

長寿医療研究委託事業
平成20年度総括研究報告書

虚血性神経細胞障害に対する免疫療法の開発

主任研究者 脇田英明 国立長寿医療センター研究所 血管性認知症研究部 室長

研究要旨

血管性認知症において、血管内皮細胞活性化や小胞体ストレス反応を起点とした大脳白質病変や認知症発症メカニズムが示され、細胞接着分子阻止抗体、HMGB-1中和抗体、アセチル化制御薬、小胞体ストレス反応の制御が治療法として有望であることを解明した。

分担研究者 脇田英明
国立長寿医療センター研究所 血管性
認知症研究部 室長

分担研究者 高橋慶吉
国立長寿医療センター 血管性認知症
研究部 部長

分担研究者 松下健二 国立長寿医療
センター 口腔疾患研究部 部長

分担研究者 富本秀和 三重大学
神経病態内科学 教授

具体的には、細胞接着分子のE-selectinに対する抗体を血管性認知症モデルラット及びマウスに投与し、記憶機能障害と虚血性大脳白質病変に対する保護効果を確認した。対照群として正常免疫グロブリンを用いた(脇田)。テトラサイクリン(tet)誘導発現ベクター(pcDNA4/TO)に野性型および変異型(R133C, C185R) Notch3を結合し、pcDNA6/TRとともにHEK293細胞に導入して安定発現細胞株を樹立した。Notch3の分解動態は細胞株をtet (2 mg/ml)を含む(tet+)培地で24時間培養した後、さらに³⁵S]アミノ酸で4時間標識した。細胞はtetを含まない(tet-)培地中で1~2日培養した後、RIPA溶液で溶解し、Notch3抗体(AbN2)を用いる免疫沈降と電気泳動を行った。Notch3蛋白質はautoradiographyで検出した。Notch3蛋白質量およびERストレス反応蛋白質はウエスタンブロット法で、細胞内凝集は免疫組織学染色により解析した。tet+培地で誘導した細胞をchemical chaperons を添加したtet-培地で培養を行った後、Notch3蛋白質をウエスタン法で解析して蛋白質凝集阻害薬剤の効果を検討した。(高橋)。HMGB-1は翻訳後修飾としてアセチル化を受け、核内から細胞外へと放出されるため、種々のアセチル化制御薬を用い、HMGB-1放出制御を検討した。ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤であるバルプロ酸(VPA)、トリコスタチンA(TSA)、またヒストンアセチル化酵素(HAT)阻害剤であるAnacardic acid(AA)、Garcinol(GC)をRAW-Blue細胞に作用させた。NF-κB活性化はレポーターアッセイで、HMGB-1放出量はELISAで定量した。細胞障害性をLDH活性で、ApoptosisをCaspase 3/7活性でそれぞれ解析した。(松下)。皮質下血管性認知症(SVD)8例、アルツハイマー病(AD)6例、対照6例の前頭葉切片を用いてHIF-1α、

A. 研究目的

血管性認知症の中で、皮質下血管性認知症は本邦に特に多く、血管性認知症の約半数を占めている。症状は緩徐進行性で、血管性危険因子の管理や抗血小板などの治療を行っても進行の抑制が困難なため、その新規治療法の開発が急務である。一方、脳虚血後の血管内皮細胞活性化、炎症性サイトカイン産生等の炎症反応の重要性が近年注目されており、新しい治療のターゲットとなっている。本研究では、皮質下血管性認知症の主要な病態である虚血性大脳白質病変における炎症機構の解析を培養細胞、モデル動物、ヒト剖検脳を用いて行い、それを制御する予防・治療法の開発を目的とする。

B. 研究方法

昨年度までの発症機序に関する研究成果より、E-selectin、ICAM-1等の細胞接着分子、High mobility group box 1(HMGB-1)、小胞体ストレス反応が治療標的として同定された。そこで、本年度は、これらの分子の制御メカニズム解析を進めるとともに、治療標的分子を制御・阻止する薬物・免疫療法の有効性を検討した。

HLA-DRの免疫組織化学を行った。昨年までの研究成果として、ICAM-1, LFA-1, TNF α 陽性反応がSVD, ADで対象と比べ亢進することが示されていることから、それぞれの結果をHIF-1 α , HLA-DRと対比観察した。以上の免疫染色結果はNIH image analyzerに取り込み、陽性面積を白質、大脳皮質に分けて半定量した（富本）。

（倫理面への配慮）

本研究で用いる遺伝子操作や疾患モデル動物については、所属研究機関の各専門委員会の承認を受けて行った。また、疾患モデル動物の処置については動物愛護精神にのっとり慎重に行った。剖検脳の解析にあたっては所属研究機関の倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

血管性認知症モデルラットのELISA法で測定した血清中の抗E-selectin阻止抗体濃度は緩やかに減少し、半減期は1週間で、2週間後でも30%のレベルにあった。記憶機能検査では、抗E-selectin阻止抗体投与群はコントロール群と比較して有意に記憶機能の低下を抑制した。病理検索では、脳梁の神経線維密度が、コントロール群と比較して、E-selectin阻止抗体投与群では有意に脳梁の神経線維の脱落を抑制した。

血管性認知症モデルマウスの記憶機能検査では、4週間後の識別指数がコントロール群と比較して、抗E-selectin阻止抗体投与群は有意に記憶機能の低下を抑制した。病理検索では、脳梁の神経線維密度が、E-selectin阻止抗体投与群では、有意に脳梁の神経線維の脱落を抑制した（脇田）。変異型Notch3は分解が非常に遅く、2日後でも80~90%の蛋白質が検出されたが、野生型Notch3は2日後にはほとんど検出されず、速やかに分解された。標識アミノ酸を用いた解析から野生型Notch3の分解半減期よりも変異型(R133C, C185R) Notch3の方が著しく長いことが明らかとなった。ER ストレス蛋白質 (BiP およびERp72) の発現量については培養を継続しても両細胞ともに発現量の変化は認められなかった。免疫組織染色による解析では、誘導直後にはNotch3抗体に反応する凝集分子が40~50%の変異Notch3発現細胞で認められ、2日後でもその細胞数は変化しなかったが、野生型の場合は2日後に1~3%まで減少することが明らかとなった。これらの結果は変異Notch3が不安定で凝集し易く、ERに蓄積して分解が阻害されているこ

とを示している。一方、変異Notch3の分解促進剤の解析ではtaurodeoxycholic acid (TDCA)、4,5-dianilinophthalimide (DAPI), Staurosporine aglycone (SA)およびThioflavine T (ThT)が変異Notch3蛋白質の分解を促進させ、Notch3の細胞内凝集の阻害効果を示すことが判明した（高橋）。RAW-Blue細胞にVPAを添加したところ、培養上清中のHMGB1濃度は24時間まで上昇を続け30.3 ng/mlに達した。それに対し、TSA添加では僅か3時間後に5 ng/mlに到達した後、それ以上の放出を認めなかった。両薬剤による、NF- κ B活性化についても同様の傾向を認めた。これらのHDAC阻害剤によるHMG B1放出はHAT阻害剤であるAA添加により部分的に抑制されたが、一方でGC添加ではApoptosisが誘導された（松下）。HIF-1 α , HLA-DR免疫組織化学では、SVD群で皮髄境界直下を除く深部白質・脳室周囲白質の染色性が高進していることが確認された。また、HIF-1 α はアストログリア、ミクログリアに発現が認められた。HLA-DRはミクログリア、マクロファージが陽性反応を呈した。HIF-1 α は白質病変部のミクログリア、アストログリアに陽性反応を認め、特にSV D群で顕著な傾向を認めた。しかし、陽性反応の強度が不十分のため、画像解析による定量化は困難であった。HLA-DR陽性活性化ミクログリアはSVD群で多く分布し、白質・皮質とも対照に比べ有意であった。アルツハイマー病では大脳皮質で軽度の活性化を認めた。ICAM-1, LFA-1についてはSVD, ADとも対照より発現が有意に高値であった。TNF α ではSVDの白質病変部、ADの大脳皮質で発現が亢進していた（富本）。

D. 考察

昨年度までの血管性認知症モデル動物の病理の解析より、血管内皮細胞のE-selectin発現が虚血性大脳白質病変、記憶機能障害発症における血管内皮細胞の活性化、グリア細胞活性化、リンパ球の浸潤等の免疫、炎症反応の起点であると考えられた。本病態機序の中心的役割をする細胞接着分子、E-selectinに対する阻止抗体は、血管性認知症モデルラット、マウスの血管内皮細胞に発現したE-selectinに特異的に結合し、白血球と血管内皮細胞の接着を阻害し、組織障害性免疫、炎症反応を抑制し、記憶機能障害と虚血性大脳白質病変に対する保護効果を認めた。以上の結果より、ヒト血管性認知症の新規治療法として、E-selectin発現を中心とした血管内皮細胞活性化を起点とした炎症機構を標的とした、病態制御が有望であることが

示された。(脇田)。変異Notch3は凝集し易く、ERに蓄積してERストレス反応を著しく誘導することが判明した。このERストレス反応の昂進は細胞増殖率を低下させ、プロテオソーム阻害剤による細胞死を増加させることが明らかとなった。この変異Notch3の性質はGO M形成に関係している可能性がある。一方、変異Notch3の分解促進剤の解析ではtaurosoodeoxycholic acid (TDCA)、4,5-dianilinophthalimide (DAPH), Staurosporine aglycone (SA)およびThioflavine T (ThT)は変異Notch3蛋白質の分解を促進させ、Notch3の細胞内凝集の阻害効果を示すことが判明した。特にDAPH, SAおよびThTはアミロイドA β の凝集を阻害することが報告されており、本研究で開発した変異Notch3発現細胞はNotch3のみならずアミロイドA β の凝集阻害剤や分解促進剤のスクリーニングにも応用可能であると考えられる(高橋)。アセチル化制御薬でHMGB1の放出を制御できることが示唆され、HMGB1を介した炎症応答の制御による虚血性神経細胞障害の治療の可能性が明らかになった。核内に存在するHMGB1は低酸素、炎症性サイトカイン、あるいは細菌毒素等の刺激によりアセチル化修飾を受けた後、細胞外へ放出される。アセチル化阻害剤は、HMGB1のアセチル化を制御することにより、HMGB1の放出を阻害し、血管内皮の活性化と炎症反応の進展を抑制することが考えられた(松下)。接着分子の血管内皮、白血球、一部ミクログリアへの発現は、対照群に比べSVD、ADで多い傾向があるが、病変部位特異性は少なく、虚血性白質病変の成立機転の上流に位置する現象と考えられる。一方、病変機序の下流に位置すると考えられる炎症性サイトカインTNF α の局在は、主たる病変部位(SVDでは大脳白質、ADでは大脳皮質)と強く相関しており、矛盾しない結果であった。これらの脳内の慢性炎症機転は、オリゴデンドログリアの細胞障害やグリオシスを引き起こし白質病変形成に関与する可能性が考えられた(富本)。

E. 結論

血管性認知症において、血管内皮細胞活性化や小胞体ストレス反応を起点とした大脳白質病変や認知症発症メカニズムが解明され、細胞接着分子阻止抗体、HMGB-1中和抗体、アセチル化制御薬、小胞体ストレス反応の制御が治療法として有望であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoshizaki K, Adachi K, Kataoka S, Watanabe A, Tabira T, Takahashi K, Wakita H. Chronic cerebral hypoperfusion induced by right unilateral common carotid artery occlusion causes delayed white matter lesions and cognitive impairment in adult mice. *Exp. Neurol.*, 210: 585-591, 2008

Yoshizaki K, Wakita H, Takeda K, Takahashi K. Conditional expression of microRNA against E-selectin inhibits leukocyte-endothelial adhesive interaction under inflammatory condition. *Biochem Biophys Res Commun* 371: 747-751, 2008

Araki W, Takahashi-Sasaki N, Chi DH, Saito S, Takeda K, Shirogami K, Takahashi K, Muraya KS, Kametani F, Shiraiishi H, Komano H, Tabira T. A family of membrane proteins associated with presenilin expression and γ -secretase function. *FASEB J* 22: 819-827, 2008

Into T, Inomata M, Nakashima M, Shibata K, Häcker H, Matsushita K: Regulation of MyD88-dependent signaling events by S-nitrosylation retards Toll-like receptor signal transduction and initiation of acute-phase immune responses. *Mol Cell Biol* 28: 1338-1347, 2008

Kanno Y, Into T, Lowenstein CJ, Matsushita K: Nitric oxide regulates vascular calcification by interfering with TGF- β signaling. *Cardiovasc Res* 77:221-230, 2008

Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabeekura J, Wakita H, Nakamura H, Into T, Matsushita K, Nakashima M: A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells* 26:

2408-2418, 2008.

2. 学会発表

Fujita Y, Tomimoto H, Takahashi R: Cilostazol alleviates cerebral small vessel changes and white matter lesions in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (abstr). The 4th Cong of the International Society for Vascular and Behavioral Cognitive Disorders (Vas-Cog), p 34, 2009

Yamada M, Ihara M, Tomimoto H: A role of intracellular adhesion molecules in the pathogenesis of white matter lesion; an analysis of human brain. The 4th Cong of the International Society for Vascular and Behavioral Cognitive Disorders (Vas-Cog), p 69, 2009

Tomimoto H: Long standing chronic cerebral hypoperfusion accelerates A β aggregation, brain atrophy and memory impairment. The 4th Cong of the International Society for Vascular and Behavioral Cognitive Disorders (Vas-Cog), p 18, 2009

渡邊 淳, 國本正子, 田平 武, Kalaria R N, 高橋慶吉: 家族性脳血管性認知症CADASILにおける血管変性メカニズムの解析. 第27回日本認知症学会, 2008年10月10日, 前橋

杉浦進介, 江口傑徳, 猪俣恵, 小松寿明
松下健二: エンドトキシンショック制御を目的としたHMGB1のアセチル化・放出の制御 第14回日本エンドトキシンショック研究会, 2008年10月25日, 仙台

猪俣恵, 江口傑徳, 杉浦進介, 小松寿明
松下健二: Th1およびTh2由来サイトカインはSTATの活性化を介してWeibel-Palade Bodyの構成因子の発現を変化させる BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) 2008年12月9日, 神戸

江口傑徳, 小松寿明, 杉浦進介, 猪俣恵
松下健二: 可溶性セレクチンによる菌体成分排除 BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会), 2008年12月12日, 神戸

杉浦進介, 江口傑徳, 猪俣恵, 小松寿明, 野口俊英, 松下健二: ヒストンアセチル化制御薬による新規炎症性サイトカインHMGB1の放出制御 BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会), 2008年12月12日, 神戸

高橋慶吉: 血管性認知症CADASILの解析 神奈川脳研究フォーラム, 2009年2月6日 横浜

脇田英明: ラット慢性低灌流モデルにおける細胞接着分子発現とリンパ球浸潤の検討. 第34回日本脳卒中学会総会, 2009年3月22日, 松江

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特許出願

発明者: 脇田英明、足立香代、五十嵐貢一、大家一典

発明の名称: 抗Eセレクチン抗体による認知症予防効果

出願年月日: 平成21年2月10日

出願番号: 特願2009-29179

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし。

研究協力者

足立香代	国立長寿医療センター研究所
引頭 毅	国立長寿医療センター研究所
江口傑徳	国立長寿医療センター研究所
猪俣 恵	国立長寿医療センター研究所
杉浦進介	国立長寿医療センター研究所
小松寿明	国立長寿医療センター研究所
吉崎嘉一	国立長寿医療センター
菅野陽介	同志社女子大学薬学部
山田真人	京都大学大学院医学研究科 臨床神経学

図1 ラット血管性認知症モデルにおけるE-selectinの発現

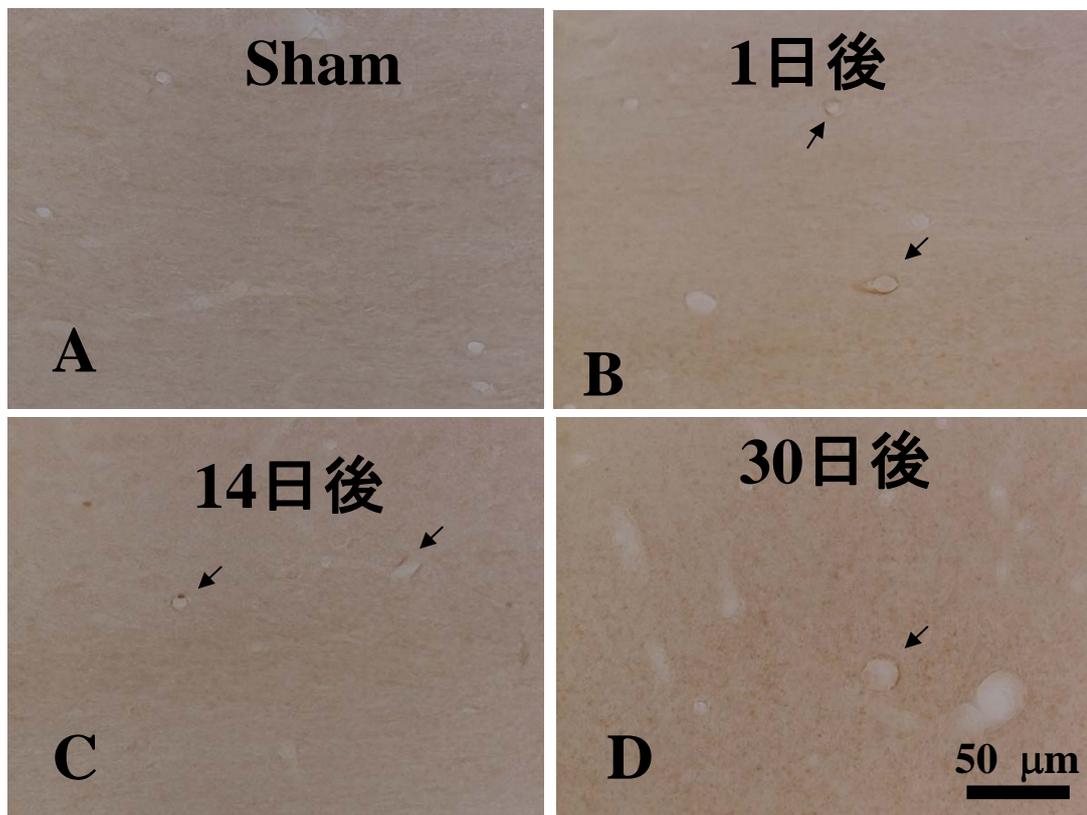


図2 ラット血管性認知症モデルにおけるCD4陽性T細胞の浸潤

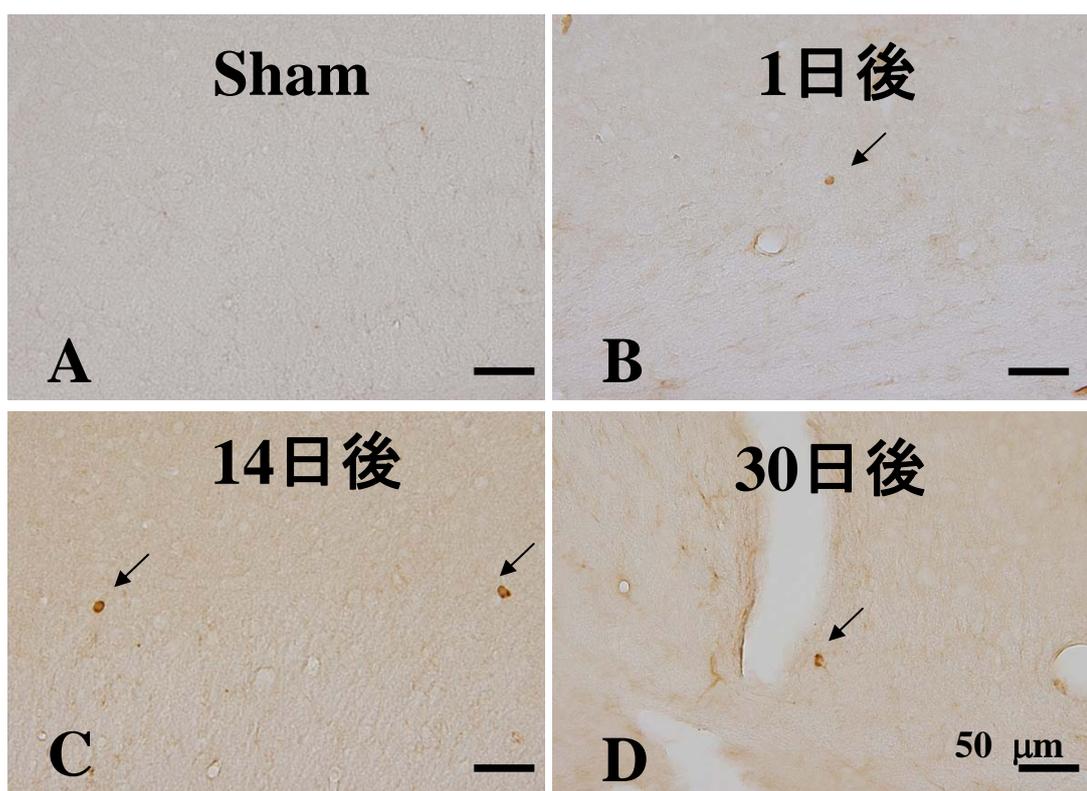


図3 ラット血管性認知症モデルにおけるミクログリア活性化

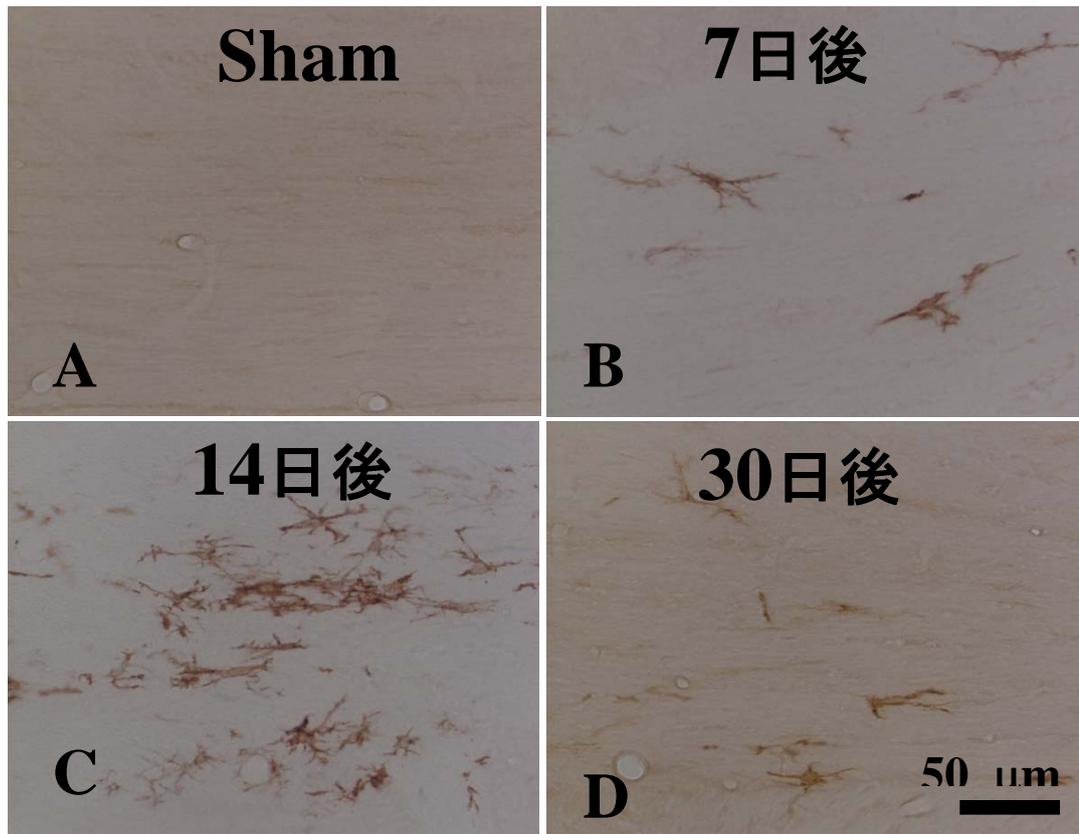


図4 抗E-selectin抗体による接着阻止

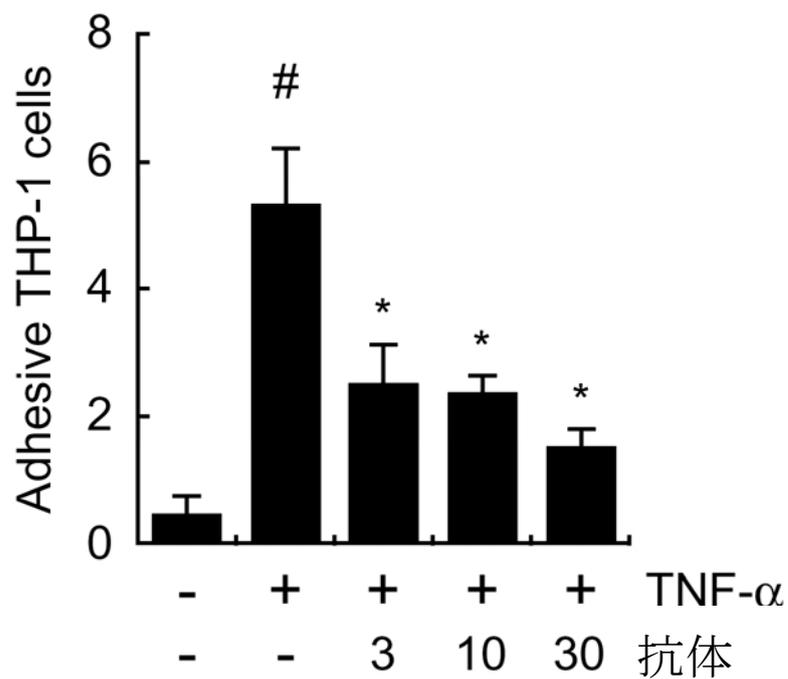


図7 変異型Notch3を導入した細胞での凝集タンパク質の解析

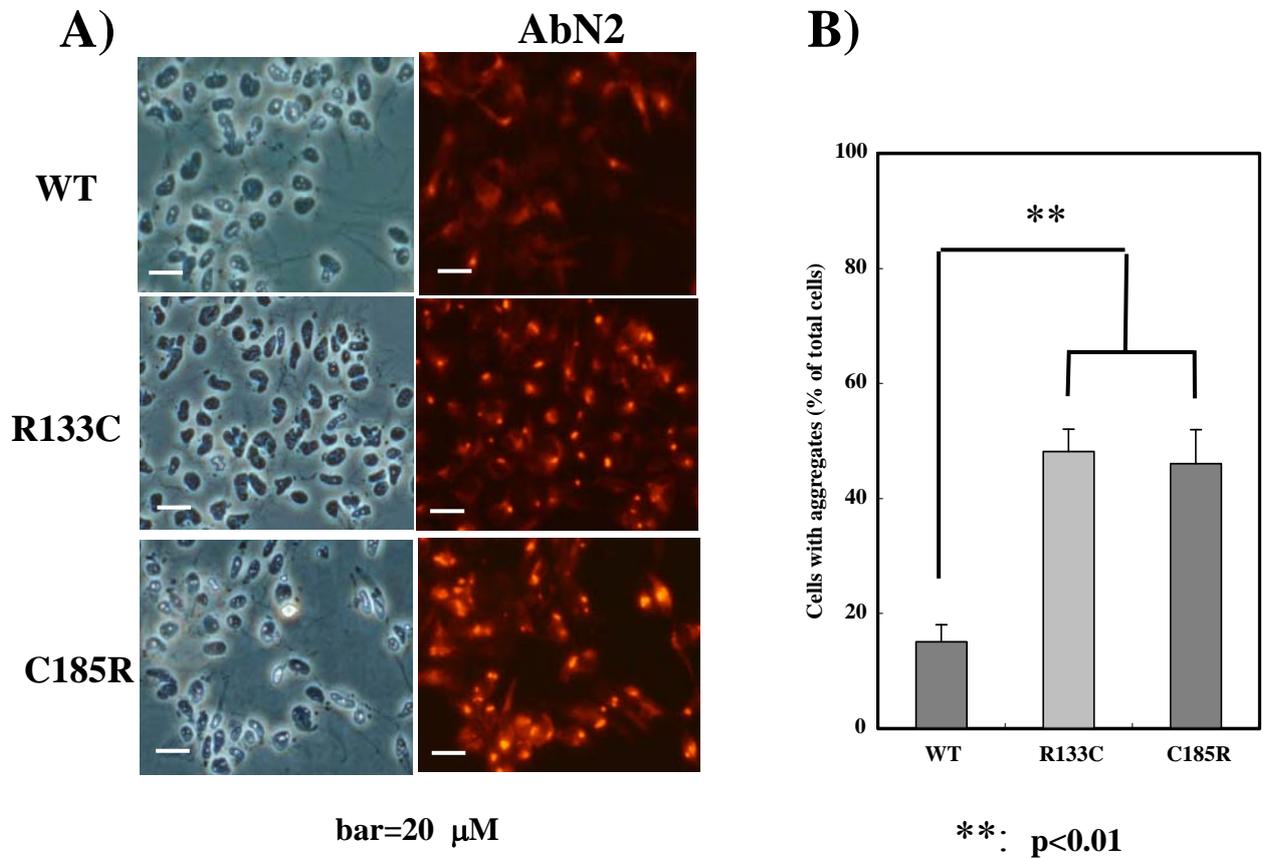


図8 低酸素下におけるHAECからのHMGB1の放出

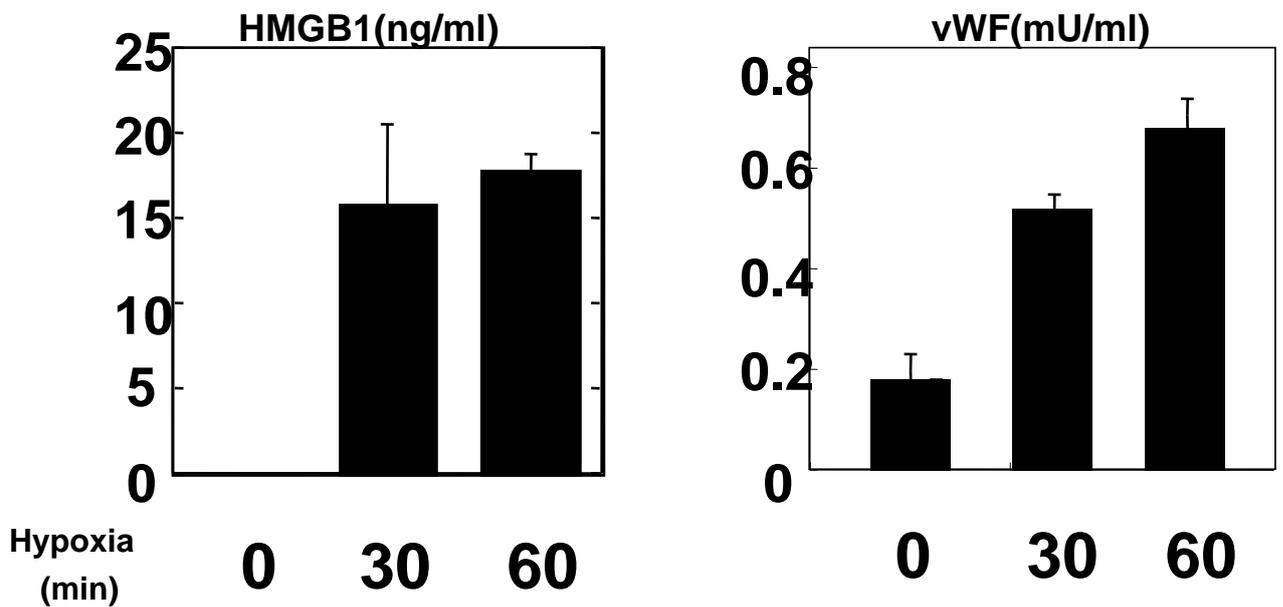


図8 HAECにおけるHMGB1によるE-selectinの発現誘導

