

## 二国間交流事業 共同研究報告書

令和5年4月1日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[日本側代表者所属機関・部局]  
国立研究開発法人国立循環器病研究センター  
[職・氏名]  
脳神経内科医長・服部頼都  
[課題番号]  
JPJSBP 120209939

1. 事業名 相手国: 米国 (振興会対応機関: OP) との共同研究

2. 研究課題名

(和文) 血管性認知症の発症・重症化における脳傍血管マクロファージの関与の解明

(英文) Association between the Deleterious Influence of Brain Perivascular Macrophages and Exacerbation of Vascular Cognitive Impairment

3. 共同研究実施期間 2020年4月1日～2023年3月31日 (3年0ヶ月)【延長前】 2020年4月1日～2022年3月31日 (2年0ヶ月)

4. 相手国側代表者(所属機関名・職名・氏名【全て英文】)

Feil Family Brain and Mind Research Institute, Weill Cornell  
Medicine, Director, Costantino Iadecola

5. 委託費総額(返還額を除く)

本事業により執行した委託費総額		3,589,860 円
内訳	1年度目執行経費	1,689,860 円
	2年度目執行経費	1,900,000 円
	3年度目執行経費	- 円

6. 共同研究実施期間を通じた参加者数(代表者を含む)

日本側参加者等	5名
相手国側参加者等	6名

\* 参加者リスト(様式 B1(1))に表示される合計数を転記してください(途中で不参加となった方も含め、全ての期間で参加した通算の参加者数となります)。

7. 派遣・受入実績

	派遣		受入
	相手国	第三国	
1年度目	-	-	-()
2年度目	-	-	-()
3年度目	2	-	-()

\* 派遣・受入実績(様式 B1(3))に表示される合計数を転記してください。

派遣:委託費を使用した日本側参加者等の相手国及び相手国以外への渡航実績(延べ人数)。

受入:相手国側参加者等の来日実績(延べ人数)。カッコ内は委託費で滞在費等を負担した内数。

## 8. 研究交流の概要・成果等

### (1)研究交流概要(全期間を通じた研究交流の目的・実施状況)

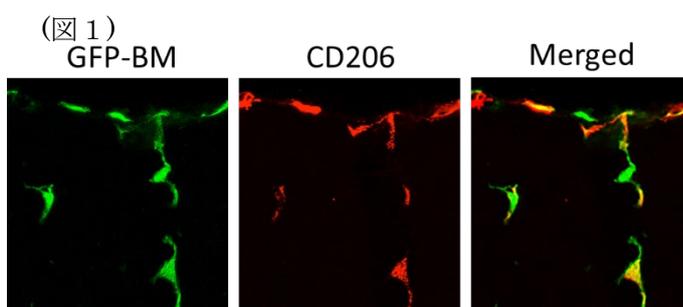
アポリポrotein E4 (APOE4) 遺伝子はアルツハイマー病、動脈硬化の危険因子と言われており、(Corder *et al. Science*. 1993; Mahley *et al. J Lipid Res*. 2009)、脳 MRI-T2 強調画像・FLAIR 画像における大脳白質高信号域と関連しているとも言われている(Rojas *et al. J Cereb Blood Flow Metab*. 2018; Schilling *et al. Neurology*. 2013)。しかし、APOE4 が VCI の危険因子であることは依然結論を得ていないため、世界中で議論的であった(Iadecola. *Neuron*. 2013)。そこで、基礎研究の手法を用いて、日本側代表参加者の服部と相手国研究者の Prof. Iadecola, Dr. Park が中心となって、APOE4 が VCI の重症化に関与しているかどうかを検証したところ、APOE4 が酸化ストレス高発現を介して、脳血管内皮障害、neurovascular uncoupling、つまり、neurovascular dysfunction を来し、その結果、大脳白質の脳血流を減少させ、大脳白質が病態の首座である VCI の発症・重症化に大きな役割を果たしていることを見出した(Koizumi\*, Hattori\* *et al. Nat Commun*. 2018:\*, equal contribution)。

そこで、本事業で分子病態機序を詳細に解明することに努めた。APOE4 が酸化ストレスを高発現し、脳血管内皮・neurovascular coupling に機能障害を来していることから、脳傍血管マクロファージ(PVM)に注目した。PVM は神経発達初期に卵形囊から発生し脳へ遊走する骨髄由来の細胞であり、脳の恒常性維持や種々の脳疾患のメカニズムにおいて重要な役割を果たしている(Herz *et al. Immunity*. 2017; Prinz *et al. Nat Immunol*. 2017)。アルツハイマー病において、アミロイドβがPVM上のNox2含有NADPHオキシダーゼを介して血管への酸化ストレスを惹起し、血管内皮機能障害、神経活動障害を引き起こす(Iadecola. *Nat Rev*. 2004; Park *et al. Circ Res*. 2017)。脳血管障害の代表的な危険因子の高血圧では、アンジオテンシン2がPVM上のアンジオテンシン1受容体を介してNox2を活性化して酸化ストレスを産生し、血管内皮機能障害と惹起して脳循環障害を引き起こす。感染症の水胞性口炎ウイルス(Vesicular Stomatitis Virus: VSV)やヒト免疫不全ウイルス(HIV)脳炎では、PVMによって好中球、単球の脳内遊走を促進する(Steel *et al. J Neuroimmunol*. 2010; Williams *et al. Ann Rev Neurosci*. 2002)。免疫疾患の一つである多発性硬化症においては、活動期にPVM数が増加して抗原提示細胞として機能する(Polglot *et al. J Neuroimmunol*. 2002)。このように、PVMは虚血性・炎症性・変性性脳疾患のキープレイヤーとして注目されている。

COVID-19の蔓延のため、2023年2月まで日本側研究者が相手国へ訪問することができなかった。このため、相手国研究者とオンライン会議で綿密に議論しながら、まずは相手国で施行可能な実験を始め、その後、日本側研究者が相手国へ渡航しなければできなかったことについては、オンライン会議で日本側から綿密に指導し、実験手技の共有を行うことに成功した。

### 【骨髄移植による傍血管マクロファージ(PVM: perivascular macrophage)の定着と除去の予備実験】

まず、レシピエント(7週齢の雄性C57BL/6Jマウス)に放射線照射を行い、18時間後に、ドナー由来の骨髄( $2 \times 10^6$ 細胞)を眼窩静脈叢へ静注し、レシピエントへドナー由来のPVMが移植されているかを確認した。確認のために、GFPトランスジェニックマウスをドナーに用い、レシピエントにGFP陽性PVM移植を試みた。移植5週後に



レシピエントの脳組織に抗 CD206 抗体 (PVM のマーカー) を用いた免疫蛍光染色を行うと、図 1 のように、レシピエントの大脳皮質に GFP 陽性細胞と CD206 陽性 PVM が二重染色されており、レシピエントの脳に確かにドナー由来 PVM が定着していることが確認できた。

次に、PVM の阻害実験を行う準備として、PVM を貪食するクロドロネートリポソームを脳室内投与し、PVM が貪食されるかどうかを確認した。10 $\mu$ L クロドロネートリポソーム (7 mg/mL) を脳室内に投与し、5~7 日後に脳組織の抗 CD206 抗体の免疫蛍光染色を施行した。野生型 (WT マウス) と *APOE4*-targeted replacement (TR) マウスの双方を用いた。図 2 のように、PBS 脳室内投与では PVM の貪食は認めないが、クロドロネートリポソームの脳室内投与で確かに PVM が十分に貪食されていることを確認できた (n=5/group)。

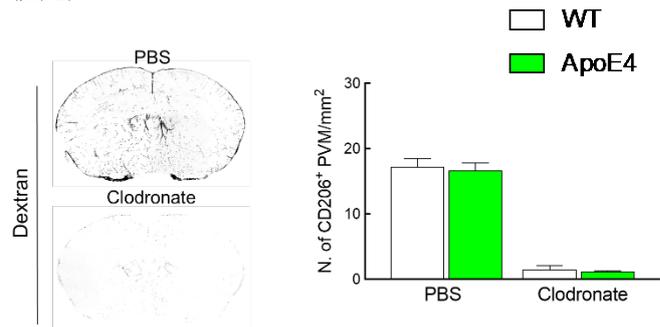
#### 【脳血管反応性試験】

研究代表者の服部は、筆頭著者として *APOE4*-TR マウスは、WT マウスや *APOE3*-TR マウスと比較して、酸化ストレス高発現のため、脳血管反応性、とりわけ、whisker stimulation による functional hyperemia やアセチルコリンを脳表灌流することによる血管内皮由来脳血管拡張の反応性が低下していることを報告した (Koizumi\*, Hattori\* *et al. Nat Commun.* 2018. \*: Equal contribution)。この実験を、*APOE4*-TR 由来 PVM 陽性レシピエント (レシピエントは WT マウス)、PVM 除去後の *ApoE4*-TR マウスを用いて脳血管反応性を確認した。図 3 のように、*APOE4*-TR 由来 PVM 陽性レシピエントの whisker stimulation とアセチルコリン脳表灌流において、*APOE4*-TR マウスと同様に脳血管反応性は低下を認めた (n=5/group)。一方、クロドロネートリポソーム脳室内投与後の脳血管反応性実験においては、PVM を除去することで、*APOE4*-TR マウスの脳血管反応性障害は、WT マウスと同様の結果となり救済された (図 4)。

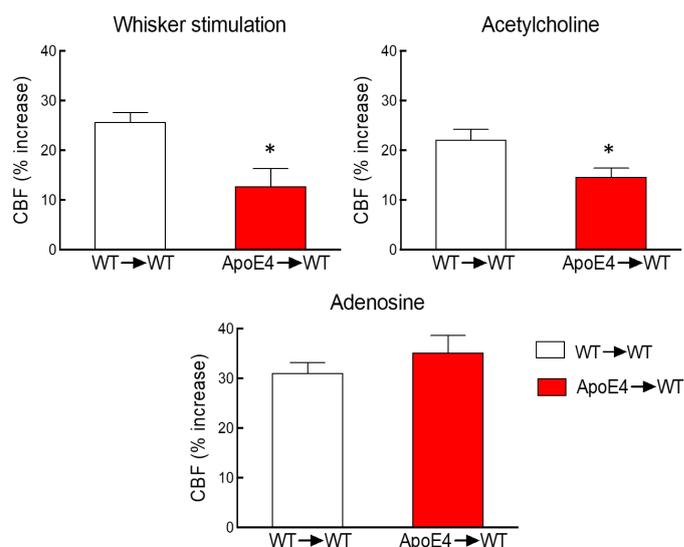
#### 【PVM による酸化ストレス発現の検証】

WT マウスに、リコンビナント(r)APOE3、APOE4 を脳表灌流し、2 光子顕微鏡で酸化ストレス (dihydroethidium: DHE) の局在を確認した。DHE は rAPOE4 を脳表灌流したときのみ発現し、PVM と共局在していた (図 5)。

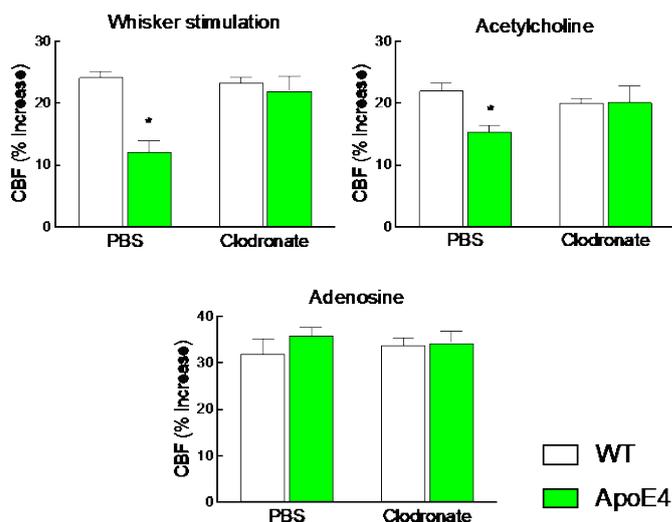
(図 2)



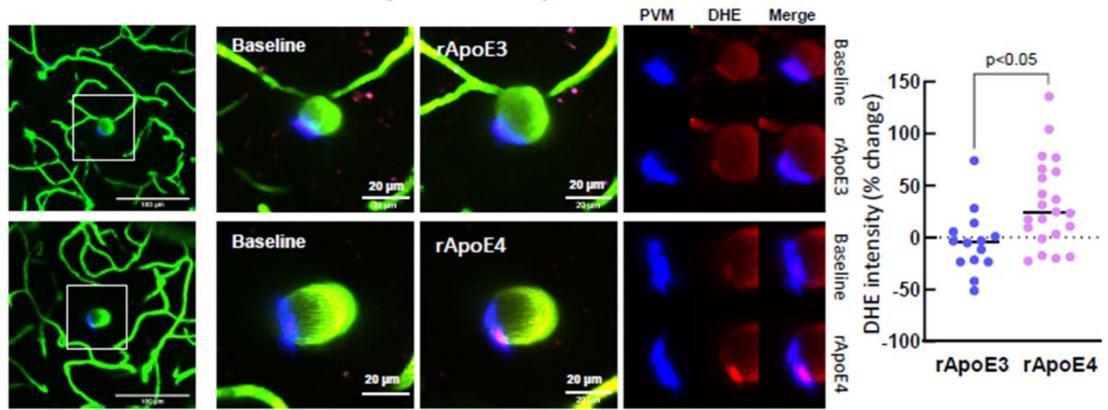
(図 3)



(図 4)



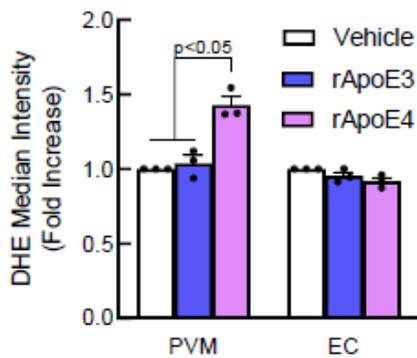
(図 5)



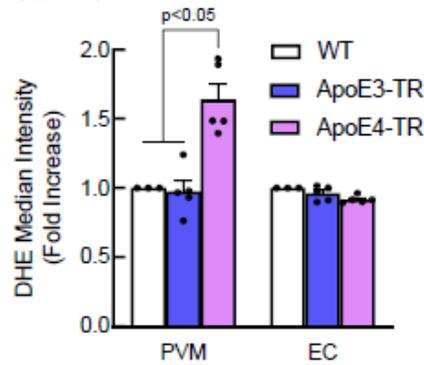
- Dihydroethidium (DHE) intensity before & after rApoE3 or rApoE4

さらに FACS で PVM と血管内皮細胞 (EC) を用いて DHE の定量を行ったところ、図 5 と同様に、rAPOE4 を脳表灌流されたマウスで PVM における DHE intensity が有意に増加していた。EC では差を認めなかった(図 6A)。また、WT、APOE3-TR、APOE4-TR マウスにおいて同様に確認したところ、APOE4-TR マウスの PVM において DHE が有意に増加した(図 6B)。この結果からみても、血管周囲の酸化ストレスの発生源は、EC ではなく PVM であることが判明した(図 6)。

(図 6A)



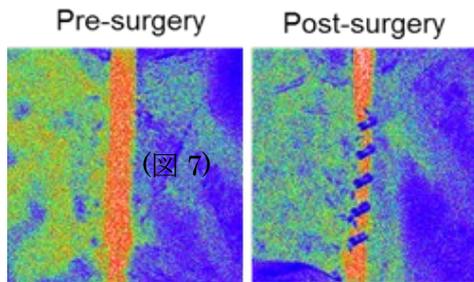
(図 6B)



【VCI モデルマウスにおける PVM の影響の検証】

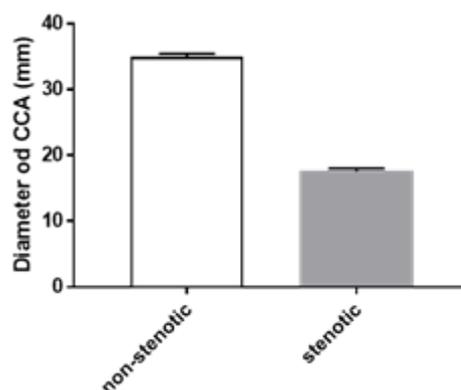
慢性脳低灌流モデルマウス(BCAS: bilateral common carotid artery stenosis)は、世界で最も頻用されている VCI モデルである(Shibata *et al. Stroke*. 2004)。内径 0.18 mm の金属コイルを両側頸動脈に装着することで、両側総頸動脈狭窄から慢性脳低灌流を惹起する(図 7、8)。このモデルを用いて、APOE4 陽性 PVM マウスの認知機能の変化を確認することとした。

(図 7)



レーザースペックル脳血流計による総頸動脈の BCAS 術前術後の画像。

(図 8)



総頸動脈の BCAS 術前術後の直径。BCAS 後は術前の約 50% 狭窄を示した。

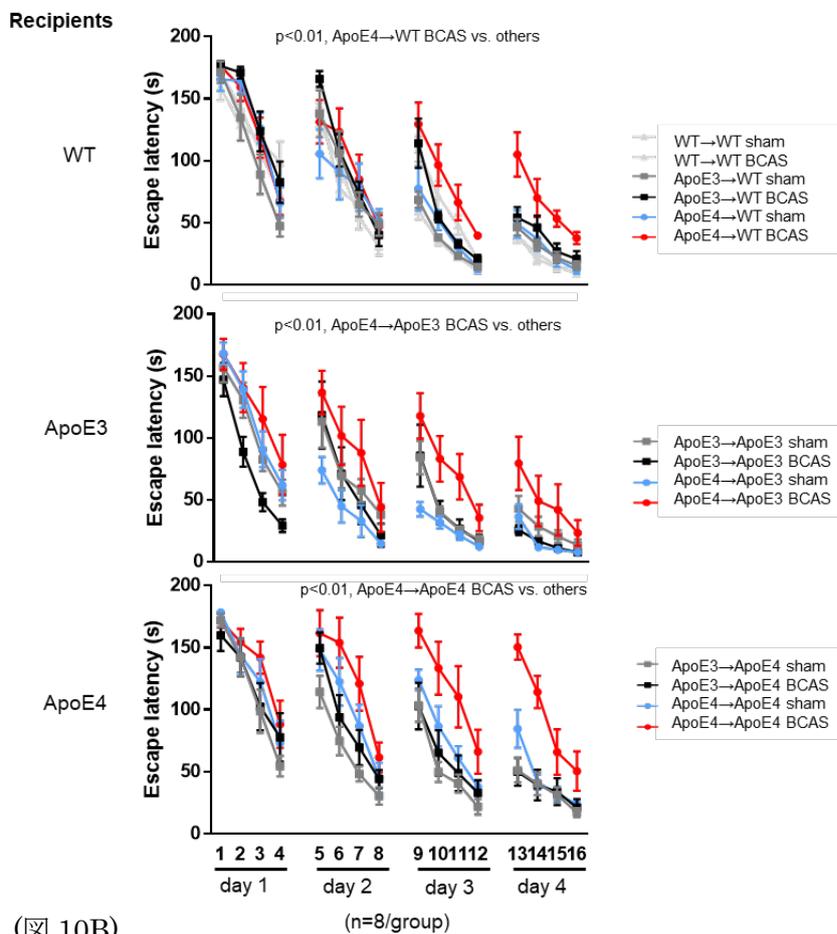
野生型 (WT)、*APOE3*-TR、*APOE4*-TR をドナー、レシピエントとして骨髄移植を行い (図 9)、WT もしくは *APOE3*-TR をコントロールとした。各群で BCAS を施行して、認知機能変化、大脳白質の病理学的検索、脳血流変化を探索した。移植される perivascular macrophage の数は、WT、*APOE3*-TR、*APOE4*-TR のいずれがレシピエントであっても受容能力に差は認めなかった。

(図 9)



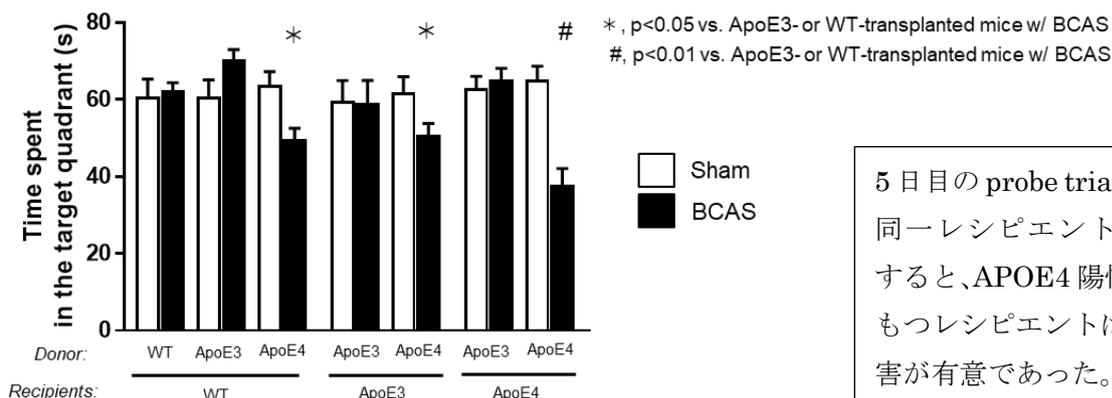
これらのマウスを用いて網羅的に認知機能の変化を確認した。Barnes 迷路試験で参照記憶は、*APOE4* 陽性 PVM を持つレシピエントで有意に障害されていた (図 10A, B)。

(図 10A)



Barnes 迷路試験による参照記憶検査。1日目から4日目までの acquisition phase において同一レシピエント間で比較すると、*APOE4* 陽性 PVM をもつレシピエントは、記憶障害が有意であった。

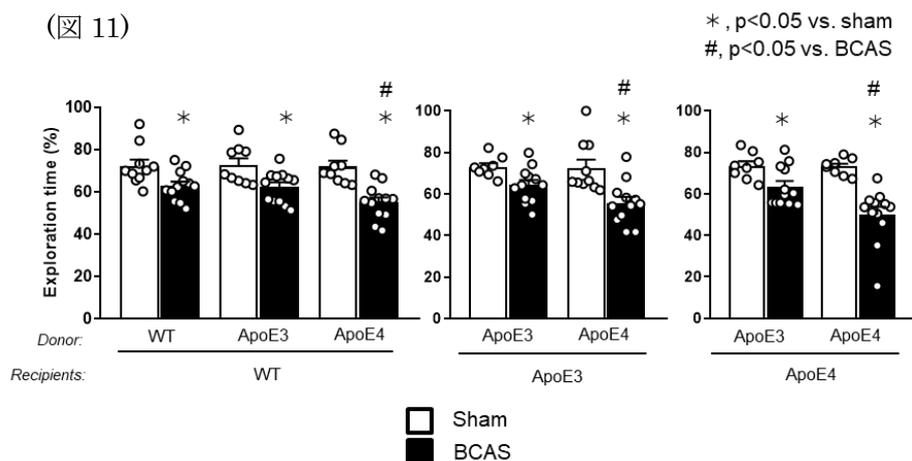
(図 10B)



5日目の probe trial において同一レシピエント間で比較すると、*APOE4* 陽性 PVM をもつレシピエントは、記憶障害が有意であった。

さらに、nobel object recognition 試験を用いた参照記憶の検討も行った。Barns 迷路試験と同様に、APOE4 陽性 PVM を持つレシピエントで有意に記憶が障害されていた (図 11)。

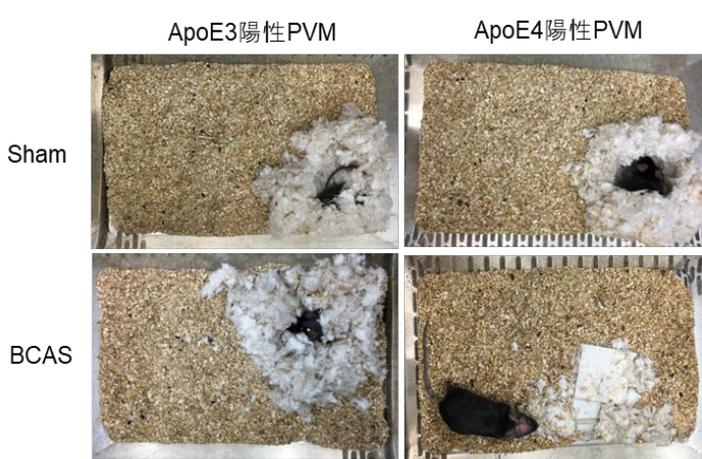
(図 11)



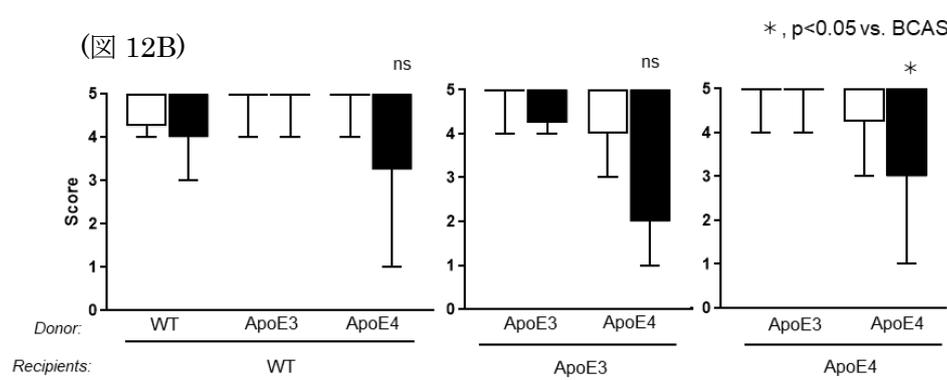
nobel object recognition 試験で、APOE4 陽性 PVM をもつレシピエントは、記憶障害が有意であった。

マウスの生活の質を評価する手法として、(図 12A) 巣作り行動 (nesting test) がある。アルツハイマー病モデルマウスでは、生活の質を向上させるための巣作り能力が低下しており、幸福な生活を維持できる能力が低いと考えられている。本研究でも nesting test を施行した。各マウスケージに 5g の正方形の nestlet を置き、12 時間後の巣つくりの様子を確認した (Deacon. *Nat Protocol*. 2006)。図 12、13 のように、AAPOE4 陽性 PVM をもつレシピエントにおいて、巣作り行動は低下している傾向があり、APOE4 陽性 PVM をもつ *APOE4*TR レシピエントでは、有意に巣つくり行動が障害されており、生活の質の極度の低下を示唆した。

(図 12A)



(図 12B)



nesting test スコアによる各レシピエントの比較である。APOE4 陽性 PVM をもつレシピエントにおいて、巣作り行動は低下している傾向があり、APOE4 陽性 PVM をもつ *APOE4*TR レシピエントでは、有意に巣つくり行動が障害されていた。

本研究の結果について、現在論文作成中であり、2023 年 6 月の Brain 2023 and Brain PET 2023 で発表予定である。

(2)学術的価値(本研究交流により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)

前述のごとく、*APOE4*はアルツハイマー病の感受性遺伝子であり、神経変性の進行に関連していると考えられ

ていた。しかし、われわれは *APOE4*-TR マウスを用いて、病前から *APOE4* が脳血管周囲の酸化ストレス高発現を介して、neurovascular dysfunction を来していることを明らかにした。つまり、*APOE4* は、神経変性ではなく、脳血管障害がトリガーとなって認知症発症/重症化へ寄与することを明らかにした。しかしながら、*APOE4* は遺伝子多型のため治療標的とすることは困難である。このため、酸化ストレス発生に関与する PVM に注目した。基礎研究レベルでは、クロドロネートリポソームの脳室内(髄腔内)投与で PVM の阻害が可能であり、将来的なヒトへの介入が潜在的に存在する。

### (3)相手国との交流(両国の研究者が協力して学术交流することによって得られた成果)

相手国研究代表者 Prof. Iadecola は、PVM 研究の大家であり、これまで認知症、脳循環障害と PVM の関わりを解明してきた (Faraco *et al. J Clin Invest.* 2016; Park *et al. Circ Res.* 2017; Faraco *et al. J Mol Med.* 2017)。このため、*APOE4* による VCI の重症化メカニズムの探求において、相手国研究者グループとの連携は欠かせない。日本側研究代表者の服部は、他の日本側参加者の猪原、眞木、殿村も、BCAS モデルを用いた認知症発症・重症化における脳循環障害との関連の解明について研究しており、服部が中心となって相手国研究者との議論に参加し、この議論が双方の研究の推進力となった。

このように、相手国参加者と日本側参加者のそれぞれの専門的知識を融合させ、上記の結果を得ることができた。現在、本研究の結果を含めた論文を作成中である。また、日本側参加者の国立循環器病研究センターの若手医師の野田は、2023 年 2 月に米国で開催された International Stroke Conference で研究発表し、将来的な留学も含めて、学会会場で相手国参加者と現在の研究の打ち合わせ・議論に参加し、今後も相手国参加者との共同研究も継続することで合意した。

### (4)社会的貢献(社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の社会的貢献はどのようにあったか)

厚生労働省は、認知症患者数は 2012 年の時点で 450 万人を超え、2025 年ころには約 720 万人に達すると推計として発表しており、この認知症患者数の増加に対して、高齢者の健康寿命の延伸を目指して取り組む必要がある。しかし、現状、認知症に対する疾患修飾薬は、アデュカヌマブが米国で条件付き承認が得られているのみである。これは、認知症患者の大部分を占める老年期認知症はアルツハイマー病理と脳血管病理(脳梗塞、脳出血、小血管病、アミロイド血管症)を併せ持つ混合型認知症と考えられており (Iadecola, *Neuron* 2013; Toledo *et al, Brain* 2013)、認知症を制圧するためにはアミロイド仮説に基づいたアミロイド産生減少のみならず「血管病への介入」が非常に重要となる (Snyder *et al, Alzheimers Dement* 2014)。本研究で、血管病への介入方法を提案することができた。近い将来、PVM を標的とする治療法を用いて、日本と米国との共同で橋渡し研究、そして、治験にまでもっていくことを目標としたい。

### (5)若手研究者養成への貢献(若手研究者養成への取組、成果)

COVID-19 の蔓延のため、若手研究者養成について満足な取り組みはできなかった。しかしながら、2023 年に入り、COVID-19 が弱毒化してきたことも判明し、国立循環器病研究センターにおいて海外渡航が許可されるようになった。このため、国立循環器病研究センターの若手研究者の野田は、International Stroke Conference 開催のために渡米し、将来的な Weill Cornell Medicine への留学を含めて、現在の研究についての相手国参加者との打ち合わせに参加した。さらに、野田が留学した際に施行可能な研究についての議論も行い、野田がポスドクとして相手国側へ留学し、われわれとの将来の共同研究も継続して行うこととなった。

(6)将来発展可能性(本事業を実施したことにより、今後どの様な発展の可能性が認められるか)

上記のごとく、日本側研究者グループ若手研究者の野田が相手国側の Weill Cornell Medicine へ留学することも含め、継続的な認知症共同研究を行っていく予定となった。

(7)その他(上記(2)～(6)以外に得られた成果があれば記載してください)

例:大学間協定の締結、他事業への展開、受賞など

2020年:日本認知症学会学会賞