に抑制し、短期記憶保持能の障害も部分的ではあるが回復させた。ミノサイクリンを投与していないコントロールの3xTg-AD/MO-DKO脳では、ポリADPリボース・ポリメラーゼ（PARP）の産物であるポリADPリボースが付加されたタンパク質がミクログリアの核内に高度に蓄積されていたが、ミノサイクリン投与によりPAR陽性のミクログリアが顕著に減少していた。3xTg-ADの大脳皮質においてはほとんどPAR陽性のミクログリアは検出されなかったことから、ミクログリアにおけるPARPの活性化はMTH1とOGG1の二重欠損、すなわち核ゲノムDNA中への8-oxoGの蓄積に依存することが明らかになった。

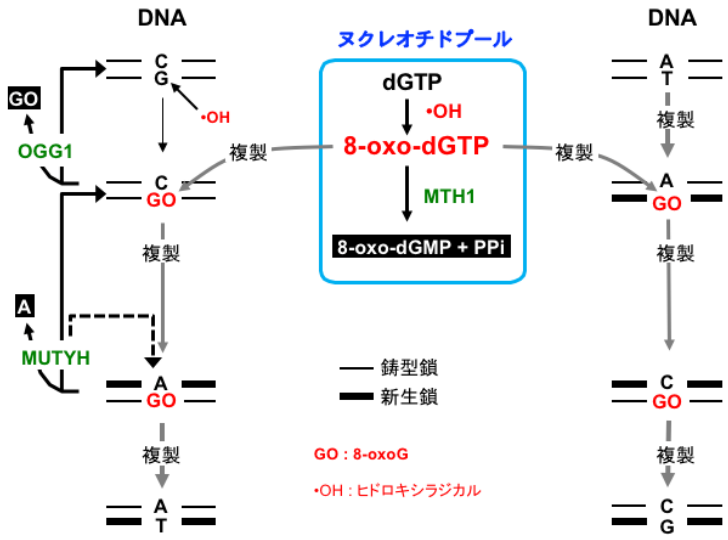


図 1. 哺乳動物細胞における 8-オキソグアニンのゲノム DNA 蓄積を抑えるメカニズム

ヌクレオチドプールに生じた 8-oxo-dGTP の DNA への取り込み、または DNA 中のグアニンの直接酸化によって DNA 中に 8–oxoG（GO）が蓄積する。MTH1 は 8-oxo-dGTP を 8-oxo-dGMP およびピロリン酸（PPi）に加水分解し、DNA への取り込みを防ぐ。 OGG1 は 8–oxoG を切り出して除去修復する。MUTYH は鋳型鎖の 8–oxoG に対して新生鎖に挿入されたアデニンを切り出し、除去修復を開始する。修復合成で 8–oxoG に対してシトシンが挿入されると、OGG1 がシトシンに対合した 8–oxoG を切り出して除去修復する。しかしながら、アデニンが挿入されると（破線）、MUTYH がアデニンを再び切り出し、除去修復が繰り返される［1］。

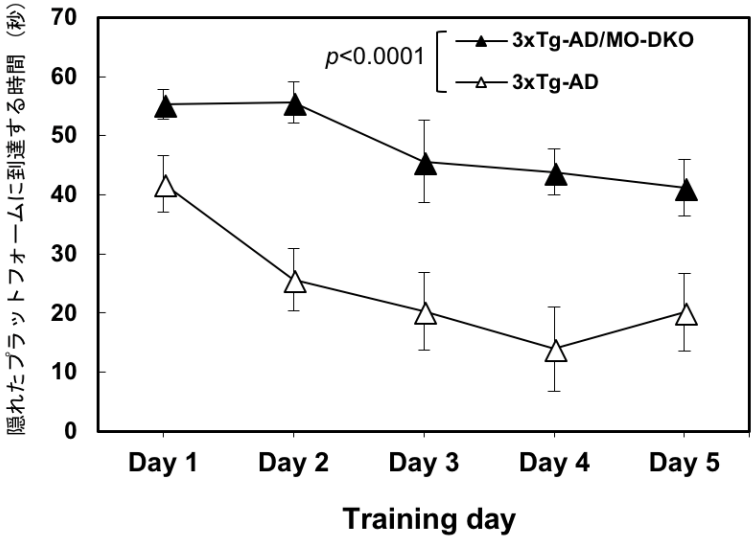


図 2. AD モデルマウスにおける MTH1 と OGG1 の欠損は、認知機能の低下を加速する

3xTg-AD マウスは、生後 6 ヵ月齢以降にモリス水迷路試験における学習能の低下を示すことが報告されている［4］。MTH1 と OGG1 を欠損した 3xTg-AD マウス（3xTg-AD/MO-DKO）は、生後 4〜5 ヶ月齢で顕著な学習能の低下を示した。Repeated Measure ANOVA の解析結果を示す。

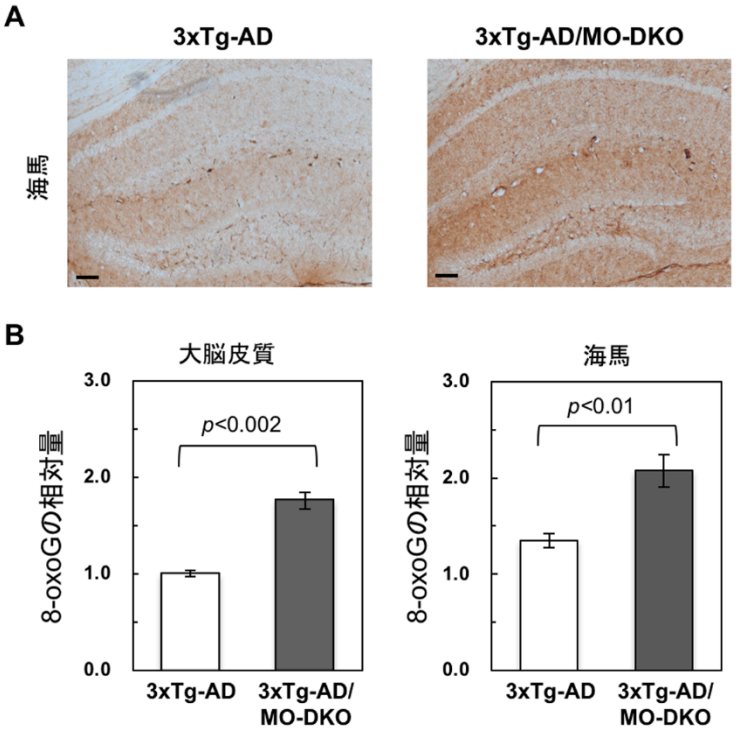


図 3. 3xTg-AD/MO-DKO マウス脳内のミクログリアにおける 8-オキソグアニン蓄積の増加

A. 8-oxoG の蓄積を免疫染色により検討したところ、特に 3xTg-AD/MO-DKO マウス（生後 4〜5 ヶ月齢）において海馬の CA1、CA2 および CA3 領域で核ゲノム DNA 中に蓄積していることが明らかになった。

B. 8-oxoG の蓄積を免疫染色により定量的に検討したところ、特に 3xTg-AD/MO-DKO マウスにおいて大脳皮質と海馬で顕著に増加していた。T-test による解析結果を示す。スケールバー = 100 μm。

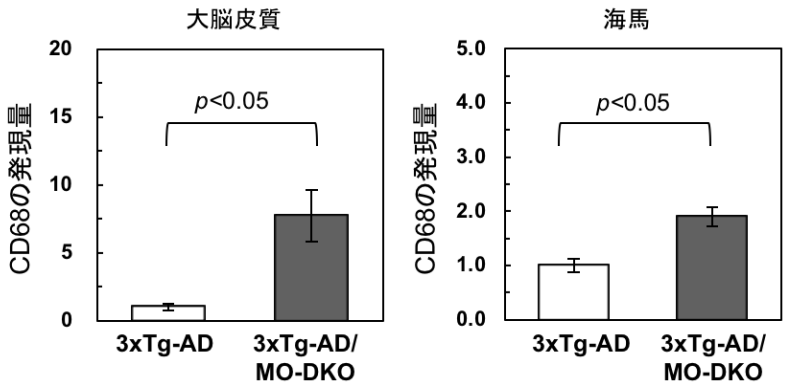


図 4. 3xTg-AD/MO-DKO マウスにおける脳内ミクログリア活性化の亢進

3xTg-AD/MO-DKO マウス（生後 4〜5 ヶ月齢）において活性化ミクログリアのマーカーである CD68 を免疫染色により定量化したところ、大脳皮質と海馬における CD68 陽性の活性化ミクログリアの顕著な増加が観察された。T-test による解析結果を示す。

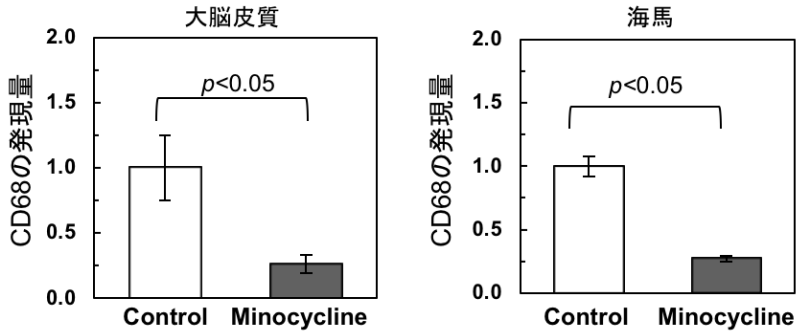


図 5. ミノサイクリンは 3xTg-AD/MO-DKO マウス脳内のミクログリア活性化を抑制する
ミクログリアの阻害剤であるミノサイクリン（Minocycline）を 3 週間、3xTg-AD/MO-DKO マウスに対して飲水投与した。ミノサイクリン投与後の 3xTg-AD/MO-DKO マウスの大脳皮質と海馬では、ミノサイクリンを投与していないコントロールの 3xTg-AD/MO-DKO 脳と比べて CD68 陽性の活性化ミクログリアが顕著に減少していた。T-test による解析結果を示す。

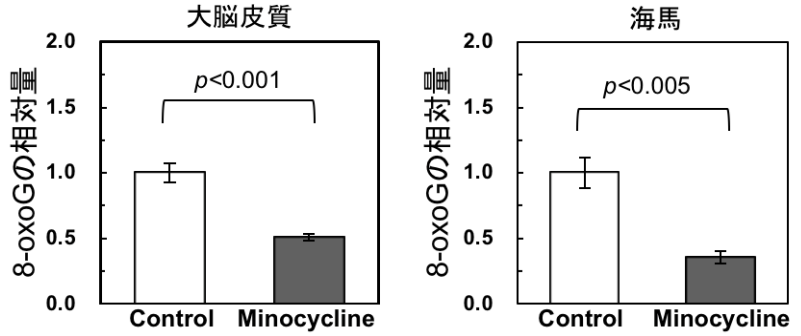


図 6. ミノサイクリンは 3xTg-AD/MO-DKO マウス脳の核ゲノム DNA への 8-オキソグアニンの蓄積を抑制する
ミノサイクリン投与後の 3xTg-AD/MO-DKO マウスの大脳皮質と海馬では、ミノサイクリンを投与していないコントロールの 3xTg-AD/MO-DKO 脳と比べて核ゲノム DNA への 8-oxoG の蓄積が顕著に減少していた。T-test による解析結果を示す。

考　察

本研究の主要な結論は、3xTg-AD モデルマウスに MTH1 と OGG1 の二重欠損を導入すると、ミクログリアの核ゲノム DNA 中の 8-oxoG の蓄積が顕著に増加し、その結果 PARP の活性化、核内タンパク質のポリ ADP リボシル化をともなって、ミクログリアの慢性的な活性化と神経細胞の脱落を引き起こし、AD 病態の悪化を加速するということである。

活性酸素は、さまざまな細胞構成分子を酸化することで細胞機能を障害するが、我々は核酸の酸化体に注目してその細胞内蓄積がもたらす細胞機能障害として神経変性の発症と進展の機序に注目し、「活性酸素によるゲノム損傷に起因する生体障害とその防御機構」の解明を進めてきた。核酸塩基の中ではグアニンが最も酸化されやすく、活性酸素にさらされた細胞内では、DNA とその前駆体ヌクレオチドのプール中に 8-oxoG が蓄積する。8-oxoG はシトシンに加えてアデニンとも対合するために、ゲノム DNA 中に蓄積すると突然変異や細胞障害の原因となる。我々は、8-oxoG のゲノム DNA 蓄積を抑制する 3 つの酵素（MTH1、OGG1、MUTYH）に注目し、8-oxoG がどのような機序で神経変性の発症と進展に関与するかを追求してきた。

DNA 中のシトシンと対合した 8-oxoG は、8-oxoG DNA グリコシラーゼ活性を持つ OGG1 により除去修復される。DNA 複製中に鋳型鎖の 8-oxoG に対してアデニンが挿入され「8-oxoG : アデニン」対合が生じると、アデニン DNA グリコシラーゼ活性を持つ MUTYH により「8-oxoG : アデニン」のアデニンが除去修復される。MUTYH によりアデニンが除去されても鋳型鎖の 8-oxoG に対して修復 DNA 合成の過程でアデニンが再度挿入される可能性が高いことから、 MUTYH による除去修復はシトシンが挿入されるまで繰り返され、新生鎖の一本鎖 DNA 切断が継続的に蓄積する（図 1)。線維芽細胞などでは核ゲノム DNA に過剰の一本鎖 DNA 切断が蓄積すると PARP が活性化され、核内タンパク質のポリ ADP リボシル化（PAR）とアポトーシス誘導因子（AIF）の核移行をともなって、プログラム細胞死が誘導される［1，5］。

本研究では、AD モデルマウスの脳で亢進している酸化ストレスは、MTH1 と OGG1 の二重欠損によりミクログリアの活性化を伴って神経細胞脱落を引き起こすことが明らかになった。MTH1 と OGG1 の二重欠損下では、MUTYH がドミナントに作用することから、ミクログリアの核ゲノム DNA に高度に新生鎖の一本鎖 DNA 切断が蓄積し、その結果 PARP の活性化とポリ ADP リボシル化 (PAR) の亢進を引き起こしたと考えられる。AD モデルマウスの脳では、8-oxoG が核ゲノム DNA に蓄積したミクログリアにおいて、プログラム細胞死ではなくミクログリアの活性化が引き起こされることが明らかになった。このモデルにおいて、AIF の核内移行などプログラム細胞死に関する分子の挙動を詳細に調べる必要がある。現在、MUTYH の寄与を明らかにするために、AD モデルマウスに OGG1 単独、あるいは OGG1 と MUTYH の二重欠損を導入したマウスを樹立し、解析を継続している。MUTYH の欠損によりミクログリアの活性化が抑えられ、結果として神経細胞脱落の抑制が期待される。このような結果は、AD の新たな治療標的としての MUTYH の意義を明らかにするものと位置付けられる。

我々は、野生型マウスや MUTYH 欠損マウスの新生仔マウスの脳からミクログリアを単離培養し、酸化ストレス負荷によるミクログリアの活性化と細胞死についても検討を進めてきたが、培養ミクログリアに酸化ストレスを負荷すると細胞死を強く誘導することから、培養ミクログリアの活性化を検討するのは困難であることがわかった。酸化ストレス負荷に用いる薬剤と負荷の条件検討が必要である。また、ミクログリアの活性化を引き起こす核ゲノム DNA に蓄積した 8-oxoG の起源についても詳細に検討する必要がある。MTH1 は活性酸素のヌクレオチドプールへの作用によって再生される 8-oxo-dGTP を分解排除するが、OGG1 は 8-oxo-dGTP の DNA 複製時の取り込みに起因する 8-oxoG に加えて、活性酸素が DNA 中のグアニンに直接作用して生成される 8-oxoG も除去修復する。この問題にアプローチするために MTH1 及び OGG1 の単独欠損や過剰発現 AD モデルマウスを用いた解析を計画している。さらに、活性化ミクログリアではどのようなメカニズムで炎症関連の遺伝子の発現が制御されるのかを明らかにするには、マウス脳から単離したミクログリアを用いて直接活性化クロマチン領域を同定し、トランスクリプトームの解析を行う必要がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学生体防御医学研究所脳機能制御学分野の岡 素雅子（現所属、福岡歯科大学先端科学研究センター）である。

文　献

1） Nakabeppu Y. Neurodegeneration caused by accumulation of an oxidized base lesion, 8-oxoguanine, in nuclear and mitochondrial DNA: from animal models to human diseases. In: Wilson III DM, editor. The Base Excision Repair Pathway: Molecular Mechanisms and Role in Disease Development and Therapeutic Design World Scientific Publishing Co., Pte. Ltd. Syngapore; 2017. p. 523-56. DOI: 10.1142/9789814719735_0015

2） Sheng Z, Oka S, Tsuchimoto D, Abolhassani N, Nomaru H, Sakumi K, et al. 8-Oxoguanine causes neurodegeneration during MUTYH-mediated DNA base excision repair. The Journal of clinical investigation. 2012;122(12):4344-61. Epub 2012 Nov 13. PMID: 23143307 DOI: 10.1172/JCI65053.

3) Nakatake S, Murakami Y, Ikeda Y, Morioka N, Tachibana T, Fujiwara K, et al. MUTYH promotes oxidative microglial activation and inherited retinal degeneration. JCI Insight. 2016;1(15):e87781. 2016 Sep 22, PMID: 27699246 DOI: 10.1172/jci.insight.87781.
4) Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kayed R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Aβ and synaptic dysfunction. Neuron. 2003;39(3):409-21. Epub 2003 Aug 05. PubMed PMID: 12895417.
5) Oka S, Ohno M, Tsuchimoto D, Sakumi K, Furuichi M, Nakabeppu Y. Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs. EMBO J. 2008;27(2):421-32. Epub 2008 Jan 12. PMID: 18188152 DOI: 10.1038/sj.emboj.7601975.