

糖尿病合併アルツハイマー病での反応性グリア系細胞における Btg2 発現増強の意義
解明
(19-45)

主任研究者 鈴木 香 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (流動研究員)

研究要旨

申請者らのグループはこれまで糖尿病合併アルツハイマー病 (AD) モデルである APP23;ob/ob マウスを用いた病態メカニズムの解明を行っており、RNA sequence 法により生後 18 か月の老齢 APP23;ob/ob マウス脳において特異的に発現上昇する 37 遺伝子を同定した。その中の 1 つで報告される細胞増殖抑制因子 B-cell translocation gene 2 (Btg2) は虚血・てんかん誘発マウス、また公開データベース検索よりヒト AD でも発現上昇する遺伝子であることが分かった。そこで我々は本分子に着目し、独自に Btg2KO マウスを作製して解析を行うこととした。

一方、糖尿病は AD 発症のリスク因子であることが疫学研究より知られている。高血糖状態では血管炎症や毛細血管の閉塞が誘発されることから、我々は糖尿病合併 AD では脳内流量の慢性的な低下が AD 発症と何らかの関係があると考え、慢性脳低灌流のモデルである両側総頸動脈狭窄 (bilateral common carotid stenosis: BCAS) 技術を三重大学神経内科・富本秀和教授よりご指導頂き、本研究部に取り入れた。

また、BCAS 施術マウス脳では Btg2 遺伝子の発現が上昇することが報告されていることから、申請者らは独自に作製した Btg2 ノックアウト (KO) マウスに BCAS を施術した際の脳内炎症を病理学的に解析するとともに、BCAS を施したマウスの認知行動について野生型マウスおよび偽手術群と比較解析することにより、Btg2 分子の糖尿病合併 AD 病態における脳内での機能と役割について調べた。

主任研究者

鈴木 香 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (流動研究員)

分担研究者

里 直行 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (部長)

A. 研究目的

申請者らのグループはこれまで糖尿病合併アルツハイマー病（AD）モデルである APP23;ob/ob マウスを用いた病態メカニズムの解明を行ってきており、RNA sequence 法により生後 18 か月の老齢 AP23;ob/ob マウス脳において特異的に発現上昇する 37 遺伝子を同定した。その中の 1 つで報告される細胞増殖抑制因子 B-cell translocation gene 2 (Btg2) は虚血・てんかん誘発マウス、また公開データベース検索よりヒト AD でも発現上昇する遺伝子であることが分かった。そこで我々は本分子に着目し、独自に Btg2KO マウスを作製して解析を行うこととした。

一方、糖尿病は AD 発症のリスク因子であることが疫学研究より知られている。糖尿病が血管障害に関与することから、我々は糖尿病合併 AD では脳内血流量の慢性的な低下が AD 発症と何らかの関係があると考え、慢性脳低灌流のモデルである両側総頸動脈狭窄 (bilateral common carotid stenosis: BCAS) 技術を三重大学神経内科・富本秀和教授よりご指導頂き、本研究部に取り入れた。

また、Ohtomo ら（文献 1）により BCAS 施術マウス脳では Btg2 遺伝子の発現が上昇することが報告されていることから、申請者らは独自に作製した Btg2KO (KO) マウスに BCAS を施術した際の脳内炎症を病理学的に解析するとともに、Btg2KO マウスにおいて慢性脳低灌流の行動に及ぼす影響を調べるため、オープンフィールド試験、新規物体認識試験、モリス水迷路による行動試験を行い、野生型マウスおよび偽手術群と比較解析し、Btg2 分子の糖尿病合併 AD 病態における脳内での機能と役割について調べた。

B. 研究方法

◆BCAS 法による慢性脳低灌流マウスモデルの作製

慢性脳低灌流法を誘発する両側総頸動脈狭窄 (BCAS) 法は以下の通りである。マウス総頸動脈より迷走神経を剥離し、内径 $\phi 0.18\text{mm}$ の鋼製マイクロコイルを装着し縫合した。偽手術群は総頸動脈露出と迷走神経の剥離のみを行い縫合した。実験終了後は BCAS 施術群・偽手術群ともに両側総頸動脈のコイル装着の有無を再確認した。

◆BCAS 施術 Btg2KO マウスの行動解析

BCAS 施術 Btg2KO マウスでのオープンフィールド試験、新規物体認識試験、モリス水迷路による行動実験の方法は以下のとおりである。生後 9~11 週齢 Btg2KO マウスは同腹野生型個体とともに本研究所実験動物施設より第 2 研究棟 3 階動物飼育室へ移動し BCAS 施術を行った。1 か月間飼育後オープンフィールド試験、新規物体認識試験を行い、施術後 1 か月半後、同一個体でモリス水迷路試験による認知機能試験を行った。オープンフィールド試験では $30 \times 30 \times 30 \text{ cm}^3$ 箱内での 15 分間、新規物体認識試験は 90 秒間の総移動距離を測定し、ビデオトラッキングシステムおよび ANY-Maze ソフトウェアを用いデータ収集及び解析を行った。モリス水迷路実験は初日午前 Free Swimming を行い、午後より 90 秒間

の Hidden platform trial を 2 session、その後 2 日目から 5 日まで午前午後各 2 session 同様に行い（合計 18 回の Trial）、6 日目にプローブテストおよび視覚テストを行った。オープンフィールド試験同様ビデオトラッキングシステムおよび ANY-Maze ソフトウェアを用いデータ収集及び解析を行った。

◆BCAS マウス脳^の生化学・病理解析

行動実験後、脳組織を生化学・分子生物学・組織学的解析用に以下の方法で回収した。マウスをイソフルランで麻酔後、心臓より PBS で灌流を行い、脳右半球を液体窒素にて急速凍結し、脳左半球を 4%パラホルムアルデヒド/PBS で 4℃一晩固定し組織解析用とした。マウス固定及び病理解析は偽手術群と常に対で行った。厚さ 5um のパラフィン切片を Klüber-barrera 染色しミエリン組織解析を行った。白質脳領域は脳梁・視神経を選択し、Wakita ら（文献 2）による白質病変重症度の評価分類を参考として第三者へ分類を委託し重症度を算出した。

◆抗体の検討

バリデーションを行ったグリア細胞特異的抗体（抗 GFAP ウサギポリクローナル抗体、抗 anti-Mac2 ラットモノクローナル抗体、抗 Iba1 ウサギポリクローナル抗体）を用いて偽手術・BCAS 施術群の野生型・Btg2K0 マウスのグリア細胞を免疫組織化学的に検出した。画像内白質総面積に対する免疫陽性面積の割合を ImageJ 画像解析ソフトウェアで数値化した。

In vitro における Btg2 のグリア細胞における機能を解析するため、Btg2 のグリア系初代培養系へレンチウイルス感染実験を行った。胎生期 E17~E18 のマウス脳より得た総グリア初代培養細胞を 37℃、200rpm で 3hr 水平振盪し、ミクログリアを単離しウイルス感染した。導入遺伝子は CSII-CMV-MCS、CSII-CMV-Btg2、CSII-CMV-MCS-IRES2-Venus プラスミドベクターと pCMV-VSV-G-RSV-Rev、pCAG-HIVgp パッケージングプラスミドベクター を 293T 細胞へトランスフェクションし、培養液を Lenti-X concentrator で 100 倍のウイルス濃縮液にして感染に用いた。

（倫理面への配慮）

本研究では倫理面において以下を配慮して実験を行った。

- ◆ 本研究のすべての動物実験は下記の国のガイドライン・法律などを遵守し、実施する。

「動物の愛護および管理に関する法律」（昭和 48 年法律第 105 号）

「研究機関などにおける動物実験等の実施に関する基本指針」（平成 18 年度厚生労働省告示第 71 号）

- ◆ マウスを用いた動物実験での 3R' s のうち、厳守義務である Refinement（苦痛の軽減）への対策として、手術の際に使用する麻酔は三種混合麻酔とその拮抗薬を併用し麻酔からの早期覚醒を促進した。その結果、術後は大変穏やかな覚醒が認められ、動物の苦痛が低い良好な結果が得られている。

- ◆ 組み換え DNA 実験に関しては平成 16 年 2 月に施行された「カルタヘナ法（遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律）」を遵守し、規定に則った実験プロトコルを作成し遵守して研究を行う。

レンチウイルス実験における遺伝子組み換え実験の注意事項、及び感染拡散防止対策として、ウイルス実験使用培地及び機器類の P2 室内でのオートクレーブ滅菌を行い、感染拡散防止を徹底する。

C. 研究結果

◆BCAS 法による慢性脳低灌流マウスモデルの作製

本研究部において導入した BCAS 技術を施して 1 ヶ月後のマウス脳白質において、BCAS 群では白質のミエリン繊維変性や空胞化といった白質病変の重症度が上昇していたことから、慢性脳低灌流が誘発されていることが確認された。Btg2K0 マウスでは野生型よりも白質病変の重症度が高い傾向がみられた。

◆BCAS 施術 Btg2K0 マウスの行動解析

・オープンフィールド試験では Btg2K0 マウス、特に BCAS 施術した雄マウスで有意な活動量の増加が見られた。新規物体認識試験でもオープンフィールド試験同様 BCAS 施術 Btg2K0 マウスにおいて有意な活動量増加傾向が見られたが、新規に変更した物体に対する接触回数が、旧物体に対して 5 割以下であったことから、認知学習が成立していない可能性があったことから、本試験はさらなる条件設定が必要であるとみなし、本結果を不採用とした。

・モリス迷路では Trial 最終日の逃避時間が BCAS 施術野生型、BCAS 施術 Btg2K0 マウスの両方で高い傾向にあったが、プローブテストでは BCAS 施術群で platform のある Quadrant area への侵入割合は偽手術群と比較して有意な差はみられなかった。以上より BCAS で野生型および Btg2K0 マウスいずれにおいても認知機能低下の傾向は認められるものの有意な差は認められなかった。

◆グリア細胞同定のための抗体バリデーション

GFAP, Mac2, Iba1 に対する抗体のバリデーションを免疫組織化学法にて行い、抗 GFAP 抗体 : Dako #IS524 ウサギポリクローナル、Proteintech #60190-1-Ig マウスモノクローナル、抗 Iba-1 抗体 : Wako #019-19741 ウサギポリクローナル、抗 Mac2 抗体 : Cederlane #CL8942AP ラットモノクローナル抗体で良好な検出が認められた。

またミクログリア特異的抗体として、ミクログリアの化学走性を誘発し ATP 応答性分子である P2Y12 抗体 (#AnaSpec, AS-55043A)、およびマクロファージ非反応性マーカーである TMEM119 (Abcam # ab209064) についても BCAS マウス脳で発現を確認した。その結果、P2Y12

は Mac2 と虚血領域で共局在が確認された。

◆抗 Btg2 抗体の作製とバリデーション

我々の研究室において独自に作製した Btg2 抗体では、ウェスタンブロッティングで Btg2 の分子量である 17kDa 付近にシグナルが検出されなかった。Santa Cruz 1A5, Sigma 社、Bioss 社抗体ではリコンビナント Btg2 タンパクを用いたウェスタンブロッティングでシグナルの検出が見られなかった。抗原ペプチドを添加し反応させた吸収抗体による免疫組織化学では免疫陽性反応が消失した。市販抗体では、Bioss 社製の抗体(#bs-0031R)を用いたウェスタンブロッティングにおいて、Btg2KO ホモマウス脳ホモジェネートで野生型よりシグナルの減少が確認されたことから、本抗体が使用可能であることが示唆された。

◆Btg2KO マウスの維持管理

CRISPR/Cas9 法による KO マウスのオフ・ターゲット効果排除については、現在当研究室で維持している Btg2KO マウス系統(11 塩基欠損)で C57BL/6J 系統正常雌マウスと 6 回の戻交配が完了し、オフ・ターゲットの影響を排除した。また本研究では上記以外の系統(8 および 10 塩基欠損)は不使用のため凍結維持を継続している。

◆in vitroでのレンチウイルスを用いた Btg2 遺伝子導入

ミクログリアへ上述ベクターで作製したレンチウイルス濃縮液で感染実験を行った。マウス総グリア初代培養細胞を 37°C、200rpm で 3hr 水平振盪し、ミクログリアを単離しウイルス感染を行った。感染ウイルス液は 293T 細胞へ感染後 6 日目の培地で、ウイルス外殻遺伝子をあらかじめ Real-Time PCR で検出し、その結果 x100 倍濃縮ストックしたウイルス液を、感染時に x1 に希釈して使用した。ポジティブコントロールである CSII-CMV-MCS-IRES2-Venus ウイルス感染細胞では Venus の蛍光が単離ミクログリアで確認された。その後 Real-Time PCR にてミクログリアの Btg2 遺伝子発現検出を行ったが、ネガティブコントロールと同レベルの発現であり良好な結果が得られなかった。

◆in vitroでの BrdU 投与による Btg2 の細胞増殖抑制機能の解析

BrdU immunohistochemistry kit (Abcam, ab125306, Sheep poly)および BrdU Monoclonal antibody (Proteintec #66241-1-1g) は共に検出可能な抗体であることから、10% FBS/DMEM-F12 で培養および無血清/DMEM-F12 で培養した初代培養グリア細胞へ 10uM の BrdU を 24hr 取り込ませて in vitro 実験での検出を試みた。その結果、無血清培地の細胞で BrdU を取り込ませた細胞と比較して 10%FBS 添加培地で BrdU を取り込ませたグリア細胞では BrdU を取り込んだ細胞核の染色性が、先に記載した Abcam 社の抗体により確認された。

D. 考察と結論

【考察】

◆ 本研究において Btg2 抗体はマウス脳ホモジェネートを用いたウェスタンブロッティング法において複数メーカー製品で検討したが、ハウスキーピング分子が問題なく検出できる試料および実験条件であるにもかかわらず Btg2 分子の検出は不明瞭であった。脳ホモジェネートをサンプルに使用し Btg2 分子を検出するための予備実験として、Flag-tag Btg2 リコンビナントタンパクをポジティブコントロールに用いて検出を行った。抗 Flag 抗体では分子量 17kDa (マウス Btg2 の分子量) に明瞭なバンドが濃度依存的に認められたが、抗 Btg2 抗体では同分子量にバンドを認められなかった。

In vitro 実験は、マウス胎児脳からの初代培養ミクログリア単離と培養、ウイルス感染まではポジティブコントロール結果から、本研究部で実験系が確立した。しかしながら現在得られているウイルスは、通常使用するウイルスよりも MOI が低いため、Btg2 の機能解析をより良い条件で行うためには、現在より MOI の高い感染ウイルス溶液を得ることが課題である。

【結論】

- ◆ 本研究部において行った BCAS 法で白質のミエリン繊維変性や空胞化といった白質病変の重症度が上昇していたことから、慢性脳低灌流の誘発と白質病変重症度の病理評価が可能となった。慢性脳低灌流の行動への影響として、Btg2KO マウスでは活動量の有意な増加が見られたが、認知行動試験であるモリス迷路では Sham/BCAS 施術および野生型/Btg2KO の間に有意な差は認められなかった。
- ◆ BCAS 施術群の脳領域でアストロサイトとミクログリア、活性化ミクログリア・マクrophage いずれも免疫陽性面積の増加傾向が見られ、特に Btg2KO マウスでは野生型より増加傾向であった。ミクログリア特異的抗体による検出から、BCAS マウス脳では、活性化ミクログリア・マクrophage に発現する分子である Mac2、また ATP 依存的に化学走性に関与する P2Y12 の発現が高かった。
- ◆ In vitro 系での Btg2 機能解析のためには、より高 MOI のウイルス液を調整する。
- ◆ マウス初代培養グリア細胞での BrdU による分裂活性が可能となったことから、増殖期の細胞の数値化と、Btg2 発現及び KO 細胞における炎症誘発と分裂活性測定結果を得る。
- ◆ 論文執筆の進捗状況については、必要なデータを継続して得つつ年次計画通り執筆を開始し着実に進めている。

<参考文献>

文献1 : Ohtomo R, Bannai T, Ohtomo G, Shindo A, Tomimoto H, Tsuji S, Iwata A.

Cilostazol alleviates white matter degeneration caused by chronic cerebral hypoperfusion in mice: Implication of its mechanism from gene expression analysis. *Neurosci. Letter* 2018, Jan 1;662:247-252.

文献2 : Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I, Kimura J. Glial activation and white matter changes in the rat brain induced by chronic cerebral hypoperfusion: an immunohistochemical study *Acta Neurophathol.* 1994, 87:484-492.

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shinohara M, Tashiro Y, Shinohara M, Hirokawa J, Suzuki K, Onishi-Takeya M, Mukouzono M, Takeda S, Saito T, Fukumori A, Saido TC, Morishita R, Sato N. Increased levels of A β 42 decrease the lifespan of ob/ob mice with dysregulation of microglia and astrocytes. *The FASEB Journal*.2020 Feb;34(2):2425-2435.
2. Shinohara M, Tashiro Y, Suzuki K, Fukumori A, Guojun Bu, Sato N., Interaction between APOE genotype and diabetes in cognitive decline., *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*.2020 Feb 6;12(1): e12006

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし