

学 位 論 文 の 要 約

三 重 大 学

所属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 臨床医学系講座 神経病態内科学分野	氏名	しまだ たくや 島田 拓弥
<p>主論文の題名</p> <p>Chronic cerebral hypoperfusion upregulates leptin receptor expression in astrocytes and tau phosphorylation in tau transgenic mice</p> <p>(慢性脳低灌流は星状細胞のレプチン受容体の発現を促進し、タウトランスジェニックマウスでタウのリン酸化を促進する)</p> <p>Takuya Shimada, Akihiro Shindo, Hirofumi Matsuyama, Kenichiro Yata, Atsushi Niwa, Ryogen Sasaki, Takashi Ayaki, Takakuni Maki, Hideaki Wakita, Hidekazu Tomimoto</p> <p>Neuroscience Letters 704 (2019) 133–140 Published: June 21, 2019 doi: 10.1016/j.neulet.2019.04.009</p> <p>主論文の要約</p> <p>1. 序論</p> <p>アルツハイマー病 (AD) は、認知機能低下をきたす進行性の疾患であり、高齢者の認知症の最多の原因である。ADの脳ではリン酸化タウによる神経原線維変化、アミロイドβによるアミロイド斑などの病理学的な特徴がみられる。ADは神経変性疾患であると考えられてきたが、近年、脳血流の低下による慢性脳低灌流がADの病態に重要な役割を持つことが明らかにされた。</p> <p>また、疫学研究で中年期の肥満が認知機能低下に関係していることが示唆され、体重増加や肥満が認知機能低下およびタウのリン酸化を促進し、ADの危険因子となっていることが報告された。本研究では肥満がADの病態に及ぼす影響を明らかにするため、レプチンに着目した。レプチンは脂肪細胞由来のホルモンであり、視床下部を通じて体重と脂肪の蓄積を調整する働きがあり、レプチンの欠乏により肥満を引き起こすとされる。</p> <p>レプチン受容体 (LepR) は大脳皮質や海馬に発現し、学習や記憶に関係が示唆されている。脳梗塞急性期に梗塞巣周囲の皮質でLepRの発現が増加しており、脳血流低下時にレプチンが神経保護作用を持つ可能性が示唆されている。しかし、慢性脳低灌流で、レプチンのシグナル伝達がどのように作用するかは明らかになっていない。本研究では、ヒトタウを過剰発現したトランスジェニック (Tg) マウス (T44)、ラット星状細胞の細胞培養、ADの剖検脳で虚血巣近傍の LepR とリン酸化タウの発現変化を検討した。</p>			

2. 材料および方法

2.1. 動物モデル

ヒトタウを過剰発現するT44 Tgマウスを10匹使用し、8か月齢の雄で統一した。70%亜酸化窒素（笑気）、30%酸素とイソフルランで麻酔を行い、慢性脳低灌流群の5匹は両側の総頸動脈に径0.18mmのマイクロコイルを留置して両側総頸動脈狭窄（BCAS）とし、コントロール群の5匹には偽手術を行った。4週後、マウスをペントバルビタールで深麻酔とし、食塩水で還流した。脳を半切し、左半球はパラフィン包埋後に2 μ m厚で薄切し、右半球はウェスタンブロット(WB)に使用するためマイナス80℃で凍結保存した。

2.2. ヒト剖検脳

三重大学病院、および京都大学病院の剖検脳15例を使用した。ADの診断はBraak stageを用いて行い、VとVIをADとした。また、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、虚血性病変を評価した。剖検脳の内訳は、AD 5例、ADと脳虚血病変の合併 5例で、筋萎縮性側索硬化症 5例をコントロールとした。

2.3. 培養細胞

生後1日のSprague-Dawleyラットの大脳皮質を分離し、星状細胞の初代培養を作成した。皮質より分離した細胞を1% ペニシリン/ストレプトマイシン (P/S)および10%ウシ胎児血清 (FBS) を含有するDMEM培地で管理した。培養細胞は混合したグリア細胞であり、星状細胞のほか、ミクログリア、オリゴデンドロサイトが含まれる。これらをフラスコ内で増殖した。12から14日後、細胞密になっていることを確認し、1時間振盪することでミクログリアを除去した。次に、培地交換し、フラスコを一晩振盪してオリゴデンドロサイト前駆細胞を除去した。星状細胞の単層をトリプシン処理によって解離させ、12ウェルのプレートに播種した。2〜3日後に細胞が増殖していることを確認し、培地を1%P/Sおよび1%FBSを含むDMEMと交換した。星状細胞をジメチルスルホキシド(DMSO) に溶解した亜致死濃度のCoCl₂ (100 μ mol/L) で7日間処理して長期の化学的低酸素状態とした。低酸素誘導因子によって低酸素状態を確認した。

2.4. 免疫組織染色

マウス脳冠状切片およびヒト脳切片を脱パラフィンし、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定した。一次抗体として抗AT-8（リン酸化タウ）抗体、または抗LepR抗体を添加し、一晩インキュベートした。洗浄後にABCキット (Vector) で30分間インキュベートし、ペルオキシダーゼ標識を可視化して観察した。次に二重標識免疫蛍光法を実施した。マウス脳のパラフィン包埋組織切片を脱パラフィンし、4%PFAで固定した。3%BSAで1時間ブロッキングした後、切片に一次抗体として抗LepR抗体および星状細胞のマーカーである抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体を添加して4℃で一晩インキュベートし、蛍光複合体を含む二次抗体と共に室温で1時間インキュベートした。切片にVectashield (Vector) を添加し、蛍光顕微鏡(Leica) で観察した。

2.5. 免疫細胞化学

星状細胞の初代培養をCoCl₂またはDMSOで7日間処置後、4% PFAで処理を行った。ブロッキング後に一次抗体として抗LepR抗体と抗リン酸化AKT(pAKT)抗体、抗GFAP抗体で一晩インキュベートし、蛍光の二次抗体で1時間インキュベートした。

2.6. ウェスタンブロット

BCASおよび偽手術マウスの脳半球を、放射性免疫沈降法(RIPA) 緩衝液でホモジナイズした。検体を10% 2-メルカプトエタノールを含有した同量の緩衝液と混合後、20%トリス-グリシゲルに添加し、電気泳動後にメンブレンに移した。ブロッキング後に一次抗体である抗AT-8抗体、抗LepR抗体、抗 β アクチン抗体を添加し、4℃で一晩インキュベートした後、ペルオキシダーゼ結合二次抗体と共にインキュベートした。

星状細胞はPro-PREPタンパク質抽出溶液を用い、サンプルを作成した。次に細胞溶解物に一次抗体として抗LepR抗体、抗pAKT抗体、抗Caspase-3抗体、抗 β -actin抗体を添加してWBを行った。化学発光検出を用いてタンパク質レベルを視覚化し、そして光学密度をImage Jを用いて分析した。

2.7. 剖検脳における免疫組織染色の半定量法

側頭葉の切片中の免疫染色された細胞はグリッド法によりカウントした。10倍の接眼レンズを用いて、0.25mm²の正方形内のLepR陽性細胞を計測し、各切片で10視野の平均を算出した。

3. 結果と考察

BCAS 4週間後にタウTgマウスの脳で免疫組織染色を行った。BCAS群では偽手術 (sham) 群に比べ、海馬でのリン酸化タウの発現が増加していた。また、BCAS群では大脳白質にリン酸化タウ陽性構造が散見されたが、sham群ではみられなかった。WB法でも同様にBCAS群でリン酸化タウが増加しており、慢性脳低灌流によりリン酸化タウが増加することが確認された。

次に、慢性脳低灌流によるLepRの変化を調べるため、蛍光顕微鏡とWBを行った。蛍光顕微鏡で、LepRは海馬および大脳白質の星状細胞に一致して発現しており、WBによりBCAS群でLepRの発現増加が認められた。この結果により慢性脳低灌流が星状細胞のLepR発現を促進することが確認された。さらに、星状細胞の初代培養を用いて、in vitroで低酸素負荷がLepRに及ぼす影響を調べた。CoCl₂による低酸素負荷群では、星状細胞の細胞質でLepRが発現し、WBによる分析でも低酸素負荷群でLepRの発現が増加していた。

さらに、LepRの発現が低酸素負荷で増加する機序を調べるため、レプチンのシグナル伝達経路の1つであるAKTに着目した。星状細胞の初代培養では、低酸素群で細胞質内のリン酸化AKTの発現を認め、WBでは発現増加を確認した。低酸素群ではアポトーシス誘導に関連するCaspase3が低下しており、低酸素負荷によるLepRの発現増加が神経保護に作用する可能性が示された。ヒト剖検脳の検討では、AD群ではコントロール群に比べ大脳白質のLepRの発現が増加しており、その傾向は脳虚血性変化を伴うAD群でより顕著であった。

本研究の限界として2つの点が挙げられる。1点目は、LepRの発現増加とタウのリン酸化亢進の因果関係を明らかにすることができなかった点である。慢性脳低灌流によりLepRの発現増加とタウのリン酸化亢進がみられたことは2つの現象の関連を示唆している。しかし、慢性脳低灌流とタウのリン酸化亢進にレプチンのシグナル伝達が関与していることを証明するために必要なレプチン/LepR阻害薬の負荷試験、レプチンのシグナル伝達に関与する分子のノックアウトや運動負荷の効果を評価できていない。2点目としてLepRの発現増加を8か月齢のT44マウスでのみ確認している点がある。他の月齢のT44マウス、および他のタウTgマウスを用いて慢性脳低灌流がLepR発現に及ぼす影響を調べる必要がある。

4. 結論

本研究により、慢性脳低灌流が LepR の発現を増加させ、タウのリン酸化を促進することを明らかにした。LepR の発現増加は AKT のシグナル伝達を介して神経保護的に働き、タウのリン酸化を抑制する可能性が示唆された。レプチンは虚血性脳血管障害のみならず AD の治療開発においても重要な治療標的となる可能性がある。