

Original article

Amyloid beta clearance and microglia: Effects of glycative stress and melatonin

Yoshikazu Yonei¹⁾, Toshio Taira²⁾, Shino Otaka²⁾, Shizuko Sekiguchi²⁾,
ANM Mamun-or-Rashid¹⁾, Masayuki Yagi¹⁾, Hiroaki Masuzaki³⁾

- 1) Anti-Aging Medical Research Center/Glycative Stress Research Center,
Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan
2) Sapporo Division, Cosmo Bio Co., Ltd., Otaru, Hokkaido, Japan
3) Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Hematology and Rheumatology,
(Second Department of Internal Medicine), Graduate School of Medicine,
University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa, Japan

Glycative Stress Research 2022; 9 (3): 135-145

(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

**アミロイドβクリアランスとミクログリア：
糖化ストレスおよびメラトニンの影響**

米井嘉一¹⁾、平 敏夫²⁾、大高志乃²⁾、関口志津子²⁾、Mamun-or-Rashid ANM¹⁾、
八木雅之¹⁾、益崎裕章³⁾

- 1) 同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター・糖化ストレス研究センター
2) コスモ・バイオ株式会社 札幌事業部
3) 琉球大学大学院 医学研究科 内分泌代謝・血液・膠原病 内科学講座（第二内科）

抄録

アミロイドβ (Aβ) は、アルツハイマー病 (AD) の発症や進行に重要な役割を果たす一方で、その生理的な役割は不明である。Aβの重合は、神経毒性の増強、難分解性化、脳への沈着をきたし、その結果、Aβのクリアランスが減少する。また、糖尿病や「睡眠の質」低下は、アルツハイマー病発症の代表的な危険因子とされている。強い糖化ストレスの代表疾患である糖尿病では、血中や組織のメチルグリオキサル (MGO) やアクロレインが増加し、「睡眠の質」低下に伴いメラトニン分泌が低下する。本研究では、Aβクリアランスに関与するミクログリアのAβ貪食能に着目し、Aβの糖化とメラトニンの影響について検証した。糖化Aβは、MGOまたはアクロレインを用いて調製した。実験には、蛍光標識TAMRA-Aβと初代ラットミクログリ

連絡先：教授 米井嘉一
同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター／
糖化ストレス研究センター
〒610-0321 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3
TEL & FAX: 0774-65-6394 e-mail: yyonei@mail.doshisha.ac.jp
共著者：平 敏夫 primarycelltaira@gmail.com;
大高志乃 shino-otaka@cosmobio.co.jp; 関口志津子 shizuko-sekiguchi@cosmobio.co.jp;
Mamun-or-Rashid ANM, mamunbtgeiu@gmail.com; 八木雅之 myagi@mail.doshisha.ac.jp;
益崎裕章 hiroaki@med.u-ryukyu.ac.jp

Glycative Stress Research 2022; 9 (3): 135-145
本論文を引用する際はここを引用してください。
(c) Society for Glycative Stress Research

ア細胞（コスモ・バイオ社製）を使用した。今回の実験から、いくつかの新しい知見が得られた。第一に、ミクログリアはA β を貪食するが、糖化A β に対する貪食能は著しく低下していた。第二は、A β 貪食能はメラトニンによって増強されたことである。また、培養ミクログリアの自然死は、A β を無添加時の方が、添加時よりも多かった。以上の所見を考慮すると、従来のA β 除去に主眼を置く治療よりも、糖化ストレス対策と「睡眠の質」向上によりA β の糖化修飾を予防することが、ADの進展予防に重要であると考えられる。

KEY WORDS: アルツハイマー病、ミクログリア、アミロイド β 、メチルグリオキサール、アクロレイン、メラトニン

はじめに

アミロイド β (A β) とは、脳内で作られる蛋白質の一種である。健康な人の脳にも存在する物質であるが、その生理的役割については良くわかっていない。

A β は、通常、脳内の遺物として短期間で分解、排出される (A β クリアランス)。しかし、酸化ストレスや糖化ストレスによりA β の構造が修飾され、異常なA β が生成される^{1,2)}。特に糖化ストレスによって蛋白同士が架橋形成されると、A β 同士が結合して異常なA β 重合体ができる。異常A β 重合体の形成は難分解性、神経毒性の増強、A β クリアランスの低下を惹起する。さらに、A β 排出されずに脳に蓄積され沈着すると、A β 老人斑 (アミロイド病理) を形成する。神経毒性の強い異常A β が、それまで健康な神経細胞の周囲にまわりつくと、神経細胞にも影響を及ぼす。これが契機となって、微小管結合蛋白質の一つであるタウ蛋白質が、細胞質中で線維化・凝集する神経原線維変化を形成する。その結果、脳の委縮が徐々に進み、アルツハイマー型認知症が進行する。これが「アミロイドカスケード仮説」に糖化ストレスを加味した概念である³⁻⁵⁾。

これまで、A β が翻訳語修飾を受けた時のミクログリア貪食に及ぼす影響については報告がない。本研究では、A β クリアランス機構の中で重要な役割を果たすMGに焦点を当て、A β の細胞内への取り込み、A β に糖化修飾を加えた時の取り込み能の変化について検証した。さらに睡眠の質に関与するメラトニン (Mel) の影響を検証した。

方法

試験試薬の調整

実験試薬には蛍光標識したTAMRA-A β (コスモ・バイオ、東京) を用いた (以下 T-A β とする)。本試薬はA β (1-42) にPEG スペーサーを介して赤色蛍光 carboxy tetramethylrhodamine (TAMRA) が標識されている⁶⁾。

Methylglyoxal (MGO) による糖化T-A β の作成

0.5 mg のT-A β を50 μ Lのトリフルオロ酢酸 (TFA) (ナカライテスク、京都) に溶解し、さらに超純水450 μ Lを加えた。100 μ Lずつマイクロチューブ5本に分注し、遠心エバポレーターを用いて一晚、濃縮・乾燥を行った。乾燥後、5本のうち2本に0.2 Mリン酸バッファー (pH 6.0) を200 μ L/チューブに添加して溶解し、1本にまとめて400 μ LのT-A β 溶液とした。T-A β 溶液を96 well ブラックプレートに80 μ L/wellで4 wellに分注し、MGO (富士フイルム和光純薬、大阪) を終濃度0 mM (Blank)、0.4 mM、2 mM、10 mMになるように添加した。添加後のプレートを37 $^{\circ}$ Cのインキュベーターに静置して糖化を行った。添加前、添加後1時間、17時間、65時間後に、マイクロプレートリーダーで蛍光性終末糖化産物 AGEs (advanced glycation end products) の波長である (励起: 340 nm、蛍光: 430 nm) の蛍光値を測定し、糖化の指標とした。

糖化T-A β を細胞に添加する際に、残存したMGOの毒性が細胞に悪影響を及ぼす可能性があったため、糖化T-A β 溶液からMGOを除くための処理として、1) エーテル沈殿による粗精製及び2) 逆相固相抽出による簡易精製を実施した。

1) エーテル沈殿による粗精製

10 mM MGOで糖化した0.5 mg/mLのT-A β 溶液をマイクロチューブに30 μ Lずつ小分けし、TFAを270 μ L添加してよく攪拌・混和した。さらに、t-ブチルメチルエーテル (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を1.5 mL添加し、-80 $^{\circ}$ Cで3時間、その後4 $^{\circ}$ Cで一晩静置して糖化T-A β を沈殿させた。T-A β 溶液を12,000 $\times$ g、15分遠心して残存MGOを含む上清を除去、再度、t-ブチルメチルエーテルを1 mL添加して攪拌後、12,000 $\times$ g、15分で遠心し上清を除去した。窒素吹付けにより乾固後、

acetonitrile (ACN)を500 μL加え、超音波で30秒間処理、さらに0.1 % TFA を500 μL加えて糖化T-Aβを溶解し、超微量分光光度計を用いて、556 nmの吸光度を測定した。測定後、凍結乾燥し、冷蔵保管した。

2) 逆相固相抽出による簡易精製

SPEカラム (HyperSep™ C18 カートリッジ; Thermo Fisher Scientific、東京) のコンディショニングとして、95 % ACN/0.1 % TFA 0.75 mLで洗浄、さらに0.1 % TFA 2.25 mLで3回平衡化を行った。ACN (acetonitrile) はMerck KgaAより入手した。2 mM MGOで糖化した0.5 mg/mLのT-Aβ溶液40 μLと0.1 % TFA 100 μLをSPEカラムにアプライした。0.1 % TFA 2.25 mLで5回洗浄、さらに95 % ACN/0.1 % TFA 0.35 mLで1回洗浄した。洗浄後、95 % ACN/0.1 % TFA 0.6 mLで糖化T-Aβを溶出し、溶出液を回収した。回収した溶出液に0.1 % TFA 0.6 mL添加し、超微量分光光度計を用いて、556 nmの吸光度を測定した。測定後、凍結乾燥し、冷蔵保管した。

アクロレインによる糖化T-Aβ (Gly-T-Aβ) の作成

0.5 mgのT-Aβを50 μLのTFAに溶解し、さらに超純水450 μLを加えた。100 μLずつマイクロチューブ5本に分注し、遠心エバポレーターを用いて一晩、濃縮・乾燥を行った。乾燥後、5本のうち2本に0.2 Mリン酸バッファー (pH 6.0) を200 μL/チューブに添加して溶解し、1本にまとめて400 μLのT-Aβ溶液とした。T-Aβ溶液を96 wellブラックプレートに80 μL/wellで4 wellに分注し、acrolein (富士フイルム和光純薬) を終濃度0 mM (Blank)、0.4 mM、2 mM、10 mMになるように添加した。添加後のプレートを37 °Cのインキュベーターに静置して糖化を行った。添加前、添加後14時間、62時間後に、マイクロプレートリーダーで蛍光性AGEsの波長である (励起: 340 nm、蛍光: 430 nm) の蛍光値を測定し、糖化の指標とした。

MG 初代培養細胞

これまでミクログリアの実験に用いられてきた株化細胞はマクロファージ様の性質が強く、炎症への反応や神経保護などの機能が生体内のミクログリアとは大きく異なっている。初代ミクログリアは、出生直後の脳から調製され、ミクログリアの他に主にアストロサイトや神経細胞などの混合培養系で増殖させることで、ミクログリア本来の機能のある程度維持している⁷⁾。検討では、アミロイドβの認識・排除というミクログリアの機能を検証するため、初代ミクログリア培養キット (コスモ・バイオ) を用いた⁸⁾。

初代 MG 細胞へのT-Aβおよび糖化T-Aβの影響

SDラット脳より調製した初代MGの混合培養系75 cm² フラスコ1枚からキット付属の培地を用いて、プロトコル⁹⁾ に従い浮遊したMGを回収し、96 wellブラックプレート8 wellに播種した (なお、播種数はカウントできないため不

明)。MGは遠沈管等への付着により細胞数が減少してしまうため、マクロファージ接着防止コーティング剤でコーティングした器材を用いて、余計な付着を防ぐ施策を講じた。播種翌日に未糖化T-Aβ及びMGO糖化T-Aβを終濃度1 μMになるように培地に添加し、4日間暴露して蛍光顕微鏡で細胞内へのT-Aβ 取込を観察した。

再現性確認及び細胞毒性を検討するため、新たに調製したMGの混合培養系フラスコ1枚から、MGを回収し、96 wellブラックプレート15 wellに播種した。播種翌日にMGO 0.4 mM、2.0 mM、10.0 mMの濃度で未糖化T-Aβ及びMGO糖化T-Aβを添加し、4日間暴露した。暴露後、蛍光顕微鏡で細胞内へのT-Aβ 取込を観察した。

観察後、培地で2回洗浄し、T-Aβ及び糖化T-Aβを除去した。除去後1日目 (培養5日目)、4日目 (培養8日目) に細胞内へのT-Aβ 取込の変化を観察し、8日後 (培養12日後) にプロトコル⁹⁾ に従い細胞増殖/細胞毒性アッセイ試薬を培地の1/10量添加し、2時間、37 °Cインキュベーターで呈色反応させ、マイクロプレートリーダーにて450 nm (リファレンス: 650 nm) の吸光度を測定し、細胞毒性を評価した。

実験群の構成

実験群の構成を下記に示す。

	T-Aβ	メラトニン (Mel)	糖化处理
a) Non-T-Aβ群 (無処置)	—	—	—
b) T-Aβ群	+	—	—
c) T-Aβ + Mel群	+	+	—
d) Gly-T-Aβ群	+	—	+
e) Gly-T-Aβ + Mel群	+	+	+

但し、Gly-T-Aβ群にはMGO処理 (10 mM) とアクロレイン処理 (10 mM) の2方式があり、Mel (メラトニン) の培養液中終濃度は100 μMとした。

本研究では、MG播種の実験を2回施行した。第1回目は、上記のa, b, c, d, eとし、d, eにはMGO処理Gly-T-Aβを用いた。第2回目はa, b, dとし、dにはMGO処理とアクロレイン処理Gly-T-Aβを用いた。2回の実験のMG培養条件が異なるため解析は別々に施行し、統合してのT-Aβ 貪食能の解析は行わなかった。

統計解析

MG細胞数はオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710、ニコン) と付属画像解析システム (BZ-H3CM/マクロセルカウント) を用いて単位面積当たりの核の数を計測した。MGによるT-Aβ 貪食能は、T-Aβ由来蛍光の面積 (基準値以上の蛍光強度を有する領域面積) を総細胞面積 (μm²) で除した値について、統計解析を行い、図では非特異的

背景蛍光領域面積 (Non-T-A β 群における非特異的高輝度領域) を調整した値を示した。統計解析はエクセル統計 (Bell Curve) を用い分散分析後 Fisher's post hoc test にて評価した。

結果

糖化 A β の生成

A β の MGO 処理においては、MGO の濃度及び糖化時間が増えるに従って、蛍光性 AGEs は増加する傾向が認められた (Fig. 1)。MGO 10 mM 添加後 65 時間では 17 時間より蛍光値が低下したため、糖化条件は 10 mM で 1 昼夜の反応時間を採用した。

同様に、アクロレイン処理時には、アクロレインの濃度及び糖化時間が増えるに従って、蛍光性 AGEs は増加する傾向が認められた (Fig. 2)。アクロレイン添加後 62 時間では 14 時間より蛍光値が低下したため、糖化条件は 10 mM で 1 昼夜の反応時間を採用した。

第 1 回目の培養実験

MG 細胞数と A β 貪食

培養は、MG 播種後 2 日目の時点で蛍光標識 T-A β 添加、10 日目に観察した。

Non-T-A β 群では、MG 細胞数は、2 日目 (実験開始日) に比べて、10 日目には細胞死により生存細胞数が減少していた (Fig. 3-a, 実験開始日の写真無し)。細胞死の原因は自然死と判定した。

T-A β 群では、MG 細胞数は、2 日目に比べて、10 日目

には細胞数の減少は認められなかった (Fig. 3-b)。10 日目の MG 細胞数は、Non-T-A β 群に比べて多く、自然死が少なかった。T-A β 標識蛍光の MG 細胞質への取り込みが見られ、A β が MG によって貪食 (細胞内への取り込み) されることが確認された。形態的な変化は特に認められなかった。

T-A β + Mel 群では、MG 細胞数は、2 日目に比べて、10 日目には細胞数が増加していた (Fig. 3-c)。MG 細胞数は、Mel 無しの T-A β 群に比べてやや多かった。自然死が少なかったのか、MG 増殖が促進されたのかについては、明らかにしえなかった。T-A β + Mel 群では、MG 細胞の蛍光取り込みが顕著で、MG による A β 貪食が活発になっていた。形態的な変化は特に認められなかった。

一方、MGO 処理した Gly-T-A β 群では、MG 細胞数は、2 日目に比べて、10 日目には細胞数が増加した (Fig. 3-d)。MG 細胞の蛍光取り込みはほとんど観察されなかった。形態的な変化は特に認められなかった。

Gly-T-A β + Mel 群では、MG 細胞数は、2 日目に比べて、10 日目も同程度であった (Fig. 3-e)。MG 細胞の蛍光取り込みはわずかであった。

MG による T-A β 貪食能について画像解析を行い、定量評価を行った (Fig. 4)。T-A β + Mel 群の画像データを T-A β 群と比較すると顕著の傾向強度が高く、T-A β 貪食が Mel により増加していた。しかし T-A β + Mel 群 3 データのうち 2 つの値の取り込み蛍光輝度が異常に高かったため、解析から除外した。図には除外しなかった値を示した。T-A β 群に比べて Gly-T-A β 群の MG 内蛍光輝度は有意に低く ($p = 0.03$)、貪食能の低下を認めた。

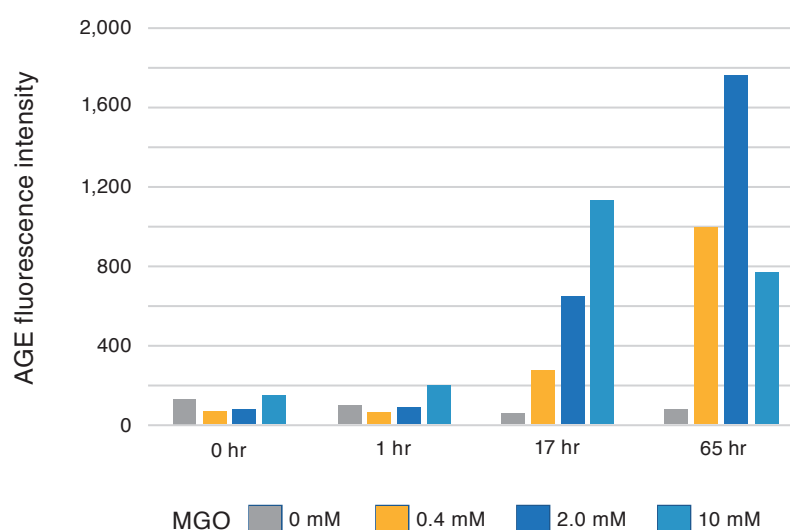


Fig. 1. Glycation of T-A β by MGO treatment.

Results are expressed as mean of duplicate values. Fluorescent intensity derived from AGEs were measured by Ex 340 nm/Em 430 nm. MGO concentration; 0 mM, 0.4 mM, 2.0 mM, 10 mM. T-A β , TAMRA- β -amyloid(1-42); MGO, methylglyoxal; AGEs, advanced glycation end products.

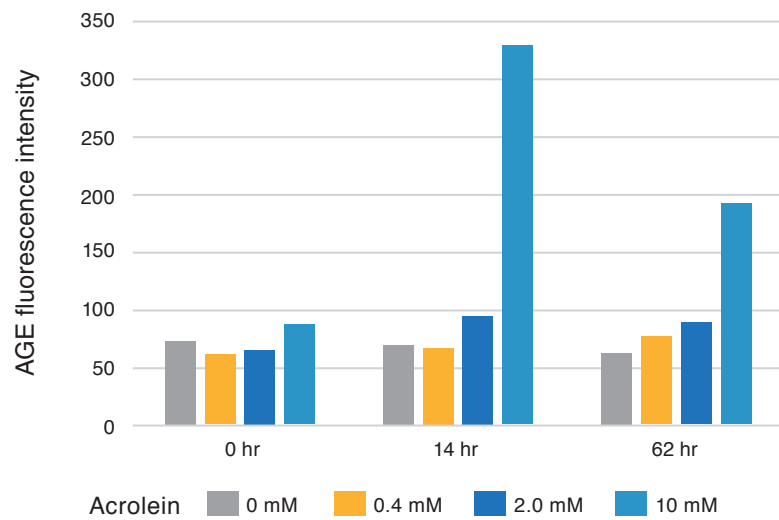


Fig. 2. Glycation of T-A β by acrolein treatment.

Results are expressed as mean of duplicate values. Fluorescent intensity derived from AGEs were measured by Ex 340 nm/Em 430 nm. Acrolein concentration; 0 mM, 0.4 mM, 2.0 mM, 10 mM. T-A β , TAMRA- β -amyloid(1-42); AGEs, advanced glycation end products.

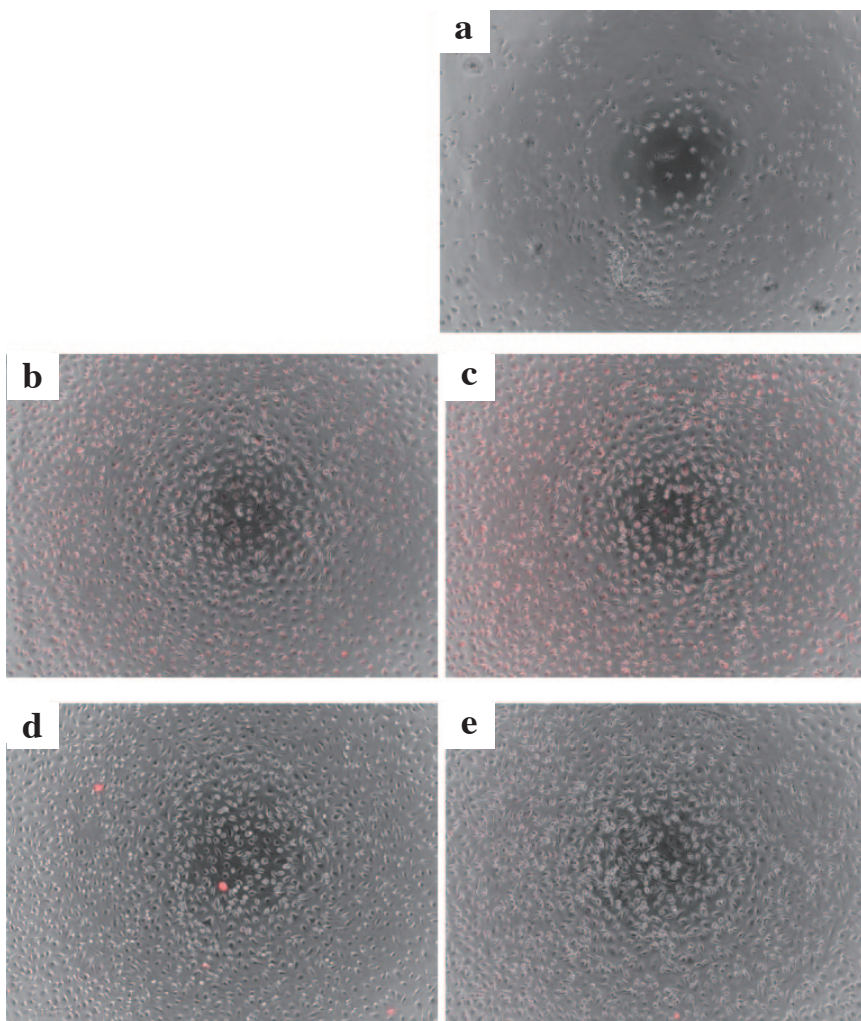


Fig. 3.

**T-A β phagocytosis by microglia:
Fluorescence microscopy image**

a) Non-T-A β group (no treatment), **b)** T-A β group, **c)** T-A β + Mel group, **d)** Gly-T-A β group, **e)** Gly-T-A β + Mel group. Images (x 100) of cultured cells 10 days after seeding (8 days after addition of T-A β). Red color portions indicate T-A β -derived fluorescence uptaken by microglia. Note the enhanced fluorescence by Mel (**c**) compared with the T-A β group (**b**). Gly-T-A β is prepared by MGO treatment (10mM, one day). T-A β , TAMRA- β -amyloid(1-42); MGO, methylglyoxal; Mel, melatonin; Gly, glycated.

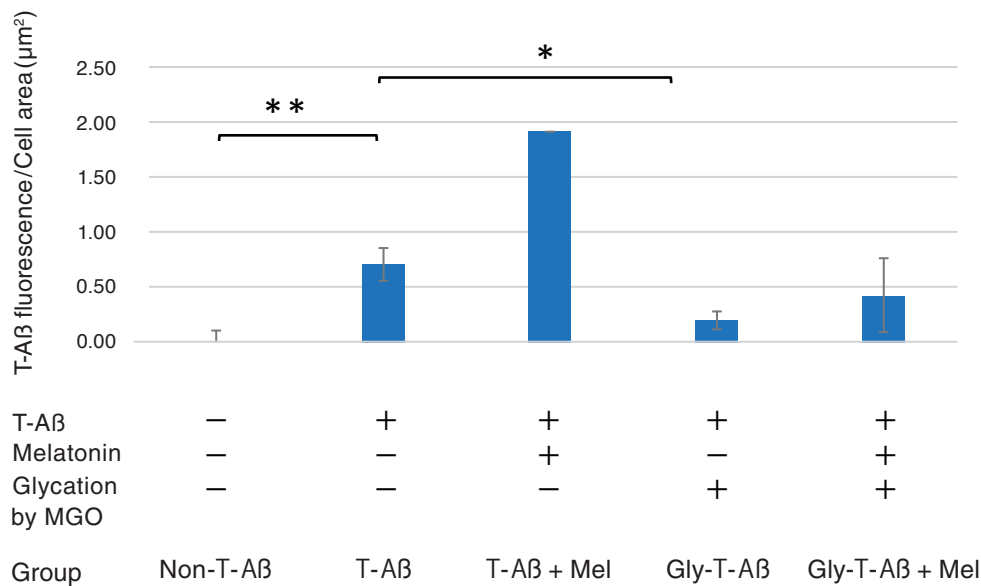


Fig. 4. Comparison of T-Aβ phagocytosis by MG: The first experiment

Y axis shows the values: T-Aβ fluorescence intensity / cell area (μm^2) followed by adjustment for the area of nonspecific background fluorescence (nonspecific high intensity area in the non-T-Aβ group). Results are expressed as mean $\pm$ SD of triplet values ($n = 4$ except Non-T-Aβ group and T-Aβ + Mel group, $n = 2$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Fisher's post hoc test (T-Aβ + Mel group excluded). T-Aβ phagocytosis is inhibited by MGO-glycation while enhanced by Mel (100 μM). Gly-T-Aβ is prepared by MGO treatment (10 mM, one day). MG, microglia; T-Aβ, TAMRA-β-amyloid (1-42); MGO, methylglyoxal; Mel, melatonin; Gly, glycated; SD, standard deviation.

第2回目の培養実験

Aβ 貪食とMGO・アクロレインの比較

MG 播種後2日目の時点で蛍光標識T-Aβ添加、10日目の蛍光顕微鏡像をFig. 5に示した。

T-Aβ群では、標識蛍光がMG細胞質への取り込みが見られ、AβがMGによって貪食（細胞内への取り込み）されることが再確認された（Fig. 5-b）。一方、MGO処理とアクロレイン処理によるGly-T-Aβ群では、MG内に標識蛍光がほとんど見られず、MGによる糖化Aβ貪食はほぼ認められなかった（Fig. 5-c, d）。MGO処理とアクロレイン処理には差がなかった。

培養10日目の細胞数をFig. 6に示した。Non-T-Aβ群、MGO処理Gly-T-Aβ群、アクロレイン処理Gly-T-Aβ群、T-Aβ群の間で細胞数に有意差はなかった。

MGによるAβ貪食能について結果をFig. 7にまとめた。MGによるT-Aβ貪食を、T-Aβ群とGly-T-Aβ群との間比較すると、糖化T-Aβに対する貪食能は著明に低下していた（ $p < 0.001$ ）。MGO処理とアクロレイン処理には差がなかった。

考察

アルツハイマー病（AD）は、進行性の認知症を引き起こす代表的疾患である。AD患者の剖検脳では、老人斑の周辺に活性化したMGが集積していることが確認されてお

り、Aβのクリアランスの障害の関与が示唆されている。しかし、健常状態でのAβの存在理由やその生理的な役割は明らかでない。

Aβは生体内において生理的条件下で生成される。 γ セクレターゼは活性中心を持つプレセニリン、ニカストリン、Aph-1、Pen-2からなる膜蛋白複合体である。基質（APPまたはNotch）はいずれも内腔側で切断を受けた後、 γ セクレターゼにより切断を受け、生じたAβは細胞外に分泌される^{3,4}。

γ セクレターゼはAβ産生経路においてカルボキシ末端側の切断に関与し、Aβ量および凝集性を決定する。そのため重要なAD創薬標的分子と考えられ、様々な低分子化合物が γ セクレターゼ阻害剤として開発されてきた。しかし、Aβ産生を抑制する療法は、治験の失敗が度重なり、このことはAβがなんらかの生理的意義を有し、脳内Aβ量の低下がAD治療につながらない可能性を示唆している⁵。

Aβ産生はADの有無や年齢にかかわらず生じており、正常脳ではAβは適切に除去され、脳に蓄積することはない^{10,11}。

以上の所見は、ADの進行制御のためには、Aβクリアランスの恒常性維持が重要であることを示している。剖検時に病理学的に認められるAβ沈着は、その時点でAβ産生、沈着、除去のバランスを反映している。

老人斑の周辺に活性化したMGが集積しており、Aβクリアランスに重要な役割を果たす。ラット培養MG

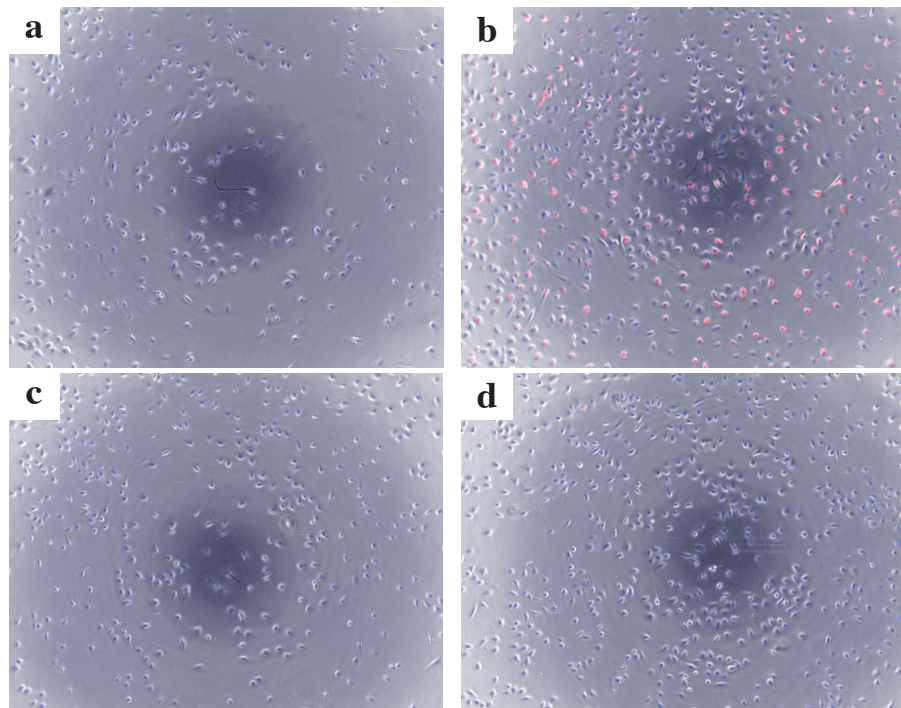


Fig. 5. T-Aβ phagocytosis by MG: Comparison between MGO and acrolein treatment.

a) Non-T-Aβ group (no treatment), **b)** T-Aβ group, **c)** MGO-Gly-T-Aβ group, **d)** Acrolein-Gly-T-Aβ group. Images (x 400) of cultured cells 10 days after seeding (8 days after addition of T-Aβ). Red color portions indicate T-Aβ-derived fluorescence uptaken by MG. No difference between MGO (**c**) and acrolein (**d**) treatment. Note the much less fluorescence in **c**) and **d**) than that in **b**). Gly-T-Aβ is prepared by MGO or acrolein treatment (10 mM, one day). MG, microglia; T-Aβ, TAMRA-β-amyloid(1-42); MGO, methylglyoxal; Gly, glycated.

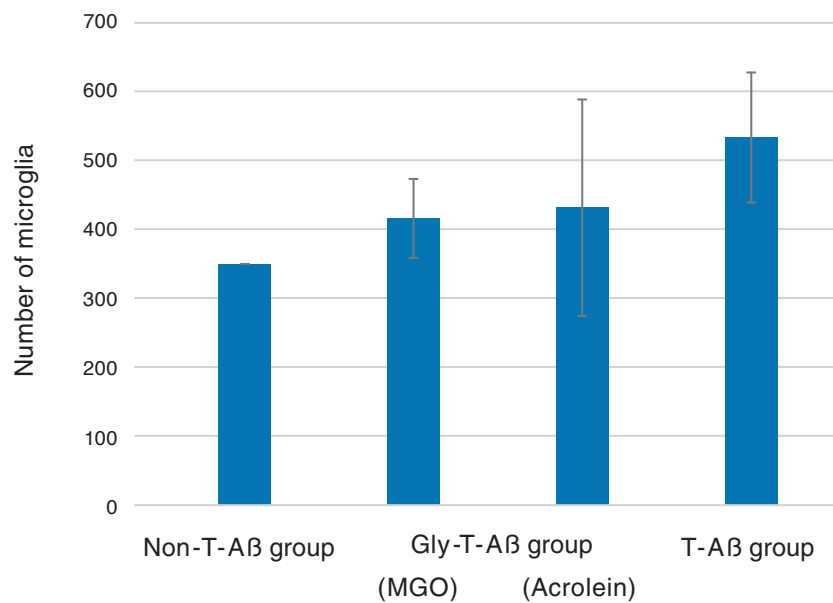


Fig. 6. Live cell counts of MG 10 days after seeding.

Results are expressed as mean $\pm$ SD of triplet values, counted the number of nuclei by image analyzer (n = 4, except Non-T-Aβ group, n = 2). Gly-T-Aβ is prepared by MGO or acrolein treatment (10 mM, one day). MG, microglia; T-Aβ, TAMRA-β-amyloid(1-42); MGO, methylglyoxal; Gly, glycated; SD, standard deviation.

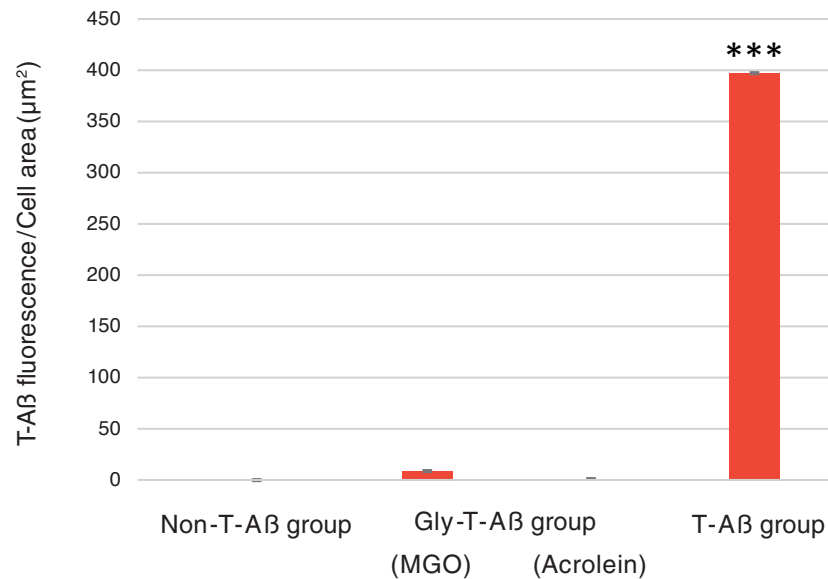


Fig. 7. Comparison of T-Aβ phagocytosis by MG: The second experiment

Y axis shows the values: T-Aβ fluorescence intensity/cell area (μm²). Results are expressed as mean ± SD, n = 3, *** p < 0.001 vs other groups, by Fisher's post hoc test. T-Aβ phagocytosis is inhibited by MGO- and acrolein-treatment (10 mM, one day). MG, microglia; T-Aβ, TAMRA-β-amyloid (1-42); MGO, methylglyoxal; Gly, glycated; SD, standard deviation.

のAβの貪食には、低分子量G蛋白質のRac 1やその下流で働くWiskott-Aldrich syndrome protein family verprolinhomologous protein (WAVE) により制御されるアクチン線維の再構築が関与する¹²⁾。

AβがMGに取り込まれると、細胞内で処理されてN末端側のフラグメントが失われる¹¹⁾。進行したADモデルマウスの活性化したMGは、ニコチン性アセチルコリン受容体α7 nAChRが発現しており、CD14/TLR複合体が発現してクリアランス機能を発揮する¹³⁾。

MGの形態については、ラット新生仔から調製した、Aβ42処置前のMGの形態はロッド型であったが、処置後すぐに形態をアメボイド型に変化させ、貪食を始めたとの報告がある¹⁴⁾。今回の実験に用いた培養MGの形態は、培養2日目からアメボイド型であった。

Aβクリアランスに影響する因子

MGのAβクリアランスに影響する因子に関する報告は少ない。アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害薬のガランタミンは、MG表面のnAChRにリガンドとして結合し、CD14/TLR複合体の発現を促し、Aβクリアランスを促進する¹⁵⁾。MGのAβ貪食は、heat shock proteins (Hsp) により増強され、反対に、核内蛋白質として知られるhigh mobility groupbox protein-1 (HMGB 1) により阻害される¹⁶⁾。ルチン(ケルセチン-3-ルチノシド)は、抗酸化作用とAGEs生成抑制作用を有する天然フラボノイドである。ルチンナトリウム (NaR) は、MGにおける貪食関連受容体の発現レベルを増加させることにより、MGを増加させ、Aβクリアランスを促進する可能性が指摘されている¹⁷⁾。

今回の実験からは、MGのAβ貪食を促進する因子としてMelが新たに加わった。「睡眠の質」向上に伴いMel分泌量は増加することから、Aβクリアランスの恒常性維持のために良質の睡眠を維持することは、ADの進展予防のために重要と位置付けられる。

マウス脳MGは、活性酸素種 (ROS) を多く産生するサブセットとROSを産生しないサブセットの2群に分けて比較した実験では、神経細胞と共培養すると、活性酸素産生MGは神経毒性を示し、活性酸素非産生MGは神経保護作用を示した¹⁸⁾。また、HIV-1 Nef蛋白質を導入してNADPHオキシダーゼ活性を高めた培養実験では、神経保護的なMGクローンが毒性MGクローンに変化する。これら所見は、MGが環境に応じて神経保護性サブセットから神経毒性サブセットへと変化する可能性を示唆している。Aβと糖化Aβに接触したMGがどのように変化を起こすか、両Aβに違いがあるのか、については、今後の検討課題である。

ADにおけるアルデヒドの関与

糖化ストレスが強い代表的疾患である糖尿病は万病の源と言われ、様々な加齢疾患の発症リスクを高める。根本的な要因はアルデヒド (-CHO基を有する化合物) を産生しやすいこと、開環型グルコース、開環型フルクトースをはじめとして、4-ヒドロキシノネナール (HNE)、アクロレインなどの脂質過酸化生成物やMGO、グリオキサル (GO)、グリセルアルデヒド、3デオキシグルコソ (3DG) が増加した状態である。これらのアルデヒドはカルボニルストレスとして、蛋白のカルボニル化反応を惹起し、

さらにAGEsを産生し、ADの神経変性に寄与する¹⁹⁻²²⁾。アルデヒドによるA β アミロイド蛋白の糖化は、毒性が増強した有害な形態変化の可能性がある²³⁾。

A β 糖化によるAGEs形成がA β 凝集能を変化させる²⁴⁾。A β 糖化は、成熟線維への β 変換を著しく遅らせ、オリゴマーなどの毒性形態が残存しやすくなる^{25,26)}。脳神経系においては、A β のみならず、タウ蛋白、 α -シヌクレインの糖化が認知症の発症と進展に関与すると考えられている。

MGOはA β 凝集体のサイズを増加させる²⁶⁾。AD患者のCSF中のMGO濃度は健常者に比べ高く²⁷⁾、MGO由来のヒドロイミダゾロン化合物も多い²⁸⁾。認知症の進展については、血清中MGOが高いほど認知機能が低下しやすいたことが報告されている²⁹⁾。

一方、アクロレインは、脂質過酸化やポリアミン代謝により生成され、高い求核性を持ち反応性が強い。アクロレインは、システイン、リジン、ヒスチジンなどの求核性アミノ酸とマイケル付加反応を起こし、蛋白のカルボニル化を惹起する。ラットへのアクロレイン経口投与(2.5 mg/kg/day、8週間胃内投与)により認知機能低下と海馬萎縮が認められた³⁰⁾。臨床的にも、AD患者の海馬や側頭葉でアクロレインが増加しており³¹⁾、血漿および髄液中のアクロレイン結合蛋白が健常者に比べて高い^{32,33)}。ADの発症と進展にも関与している³⁴⁾。

A β 形態変化の影響に関する研究は多くない。MGO処理により作成した糖化A β は、RAGE発現の亢進とGSK-3 (glycogen synthase kinase-3) 活性化を惹起し、毒性が強いことが報告されている³⁵⁾。そこで、今回は我々が、MGOとアクロレイン処理による糖化A β を作成し、MG貪食能への影響を検証するに至り、糖化A β に対しては貪食能が低下することを見出した。

Melの関与

Melは松果体から分泌されるホルモンで抗酸化作用³⁶⁾や糖代謝の恒常性維持作用³⁷⁾を有する。一方、睡眠の質低下と概日リズムの乱れはAD発症のリスクを高めることが知られ³⁸⁾、これらの事象を結び付ける因子としてMelが注目されている³⁹⁾。Melは、セクレターゼの発現制御ネットワークを調節することで、アミロイド前駆体タンパク質(APP)のプロセッシングとA β の生成を抑制的に作用する⁴⁰⁾。

MelはA β 凝集を阻害し⁴¹⁻⁴⁴⁾、神経毒性を改善し^{45,46)}、リンパ管を介したリンパドレナージを改善し⁴⁷⁾、BBB輸送および分解経路を通じてA β クリアランスを促進する。

A β 40は凝集性が強く脳内に沈着しやすく、A β 42は排出されやすいことから、血漿A β 40/42比はA β クリアランス障害の指標と位置付けられ、この比が高いAD発症リスクが高い⁴⁸⁾。我々は、A β 40/42が加齢に伴い増加すること⁴⁹⁾、睡眠の質が低い集団ではA β 40/42が高いこと⁵⁰⁾を報告している。本所見は、Mel分泌が低い集団ではA β クリアランスが低下している可能性を示唆しており、本研究の結果と相反しない。

Melは記憶力に対しても好影響を及ぼす^{51,52)}。Melの分泌障害を示すOXYSLラットではMel投与により、不安の増大と参照記憶の劣化が抑制される⁵³⁾。Melは、活性酸素やRAGE (receptor for advanced glycation end products)の上昇を抑制することにより、D-ガラクトース投与マウスの記憶機能を向上させることも明らかにされている⁵¹⁾。Melは、血液脳関門を通過し、脳組織でN1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) に変換され、マウスの長期物体記憶を促進されることが報告された⁵⁴⁾。

A β が神経細胞に取り込まれると、ミトコンドリア内膜のイオン勾配が変化、ミトコンドリア障害が惹起され、呼吸制御比とATPaseの加水分解活性が減少する⁵⁵⁾。さらにマイトファジーが障害を受けるため、ミトコンドリア修復に支障をきたす⁵⁶⁾。これに対しMelが抑制作用を示す^{55,56)}。ADにおけるミトコンドリアやマイトファジーの障害には、ミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素(ALDH2)⁵⁷⁾やRAGE⁵¹⁾の関与が指摘されている。

我々は、その背景に潜む糖化ストレスの観点から研究を進めてきた結果、Melが食後高血糖(血糖スパイク)を抑制すること⁵⁸⁾、AGEs分解促進作用⁵⁹⁾を有することを報告した。さらに今回は、MelがMGのA β 貪食を促進することを見出した。これらの所見は、ADの進展をできるだけ遅らせるためには、睡眠の質を高め、自己のMel分泌を高めることが一次予防として重要でありことを示している。AD予防策のパラダイムシフトと呼んでも良いであろう。

結語

これまでにMGは、シナプスの機能制御、脳内異物除去または免疫に関わる細胞として、脳の恒常性維持に重要な役割を担うことが示されてきた。今回の実験からいくつかの新知見が得られた。第一に、MGがA β を貪食・分解するだけでなく、A β 添加を受けない場合よりもMGに対し保護的に作用し、A β がMGの恒常性維持に、生理的役割として、貢献している可能性が示唆された。第二は、MGによるA β 貪食がMelによって促進されることである。Mel分泌量が低下した「睡眠の質」低下者ではAD罹患率が高いという疫学所見に合致する。第三は、MGは糖化修飾を受けたA β に対し貪食困難となり、A β クリアランスが低下する可能性があることである。糖化ストレスが強く、糖化A β 増加していると予想される糖尿病患者ではAD罹患率が高いという疫学所見に合致する。

以上を考慮すると、これまでのA β を排除するというのではなく、糖化ストレス対策によるA β 糖化修飾の予防、睡眠の質向上といった生活習慣によるAD進展予防が重要と考えられる。新規の創薬の観点からは、脳内に蓄積した糖化修飾A β の処理物質やMGの貪食能促進物質の探索が期待される。

利益相反申告

著者らは、本研究に関して申告すべき利益相反はない。

謝辞

本研究は文部科学省研究助成（20K11593）によって実施された。本研究は、第25回糖化ストレス研究会（2022年9月10日、京都）にて発表した。

参考文献

- 1) Nunomura A, Tamaoki T, Motohashi N, et al. The earliest stage of cognitive impairment in transition from normal aging to Alzheimer disease is marked by prominent RNA oxidation invulnerable neurons. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012; 71: 233-241.
- 2) Takeuchi M, Yamagishi S. Possible involvement of advanced glycation end products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des*. 2008; 14: 973-978.
- 3) Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2015; 52: 1-18.
- 4) Cline EN, Bicca MA, Viola KL, et al. The amyloid- β oligomer hypothesis: Beginning of the third decade. *J Alzheimers Dis*. 2018; 64(s1): S567-S610.
- 5) Frisoni GB, Altomare D, Thal DR, et al. The probabilistic model of Alzheimer disease: The amyloid hypothesis revised. *Nat Rev Neurosci*. 2022; 23: 53-66.
- 6) Dahlgren KN, Manelli AM, Blaine Jr. SW. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem*. 2002; 277: 32046-32053.
- 7) Takenouchi T, Iwamaru Y, Sugama S, et al. The activation of P2X7 receptor induces cathepsin D-dependent production of a 20-kDa form of IL-1 β under acidic extracellular pH in LPS-primed microglial cells. *J Neurochem*. 2011; 117: 712-723.
- 8) コスモ・バイオ株式会社. 初代ミクログリア培養キット (SD ラット). 添付資料.
https://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/PMC_/MGSD.20181218.pdf Accessed at July 22, 2022.
- 9) 株式会社 同仁化学研究所. 細胞増殖/細胞毒性測定用試薬. 添付資料.
<https://www.dojindo.co.jp/manual/CK04.pdf> Accessed at July 22, 2022.
- 10) Akiyama H, Arai T, Kondo H, et al. Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2000; 14(Suppl 1): S47-53.
- 11) 秋山治彦. A β 沈着とミクログリア. 老年期痴呆研究会誌. 2010; 15: 79-81.
- 12) 北村佳久, 高田和幸, 谷口隆之. ストレスタンパク質とミクログリアによるアミロイド β 貪食機能. 日薬理誌. 2004; 124: 407-413.
- 13) 岩原直敏, 下濱 俊. ミクログリアによるA β 貪食機構とAlzheimer病. 神経治療. 2019; 36(4): 528-530.
- 14) Kitamura Y, Shibagaki K, Takata K, et al. Involvement of Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolinhomologous protein (WAVE) and Rac 1 in the phagocytosis of amyloid- β (1-42) in rat microglia. *J Pharmacol Sci*. 2003; 92: 115-123.
- 15) Matsumura A, Suzuki S, Iwahara N, et al. Temporal changes of CD68 and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor expression in microglia in Alzheimer's disease-like mouse models. *J Alzheimers Dis*. 2015; 44: 409-423.
- 16) Takata K, Kitamura Y, Kakimura J, et al. Role of high mobility group protein-1 (HMG1) in amyloid- β homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 301: 699-703.
- 17) Pan RY, Ma J, Kong XX, et al. Sodium rutin ameliorates Alzheimer's disease-like pathology by enhancing microglial amyloid- β clearance. *Sci Adv*. 2019; 5: eaau6328.
- 18) Sawada M, Imamura K, Nagatsu T. Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 2006; 70: 373-381.
- 19) Woltjer RL, Maezawa I, Ou JJ, et al. Advanced glycation endproduct precursor alters intracellular amyloid-beta/A beta PP carboxy-terminal fragment aggregation and cytotoxicity. *J Alzheimers Dis*. 2003; 5: 467-476.
- 20) Angeloni C, Zamboni L, Hrelia S. Role of methylglyoxal in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 238485.
- 21) Barić N. Role of advanced glycation end products (AGEs) on the reactive oxygen species (ROS) generation in Alzheimer's disease amyloid plaque. *Glycative Stress Res*. 2015; 2: 140-155.
- 22) Barić N. The decline of the expression of low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) during normal ageing and in Alzheimer's disease. *Glycative Stress Res*. 2022; 9: 42-54.
- 23) Muronetz VI, Melnikova AK, Seferbekova ZN, et al. Glycation, glycolysis, and neurodegenerative diseases: Is there any connection? *Biochemistry (Mosc)*. 2017; 82: 874-886.
- 24) Alghamdi A, Forbes S, Birch DJS, et al. Detecting beta-amyloid glycation by intrinsic fluorescence: Understanding the link between diabetes and Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys*. 2021; 704: 108886.
- 25) Emendato A, Milordini G, Zacco E, et al. Glycation affects fibril formation of A β peptides. *J Biol Chem*. 2018; 293: 13100-13111.
- 26) Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, et al. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994; 91: 4766-4770.
- 27) Kuhla B, Lüth HJ, Haferburg D, et al. Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1043: 211-216.
- 28) Ahmed N, Ahmed U, Thornalley PJ, et al. Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment. *J Neurochem*. 2005; 92: 255-263.

- 29) Beeri MS, Moshier E, Schmeidler J, et al. Serum concentration of an inflammatory glycotoxin, methylglyoxal, is associated with increased cognitive decline in elderly individuals. *Mech Ageing Dev.* 2011; 132: 583-587.
- 30) Huang YJ, Jin MH, Pi RB, et al. Acrolein induces Alzheimer's disease-like pathologies in vitro and in vivo. *Toxicol Lett.* 2013; 217: 184-191.
- 31) Dang TN, Arseneault M, Murthy V, et al. Potential role of acrolein in neurodegeneration and in Alzheimer's disease. *Curr Mol Pharmacol.* 2010; 3: 66-78.
- 32) Tsou HH, Hsu WC, Fuh JL, et al. Alterations in Acrolein Metabolism Contribute to Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2018; 61: 571-580.
- 33) Waragai M, Yoshida M, Mizoi M, et al. Increased protein-conjugated acrolein and amyloid- β 40/42 ratio in plasma of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2012; 32: 33-41.
- 34) Chen C, Chen Y, Lu J, et al. Acrolein-conjugated proteomics in brains of adult C57BL/6 mice chronically exposed to acrolein and aged APP/PS1 transgenic AD mice. *Toxicol Lett.* 2021; 344: 11-17.
- 35) Li XH, Du LL, Cheng XS, et al. Glycation exacerbates the neuronal toxicity of β -amyloid. *Cell Death Dis.* 2013; 4: e673.
- 36) Harceland R, Pandi-Perumal SR. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr Metab (Lond).* 2005; 2: 22.
- 37) Watanabe K, Katagiri S, Hattori A. Melatonin and glucose metabolism. *Glycative Stress Res.* 2020; 7: 105-109.
- 38) Wu H, Dunnett S, Ho YS, et al. The role of sleep deprivation and circadian rhythm disruption as risk factors of Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol.* 2019; 54: 100764.
- 39) Li Y, Zhang J, Wan J, et al. Melatonin regulates A β production/clearance balance and A β neurotoxicity: A potential therapeutic molecule for Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother.* 2020; 132: 110887.
- 40) Shukla M, Govitrapong P, Boontem P, et al. Mechanisms of melatonin in alleviating Alzheimer's disease. *Curr Neuroparmacol.* 2017; 15: 1010-1031.
- 41) Rebelo S, Vieira SI, Esselmann H, et al. Tyrosine 687 phosphorylated Alzheimer's amyloid precursor protein is retained intracellularly and exhibits a decreased turnover rate. *Neurodegener Dis.* 2007; 4: 78-87.
- 42) Robakis NK, Ramakrishna N, Wolfe G, et al. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84: 4190-4194.
- 43) Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature.* 1995; 376: 775-778.
- 44) Balmik AA, Chinnathambi S. Multi-faceted role of melatonin in neuroprotection and amelioration of Tau aggregates in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2018; 62: 1481-1493.
- 45) Hoppe JB, Frozza RL, Horn AP, et al. Amyloid-beta neurotoxicity in organotypic culture is attenuated by melatonin: Involvement of GSK-3 β , tau and neuroinflammation. *J Pineal Res.* 2010; 48: 230-238.
- 46) Ionov M, Burchell V, Klajnert B, et al. Mechanism of neuroprotection of melatonin against beta-amyloid neurotoxicity. *Neuroscience.* 2011; 180: 229-237.
- 47) Pappolla MA, Matsubara E, Vidal R, et al. Melatonin treatment enhances A β lymphatic clearance in a transgenic mouse model of amyloidosis. *Curr Alzheimer Res.* 2018; 15: 637-642.
- 48) Igarashi K, Yoshida M, Waragai M, et al. Evaluation of dementia by acrolein, amyloid- β and creatinine. *Clin Chim Acta.* 2015; 450: 56-63.
- 49) Meno M, Yokota S, Hashimoto M, et al. Plasma amyloid β 40/42 ratio and its characteristics. *Glycative Stress Res.* 2021; 8: 62-72.
- 50) Haasbroek K, Yagi M, Ando M, et al. Effects of mats with "A Distinctive 4-Layer 3-Dimensional Structure" on sleep quality and gut microbiota: A non-controlled open-label study. *Glycative Stress Res.* 2021; 8: 73-86.
- 51) Ali T, Badshah H, Kim TH, et al. Melatonin attenuates D-galactose-induced memory impairment, neuroinflammation and neurodegeneration via RAGE/NF-K B/JNK signaling pathway in aging mouse model. *J Pineal Res.* 2015; 58: 71-85.
- 52) Zhang S, Wang P, Ren L, et al. Protective effect of melatonin on soluble A β 1-42-induced memory impairment, astrogliosis, and synaptic dysfunction via the Musashi1/Notch1/Hes1 signaling pathway in the rat hippocampus. *Alzheimers Res Ther.* 2016; 8: 40.
- 53) Rudnitskaya EA, Muraleva NA, Maksimova KY, et al. Melatonin attenuates memory impairment, amyloid- β accumulation, and neurodegeneration in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2015; 47: 103-116.
- 54) Iwashita H, Matsumoto Y, Maruyama Y, et al. *J Pineal Res.* 2021; 70: e12703.
- 55) Rosales-Corral S, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, et al. Accumulation of exogenous amyloid-beta peptide in hippocampal mitochondria causes their dysfunction: A protective role for melatonin. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012: 843649.
- 56) Chen C, Yang C, Wang J, et al. Melatonin ameliorates cognitive deficits through improving mitophagy in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Pineal Res.* 2021; 71: e12774.
- 57) Wang S, Wang L, Qin X, et al. ALDH2 contributes to melatonin-induced protection against APP/PS1 mutation-prompted cardiac anomalies through cGAS-STING-TBK1-mediated regulation of mitophagy. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5: 119.
- 58) Ogura M, Okuda F, Hattori A, et al. Effect of melatonin intake on postprandial blood glucose in the breakfast. *Glycative Stress Res.* 2018; 5: 75-81.
- 59) Takabe W, Mitsushashi R, Parengkuan L, et al. Cleaving effect of melatonin on crosslinks in advanced glycation end products. *Glycative Stress Res.* 2016; 3: 38-43.