

アルツハイマー病と Scara1

6年C組 熊懷紗英

指導教諭 櫻井 昭

1. 要約

アルツハイマー病と Scara1 に関する2つの相反する論文が発表されている。1つは Scara1 の欠損はミクログリアのアミロイド β ($A\beta$) のクリアランスを阻害し、アルツハイマー病の発症を加速させるというもの。もう1つは Scara1 は $A\beta$ のクリアランスに関与しているわけでもなく、アルツハイマー病の発症にも関与しないという論文である。私はこの結果の違いにはアルツハイマー病には $A\beta$ のオリゴマーが関与し、Scara1 はミクログリアのオリゴマーに関する活性に変化をもたらすと考え、それを証明する追加実験を考えた。

キーワード Scara1 アミロイド β $A\beta$ オリゴマー

2. 研究の背景と目的

2.1 研究動機

私の祖母がアルツハイマー病を患っていたこともあり、アルツハイマー病には非常に関心が高かった。また、以前外部での講義を聞かせていただいたときに、オリゴマー仮説(2.2.2 参照)の話聞き、興味をもち、研究の題材にしたいと考えた。

ただ今回扱うテーマを半年という限られた期間のなかで高校生が実験で検証し考察するのは厳しいと考えたので、今すでに発表されている論文を考察し、浮かんだ疑問の検証方法について考えた。

2.2 アルツハイマー病について

2.2.1 アルツハイマー病とは

アルツハイマー病は、主に $A\beta$ やタウタンパク質が凝集し、その凝集したものによって、ニューロン(神経細胞)が死に至る

ことにより、記憶障害や思考能力の低下などの症状が出てしまう病気である。まだ有効な治療薬は実用化されておらず、注目されている研究のひとつである。

$A\beta$ はニューロンの細胞膜にある $A\beta$ 前駆体タンパク質(A β PP)というタンパク質がはたらきを終わると、 β セクレターゼと γ セクレターゼという酵素によって切り離され、脳内に放たれる。すると、 $A\beta$ 同士が次々と凝集していく。(この凝集し、巨大なかたまりとなったものをアミロイド斑、もしくは老人斑と呼ぶ。) $A\beta$ がニューロンにダメージを与えて細胞死を引き起こしたり、シナプス間隙に入り込むことにより、情報伝達の阻害をされると考えられている。

$A\beta$ が蓄積されることにより、ニューロンの中にある微小管を構成するタンパク質チューブリンをバラバラにならないようにするはたらきのあるタウタンパク質が、

微小管からはなれ、凝集してしまう。微小管がなくなってしまうことにより、ニューロンは隅々まで栄養が運べなくなることで、ニューロンの死につながり、またタウの凝集はニューロンから吐き出され、健康なニューロンにも被害を及ぼしてしまう。

脳内にはグリア細胞というニューロンに栄養を渡したり、病変を修復したりする細胞があり、そのひとつにミクログリアと呼ばれるものがある。ミクログリアは普段 $A\beta$ の除去する作用があります。

2.1.2 オリゴマー仮説

今まではアミロイド斑が脳内のニューロンに有害で、アルツハイマー病の原因と考えられてきた。しかし認知機能の低下とアミロイド斑の数が一致しないという事例もあり、近年 $A\beta$ が数個～数十個の分子が会合した小さな集合体を $A\beta$ オリゴマーといい、これが非常に毒性が強く、ニューロンに害を与え、その機能を邪魔することで認知機能の低下が起こるといふ仮説が有力視される考え方が出てきた。

ミクログリアによる $sA\beta$ の取り込みが実際に受容体介在の事象であることを確認するために、増加する濃度の $sA\beta$ およびフローサイトメトリーによる定量された取り込みを有する N9 ミクログリアをインキュベートした。図 2a に見られるように、ミクログリアによる $sA\beta$ の取り込みは $\sim 2\mu M$ で飽和に達し始めた。さらに、N9 ミクログリアによる $sA\beta$ の取り込みは時間依存性であり、約 4 時間で飽和に達した (図 2b)。これらのデータは、ミクログリアによる $sA\beta$ の取り込みが受容体媒介性であり、用量および時間依存的に飽和性であることを示している。ミクログリアによる $sA\beta$ の取り込みがスカベンジャーレセプターによって媒介されることをさらに確認するために、N9 細胞を $1\mu M$ の $sA\beta$ 1-42-HilyteFluor488 $\pm 200\mu M$ フコイダン (スカベンジャーレセプターの広範な阻害剤) で 2 時間インキュベートし、フローサイトメトリーによる取り込みを測定した。フコイダンは、N9 ミクログリア (図 2c) によって採取された $sA\beta$ の量および $sA\beta$ を取った細胞の数を有意に阻害した (図 2d)。

3. 論文内容

3.1 論文 A

3.1.1 題名

Scarl deficiency impairs clearance of soluble Amyloid- β by mononuclear phagocytes and accelerates Alzheimer's-like disease progression

Dan Frenkel 他

3.1.2 内容 (一部抜粋)

shRNA スクリーニングにより、Scarl は $A\beta$ の受容体であると同定された

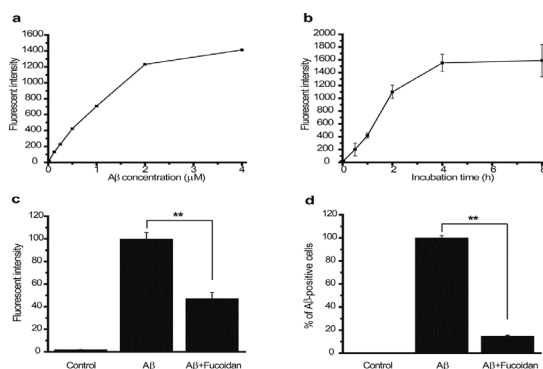


図 2 N9 ミクログリアによる $sA\beta$ 取り込み

Scara1 欠損は、sA β 取り込みの減少と関連している

Scara1 の標的化された欠失のみが、新鮮な単球 (図 3a) およびミクログリア (図 3b) による sA β の取り込みのそれぞれ 65% および 50% の有意な減少をもたらした。このデータは、Scara1 が単球およびミクログリアによる sA β の取り込みに対する主要受容体であり、Scara1 媒介性取り込みが重複していないことを示している。

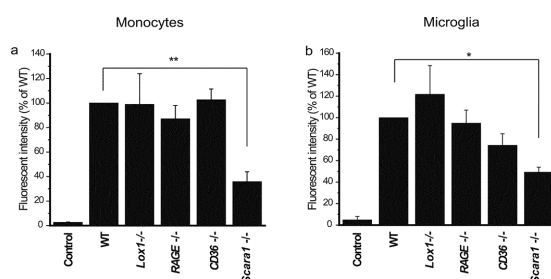


図 3 Scara1 は sA β の主要な単球およびミクログリア受容体である

PS1-APP-Scara1 - / -マウスにおける死亡率の増加

Scara1 が in vivo で sA β のクリアランスを媒介するかどうか、および A β の蓄積に対するこのようなクリアランスの効果を判定するために、我々は PS1-APP- Scara1 - / -マウスを作製し、これらのマウスを A β レベルおよび AD(アルツハイマー)様病状について分析した。これを達成するために、ケモカイン受容体 Ccr21 を欠損したトランスジェニック APP マウスを作製するために過去に成功した戦略を利用した。簡潔には、C57BL6 バックグラウンド上の PS1-APP マウスを Scara1 - / -マウス (C57BL6 バックグラウンド上で

も) と交配させて、PS1-APP- Scara1 +/-マウスを作製した。次いで、これらのマウスを Scara1 - / -マウスに渡して、PS1-APP- Scara1 - / -マウスを作製した。Scara1 +/-および PS1-APP- Scara1 - / -マウスは、当初、明らかな行動異常なく健康的に見られた。しかし、7 週齢に達した後、対照 PS1-APP マウスと比較して、PS1-APP- Scara1 +/-および PS1-APP- Scara1 - / -マウスの両方の死亡率の顕著な増加があった (図 4a)。160 日齢までに、PS1-APP- Scara1 - / +の 39%および PS1-APP- Scara1 - / -マウスの 53%が死亡したが、PS1-APP マウスの 16%と比較して死亡した。対照的に、PS1-APP- Scara1 - / -マウスは、我々のデータ収集が 160 日までに停止するまで、死亡し続けたのに対して、死亡 PS1-APP- Scara1 +/-マウスの数は 108 日でプラトーに達した。PS1-APP- Scara1 - / -マウスは PS1-APP- Scara1 +/-マウスよりも 160 日で死亡率が高かったが、これらの 2 つの遺伝子型の全体的な差異は統計的有意性に達しなかった (図 4a)。これらのデータは、Scara1 欠損が、PS1-APP トランスジェーンを発現するマウスにおける死亡率の増加をもたらすことを示す。また Ccr2 欠損 (単核食細胞漸増を減少させるが、その機能に影響を与えない欠損) で見いだされたものと同様である。そして単核細胞食細胞数または機能の遮断が AD マウスモデルにおいて有害な効果を有することを示す。

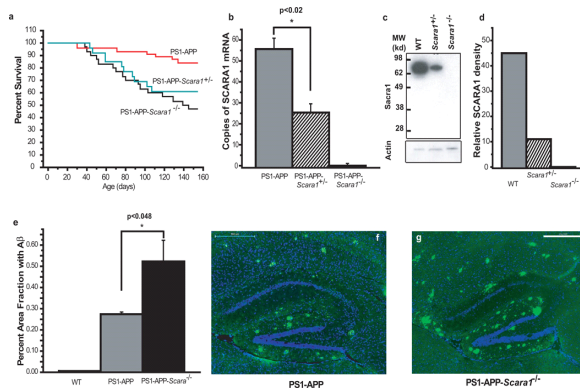


図 4

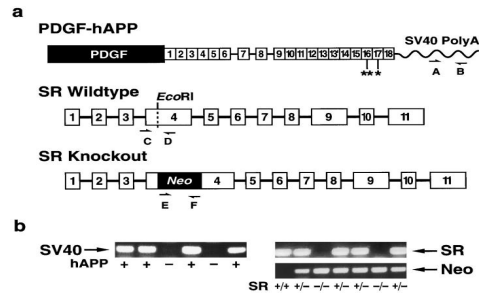


図 1

SR の欠如は、hAPP マウスにおけるアミロイドプラーク沈着に影響しない

3.2 論文B

3.2.1

Elimination of the Class A scavenger receptor does not affect amyloid plaque formation or neurodegeneration in transgenic mice expressing human amyloid protein

Frederick Huang 他

3.2.2 内容(一部抜粋)

hAPP トランスジェニックマウス(h はヒトを表す)におけるSR(Scarf1)の排除

生体内でSRがアミロイド斑の形成および神経変性に決定的に重要であるかどうかを調べるために、ヒトAβ発現を高レベルで示すFAD突然変異体hAPPマウスをSR^{-/-}マウスと交配した。病理組織学的分析のために、hAPP^{+/-}SR^{+/+}、hAPP^{+/-}SR^{-/-}、hAPP^{-/-}SR^{+/+}、およびhAPP^{-/-}SR^{-/-}の遺伝子型を選択した(図1)。

hAPP^{+/-}SR^{+/+}マウスにおけるアミロイド沈着は、6~8ヶ月齢前後で始まる。SR欠損がAβクリアランスを損ない、それによってアミロイド沈着を促進するかどうかを評価するために、野生型またはノックアウトマウスである6および12カ月齢のhAPP^{+/-}マウスにおけるアミロイド沈着を比較した。チオフラビンS染色は、hAPP^{-/-}マウスにおいてプラークを同定せず、hAPP^{+/-}SR^{+/+}マウスおよびhAPP^{+/-}SR^{-/-}マウスにおいて同様の数および分布のアミロイド斑を示した。(図2, 3a, 3bおよび4)これは、SRの不在がhAPP^{+/-}マウスにおけるアミロイド沈着を加速させないか、またはそうでなければ増強しなかったことを示す。

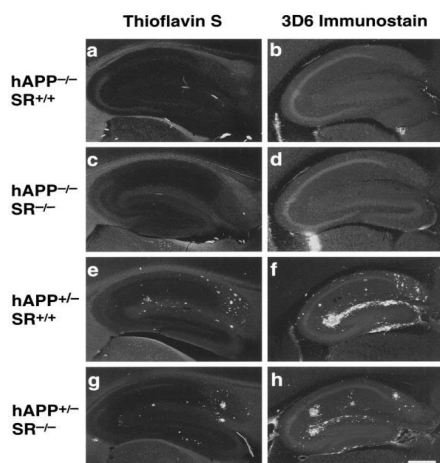


図 2

SR に対する野生型またはノックアウトである hAPP マウスにおけるアミロイド斑の類似性。12 ヶ月齢のマウスの矢状海馬切片を、チオフラビン S (a 、 c 、 e および g) または抗 Aβ 抗体 (3D6) (b 、 d 、 f および h) で染色し、hAPP - / - マウス (a ~ d) はアミロイド斑を有していなかった。d の左下部の明るい信号は、染色アーチファクトを表す。hAPP /Aβ (e-h) を発現する SR + / + および SR - / - マウスにおいて、同等のプラーク沈着が見出された。チオフラビン S は、より成熟したアミロイド沈着物の特徴である β-プリーツシートを主に染色するが、3D6 はまた、これらの 2 つのマーカーで得られる染色パターンを説明するより拡散性の Aβ 沈着物を標識する。スケールバー、180 μ m。

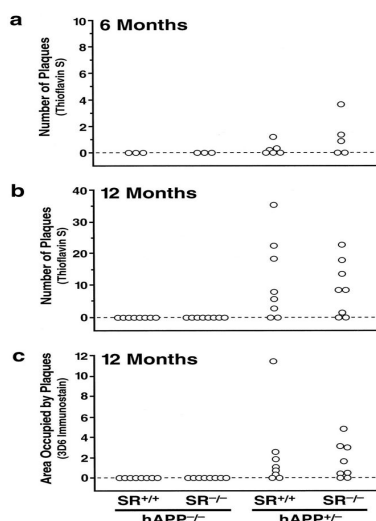


図 3

SR に対する野生型またはノックアウトである hAPP マウスにおける同等の年齢依存性アミロイド斑の蓄積。チオフラビン S 陽性のプラークを蛍光顕微鏡で視覚化し、材料 (材料) に記載されているように、6 ヶ月齢および 12 (b) ヶ月齢でカウントした。

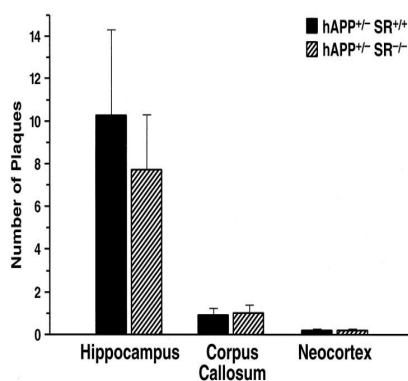


図 4

hAPP マウスにおけるアミロイド斑の局所分布は、SR によって影響を受けない。12 ヶ月齢のマウスの異なる脳領域 (遺伝子型あたり n = 8) でチオフラビン S 陽性プラークを計数した。データは、セクシ

yonあたりの平均プラーク数を表す。プラークの大部分は海馬で見られ、hAPP +/- SR + / +マウスと hAPP + / - SR - / -マウスのプラーク数には分析された脳領域のいずれにおいても統計的に有意な差はなかった。

脳切片を抗 Aβ 抗体 3D6 で標識し、Aβ 免疫反応性沈着物が占める海馬面積を測定すると、チオフラビン-S 染色の結果が確認された (SR 発現の有無にかかわらず、hAPP +/-マウス間に有意差は検出されなかった 3c)。hAPP +/- SR + / +マウスの他の系統におけるプラーク形成の初期段階での観察と一致して、プラーク負荷における実質的ではあるが同等の変動性がマウスの 2 つの群 (図 3) 内で見られた。

チオフラビン S 染色したプラークの領域分布およびサイズも、SR 発現の有無にかかわらず、hAPP +/-マウスにおいて非常に類似していた (図 2 および 4)。プラークの負荷は海馬で最大であり、海綿のすぐ上に大部分の吻状および新皮質のプラークが見出された。視床、小脳、または脳幹においてプラークは観察されなかった (データなし)。

SR の欠乏は、hAPP マウスにおける神経変性の程度に影響しない

AD における認知障害の最良の神経病理学的相関の 1 つは、特定の脳領域におけるシナプトフィジン免疫反応性シナプス前末端の喪失である。PDGF-hAPP マウスにおける

Aβ 発現の増加は、海馬の外側分子層におけるシナプトフィジン免疫反応性シナプス前末端の著しい減少および MAP-2 免疫反応性ニューロン樹状突起のより僅かな減少と関連する。したがって、研究者らは免疫標識された脳切片およびコンピュータ支援画像分析の共焦点顕微鏡法を用いて、異なるマウス群におけるシナプス前末端およびニューロン樹状突起の完全性を評価した。神経変性変化のこの半定量的評価は、多様な実験モデルおよび罹患したヒトの脳においてよく使用されている。これは、定量的イムノブロットとの比較、酵素結合免疫吸着アッセイによるシナプスタンパク質の定量、および立体的「ディセクター」アプローチの改変によって以前にも検証されている。

hAPP - / - SR + / +コントロールと比較して、hAPP - / - SR - / -マウスは正常レベルのシナプトフィジン免疫反応性シナプス前末端を有していた (図 5)。神経系 (CNS) の発達または神経変性の変化が含まれる。

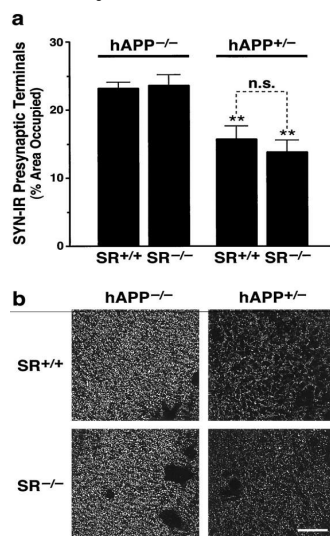


図 5

b SR 発現の欠如は、12 ヶ月齢の hAPP マウスの海馬におけるシナプトフィジン免疫反応性シナプス前末端の減少を妨げない。

a : コンピュータ支援画像解析を用いてシナプトフィジン免疫反応性 (SYN-IR) の密度を決定した。

対照的に、SR 発現を伴うかまたは伴わない hAPP +/-マウスは、海馬の外側分子層におけるシナプトフィジン免疫反応性シナプス前末端の有意な損失を有したが、これらのマウスにおける SR の存在または非存在は、神経変性の程度に有意に影響しなかった(図 5)。海馬の外側分子層における MAP-2 免疫反応性ニューロン樹状突起の密度も、hAPP + / -マウスと比較して、hAPP - / -対照 (Tukey-Kramer post-hoc 試験による $P < 0.05$) と同様のレベル (hAPP - / -SR + / + 37.5 ± 1.3 、hAPP - / -SR - / - 37.1 ± 1.3 、hAPP + / -SR + / + 31.8 ± 1.9 、hAPP +/- SR - / - 32.3 ± 1.6 ; 値は占有される画像面積のパーセントを表す)。

4. 考察

4.1 論文考察

論文 A ではマウスから単離したミクログリアでの取り込みなども確認した上で、Scara1 ノックアウトマウスにおいて脳から抽出した $A\beta$ の量そのものが増えていたことから、Scara1 によって生体内でも $sA\beta$ が減り、そこからできるアミロイド斑も減るということを示唆している。対して論文 B ではモデルマウスにおいて Scara1 のノックアウトによるアミロイド斑の数などの影響をみている。

これらの論文での相違点として主に以下の 2 点が考えられる。

a. $A\beta$ オリゴマーかアミロイド斑か

b. 使っているマウスの種類

a に関してはミクログリアは Scara1 によって $sA\beta$ の取り込みを促進されたと考えることができる。b に関しては論文 A では PS1-APP というアミロイド斑の凝集が速めのマウスだが、論文 B では J9 という蓄積が穏やかなマウスを使用している。したがって、実験期間に差があることになっている。また、ここでミクログリアの機能を考える。ミクログリアは $A\beta$ の除去に寄与する作用がある一方で、 $A\beta$ の濃度が高まり、タウ凝集によって多数のニューロンが損害を受けたことを感知すると、脳がバクテリアやウイルスといった病原体から攻撃を受けているとみなし、貪食作用から攻撃モードに変容する。こうなると周辺の細胞を破壊したりしてしまうのだ。

なぜ矛盾した結果が出てしまうのか、どこが矛盾しているポイントなのかを検証するために複数の結果を想定した追加実験を行う必要があると思われる。

4.2 追加実験

ここでは今現在の技術で実現し得るかは考慮しないものとする。将来的に実現が可能となればこの矛盾は解決される意味でこの追加実験を考えたい。

①マウスの種類をそろえる。今回は PS1-APP マウスを使用するとする。

② PS1-APP-Scara1+/+(a)、PS1-APP-Scara1-/(b)、ミクログリア欠損の PS1-APP-Scara1+/+(c)、PS1-APP-Scara1-/(d) マウスを作成する

③A β オリゴマーだけを染色するもの、アミロイド斑だけを染色するもの2つをマウスに投与する。(後者は可能だが、前者が今現在可能かどうかは不明瞭だ。)

④1ヶ月ごとに神経変性、sA β とアミロイド斑の沈着状況を記録する。

⑤これを6ヶ月観察する。

4.3 追加実験の結果予想とそれに基づく仮説

(1)a、b、c、d全て同じ結果になる

→ミクログリアは神経変性に全く関与しない。

(2)aとcだけA β の量が減少した。

→ミクログリアではなく Scaral だけがA β のクリアランスに関係している。ここからはa、b、dだけで考察していく。

(3)A β の沈着において、dは一次関数や二次関数などの数学的に何らかの規則にそって増えていくと考えられることを前提として、aとbの結果が等しく、関数の傾きがdと異なる。

→ミクログリアは6ヶ月の間は清掃モードとして常に働いている。攻撃モードには12ヶ月程度の沈着ではならず、ScaralはA β のクリアランスに全く寄与していない。

(4)途中まではa、b、dの関数は等しい(dとa、bには傾きに差があるとしても、関数の種類は等しい)が、ある時を境にしてa、bの関数は崩れ、神経変性の進行が加速する。

→ミクログリアは12ヶ月で清掃モードおよび攻撃モードどちらも発動する。このときも Scaral はA β クリアランスに関与しない。

(5)sA β とアミロイド斑の数がd、b、aの順に多く、神経変性の進行度合いもd、b、aの順に多い。

→ScaralはA β のクリアランスに有効的に寄与している。

(6)アミロイド斑の数にはaとbの間で顕著な差はないが、sA β の数はd、b、aの順に多くなっており、神経変性もd、b、aの順に進行している。

→ScaralはsA β の受容体として選択的に取り込みを促す。神経変性の度合いを記録することで、A β オリゴマーの毒性もはかることができる。

(7)(4)のような傾向が見られたが、ある時点を機にミクログリアが攻撃モードに入ってしまう、それにより神経変性の度合いは12ヵ月後a、bが等しくなる。

→攻撃モードはScaralの受容体としての効果を打ち消す勢いで、神経を変性させている。ScaralはA β クリアランスに寄与しない。

(8)sA β の数はaが一番少ないが、逆にアミロイド斑はbが一番少なくなっている。神経変性はaが最初の6ヶ月くらいまではaが一番進行していなかったが、ある時点でミクログリアが攻撃モードを発動し、12ヵ月後の神経変性の度合いはaとbは等しくなる。

→ScaralはsA β に選択的に受容体なり、ミクログリアの取り込みをsA β の数を増やす代わりにアミロイド斑の取り込みが減少している。ただアミロイド斑にもある程度の毒性があり、ある時点を機にミクログリアが攻撃モードになってしまう、それにより12ヶ月後には神経変性の進行度合いは等しくなってしまう。

5. 今後の展望

今回は時間の都合上、論文考察は2つの論文しか用いていなかったため、考察の信憑性が確かとは言いがたい。これからはより多くの文献を用いて考察し、自分でも実験を行うことで Scaral のはたらきを考察する必要がある。

ミクログリアおよび Scaral のはたらきを解明することで、これからのアルツハイマー病治療にも何か役に立つ可能性を秘めているのは事実だ。これらのはたらきに注目しつつ違う面からも考察を行うこと大切だと考える。

6. 参考文献

Newton ニュートン(2017年3月号)

7. 謝辞

これまでたくさんの疑問にお答えいただいた様々な大学の教授の方、また論文研究についてやこれまでの研究を教えてくださいました渡辺校長、そして私を指導して下さった櫻井先生、私の研究に協力して下さった皆様に深く感謝の意を表します。