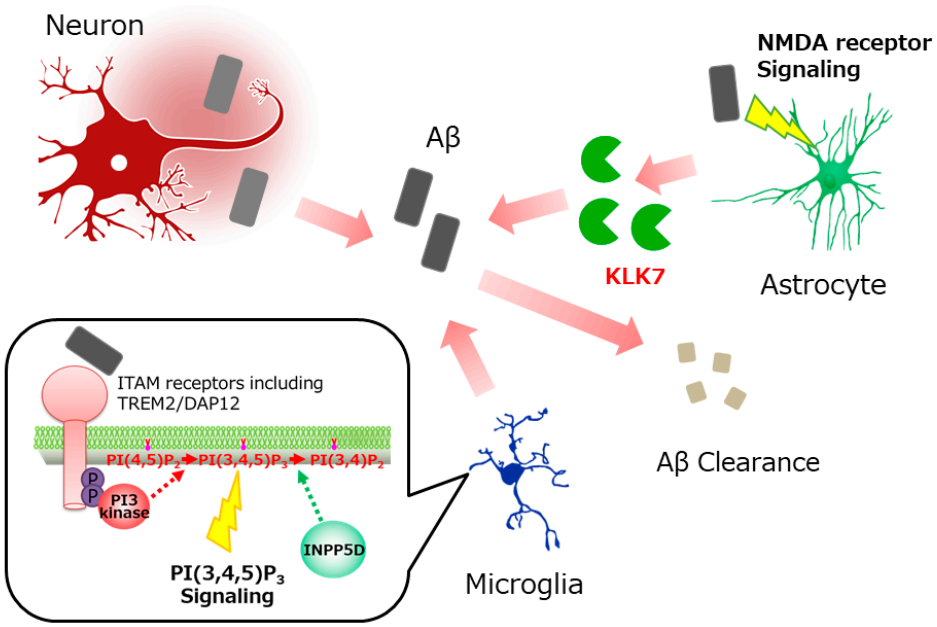
95　認知症発症機構における慢性脳内炎症の解明と創薬研究	富田　泰輔

【目的】アルツハイマー病を始めとする神経変性疾患における病理学的特徴として、アミロイドβ（Aβ）やタウなどが高度に線維化した凝集体の蓄積に加え、主にグリア細胞の活性化に代表される脳内炎症反応が挙げられる。遺伝学的および病理学的な解析からこの蓄積病態によって惹起される慢性脳内炎症が認知症発症のタイミングと進行速度を決定づけていると考えられているが、その詳細な分子メカニズムは不明である。そこで本課題においては、認知症発症機構における異常凝集タンパク質に対するグリア細胞における慢性炎症性応答を解析し、その分子・細胞病態の解明を通して、脳内炎症制御法の確立と新規グリア細胞創薬研究を遂行することを目的として研究を行った。

【方法】本課題においては、1. CRISPR/Cas9 システムを利用した、新規グリア細胞炎症性反応分子の Cell based スクリーニング、2. Aβ に呼応して発現変動する新規アストロサイト炎症性プロテアーゼ KLK7 の活性制御法の開発、2 つを柱項目とし、*in vitro*、*in vivo* において研究を進めた。

【結果】1. については、蛍光標識された Aβ を用いてその取り込み量を FACS によって定量的に評価する系を確立し、全ゲノムを対象とした guide RNA ライブラリーを用いて様々なゲノム編集が行われた細胞集団において異常な蛍光強度を示す細胞集団をソートし、標的遺伝子を次世代シーケンサーによって解析した。得られた遺伝子群の情報から over-representation analysis、インタラクトーム解析により、AD の遺伝学的リスク因子である *Inpp5d* 及び *Cd2ap* がスクリーニングで得られた遺伝子群の近傍に同定され、これらの遺伝子が関与する、ミクログリアにおける PI（3、4、5）P3 シグナリングが Aβ 取り込みに関与していることが示唆された。2. については、我々が新規 Aβ 分解酵素として同定した KLK7 の発現量を上昇させる化合物を初代培養アストロサイトにおいて探索し、アルツハイマー病治療薬として認可されている、NMDA 受容体拮抗薬であるメマンチンに *Klk7* 発現上昇能が認められた。またアルツハイマー病モデルマウスにおいて、メマンチン投与によりアミロイド斑の減少が確認された。すなわち、アストロサイトにおける NMDA 受容体シグナル経路の抑制が KLK7 の発現量を上昇させ、抗 Aβ 作用をもたらすと考えられた。

Aβ によって惹起される慢性炎症反応の分子機構



95. 認知症発症機構における慢性脳内炎症の解明と創薬研究

富田　泰輔

東京大学 大学院薬学系研究科 機能病態学教室

Key words : 認知症，アストロサイト，ミクログリア，慢性炎症，アミロイド

緒　言

アルツハイマー病（AD）を初めとする認知症患者の神経変性疾患における病理学的特徴の一つとして、高度に線維化したタンパク質凝集体の形成および沈着があげられる。その構成タンパク質としては、それぞれアミロイド β（Aβ）およびタウ、α-シヌクレイン、TAR DNA-binding protein 43 kDa（TDP-43）など、疾患によって様々であるが、遺伝学的な解析からこれら脳内における凝集体を構成するタンパク質代謝の破綻が認知症発症のトリガーであると考えられている。一方、これら蓄積病理の形成は必ずしも疾病の発症すなわち神経細胞死とは必ずしも一致していない。すなわち、異常タンパク質凝集・蓄積は疾患プロセスに確実に必要なステップであるが、脳に備わっている何らかの機能性維持機構によって認知症発症に至らず、慢性的に蓄積病態が継続することで最終的に神経細胞死が惹起されると想定される。近年のゲノムワイド関連解析などの結果から、蓄積病理の結果生じる脳内炎症反応が慢性的に継続することが、認知症発症のタイミングと進行速度を決定づけていると考えられるようになった。すなわち、神経細胞におけるタンパク質蓄積病態により引き起こされるグリア細胞の変調が中枢神経系における病態プロセスを修飾し、さらには認知症発症を規定していると言える［1］。そこで本研究においては、三大認知症における異常凝集タンパク質に対するグリア細胞における炎症性応答とその分子病態について、1. 新規グリア細胞炎症性反応分子のスクリーニング、2. それらの分子が脳内プロテオスタシスに関与するパスウェイの同定とその活性制御法の開発、を主たる目的として、脳内炎症制御法の確立と新規グリア細胞創薬研究を遂行する。

方法および結果

1. CRISPR/Cas9 システムによる新規グリア細胞炎症性反応分子のスクリーニング

細胞外に存在する凝集タンパク質に呼応する炎症性反応として、貪食系に着目し、細胞内凝集タンパク量を蛍光強度の違いとして検出可能な系を確立し、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術と FACS 及び次世代シーケンサーを利用した Unbiased ゲノムワイドノックアウトスクリーニングを行うこととした。まず初めに、AD 発症関連分子である Aβ を用いて系を確立、解析することとした。Aβ は AD 患者脳において細胞外に蓄積する老人斑の主要構成成分であり、Aβ 蓄積に対してグリア細胞が活性化することが知られている。

Cas9 を恒常的に発現する Neuro2a 細胞に対してレンチウイルスにより全ゲノムを標的とした guide RNA ライブラリーを導入し、様々にゲノム編集された細胞集団を作成した。この編集済みの細胞集団に対し蛍光標識された Aβ を処理し、その取り込みを FACS によって評価することで、異常な蛍光強度を示す細胞集団をソートした（図 1A）。ソートした細胞集団中のゲノムに挿入された gRNA 配列を PCR により増幅し NGS で解析し、Aβ 取り込みが変化した細胞集団における gRNA の出現頻度を評価した（図 1B）。更に同定された標的遺伝子群に対して over-representation analysis（ORA）を行い、Phosphatidyl inositol-3-phosphate binding、Endosome organization、Defense response to gram-negative bacterium、Autophagosome などが Aβ 取り込みに関与するパスウェイとして示唆された。またインタラクトーム解析より、AD の遺伝学的リスク因子であり［2］、ミクログリアに高発現する *Inpp5d* 及び *Cd2ap* がスクリーニングで得られた遺伝子群の近傍に同定された。

また同様の定量的アッセイ系について、AD や前頭側頭葉変性症における神経細胞死と相関が認められる、タウについても検討を行った。Aβ と異なり、タウは細胞内凝集体を形成するが、近年、細胞外に放出されたタウが近傍の細胞に取り込まれて新たな蓄積物の形成を惹起すること、その過程にミクログリアが関与することなどが報告されている［3］。タウの細胞内凝集を定量的に可視化する目的で、FRET（凝集内のタンパクの高度な接近を、異なる蛍光タンパクを付加したタウを共発現させることで検出）、semi-intact cell（細菌毒素による表面膜の孔に対し、不溶性凝集体は通過できないことを利用）、凝集特異プローブ（PBB3 を始めとした凝集特異蛍光プローブによる検出）による検出の検討を行い、前者二つは再現性、S/N 比、FACS 後の生存性についてスクリーニング系の要求を満たさなかったが、PBB3 を用いた系では十分に条件を満たすことが明らかとなった。今後、この系を用いて同様のスクリーニングを行い、細胞外に存在するタウを認識、取り込み、細胞質凝集に至るメカニズムに関わる分子の同定を目指す。

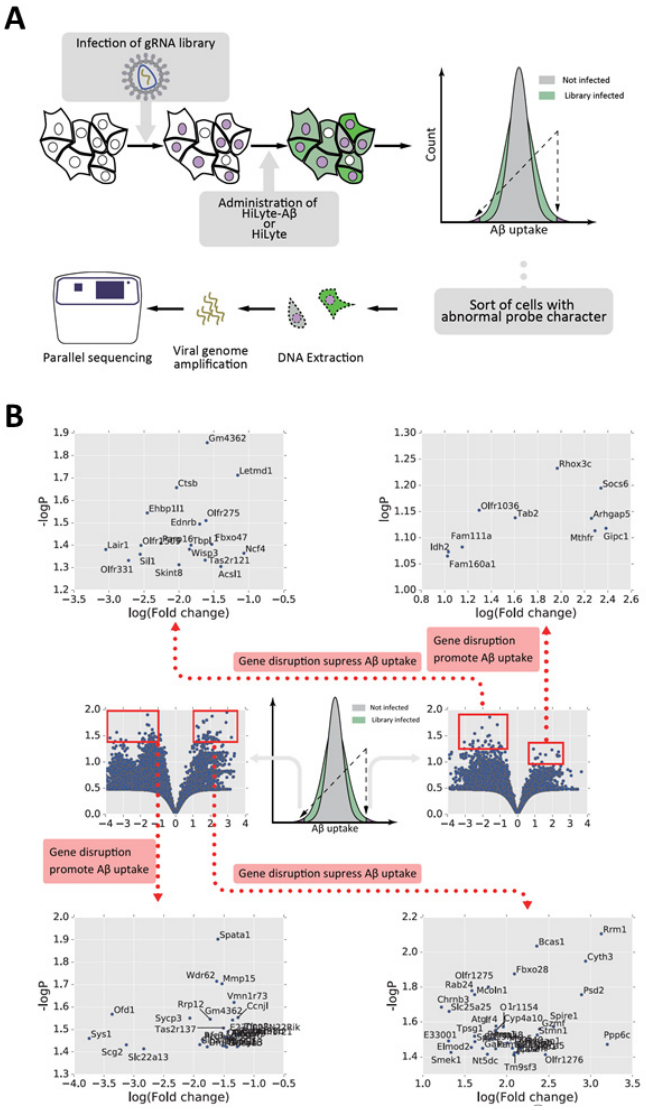


図 1. Aβ 取り込みに関わる遺伝子のゲノムワイドスクリーニング

A）Aβ の取り込みに関わる遺伝子の網羅的ゲノムワイド CRISPR/Cas9 スクリーニングの模式図。B）87,897 遺伝子を標的とした guide RNA を用いてスクリーニングを行った。異常な Aβ 取り込みを示す細胞を FACS によって回収後、IonProton により挿入された guide RNA を同定しその同定された頻度を標的遺伝子名によって Volcano plot として示した。

2. 脳内プロテオスタシスに関与するパスウェイの同定とその活性制御法の開発

これまでに我々は独自に、グリオーマや初代培養アストロサイトが Aβ 分解活性を培養上清に放出していること、またその責任分子として、分泌型セリンプロテアーゼ Kallikrein related peptidase 7（KLK7）を同定していた［4］。*KLK7* 発現量は AD 患者脳において減少しており、また *Klk7* ノックアウトマウスではアミロイド斑蓄積が有意に促進したこと（図 2A、B）。一方リコンビナント KLK7 タンパク質を脳内へインジェクションすることにより Aβ 量の低下が認められたことから、KLK7 の発現量または活性を上昇させることが可能なパスウェイは新たな創薬標的機構となることが想定された。そこで KLK7 の発現制御機構の解明と薬理学的な介入法の開発を *in vitro*、*in vivo* において進めることとした。

まず Aβ が蓄積する AD モデルマウスにおいて検討したところ、月齢およびアミロイド蓄積依存的に *Klk7* 発現量の亢進が観察された（図 2C）。そこで初代培養アストロサイトに対して Aβ 処理を行ったところ、濃度依存性に *Klk7* の発現量が上昇した（図 3A）。また興味深いことに LPS や IL-6 などでは *Klk7* の発現量が変化しないことから、Aβ によって惹起される炎症性反応に特異的に発現制御を受けていることが示唆された。そこでまず、Aβ およびアルツハイマー病に関連した既知化合物について、初代培養アストロサイトを用いて探索したところ、アルツハイマー病治療薬として認可されている、NMDA 受容体拮抗薬であるメマンチンに *Klk7* 発現上昇能が認められ（図 3B）、この時培養上清における Aβ 分解活性の亢進も確認された（図 3C）。メマンチンは神経細胞にも作用しうることから［5］、初代培養神経細胞もしくは初代培養神経･グリア共培養系に対してメマンチンを添加し細胞外 Aβ の分解を検討したところ、神経細胞では Aβ 分解活性は認められなかった一方で、グリアとの共培養系においては Aβ 量が著減した。またこのメマンチンの効果は、*Klk7* ノックアウトマウス由来の初代培養アストロサイトでは消失した。これらのことから、メマンチンはグリア細胞に対して作用し、Aβ 分解活性を亢進させることが示唆された。

そこで初代培養アストロサイトにおけるメマンチンの薬理学的解析を行った。神経細胞においてシナプス伝達抑制に頻用されている NMDA 受容体拮抗薬である MK-801 にはその効果が認められなかった。しかし初代培養アストロサイトに対してグルタミン酸、NMDA を処理したところ、*Klk7* 発現量の低下が認められた。またメマンチンは NMDA 受容体の他、α7 ニコチン性アセチルコリン受容体に対しても作用することが知られているが、アセチルコリン受容体特異的なアンタゴニストである α ブンガロトキシンは *Klk7* 発現量に影響を与えなかった。すなわち、アストロサイトにおける NMDA 受容体シグナル経路の抑制が *Klk7* の発現量上昇を惹起し、抗 Aβ 効果をもたらすと考えられた。そこでこの効果を *in vivo* で検証する目的で、AD モデルマウスに対してメマンチンを飲水投与したところ、*Klk7* の発現量亢進、そして脳内アミロイド量の低下が認められた。

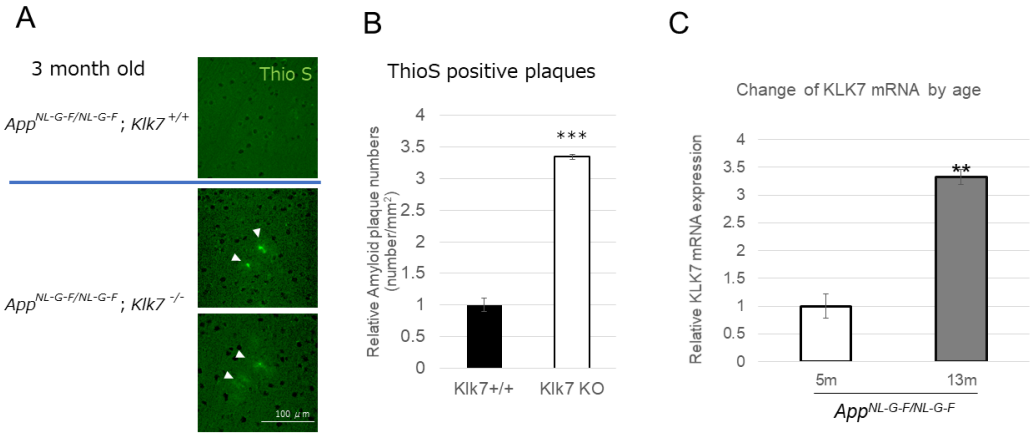


図 2. アミロイド蓄積に対する KLK7 の影響

A）*Klk7* ノックアウトマウスと AD モデルマウスを交配した結果、通常アミロイド蓄積のみられない三ヶ月齢でチオフラビン S（ThioS）陽性アミロイド斑が検出される。B）A の定量的解析結果。C）AD モデルマウスにおける *Klk7* 発現量の変化。アミロイド蓄積が増加すると共に *Klk7* の発現量も上昇する。

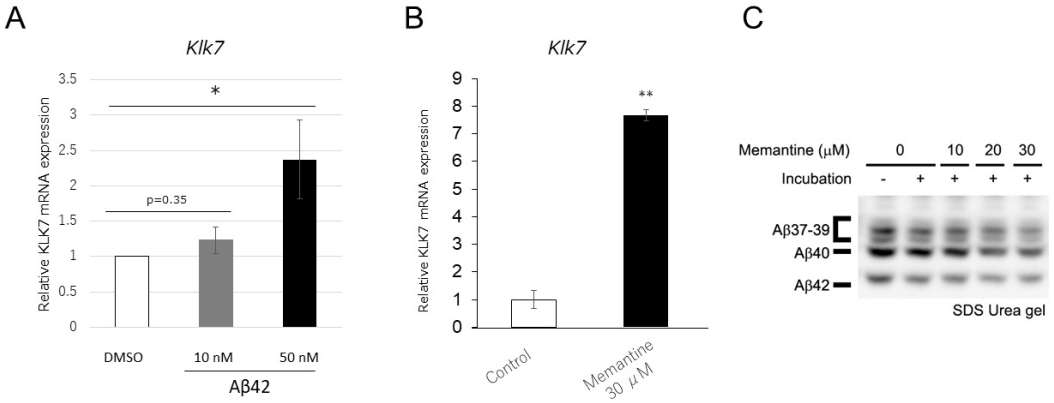


図 3. 初代培養アストロサイトにおける Aβ、メマンチンの影響

A）初代培養アストロサイトに合成 Aβ ペプチドを処理すると *Klk7* 発現量が上昇する。B）初代培養アストロサイトにメマンチンを処理すると *Klk7* 発現量が上昇する。C）メマンチンを投与すると、培養上清における Aβ 分解活性が上昇し、残存する Aβ 量が低下する。

考　察

本研究において我々は、認知症発症機構における慢性炎症反応の分子機構解明を目的として、特に AD 発症に関与する Aβ を用いて研究を行い、以下の二点を明らかとした。

1. 細胞外 Aβ の取り込み機構に関するゲノムワイド CRISPR/Cas9 スクリーニングを行い、その情報をもとに AD 発症リスク遺伝子として同定されていた *Inpp5d* や *Cd2ap* が Aβ 取り込みに関わっている可能性を見出した。今後これらの遺伝子の寄与についてモデルマウスなどを用いて解析する。
2. アストロサイト由来新規 Aβ 分解酵素 KLK7 の発現および活性の変化に関与する分子機構について薬理学的な解析を行い、アストロサイトにおける NMDA 受容体経路を同定した。今後この経路を制御する化合物の探索を行い、アストロサイトを創薬標的細胞とした研究を展開する。

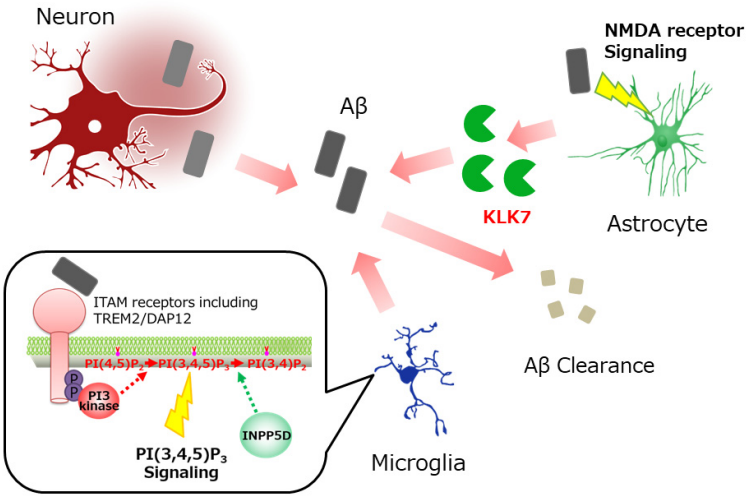


図 4. 本研究のまとめ

ミクログリアに高発現する AD 発症リスク遺伝子 *Inpp5d* や *Cd2ap* は Aβ 取り込み経路に関わっていると考えられる。またアストロサイトにおける Aβ 分解酵素 KLK7 の発現は NMDA 受容体シグナルを介して制御されている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、理化学研究所の斎藤貴志副チームリーダー、西道隆臣チームリーダー、新潟大学脳研究所の池内健教授、第一三共株式会社の高橋香織、牧野充裕、東京大学大学院医学系研究科の大内尉義名誉教授、秋下雅弘教授、岩坪威教授です。また東京大学大学院薬学系研究科機能病態学研究室の海老沼五百理大学院生、木棚究元大学院生、建部卓也元大学院生、高鳥翔助教、堀由起子助教には実際に研究を推進していただきました。心から深謝いたします。

文　献

1) Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, Herrup K, Frautschy SA, Finsen B, Brown GC, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, Petzold GC, Town T, Morgan D, Shinohara ML, Perry VH, Holmes C, Bazan NG, Brooks DJ, Hunot S, Joseph B, Deigendesch N, Garaschuk O, Boddeke E, Dinarello CA, Breitner JC, Cole GM, Golenbock DT, Kummer MP. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. Lancet Neurol. 2015 Apr;14(4):388-405. PMID: 25792098 DOI: 10.1016/S1474-4422(15)70016-5.

2) Kanatsu K, Tomita T. Molecular mechanisms of the genetic risk factors in pathogenesis of Alzheimer disease. Front Biosci (Landmark Ed). 2017 Jan 1;22:180-192. PMID: 27814610

3) Goedert M, Eisenberg DS, Crowther RA. Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration. Annu Rev Neurosci. 2017 Jul 25;40:189-210. PMID: 28772101 DOI: 10.1146/annurev-neuro-072116-031153.

4) Kidana K, Tatebe T, Ito K, Hara N, Kakita A, Saito T, Takatori S, Ouchi Y, Ikeuchi T, Makino M, Saido TC, Akishita M, Iwatsubo T, Hori Y, Tomita T. Loss of kallikrein-related peptidase 7 exacerbates amyloid pathology in Alzheimer's disease model mice. EMBO Mol Med. 2018 Jan 8. PMID: 29311134 DOI: 10.15252/emmm.201708184.

5) Ito K, Tatebe T, Suzuki K, Hirayama T, Hayakawa M, Kubo H, Tomita T, Makino M. Memantine reduces the production of amyloid-β peptides through modulation of amyloid precursor protein trafficking. Eur J Pharmacol. 2017 Mar 5;798:16-25. PMID: 28167259 DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.02.001.