

*Original paper***Actions of mesenchymal stem cell secretome on microglia amyloid- β uptake**

Yoshikazu Yonei¹⁾, Kyle Haasbroek¹⁾, Shino Otaka²⁾, Chieko Sakiyama¹⁾, Shohei Iwase³⁾, Masayuki Yagi¹⁾

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) Drug Discovery and Contract Services Division, Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan

Glycative Stress Research 2024; 11(4): 192-203

(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

**ミクログリア細胞アミロイド β 取り込みへの
間葉系幹細胞セクレトームの作用**

米井嘉一¹⁾、Haasbroek Kyle¹⁾、大高志乃²⁾、崎山智恵子¹⁾、岩瀬祥平³⁾、八木雅之¹⁾

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) コスモ・バイオ株式会社 創薬・受託サービス事業部

抄録

高齢認知症患者の脳内において重要な機能を持つ蛋白質（アミロイド β 、タウ、 α シヌクレイン）は翻訳後修飾を受けて重合、凝集を経て組織内沈着をしている。その要因である糖化ストレスは、アルデヒド過剰な状態であり、高血糖、高脂肪食、飲酒により惹起される。脂質が豊富な脳では、糖質由来アルデヒドに加えて、脂肪酸の酸化によって生じる脂肪酸由来アルデヒドがダブルパンチのように脳内蛋白を修飾する。既報では糖化修飾A β はミクログリア貪食抵抗性となり、クリアランスに支障をきたす可能性があることを示した。本研究は、ミクログリア由来BV2細胞を用いてA β 貪食能評価モデルを作製し、間葉系幹細胞セクレトーム（stem cell secretome: SCST）の影響を評価した。SCSTは様々な成長因子や細胞外小胞（EV）を含み、点鼻投与により高齢認知症症状が改善することが報告されている。実験の結果、SCSTは用量に依存してA β 貪食を促進することが示された。これらの所見はSCSTがミクログリアを活性化して、A β クリアランスの恒常性維持に貢献する可能性を示唆している。ミクログリア活性化現象はグリアプロテクションの観点からも重要であると推測している。

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：Haasbroek K kylehaasbroek@gmail.com; 大高志乃 shino-otaka@cosmobio.co.jp;

崎山智恵子 csakiyam@mail.doshisha.ac.jp; 岩瀬祥平 shohei-iwase@cosmobio.co.jp;

八木雅之 myagi@mail.doshisha.ac.jp

Glycative Stress Research 2024; 11(4): 192-203
本論文を引用する際はこちらを引用してください。
(c) Society for Glycative Stress Research

KEY WORDS: ミクログリア、アミロイド β 、食食、認知症、幹細胞セクレトーム、グリアプロテクション

はじめに

高齢者の認知症患者の脳内の重要な蛋白質（アミロイド β 、タウ、 α シヌクレイン）が翻訳後修飾を受けて重合、凝集を経て組織内沈着をしている。アミロイド β (Amyloid- β : A β)の生理的な役割は不明であるが、アルツハイマー病 (AD)の発症と進展の過程では重要な役割を果たす。A β 重合により神経毒性増強、難分解性、脳内沈着をきたしA β クリアランスは低下すると言われている。我々はADの進展リスク因子として糖化ストレスに注目している。糖化ストレスはアルデヒド過剰な状態であり、糖尿病、高脂肪食、飲酒により惹起される。脂質が豊富な脳では、糖質由来アルデヒドに加えて、脂肪酸の酸化によって生じる脂肪酸由来アルデヒドがダブルパンチのように脳内蛋白を修飾する。

糖化ストレスの代表疾患である糖尿病患者ではメチルグリオキサル (MGO) やアクロレイン (Acro) が増加する。これまでの研究では、A β クリアランスの一端を担うミクログリアA β 食食能に焦点を当て、糖化ストレスの影響について検証した。糖化A β はMGOあるいはAcro処理により作成した。実験には蛍光標識A β (TAMRA-A β)とマウス由来初代ミクログリア細胞 (コスモ・バイオ)を用いた。この細胞を用いた実験では、ミクログリアはA β を食食するが、糖化A β に対する食食能は著減することが示された¹⁾、初代培養ミクログリア細胞は、A β 添加時の方が非添加時より活性化、増殖、自然死の減少の傾向を示し、A β による神経栄養性グリアプロテクションの可能性がある。この現象については今後検討すべき課題である。同様のコメントは他の論文でも記載されている²⁾。以上を考慮すると、A β を完全に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り、「A β クリアランスを向上させAD進展を予防すること」が重要である。

このような背景から、我々の研究室では、科研費助成申請書に示した通り、ミクログリアA β 食食能を促進する成分、抑制する成分の探索を始めた³⁾。候補物質として腸内細菌叢の相利共生菌由来 EVに焦点を当てている。

この間に森田らは間葉系幹細胞由来セクレトーム (mesenchymal stem cell secretome: SCST) の点鼻投与が認知症高齢患者の長谷川式認知症スコアを改善させることを報告した⁴⁾。同様の報告は他にもある⁵⁻⁷⁾。認知症症状が改善した機序の一つとして、私たちは仮説「SCSTによる

ミクログリアA β 食食の促進」を立てた。仮説検証のため、BV2を用いたA β 食食モデルにおいて、認知症患者に使用したSCSTの食食へ及ぼす作用の検討を行った。グリア細胞によるA β 食食が促進すればA β クリアランスが改善する可能性がある。A β クリアランスを向上させる因子が利用できれば、ADの進展予防、ADの増悪予防のために有用な手段が得られるものと期待している。

方法

ミクログリア初代培養細胞から細胞株へ

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、炎症に対する反応や神経保護などの機能が生体内ミクログリアとは大きく異なると言われている。初代培養ミクログリアは、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を維持している⁸⁾。これまでの研究では、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、ラット初代ミクログリア培養キット (コスモ・バイオ)を用いてきた⁹⁾。初代培養細胞は、比較的多くの検体試料数の効能を反復して評価する実験モデルに向かないと判断し、今回はマウスミクログリア細胞株BV2 (コードNo.: 305156-ACADEMIC, Cell Lines Service GmbH, Germany)を用いた。基礎培地として、RPMI 1640 Medium (Thermo Fisher Scientific Inc.)、組成: RPMI 1640 + 10% FBS (fetal bovine serum) + ペニシリン-ス-ストレプトマイシン (100 IU/mL, 0.1 mg/mL)を用いた。

ミクログリア系細胞株BV2細胞

BV2細胞は、動物実験に広く使用されているC57BL/6マウスに由来するミクログリア細胞株の一種である^{10,11)}。細胞は、v-rafおよびv-mycがん遺伝子を保有するJ2レトロウイルスを使用して不死化され、樹立された。BV2細胞の培養には、RPMI 1640 Medium (Thermo Fisher Scientific Inc.)にfetal bovine serum (FBS)を10%、Penicillin-Streptomycin (富士フイルム和光純薬)を100 IU/mL、0.1 mg/mLになるように添加したものをを用い、蛍光観察時にはフェノールレツ

ド不含培地として、RPMI 1640 Medium, no phenol red (Thermo Fisher Scientific Inc.) に fetal bovine serum (FBS) を 10 %、Penicillin-Streptomycin (富士フイルム和光純薬) を 100 IU/mL、0.1 mg/mL になるように添加したものをを用いた。

蛍光標識 Aβ (TAMRA-Aβ) の合成

既報¹⁾で用いた TAMRA-Aβ は、蛍光標識した TAMRA-Aβ (コスモ・バイオ、東京) を用いた。この試薬は Aβ-(1-42) に PEG スペーサーを介して赤色蛍光 carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) が標識されている²⁾。

Aβ-(1-42) ペプチドは、取り扱いが難しい試薬である。両親媒性配列と強い自己凝集性により、構造と機能の両方の特性評価が複雑になっている。ロット間の大きな変動は、凝集挙動と生物活性の両方に影響する。Dahlgren KNらは最近「構造履歴」と呼ばれるものを除去することで、この変動を最小限に抑える措置を講じた²⁾。構造履歴とは、テンプレートまたはシードとして機能し、ペプチド溶液の大部分を特定の凝集経路に導くことができる二次、三次、または四次構造を意味する。これらの構造シードは、主に化学純度に焦点を当てたもの、構造の不均一性には焦点を当てない従来の品質管理方法を使用した合成品では検出されない。

しかし、この良好な性状安定性を有する Aβ-(1-42) ペプチドは、2022年に製造中止となり、在庫が底をついた。

その後、蛍光標識 Aβ の様々な市販品の使用を試みたが、性状が不安定であったり、難溶解性であったり、初代ミクログリアとの相性が悪かったりといった様々な理由により、実験に適した標識 Aβ を得ることができなかった。そのため新たに Aβ を合成するに至った。今回の実験に使用した TAMRA 標識マウス Aβ はコスモ・バイオ株式会社札幌事業所にて合成した。配列は、5-TAMRA-XDAEFGHDSG FEVRHQKLKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGGVVIA X : AEEAc (PEG)、分子量 4975.57 であった。

Aβ 貪食能の検証

Aβ の前処理

マウス Aβ をトリフルオロ酢酸 (TFA) (ナカライテスク) に 1 mg/mL に溶解した後、溶解液 100 μL/本を 2 本のマイクロチューブに分け、蒸留水で 10 倍に希釈し、遠心エバポレーターで乾燥した。Aβ の凝集をほぐす目的のため、遠心エバポレーターで乾燥した Aβ に 1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) (関東化学) を 100 μL/チューブ加え、再溶解した。細胞は再び遠心エバポレーターで乾燥させ、使用するまで -20 °C で保存した。細胞添加の前日、乾燥した Aβ を 40 μL のジメチルスルホキシド (DMSO) (Merck KGaA) (2.5 mg/mL) に溶解し、さらに 960 μL の培地を加えて 25 倍に希釈した (最終 Aβ 濃度: 100 μg/mL = 20 μM、

DMSO 濃度: 4 %)。培地で希釈した Aβ を 4 °C で 24 時間インキュベートし、Aβ をオリゴマー化した。

実験手技: Aβ 貪食能の検証

継代して十分量に達するまで培養した BV2 細胞を、96 ウェルプレートに 5×10^3 cells/well の密度で播種した。播種翌日、下記の濃度になるように添加用培地を調製し、100 μL/well で培地交換して添加した。

Negative control	Aβ なし	DMSO 終濃度: 0.2 %
Positive control	Aβ 終濃度: 1 μM	DMSO 終濃度: 0.2 %
Yeast EV		
×100	Aβ 終濃度: 1 μM	DMSO 終濃度: 0.2 % EV: 1 %
×1,000	Aβ 終濃度: 1 μM	DMSO 終濃度: 0.2 % EV: 0.1 %
×10,000	Aβ 終濃度: 1 μM	DMSO 終濃度: 0.2 % EV: 0.01 %
Stem cell ST A		
×2	Aβ 終濃度: 1 μM	DMSO 終濃度: 0.2 % HGF: 50 ng/mL
×20	Aβ 終濃度: 1 μM	DMSO 終濃度: 0.2 % HGF: 5 ng/mL
×200	Aβ 終濃度: 1 μM	DMSO 終濃度: 0.2 % HGF: 0.5 ng/mL
Stem cell ST B		
×2	Aβ 終濃度: 1 μM	DMSO 終濃度: 0.2 % HGF: 5 ng/mL
×5	Aβ 終濃度: 1 μM	DMSO 終濃度: 0.2 % HGF: 2 ng/mL
×20	Aβ 終濃度: 1 μM	DMSO 終濃度: 0.2 % HGF: 0.5 ng/mL

(但し、HGF は推定濃度)

添加 24 時間後、上清を除き、HBSS (-) で 1 回洗浄後、フェノールレッド不含の培地を 100 μL 添加した。

その後オールインワン顕微鏡 (BZX-710、キーエンス) で蛍光画像撮影 (対物 x 10、Red, Blue) を行った。

TAMRA-Aβ の蛍光画像と位相差の画像から、画像解析を行い、画像あたりの TAMRA の蛍光強度及び細胞の総面積値を算出した。

計算式: TAMRA 蛍光強度 / 細胞の総面積値

TAMRA 蛍光強度を細胞の総面積値で補正し、さらに陰性対照 (Negative Control) 群に対する各群のコントロール比 (%NC) 及び Aβ 添加群 (陽性対照、positive control) に対する各群のコントロール比 (% Aβ) を算出して、グラフ化した。

遺伝子発現の検証: マイクロアレイ法

BV2 細胞を十分な量になるように継代し、100 mm ディッシュに約 1.6×10^6 個 / ディッシュの密度で播種した。播種の翌日、以下の濃度になるように添加用培地を調製し、10 mL / ディッシュずつ培地交換する形で添加した。添加 24 時間後に上清を除去し、細胞を溶解して Total RNA を抽出した。抽出後、マイクロアレイ解析はマイクロジェン・ジャパン (東京) にて実施した。

下記の 2 群において BV2 細胞内の遺伝子発現の変動を

網羅的に解析した。

Negative control Aβ: なし DMSO 終濃度: 0.3%

Positive control Aβ: 1 μM DMSO 終濃度: 0.3%

幹細胞ST (幹細胞培養上清/エクソソーム)

本試験では2種類の細胞上清液を用いた。

一つめは既報で使用したものと同一STで⁴⁾、フリーズドライ化した脂肪由来間葉系幹細胞ST (Stem Cell ST A) を使用した (ネイチャーバイオニクス(株)、東京)。1バイアルを1 mLで溶解した時にエクソソームがおおよそ 1×10^8 個、主要な成長因子の一つである肝細胞増殖因子 (hepatocellular growth factor: HGF) が 1.2×10^5 pg/mL 含まれるほか、多数の様々な種類の成長因子や栄養因子、サイトカインなどが高濃度に含まれている。HGFのほか、いくつかの代表的成分についてそれぞれ指標量を設定しこれらの量を満たすよう製品化しているため、有効成分はどれもほぼ同量でロット間格差は少ない。

幹細胞のドナーは20～30代の健康な日本人女性で、インスリンや抗生物質を使わず、ウイルス感染のリスク回避のため動物やヒトの血清を使用しない完全無血清培地を用いている。培養過程で大量に産生されるアンモニアなどの不要な成分については検出限界値以下にまで除去し、各種成長因子やエクソソームなどの有効成分を濃縮している。

二つめのST試料 (Stem Cell ST B) は、日本国内の医療機関より供与を受けた。含有するHGF推定濃度5 ng/mLである。他にエクソソームや成長因子などを含有しているが、含有量は不明であり。

比較対象として酵母由来細胞外小胞 (extracellular vesicle: EV) を使用した。酵母由来EV (Yeast EV) は、YSEV-R3 (コスモ・バイオ) を用いた。

結果

ミクログリアAβ貪食能

ミクログリア由来BV2細胞の培養状況を蛍光顕微鏡像と位相差顕微鏡像としてFig. 1, Fig. 2に示す。

Aβ非添加群 (陰性対照) ではTAMRA蛍光は検出されないが、Aβ添加群 (陽性対照) では蛍光が検出できた。Yeast EVや幹細胞由来ST添加による、ミクログリアAβ貪食能が変化したか否かについては、画像観察のみでは評価が困難であった。

Table 1, 2はそれぞれの蛍光強度を計測し、ミクログリアAβ貪食能の指標とした。各群はn = 4で実施した。またPlateごとに陰性対照と陽性対照を設けた。測定条件の違いにより陽性対照の測定値に差が生じるため、各プレートに陰性対照と陽性対照を設定した。

Fig. 3に陽性対照に対する蛍光強度の比を示した。前回の臨床研究⁴⁾で用いた間葉系SCST-Aのみが、用量依存的に

ミクログリアのAβ貪食を増強した。SCSTには製品間で大きな差があることが示された。

マイクロアレイ解析

Aβが実際にミクログリアに取り込まれ、分子レベルで作用を及ぼすかどうかを検証するため、マイクロアレイを用いて遺伝子発現の変化を解析した。Gene Ontology (GO) による解析結果は、生物学的プロセス (biological process) (Fig. 4-a)、細胞構成要素 (cellular component) (Fig. 4-b)、分子機能 (Fig. 4-c) (molecular function) の3つに分類された。生物学的プロセスでは、細胞プロセスの制御、生物学的プロセスの制御、生物学的制御、刺激に対する細胞応答、シグナル伝達において遺伝子発現の変化が観察された。細胞構成要素では、細胞の解剖学的実体において遺伝子発現の変化が観察された。分子機能では、シグナル受容体活性、シグナル伝達系、膜貫通型受容体活性、Gタンパク質共役型受容体活性で遺伝子発現の変化が観察された。

Aβが実際にミクログリアに実際に取り込まれて、分子レベルで影響を及ぼしているか否かを検証するために、マイクロアレイによる遺伝子発現の変化を解析した。Gene Ontology (GO; 遺伝子オントロジー) 解析結果を生物学的プロセス (Fig. 4)、細胞構成要素 (Fig. 5)、分子機能 (Fig. 6) の3つのカテゴリーに分類して、解析結果を示した。生物学的プロセスでは、細胞プロセスの調節 (regulation of cellular processes)、生物学的プロセスの調節 (regulation of biological processes)、生物学的調節 (biological regulation)、刺激に対する細胞応答 (cellular response to stimuli)、シグナル伝達 (signal transduction) などに遺伝子発現変動がみられた。細胞構成要素では、細胞の解剖学的実体 (anatomical entity of cells) などに遺伝子発現変動がみられた。分子機能ではシグナル受容体活性 (signal receptor activity) やシグナル伝達システム (signal transduction system)、膜貫通受容体活性 (transmembrane receptor activity)、G蛋白質共役受容体活性 (G protein-coupled receptor activity) などに遺伝子発現変化が認められた。

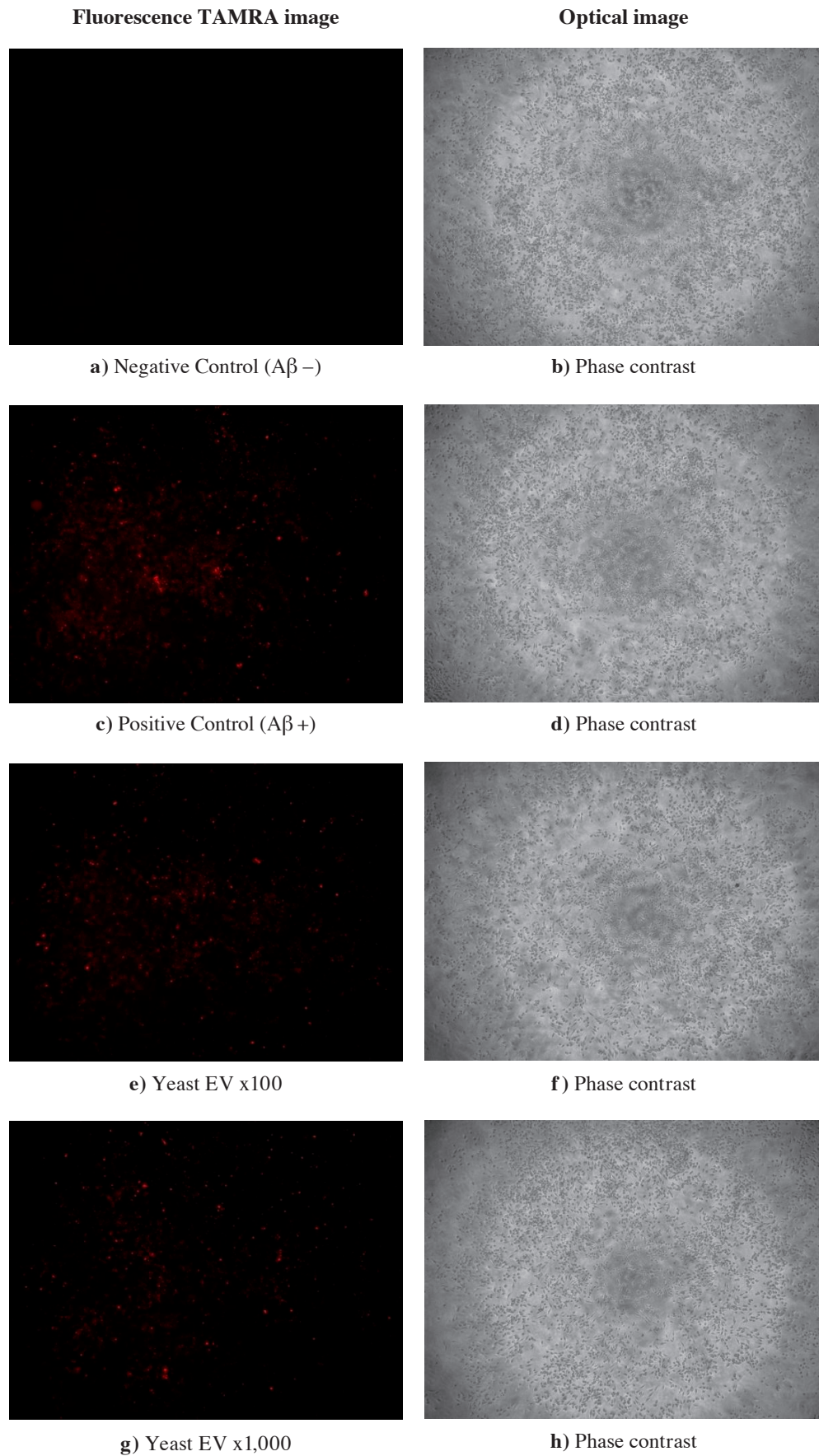
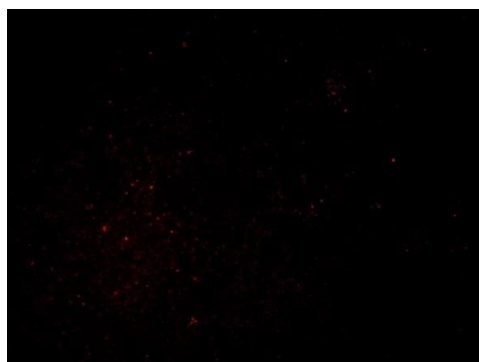


Fig.1. Cultured microglia image (Plate 1).

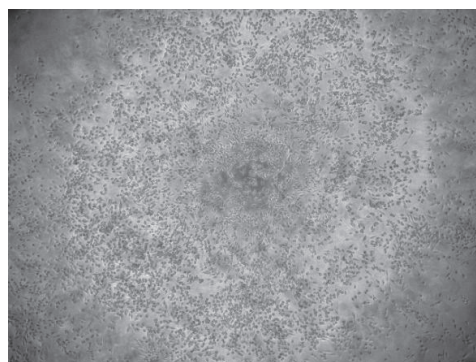
EV, extracellular vesicle.

Fluorescence TAMRA image

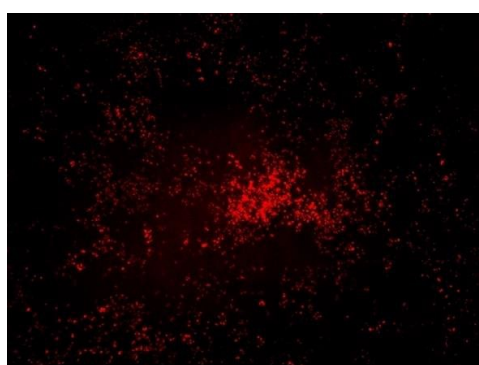


a) Yeast EV x10,000

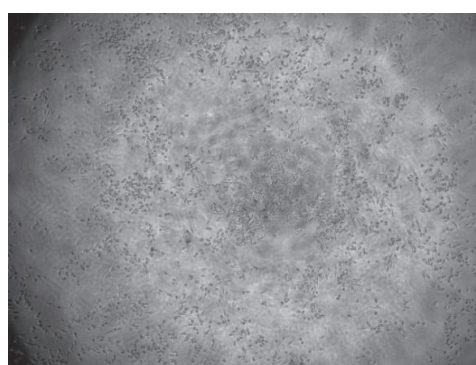
Optical image



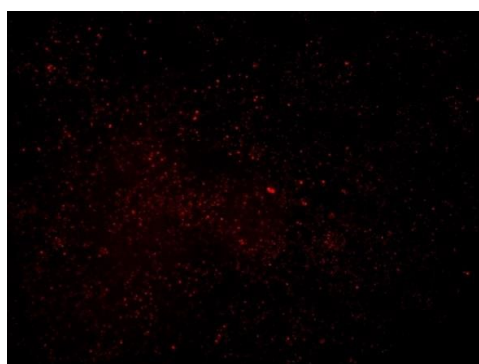
b) Phase contrast



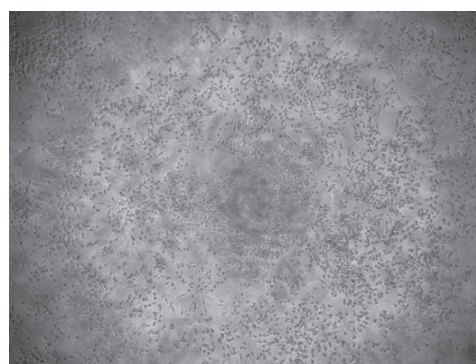
c) SCST-A x2



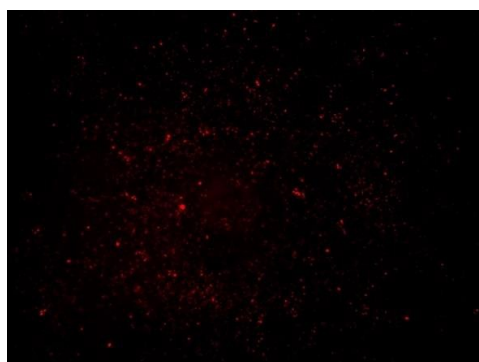
d) Phase contrast



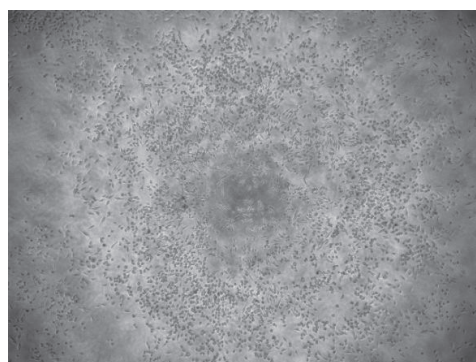
e) SCST-A x20



f) Phase contrast



j) SCST-A x200



h) Phase contrast

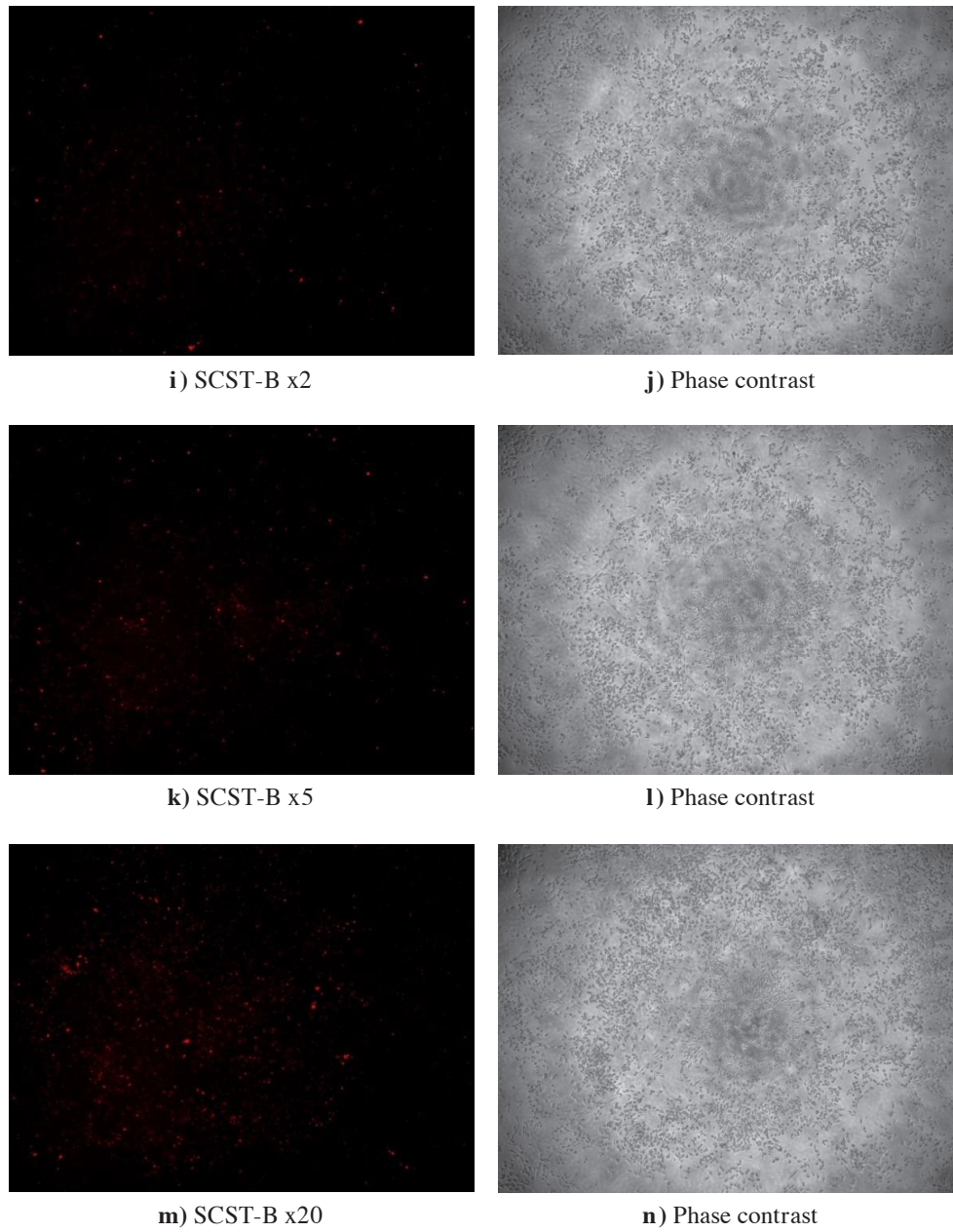


Fig.2. Cultured microglia image (Plate 2).

EV, extracellular vesicle. SCST, mesenchymal stem cell-derived secretome.

Table 1. Results of fluorescence intensity: A β phagocytosis index (Plate 1).

Group (Plate 1)	FI (Integrated)	Area (Integrated)	FI/Area (Corrected)	Average	SEM	% NC	% PC
Negative control (NC) A β (-)	5,662	5,886,304	9.62.E-04	2.57.E-04	2.03.E-04	100%	-
	108	5,173,551	2.09.E-05				
	135	6,504,722	2.08.E-05				
	162	6,253,515	2.59.E-05				
Positive control (PC) A β (+)	604,653	4,816,245	1.26.E-01	1.51.E-01	1.33.E-02	58,529%	100%
	720,560	5,875,886	1.23.E-01				
	1,163,465	6,7042,90	1.74.E-01				
	1,332,503	7,369,924	1.81.E-01				
	978,860	6,210,947	1.58.E-01				
	756,885	6,543,283	1.16.E-01				
	871,041	6,453,243	1.35.E-01				
Yeast EV x100 A β (+)	395,331	4,434,738	8.91.E-02	1.20.E-01	1.03.E-02	46,600%	80%
	746,704	6,398,303	1.17.E-01				
	820,308	6,409,137	1.28.E-01				
	915,831	6,278,260	1.46.E-01				
Yeast EV \times 1,000 A β (+)	295,519	4,741,174	6.23.E-02	1.03.E-01	1.37.E-02	39,831%	68%
	471,174	3,434,813	1.37.E-01				
	494,521	4,304,150	1.15.E-01				
	422,725	4,420,153	9.56.E-02				

FI, fluorescence intensity; SEM, standard error mean; EV, extracellular vesicle.

Table 2. Results of fluorescence intensity: A β phagocytosis index (Plate 2).

Group (Plate 2)	FI (Integrated)	Area (Integrated)	FI/Area (Corrected)	Average	SEM	% NC	% PC
Negative control A β (-)	5	5,825,113	8.58.E-07	2.20.E-04	1.83.E-04	100%	-
	28	7,062,462	3.96.E-06				
	132	6,300,474	2.10.E-05				
	5,839	6,845,136	8.53.E-04				
Positive control A β (+)	264,613	6,015,738	4.40.E-02	6.00.E-02	1.01.E-02	27,333%	100%
	264,740	5,136,753	5.15.E-02				
	259,160	5,192,431	4.99.E-02				
	554,611	5,852,807	9.48.E-02				
Yeast EV \times 10,000 A β (+)	163,736	6,176,329	2.65.E-02	3.56.E-02	4.21.E-03	16,198%	59%
	196,163	5,547,236	3.54.E-02				
	168,509	5,372,446	3.14.E-02				
	321,880	6,555,047	4.91.E-02				
	1,103,828	5,097,519	2.17.E-01				
	875,578	4,886,988	1.79.E-01				
	1,525,473	5,143,644	2.97.E-01				
SCST-A \times 2 A β (+)	1,277,428	2,781,199	4.59.E-01	2.89.E-01	5.04.E-02	131,519%	481%
	1,054,059	4,444,514	2.37.E-01				
	913,478	4,601,226	1.99.E-01				
	1,285,373	4,929,043	2.61.E-01				
SCST-A \times 20 A β (+)	647,831	4,160,483	1.56.E-01	1.56.E-01	3.61.E-03	70,917%	259%
	854,001	5,840,659	1.46.E-01				
	974,431	5,850,179	1.67.E-01				
	895,619	5,788,828	1.55.E-01				
SCST-A \times 200 A β (+)	491,261	4,412,781	1.11.E-01	1.09.E-01	1.66.E-03	49,771%	182%
	620,828	5,920,794	1.05.E-01				
	696,461	6,465,712	1.08.E-01				
	721,674	6,359,165	1.13.E-01				
SCST-B \times 2 A β (+)	137,547	4,530,323	3.04.E-02	3.55.E-02	5.40.E-03	16,178%	59%
	164,859	5,775,365	2.85.E-02				
	161,843	5,569,193	2.91.E-02				
	281,414	5,191,789	5.42.E-02				
SCST-B \times 5 A β (+)	262,819	4,586,097	5.73.E-02	5.76.E-02	1.27.E-03	26,215%	96%
	332,899	6,202,677	5.37.E-02				
	371,320	6,127,799	6.06.E-02				
	381,500	6,488,118	5.88.E-02				
SCST-B \times 20 A β (+)	448,949	5,450,273	8.24.E-02	1.10.E-01	1.40.E-02	50,232%	184%
	327,562	3,844,944	8.52.E-02				
	565,440	3,778,175	1.50.E-01				
	417,598	3,362,082	1.24.E-01				

FI, fluorescence intensity; SEM, standard error mean; EV, extracellular vesicle; SCST, mesenchymal stem cell-derived secretome.

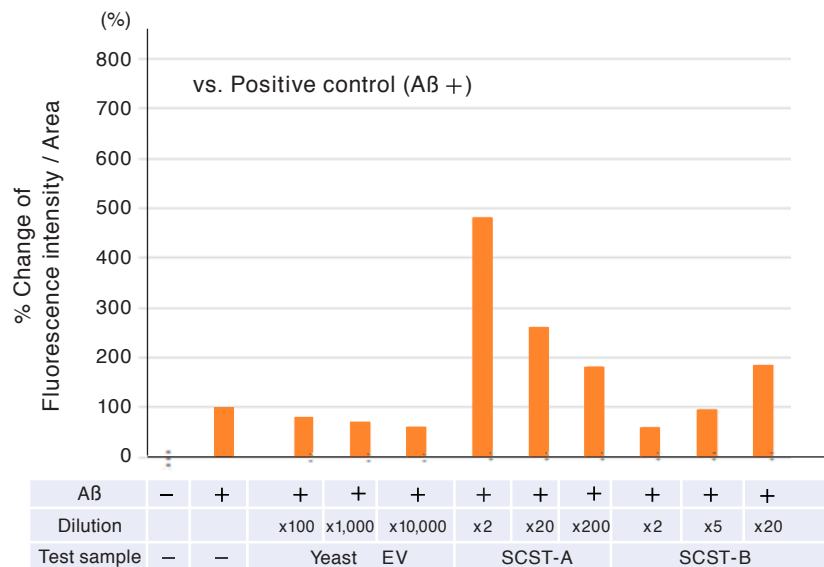


Fig. 3. Microglia Aβ phagocytosis potential: Comparison with positive control.

Results are expressed as % change of fluorescence intensity derived from TMRA-Aβ uptake by microglia VB2 cell (data from **Table 1 & 2**). EV, extracellular vesicle; SCST, mesenchymal stem cell-derived secretome.

Fig. 4-a.

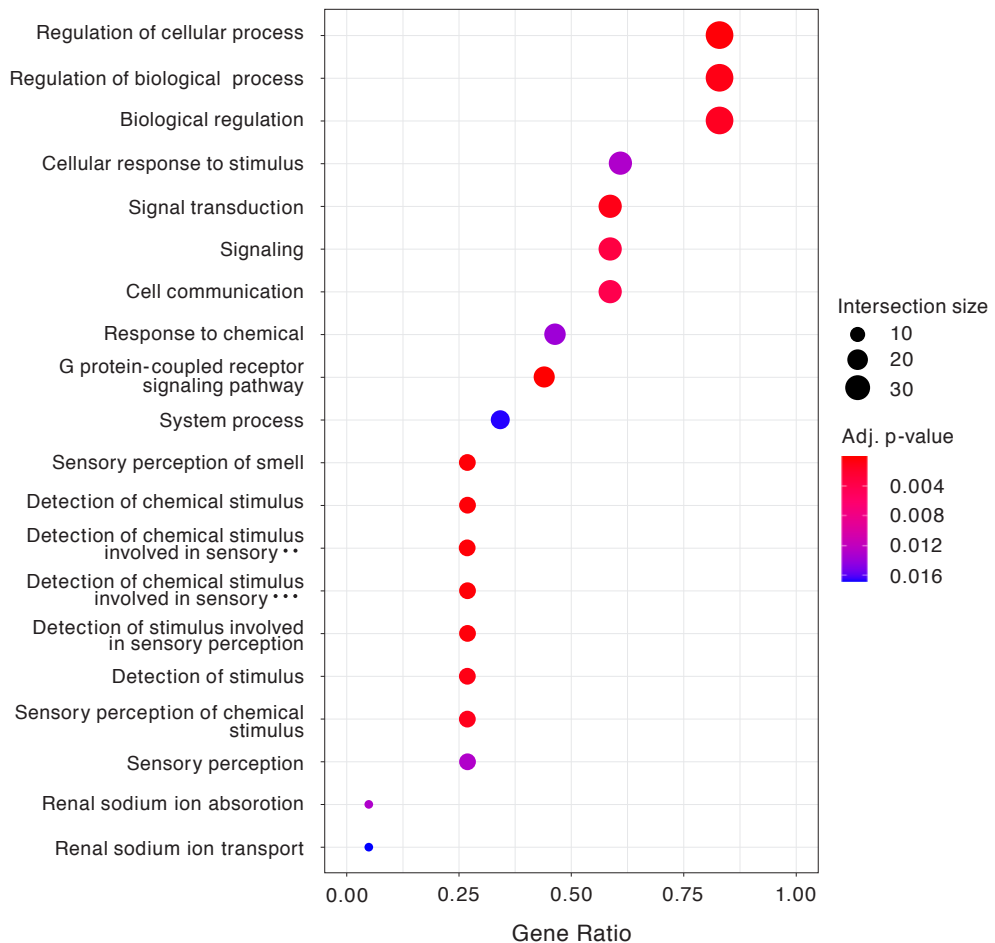


Fig. 4-b.

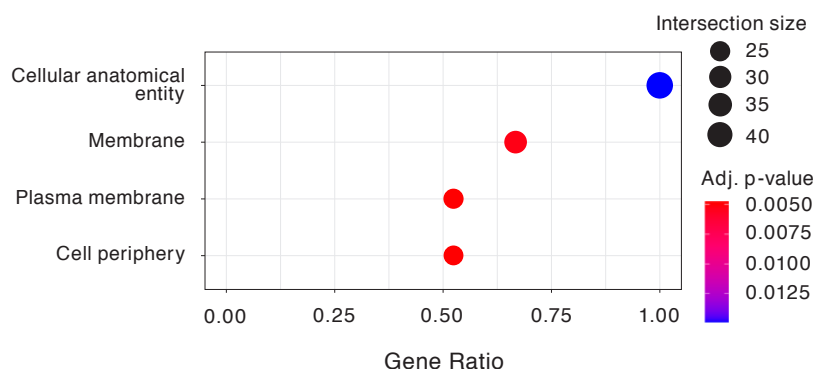


Fig. 4-c.

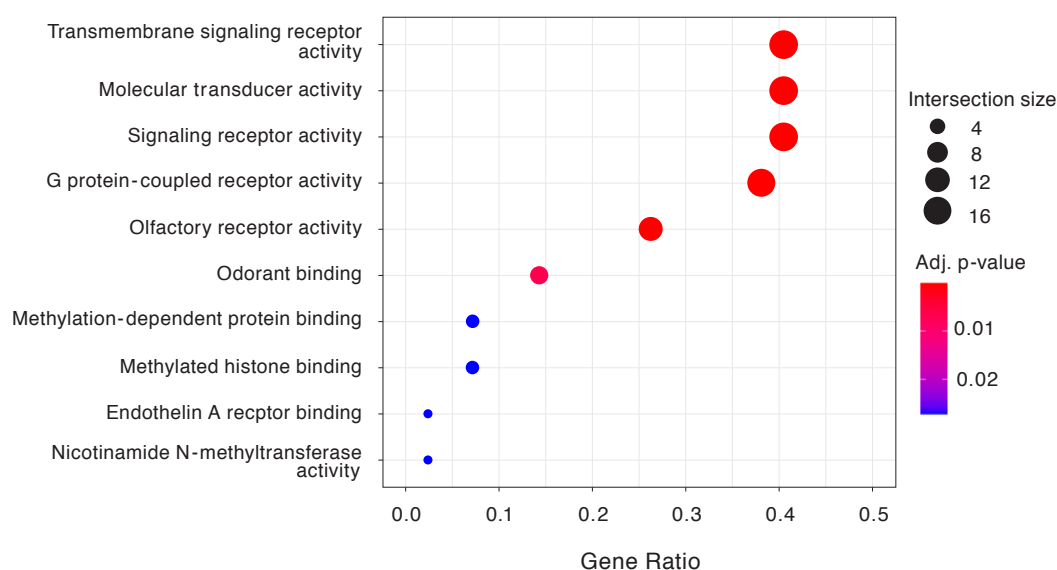


Fig. 4. Microarray GO functional analysis.

a) Biological process. b) Cellular component. c) Molecular function.

Results are expressed as Gene Ratio (intersection-size/query-size.). GO, gene ontology.

考察

グリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア）は、中枢神経系（CNS）の活動の補助、組織環境の整備、栄養補給、そして、Aβ クリアランスの観点から大切な役割を果たしている。グリア細胞が障害を受けるとCNSにも悪影響を及ぼす¹²⁾。グリア細胞に障害を惹起する因子として炎症、酸化ストレス、糖化ストレス¹³⁾が挙げられる。代謝ストレスという名称がしばしば使われてきたが、ほとんどの場合アルデヒド過剰が関与していることから、本論文では糖化ストレスとして扱う。これらの因子を軽減して、グリアプロテクションを目指すことは、中枢神経系の恒常性維持のために極めて重要である。

これまでに、多くの Aβ 除去療法が試みられたが、有害

事象が多く、成功した事例はない。セクレターゼ活性制御による Aβ 産生メカニズムの抑制、Aβ 凝集阻害によるアミロイド形成抑制、そして Aβ 除去を促進するアミロイド沈着の抑制を主たる薬効とする治療薬開発の実情である。孤発性アルツハイマー病患者においては Aβ クリアランス速度が有意に低下していることが示されており¹⁴⁾、Aβ の分解代謝経路の全容解明が待たれている。

Dahlgren KN らによれば、初期の *in vitro* 研究では、Aβ 誘発性神経毒性にはペプチドが線維状凝集状態をとることが必要であり、低用量の非凝集ペプチドは実際に神経栄養効果を示すと考えられていたという²⁾。彼らの検証では、オリゴマー Aβ-(1-42) はニューロンの生存率を著しく低下させるが、非凝集ペプチドは生存率への影響が少ない。非侵襲性 Aβ は低濃度 (1-100 nm) で神経栄養効果と高濃度

(1–15 μm)での神経毒性を発揮させる二相性反応を示した。凝集していないAβ-(1–40)は、20 μmでもニューロン生存率に有意な影響を及ぼさず、1 μm未満の濃度では、凝集していないAβ-(1–42)調製物と同様に神経栄養性であるように見えたという。

ミクログリアのAβ 貪食能の健康維持、低下した機能の回復、活性増進によるCNSへの支援は、認知症(特にアルツハイマー型認知症を念頭においた)の進展予防にも有効である可能性があり、新たな治療戦略が期待されている¹⁵⁻²¹⁾。メトホルミン^{16, 22)}、クルクミン^{23, 24)}やレスベラトロール^{23, 25)}は抗酸化機能だけでなく、抗糖化作用としてAGEs生成抑制活性を有する。グリアプロテクションにおいてもGSケアが重要であることを示唆する所見である。

一方、酸化と脂質負荷はミクログリアの機能低下を惹起する²⁶⁾。ミトコンドリア機能の回復もミクログリアAβ 貪食を回復させる²⁷⁾。酸化と脂質負荷によって、脂肪酸の酸化が惹起され、脂肪酸由来アルデヒド生成が亢進し、過剰状態に至る。GAPDHとALDHはアルデヒドを代謝する過程でNADを消費し、脂質負荷により亢進したβ酸化の過程でもNADが消費される。その結果、ミトコンドリア内TCAサイクルでNAD不足に陥り、ATP産生が減る、最終的にミクログリアの細胞機能が減弱すると予想される。

老人斑(アミロイド斑)にはMGOやAcroといったアルデヒド修飾蛋白の沈着が免疫染色により認められることから²⁸⁻³⁸⁾、糖化Aβの存在が強く疑われる。尿中のアルデヒド修飾蛋白は認知症評価指標になる可能性を指摘している³⁹⁾。

脂質に富む脳では、重要なタンパク質は、炭水化物由来のアルデヒド(GO [glyoxal], MGO, 3DG [3-deoxyglucosone], GA [glyceraldehyde])だけでなく、脂肪酸(FA)の酸化によって生成されるFA由来のアルデヒド(MGO、アクロ、MDA [マロンジアルデヒド]など)⁴⁰⁻⁴²⁾による二重の攻撃に対して脆弱である。

脂質の多い脳は、重要な蛋白質が糖質由来アルデヒド(GO、MGO、3DG、GA)だけでなく、脂肪酸の酸化によって生じる脂肪酸由来アルデヒド(MGO、Acro、MDA [malondialdehyde]など)⁴⁰⁻⁴²⁾によるダブルパンチ攻撃を受けやすい¹³⁾。

我々の先行研究では、MGOやAcro修飾Aβはミクログリアによる貪食が困難であることを報告した¹⁾。この結果は、糖化ストレスによるAβのアルデヒド修飾がAβクリアランスの低下原因になっている可能性を示唆している。その後の臨床研究⁴⁾では、間葉系幹細胞由来培養上清の点鼻投与が認知症患者の症状改善につながる可能性があることを報告した。その改善機序を探る目的で、本研究では、Aβクリアランス指標の一つであるミクログリアAβ 貪食能への作用を検証した。

幹細胞上清には様々な成長因子やEVが含まれている。HGFは肝臓や腎臓の再生、神経組織の保護を担う生理活性蛋白質である。肝細胞の最も強力な増殖因子として知ら

れ、肝臓以外の臓器でも産生されてる⁴³⁾。HGFは1 ng/mL以上の濃度で初代培養成熟ラット肝細胞の増殖を強力に促進する⁴⁴⁾。ヒト血清中のHGF濃度は、劇症肝炎患者で平均約10 ng/mLでと高値を示す。急性肝炎、肝硬変および肝癌では成人健常者(約0.2 ng/mL)の2–3倍の値を呈するものの、1 ng/mLを超えることは少ない。SCST-A × 200の培養液中HGF想定濃度(HGF: 0.5 ng/mL)が成人健常者の2–3倍である。今回の実験結果は、幹細胞上清の投与によりミクログリアAβ 貪食能が容量依存性に増加することが示された。幹細胞上清の鼻投与が、同様に作用してAβクリアランスの改善もしくは恒常性維持に貢献する可能性がある。

培養上清に含まれる成長因子が神経系細胞やグリア細胞の保護や活性化に寄与すると予想される。記憶機能に深く関与する海馬歯状回転の神経細胞は、高齢者においても分裂・増殖機能が保たれることから、これらの細胞機能の賦活化は認知症症状の改善に大きく寄与すると予想される。点鼻投与により脳実質組織内への程度有効成分がどの程度移行するか、今回の試験では明らかにしえなかったが、その点については今後の課題である。

Aβのミクログリアへの分子的影響 Molecular impacts of Aβ on microglia

Aβが実際にミクログリアに実際に取り込まれて、分子レベルで影響を及ぼしているか否かを検証するために、マイクロアレイによる遺伝子発現の変化を解析した。生物学的プロセス、細胞構成要素、分子機能の各カテゴリーで顕著な変動発現にみられた遺伝子が抽出された。Aβ添加がミクログリアの遺伝子発現に分子レベルで影響(衝撃)を与えたことが示された。今回の解析ではAβオリゴマー体を使用した、非凝集体Aβでは異なる結果が得られる可能性がある。個々の遺伝子の発現状態の変動については、Aβがグリアプロテクションに関与するか否か、今後時間をかけて解析を行う予定である。培養上清の影響がどの遺伝子に影響するかは、極めて興味深い問題である。

ミクログリアAβ 貪食能モデル

今回の研究ではミクログリアAβ 貪食の評価モデルを構築した。様々な試験物質の効能を他施設においても比較評価できるように、再現性を重視した。

実験モデルの作成にあたり、初代培養細胞と系統培養細胞株とどちらのミクログリアを使用するか検討した。前者はミクログリアとしての特性を高レベルで保持していると想定されるが、実験毎に動物より採取する必要があり、個体差や手技による差が生じる可能性がある。後者はミクログリアとしての特性を一部失っているが、実験における再現性が高いことが評価されている。長い期間をかけて複数回の実験を要し、多種類の比較因子について解析するモデルとして後者を選択した。

使用するAβの選択を行った。既報¹⁾で使用したTAMRA-Aβが生産中止になったことが原因である。蛍光標識の賦与、アルデヒド修飾やオリゴ体／フィブリル体作成による性状変化、初代培養ミクログリアと培養株との相性と細胞毒性について検討した。結果として、新規に合成したAβを用いた。経緯については別報で報告する。次にAβを標識する蛍光色素について、Polaric (コスモ・バイオ)とTAMRAを比較した。Aβに蛍光標識後、既報²⁾に従いオリゴメトリー体とフィブリル体を作成し、蛍光強度を評価した。その結果、蛍光強度変化が少なかったTAMRA-Aβを選択することにした。

計測方法については、共焦点レーザー顕微鏡を用いる方法とオールインワン蛍光顕微鏡とを比較した。前者は美しい写真撮影には適するが、別途画像解析を別装置で行う必要があり主義が煩雑であった。後者は、一定条件での撮影、写真ファイルの保存、画像解析に至るまでの過程が一つの機器で済み、手技は前者に比べ煩雑でない。これが、Aβ貪食能評価モデルに後者を選択した理由である。

結語

先行研究⁴⁾で認知症患者の機能改善が報告された間葉系幹細胞由来培養上清を用いて、ミクログリアAβ貪食能の評価を行った。その結果、培養上清添加により容量依存性に

Aβ貪食活性が上昇する可能性が示された。マイクロアレイ解析ではAβ貪食時に様々な遺伝子発現が惹起されていた。今後は、ミクログリアへの培養上清添加がグリアプロテクション有効か否かを検証し、どのような変化が遺伝子発現に生じるか解析を行う予定である。

研究助成

本研究を遂行するにあたり文部科学省科学研究助成費(科研費 23K10882)を受けた。

利益相反申告

特にない。

参考文献

- 1) Yonei Y, Taira T, Otaka S, et al. Amyloid β clearance and microglia: Effects of glycative stress and melatonin. *Glycative Stress Res.* 2022; 9: 135-145.
- 2) Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB Jr, et al. Oligomeric and fibrillar species of amyloid- β peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem.* 2002; 277: 32046-32053.
- 3) Yonei Y. Factors influencing microglia A β phagocytosis: Involvement of AGE degradation promoters and bacteria-derived EV. Issue #23K10882. 2023, April 13. (in Japanese) <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-23K10882/>
- 4) Morita Y, Izawa H, Ohga H, et al. Safety and clinical efficacy on intranasal administration of mesenchymal stem cell-derived secretome in patients with Alzheimer's disease and its future prospect. *Glycative Stress Res.* 2024; 11: 103-110.
- 5) Xie X, Song Q, Dai C, et al. Clinical safety and efficacy of allogenic human adipose mesenchymal stromal cells derived exosomes in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: A phase I/II clinical trial. *Gen Psychiatr.* 2023; 36(5): e101143.
- 6) Lofty A, AboQuella NM, Wang H. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials. *Stem Cell Res Ther.* 2023; 14: 66-83.
- 7) Goo J, Lee Y, Lee J, et al. Extracellular vesicles in therapeutics: A comprehensive review on applications, challenges, and clinical progress. *Pharmaceutics.* 2024; 16(3): 311.
- 8) 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.
- 9) Cosmo Bio Co. Ltd. Primary Microglia Culture Kit (SD rat), Code No. MGSD. Attachment. https://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/PMC_/MGSD.20181218.pdf Accessed at November 30, 2024. (in Japanese)
- 10) Sama P, Long TC, Hester S, et al. The cellular and genomic response of an immortalized microglia cell line (BV2) to concentrated ambient particulate matter. *Inhal Toxicol.* 2007; 19: 1079-1087.
- 11) Moniruzzaman M, Lee G, Bose S, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of N-((3,4-dihydro-2H-benzo[h]chromene-2-yl)methyl)-4-methoxyaniline in LPS-induced BV2 microglial cells. *Biol Pharm Bull.* 2015; 38: 1831-1835.

- 12) Quincozes-Santos A, Santos CL, de Souza Almeida RR, et al. Gliotoxicity and glioprotection: The dual role of glial cells. *Mol Neurobiol.* 2021; 58: 6577-6592.
- 13) Yonei Y, Yagi M, Sato K, et al. Glycative stress: Molecular impacts and defense mechanisms. *Glycative Stress Res.* 2023; 10: 145-158.
- 14) Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, et al. Decreased clearance of CNS β -amyloid in Alzheimer's disease. *Science.* 2010; 330(6012): 1774.
- 15) Kim H, Le B, Goshi N, et al. Primary cortical cell tri-culture to study effects of amyloid- β on microglia function and neuroinflammatory response. *J Alzheimers Dis.* 2024; 13872877241291142.
- 16) Guo X, Zhang B, Chen Y, et al. Multifunctional mesoporous nanoselenium delivery of metformin breaks the vicious cycle of neuroinflammation and ROS, promotes microglia regulation and alleviates Alzheimer's disease. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2024; 245: 114300. doi: 10.1016/j.colsurfb.2024.114300.
- 17) Feng Q, Zhang X, Zhao X, et al. Intranasal delivery of pure nanodrug loaded liposomes for Alzheimer's disease treatment by efficiently regulating microglial polarization. *Small.* 2024; e2405781.
- 18) Jiang M, Zhao D, Zhou Y, et al. Cathepsin B modulates microglial migration and phagocytosis of amyloid β in Alzheimer's disease through PI3K-Akt signaling. *Neuropsychopharmacology.* 2024 Sep 20.
- 19) Aerbajinai W, Zhu J, Chin K, et al. Glia maturation factor- γ regulates amyloid- β 42 phagocytosis through scavenger receptor AI in murine macrophages. *J Leukoc Biol.* 2024; qiaei197. doi: 10.1093/jleuko/qiaei197.
- 20) Piccioni G, Maisto N, d'Ettorre A, et al. Switch to phagocytic microglia by CSFR1 inhibition drives amyloid- β clearance from glutamatergic terminals rescuing LTP in acute hippocampal slices. *Transl Psychiatry.* 2024; 14: 338.
- 21) Aljohani NB, Qusti SY, Alsiny M, et al. Carboxymethylcellulose encapsulated fingolimod, siRNA @ZnO hybrid nanocomposite as a new anti-Alzheimer's material. *RSC Adv.* 2024; 14: 22044-22055.
- 22) Kiho T, Kato M, Usui S, et al. Effect of buformin and metformin on formation of advanced glycation end products by methylglyoxal. *Clin Chim Acta.* 2005; 358: 139-145.
- 23) Banaszak M, Górna I, Woźniak D, et al. The impact of curcumin, resveratrol, and cinnamon on modulating oxidative stress and antioxidant activity in type 2 diabetes: Moving beyond an anti-hyperglycaemic evaluation. *Antioxidants (Basel).* 2024; 13: 510.
- 24) Abbas W, Alam Khan R, Tasawar Baig M, et al. Effect of *Curcuma longa* on glycemia, neuropathic sensation and advanced glycation end product in diabetic patients. *Pak J Pharm Sci.* 2022; 35: 873-878.
- 25) Huang CY, Chen SH, Lin T, et al. Resveratrol attenuates advanced glycation end product-induced senescence and inflammation in human gingival fibroblasts. *J Dent Sci.* 2024; 19: 580-586.
- 26) Lin D, Gold A, Kaye S, et al. Arachidonic acid mobilization and peroxidation promote microglial dysfunction in A β pathology. *J Neurosci.* 2024; 44: e0202242024.
- 27) Tang Y, Wang Y, Gao Z, et al. sAPP α peptide promotes damaged microglia to clear Alzheimer's amyloid- β via restoring mitochondrial function. *Chemistry.* 2024; 30: e020400870.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) Beeri MS, Moshier E, Schmeidler J, et al. Serum concentration of an inflammatory glycotxin, methylglyoxal, is associated with increased cognitive decline in elderly individuals. *Mech Ageing Dev.* 2011; 132: 583-587.
- 31) Angeloni C, Zamboni L, Hrelia S. Role of methylglyoxal in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 238485.
- 32) 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.
- 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) 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.
- 35) Igarashi K, Yoshida M, Waragai M, et al. Evaluation of dementia by acrolein, amyloid- β and creatinine. *Clin Chim Acta.* 2015; 450: 56-63.
- 36) Tsou HH, Hsu WC, Fuh JL, et al. Alterations in acrolein metabolism contribute to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2018; 61: 571-580.
- 37) 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.
- 38) Chen C, Lu J, Peng W, et al. Acrolein, an endogenous aldehyde induces Alzheimer's disease-like pathologies in mice: A new sporadic AD animal model. *Pharmacol Res.* 2022; 175: 106003.
- 39) Yoshida M, Uemura T, Mizoi M, et al. Urinary amino acid-conjugated acrolein and taurine as new biomarkers for detection of dementia. *J Alzheimers Dis.* 2023; 92: 361-369.
- 40) Araujo LCC, Bordin S, Carvalho CRO. Reference gene and protein expression levels in two different NAFLD mouse models. *Gastroenterol Res Pract.* 2020; 2020: 1093235.
- 41) Fan X, Yao, H, Liu X, et al. High-fat diet alters the expression of reference genes in male mice. *Front Nutr.* 2020; 7: 589771.
- 42) Sato K, Zheng Y, Martin-Morales A, et al. Generation of short chain aldehydes and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). *Glycative Stress Res.* 2022; 9: 129-134.
- 43) Gohda E. Function and regulation of production of hepatocyte growth factor (HGF). *Folia Pharmacol Jpn.* 2002; 119: 287-294. (in Japanese)
- 44) Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H, et al. Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. *J Clin Invest.* 1988; 81: 414-419.