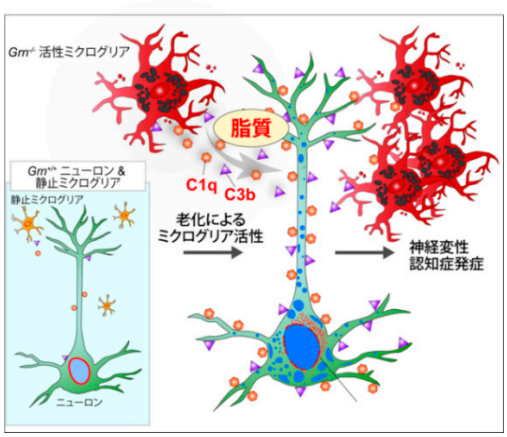
130　グリア脂質代謝異常が誘発する神経変性機構	橋本　恵

【目的】認知症をはじめとする神経変性疾患の発症は、老化という過程の中で、脳を取り巻く環境が変わり、ニューロンの生存を脅かす影響を与えることが要因のひとつである。これまでに、若年性認知症の一種である、前頭側頭型認知症モデル・プログラニュリン欠損（*Grn*$^{-/-}$）マウスの脳において、加齢に伴いミクログリアのボディーガード機能、すなわち貪食による不要物質除去機能と炎症物質産生機能が過剰に活発化し、攻撃状態となることを明らかにし、そのミクログリアが過剰な補体因子を分泌することでニューロンを攻撃することを見出した。加えて、認知症ミクログリアが補体だけでなく炎症性脂質の過剰分泌を介して神経変性を誘発することを見出した。脂質は認知症を発症させる要因なのだろうか？過剰な脂質摂取や代謝不良が生活習慣病を引き起こし、QOL を損なう実情にある。2007 年には脂質代謝不良の状態が脂質異常症・リピドーシスと名付けられ、日本人の 4 人に 1 人は脂質異常症と推定されている。認知症の脳でも脂質蓄積、すなわちリピドーシスが起こっているという傍証が次々と報告されているものの、どのような機構で認知症における免疫細胞が脂質代謝不良を引き起こすのか、その脂質代謝不良がどのように神経細胞死を誘発するのか、その答えは分かっていない。本研究の目的は、独自に開発したオルガネラ分画技術とマルチオミクスを融合させ、脳に常駐する免疫細胞であるミクログリアの脂質代謝異常が認知症発症に及ぼす影響を提示することである。

【方法】13 ヶ月齢前頭側頭型認知症モデル *Grn*$^{-/-}$マウスにおいて脂質代謝異常を示すオルガネラを特定するために、脳を用いてオルガネラ画分を作製し、リピドミクス・プロテオミクス解析を行った。また、免疫組織染色により脂質代謝異常を示す細胞種の特定を行った。*Grn*$^{-/-}$マウスにおいて、脂質代謝異常が神経変性を誘発する機構を検証するために、ミクログリア-ニューロン共培養システムを開発し、脂質代謝異常を示す *Grn*$^{-/-}$ミクログリアが神経変性を誘発することを確かめた。

【結果】*Grn*$^{-/-}$マウス脳オルガネラ分画液を作製し、オルガネラ局在とオミクスデータを融合させると、初期エンドソーム、リソソーム、ミトコンドリア、輸送小胞において年齢依存的な脂質蓄積が確認された。また、この脂質蓄積はミクログリアが発端であり、これに続く形式でニューロンでも脂質蓄積が始まった。続いて、*Grn*$^{-/-}$ミクログリアにおける脂質蓄積の起因を観察すると、脂質のエンドソーム-リソソーム輸送システムが崩壊し、脂質代謝異常が起きていることがわかった。またその結果、*Grn*$^{-/-}$ミクログリアは脂肪酸を過剰分泌していた。この *Grn*$^{-/-}$ミクログリア由来過剰脂質の放出がニューロンに与える影響を、*Grn*$^{-/-}$ミクログリア-ニューロン共培養システムを用いて解析したところ、*Grn*$^{-/-}$ミクログリアは炎症性酸化リン脂質を介してニューロン細胞死や神経突起分岐減少を引き起こすことが示された。これらの結果から、ミクログリアが老化により様々な炎症性タンパク質だけでなく脂質までも分泌することでニューロンを攻撃し、前頭側頭型認知症を引き起こすことが証明された。

炎症物質を介した老化ミクログリアによる神経変性誘発



130. グリア脂質代謝異常が誘発する神経変性機構

橋本　恵

お茶の水女子大学 お茶大アカデミック・プロダクション

Key words：ミクログリア，プログラニュリン，脂質代謝，前頭側頭型認知症，神経変性疾患

緒　言

認知症をはじめとする神経変性疾患の発症は、老化という過程の中で、脳を取り巻く環境が変わり、ニューロンの生存を脅かす影響を与えることが要因のひとつである。脳免疫細胞の一種ミクログリアは、これまで脳のボディーガード的な役割を担うとされてきたが、老化すると、ニューロンへの攻撃に積極的に関わることが分かってきた。しかし、静止ミクログリアが、1. 老化による攻撃性ミクログリアへの転換、2. ニューロンへの攻撃、3. ニューロン減少を誘発する 3 つの現象の関連性は明瞭なものの、攻撃性ミクログリアへの分極機構とニューロンへの攻撃様式についての全貌は明らかにされていない。これまでに、若年性認知症の一種である、前頭側頭型認知症モデル・プログラニュリン欠損（*Grn*$^{-/-}$）マウスの脳において、加齢に伴いミクログリアのボディーガード機能、すなわち貪食による不要物質除去機能と炎症物質産生機能が過剰に活発化し、攻撃状態となることを明らかにし、そのミクログリアが過剰な補体因子 C1q 及び C3b を分泌することでニューロンを攻撃することを見出した［1］。加えて、老化ミクログリアの脂質輸送遺伝子の発現変化が大きいことから、認知症ミクログリアが補体だけでなく炎症性脂質の過剰分泌を介して神経変性を誘発することを見出した。つまり、心筋梗塞や脂肪肝など多くの人が患う生活習慣病と常に隣り合わせの脂質代謝異常が、認知症をも引き起こすと推察される。

脂質は認知症を発症させる要因なのだろうか？過剰な脂質摂取や代謝不良が生活習慣病を引き起こし､QOL を損なう実情にある。2007 年には脂質代謝不良の状態が脂質異常症・リピドーシスと名付けられ、日本人の 4 人に 1 人は脂質異常症と推定されている。認知症の脳でも脂質蓄積、すなわちリピドーシスが起こっているという傍証が次々と報告されているものの［2〜4］、どのような機構で認知症における免疫細胞が脂質代謝不良を引き起こすのか、その脂質代謝不良がどのように神経細胞死を誘発するのか、その答えは分かっていない。

本研究の目的は、独自に開発したオルガネラ分画技術とマルチオミクスを融合させ、脳に常駐する免疫細胞であるミクログリアの脂質代謝異常が認知症発症に及ぼす影響を提示し、認知症予防、治療、診断方法開発の足掛かりにすることである。

方法および結果

1. オルガネラを基盤とした *Grn*$^{-/-}$脳における脂質蓄積局在

前頭側頭型認知症モデル *Grn*$^{-/-}$マウスにおいて脂質が蓄積するオルガネラを同定し、脂質代謝異常機構解明の足がかりにするために、*Grn*$^{-/-}$マウス全脳のオルガネラを用いたリピドミクス解析を行った。まず、ヒトに当てはめると約 50 歳にあたる、13 ヶ月齢認知症モデル *Grn*$^{-/-}$マウス脳を用い、オルガネラ分画液をスクロース密度勾配遠心法により作製し、ウエスタンブロットにより各オルガネラ局在を把握した（図 1A）。その後、各オルガネラ分画液の機能状態と脂質量を知るために、プロテオミクス及びリピドミクス解析を行い、オルガネラ局在とマルチオミクスデータをバイオインフォマティクス融合し、認知症における脂質蓄積の原因となるオルガネラの同定を試みた。*Grn*$^{-/-}$マウス脳では初期エンドソーム、リソソーム、ミトコンドリア、輸送小胞において

多くのタンパク質発現変化が認められたことから、*Grn*$^{-/-}$マウス脳においてこれらのオルガネラ機能異常が認められた（図 1B）。また、各オルガネラ分画液を用いたリピドミクスデータから炎症性脂質を抽出し、炎症性脂質が局在するオルガネラを解析したところ、機能異常があったオルガネラ画分では年齢依存的な炎症性脂質の増加が起きていた（図 1C）。また、*Grn*$^{-/-}$マウス脳の中性脂質マーカーである LipidTOX を用いて染色し、脂質蓄積が顕著な細胞を特定したところ、年齢依存的な脂質蓄積が Iba1^{+}ミクログリア、そして Tuj1^{+}ニューロンの 2 種細胞のみで観察された。さらに、ミクログリアとニューロン細胞内における LipidTOX 蛍光強度を画像解析したところ、ミクログリアの方がニューロンよりも早期の 7 から 11 ヶ月齢にかけて脂質蓄積を示し、その後 11 から 18 ヶ月齢にかけてニューロンでの脂質蓄積が起きることがわかった（図 1D）。一方で、Olig2^{+}オリゴデンドロサイトおよび GFAP^{+}アストロサイトでは脂質の蓄積は観察されなかった。このことから、前頭側頭型認知症における脂質蓄積はミクログリアが起点であると考えられる。

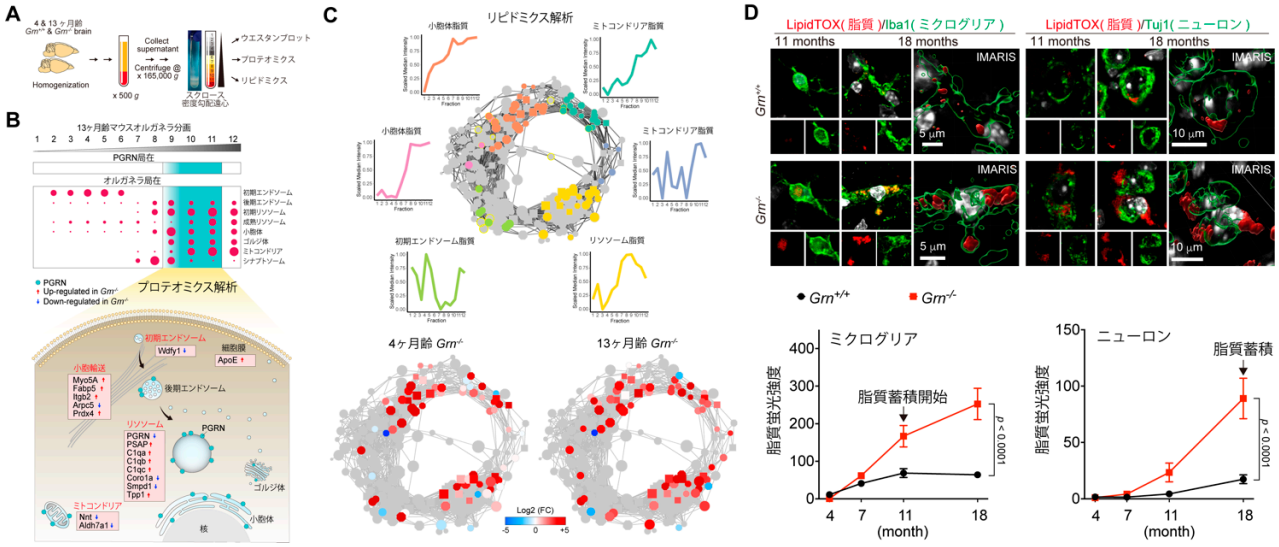


図 1. *Grn*$^{-/-}$マウス脳におけるリピドーシスプロファイル

A） *Grn*$^{-/-}$全脳を用いたオルガネラ分画方法。

B） *Grn*$^{-/-}$脳オルガネラ分画を用いたプロテオミクスデータ。

C） オルガネラ分画とリピドミクスデータの融合および *Grn*$^{-/-}$脳オルガネラにおける脂質量変化。

D） *Grn*$^{-/-}$視床ミクログリアとニューロンにおける年齢依存的脂質蓄積。P 値（two-way ANOVA）。

2. *Grn*$^{-/-}$ミクログリアにおける脂質代謝異常機構

Grn$^{-/-}$ミクログリアが脂質蓄積を示すメカニズムを明らかにするために、*Grn*$^{-/-}$初代培養ミクログリアを用いて、脂質代謝異常が起こるオルガネラを観察した。まず、*Grn*$^{-/-}$初代培養ミクログリアにおいても、脳組織と同様に脂質異常蓄積が起きているかどうかをリピドミクス解析により確認した。すると、*Grn*$^{-/-}$初代培養ミクログリアは脳組織と同様に脂質を多く含んでいることがわかった（図2A）。また、*Grn*$^{-/-}$脳組織において、エンドソームや輸送小胞内での脂質が顕著に増加していたことから、*Grn*$^{-/-}$ミクログリアは脂質分泌が盛んであることが推察される。そこで、この推察を検証するために、*Grn*$^{-/-}$ミクログリア培養上清（Microglial conditional media : MCM）を用いたリピドミクス解析により *Grn*$^{-/-}$ミクログリアの脂質分泌量を観察したところ、*Grn*$^{-/-}$ミクログリア培養上清には飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸を含む多くの脂肪酸が含まれていた （図2B）。このことから、*Grn*$^{-/-}$ミクログリアは、*Grn*$^{+/+}$ミクログリアと比較して脂質分泌が盛んであることがわかった。加えて、*Grn*$^{-/-}$脳組織のオルガネラ画分を用いたプロテオミクス解析では、脳内の脂質代謝異常はリソソーム経路や輸送小胞で生じると明らかになったことから、*Grn*$^{-/-}$培養ミクログリアを用いリソソーム経路における

脂質代謝経路異常を蛍光染色により解析した。すると、*Grn*$^{+/+}$ミクログリアでは、脂質は細胞内取り込みや合成後、CD68^{+}成熟リソソームに運ばれたものの、*Grn*$^{-/-}$培養ミクログリアはCD68^{+}成熟リソソームを形成せず、成熟リソソーム内で脂質分解が行われる証拠は得られなかった。一方で、*Grn*$^{-/-}$培養ミクログリアはRab3A^{+}分泌小胞やRab7^{+}後期エンドソームに局在する脂質が増加していた（図2C）。つまり、前頭側頭型認知症モデル*Grn*$^{-/-}$ミクログリアでは、リソソーム成熟がスムーズに移行されず、後期エンドソームに脂質が蓄積され、さらには分泌小胞にも多くの脂質が局在し、細胞外に過剰に脂質が分泌されていることが明らかになった。

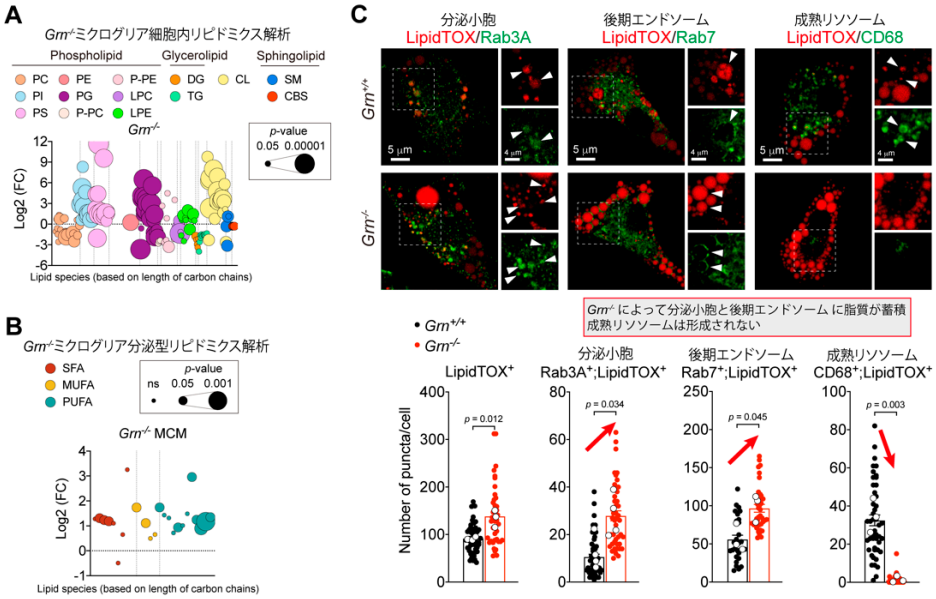


図 2.　*Grn*$^{-/-}$ミクログリアにおける脂質代謝異常

A）　*Grn*$^{-/-}$初代培養ミクログリアにおける脂質増加。

B）　*Grn*$^{-/-}$初代培養ミクログリア培養上清（MCM）における脂質増加。

C）　*Grn*$^{-/-}$初代培養ミクログリア分泌小胞、後期エンドソームにおける脂質代謝異常。

P 値（two-tailed t-test）。

3. *Grn*$^{-/-}$ミクログリア由来炎症性脂質を介した神経変性の誘発

脂質蓄積を起こした *Grn*$^{-/-}$ミクログリアがニューロンを攻撃し神経変性疾患を誘発する要因のひとつになるかどうかを解き明かすために、*Grn*$^{+/+}$及び *Grn*$^{-/-}$ミクログリア-ニューロン共培養システムを開発した。具体的には、培養 13 日目の初代培養皮質神経に初代培養ミクログリアを播種し、さらに脂質代謝を促進させるためにオレイン酸（Oleic acid : OA）を同時に添加し、24 時間後に神経細胞死及び神経突起形態の観察を行った（図 3A）。この共培養システム上でも、*Grn*$^{-/-}$ミクログリアは *Grn*$^{+/+}$ミクログリアと比べて脂質を豊富に含んでおり、*Grn*$^{-/-}$ミクログリア内の脂質が神経変性に及ぼす影響を観察することが可能な培養システムであることを確認した。中性脂質マーカー・LipidTOX を用いてミクログリア内の脂質を可視化したところ、*Grn*$^{-/-}$ミクログリアは *Grn*$^{+/+}$ミクログリアと比較して、より多くの LipidTOX^{+}脂質を細胞体に含んでいた。また、*Grn*$^{-/-}$ミクログリアと共培養した *Grn*$^{-/-}$ニューロンは、*Grn*$^{+/+}$ミクログリアと共培養した時よりも多くの LipidTOX^{+}脂質を有していた（図 3B）。ミクログリアを共培養した際の、神経細胞死を cleaved-caspase 3 染色により可視化し、陽性細胞数を解析すると、*Grn*$^{-/-}$ミクログリアは、*Grn*$^{+/+}$ミクログリアに比べて神経細胞死をより多く誘発していた（図 3C）。また、MAP2^{+}神経突起の長さと本数を解析し、Area under the curve（AUC）で示すと、*Grn*$^{-/-}$ミクログリアとの共培養は神経突起退縮を促進させることがわかった（図 3C）。ミクログリアが脂質を介して神経を攻撃する場合、*Grn*$^{-/-}$ミクログリアの脂質代謝異常が発生し、認知症ミクログリアか

らの神経毒性脂質放出が上昇することで神経細胞死を誘発するという過程を辿るはずである。そこで、炎症性脂質の一種・酸化ホスファチジルコリンの取り込みを中和抗体阻害することで、認知症ミクログリアから分泌される炎症性脂質が神経変性を誘発することを確認したところ、*Grn*$^{-/-}$ミクログリア-ニューロン共培養システムでは、炎症性脂質受容体の中和抗体により神経突起退縮や神経細胞死が抑制されることを明らかにした（図 3C）。このことから、*Grn*$^{-/-}$ミクログリアは炎症性脂質を放出し、ニューロン機能を衰弱させることが示された。本研究により、脳のボディーガード役であるはずのミクログリアが老化により様々な炎症性タンパク質を分泌することでニューロンを攻撃するという先行研究はいくつかあるものの、タンパク質だけでなく脂質までも放出しニューロンを脅かしているということが示された。

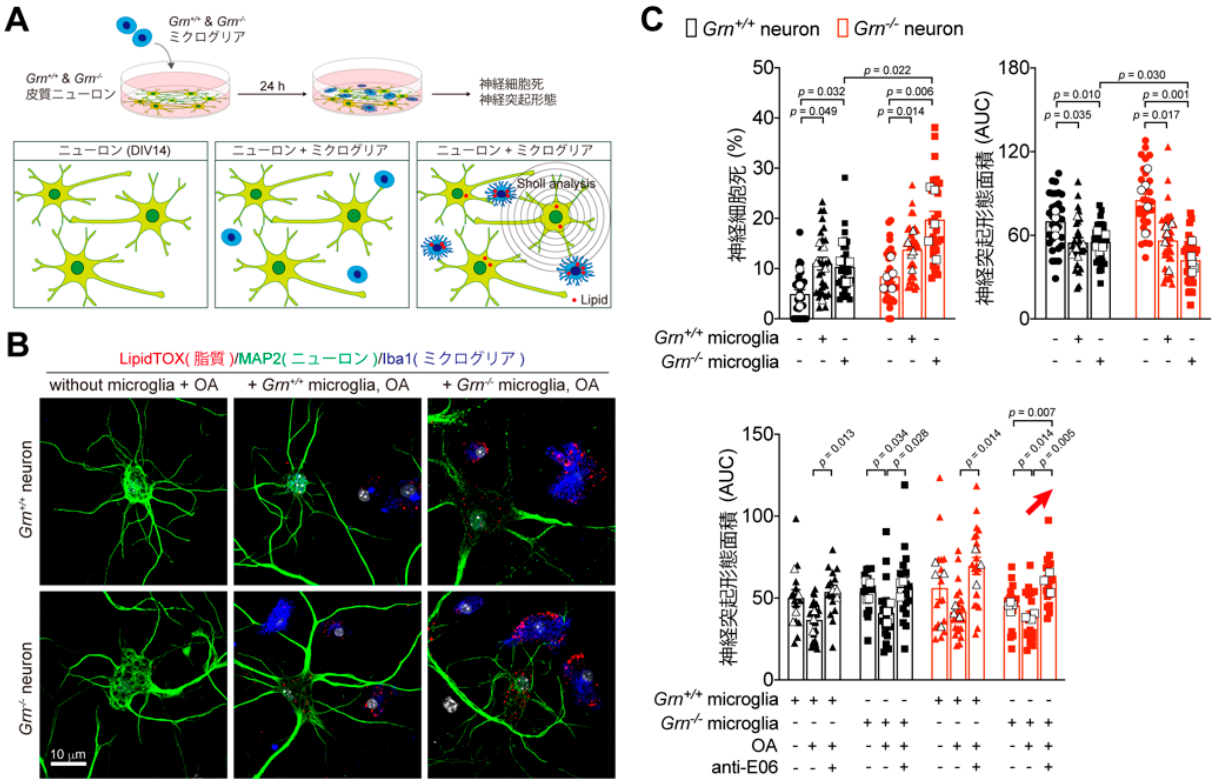


図 3. *Grn*$^{-/-}$ミクログリアは炎症性脂質を介して神経変性を誘導する

A） *Grn*$^{-/-}$ミクログリア-ニューロン共培養システムの作製方法。

B） *Grn*$^{-/-}$ミクログリア共培養による神経突起の退縮。

C） *Grn*$^{-/-}$ミクログリアが誘発する神経細胞死と神経突起退縮（上）、炎症性脂質受容阻害による *Grn*$^{-/-}$ミクログリア由来神経突起退縮の抑制（下）。P 値（two-way ANOVA）。

考　察

本研究により、前頭側頭型認知症の脳でリピドーシスが起きる機構の解明に加えて、ミクログリアが脂質を放出してニューロンを減少させることが明らかになった。近年、脳に常駐する4種の細胞、ニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、ミクログリアが様々な形式で相互に影響し合う機構が少しずつ明らかになってきている［5］。認知症をはじめとする神経変性疾患においてもこれらの細胞間相互作用の崩壊に起因する証拠が報告されているが［6］、多くは炎症性タンパク質を介したものであり、脂質に関する報告は少なかった。本研究

において、ミクログリアからニューロンへの脂質蓄積連鎖が起きることを発見し、ミクログリアが分泌する炎症性脂質がニューロンを変性させることを証明した。今後は、脳以外の器官での脂質代謝異常や生活習慣病、さらには脂質過剰摂取が知能に影響を及ぼすかという展開に進み、脳機能や認知症リスクの低下に繋がる知見を発信する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者であるカリフォルニア大学サンフランシスコ校の Eric J. Huang 教授に感謝申し上げる。

文　献

1） Zhang J, Velmeshev D, Hashimoto K, Huang YH, Hofmann JW, Shi X, Chen J, Leidal AM, Dishart JG, Cahill MK, Kelley KW, Liddelow SA, Seeley WW, Miller BL, Walther TC, Farese RV Jr, Taylor JP, Ullian EM, Huang B, Debnath J, Wittmann T, Kriegstein AR, Huang EJ. Neurotoxic microglia promote TDP-43 proteinopathy in progranulin deficiency. Nature. 2020 Dec;588(7838):459-465. Epub 2020 Aug 31. PMID: 32866962. DOI: 10.1038/s41586-020-2709-7.

2） Evers BM, Rodriguez-Navas C, Tesla RJ, Prange-Kiel J, Wasser CR, Yoo KS, McDonald J, Cenik B, Ravenscroft TA, Plattner F, Rademakers R, Yu G, White CL 3rd, Herz J. Lipidomic and Transcriptomic Basis of Lysosomal Dysfunction in Progranulin Deficiency. Cell Rep. 2017 Sep 12;20(11):2565-2574. PMID: 28903038. DOI: 0.1016/j.celrep.2017.08.056.

3） Arrant AE, Onyilo VC, Unger DE, Roberson ED. Progranulin Gene Therapy Improves Lysosomal Dysfunction and Microglial Pathology Associated with Frontotemporal Dementia and Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. J Neurosci. 2018 Feb 28;38(9):2341-2258. Epub 2018 Jan 29. PMID: 29378861. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3081-17.2018.

4） Marschallinger J, Iram T, Zardeneta M, Lee SE, Lehallier B, Haney MS, Pluvinage JV, Mathur V, Hahn O, Morgens DW, Kim J, Tevini J, Felder TK, Wolinski H, Bertozzi CR, Bassik MC, Aigner L, Wyss-Coray T. Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. Nat Neurosci. 2020 Feb;23(2):194-208. Epub 2020 Jan 20. PMID: 31959936. DOI: 10.1038/s41593-019-0566-1.

5） Vainchtein ID, Molofsky AV. Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health. Trends Neurosci. 2020 Mar;43(3):144-154. Epub 2020 Feb 7. PMID: 32044129. DOI: 10.1016/j.tins.2020.01.003.

6） Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature. 2017 Jan 26;541(7638):481-487. Epub 2017 Jan 18. PMID: 28099414. DOI: 10.1038/nature21029.