

京都大学	博士（薬学）	氏名	池口 詩織
------	--------	----	-------

論文題目	アミロイドβタンパク質による海馬神経新生抑制機構およびその制御に関する研究		
------	---------------------------------------	--	--

(論文内容の要旨)

アルツハイマー病 (AD) は脳内炎症や神経細胞死など進行性の症状を特徴とする神経変性疾患であり、患者数は全世界で推定三千万人に上るにもかかわらず未だ根本的な治療薬が存在しない疾患である。ADの代表的な症状として認知機能障害がある。AD患者において記憶の形成や獲得に重要な海馬歯状回における神経新生の異常が観察されることから海馬神経新生の異常は認知機能の低下に関与し、これを回復させることが認知機能障害に対する治療に繋がると考えられる。また、ADの病理学的特徴である老人斑の主要構成成分であるアミロイドβタンパク質 (Aβ) は神経新生を抑制することが報告されているが、その詳細は不明である。本研究では成体マウスの海馬におけるAβの神経新生障害メカニズムの解明、また神経新生障害を抑制する候補化合物として、腸内において抗炎症作用をもつ腸内細菌由来の脂肪酸に着目して検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章 Aβによる海馬神経新生抑制メカニズムの解析

Aβが海馬における神経新生に与える影響について、詳細は未だ明らかとなっていない。そこで、成体マウスの海馬におけるAβの神経新生障害作用およびそのメカニズムについて検討した。野生型と比較して高い凝集能と強い細胞毒性をもつE22P-Aβ42をマウス側脳室に投与したところ、海馬歯状回における神経幹細胞数が増加する一方で、新生幼若ニューロン数および新生成熟ニューロン数の有意な減少が観察された。また、E22P-Aβ42の投与によりミクログリアのマーカーであるIba1陽性細胞の増加が認められた。ミクログリアは脳内の免疫担当細胞であり、老人斑の周囲で活性化していることが報告されている。そこで、ミクログリアの活性化に着目しAβによる神経新生障害のメカニズムについて検討したところ、ミクログリア活性化抑制薬であるミノサイクリンの腹腔内への投与によりAβ投与後に見られた神経幹細胞の増殖や幼若ニューロン数の減少が抑制された。以上の結果より、Aβは成体マウスの海馬歯状回において、ミクログリア活性化を介して神経幹細胞を増殖させニューロンへの分化を抑制することが示唆された。

第二章 腸内細菌産生脂肪酸による培養ミクログリア活性化抑制作用メカニズムの解析

Aβによるミクログリアの活性化を抑制することで神経新生抑制を回復できることが示唆されたため、ミクログリア活性化抑制物質の探索を行った。10-Oxo-trans-11-octadecenoic acid (KetoC) および10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (HYA) は腸

内細菌により産生される脂肪酸の一種であり、消化管内において腸管バリア機能制御、腸管免疫制御機能、炎症抑制作用など免疫に対して重要な働きをもつことが報告されているが、脳内における作用についての報告はない。そこでミクログリアの活性化抑制物質として上記の脂肪酸に着目し、マウスミクログリア細胞株を用いて両脂肪酸のミクログリア活性化に対する作用及び作用機序を検討した。LPSによる一酸化窒素（NO）産生をミクログリア活性化の指標とし、KetoCおよびHYAの作用を検討したところ、両脂肪酸はLPS誘発NO産生を抑制すると共に誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）のmRNA発現並びにタンパク質発現を抑制した。さらに、KetoCおよびHYAはLPS誘発のERKのリン酸化を有意に抑制したが、NF- κ Bの活性化、PPAR α ・ γ およびMAPK であるp38、JNKの活性化に対して影響を与えなかった。以上の結果より、KetoCおよびHYAはERKのリン酸化を抑制することでミクログリアの活性化を抑制することが示唆された。

第三章 A β による成体マウス海馬神経新生抑制に対する腸内細菌産生脂肪酸の作用解析

腸内細菌産生脂肪酸であるKetoCにミクログリア活性化抑制作用があることが明らかになったため、成体マウスの海馬歯状回におけるA β 誘発ミクログリア活性化や神経新生障害に与えるKetoCの影響について検討した。マウス側脳室へのE22 P-A β 42の投与によりIba1陽性のミクログリア細胞数が増加したが、KetoCの投与によりその数が有意に減少した。さらにKetoCは、A β 誘発の神経幹細胞増殖、新生幼若ニューロン数の減少及び新生成熟ニューロン数の減少を有意に抑制した。以上の結果より、KetoCは脳内においてミクログリアの活性化を抑制することにより、A β により惹起される新生幼若ニューロンや新生成熟ニューロン数の減少を抑制することが示唆された。

以上、本研究ではA β が成体マウスの海馬歯状回においてミクログリア活性化を介して神経幹細胞の増殖を亢進する一方、ニューロンへの分化を抑制することを明らかにした。また、腸内細菌産生脂肪酸であるKetoCおよびHYAのミクログリア活性化抑制作用にERKのリン酸化抑制が重要であることを明らかにし、KetoCは成体マウスの海馬においてもミクログリアの活性化を抑制することで、神経新生を正常化させることを明らかにした。本研究の成果は、神経新生の異常が認知機能障害の一因であると考えられるADにおいて、A β 誘発ミクログリア活性化抑制が新規治療標的となり得ること、さらに腸内細菌産生脂肪酸の中枢における有用性を示唆するものである。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

アルツハイマー病 (AD) は脳内炎症や神経細胞死など進行性の症状を特徴とする神経変性疾患であり、患者数は全世界で推定三千万人に上るにもかかわらず未だ根本的な治療薬が存在しない疾患である。ADの代表的な症状として認知機能障害がある。AD患者において記憶の形成や獲得に重要な海馬歯状回における神経新生の異常が観察されることから海馬神経新生の異常は認知機能の低下に関与し、これを回復させることが認知機能障害に対する治療に繋がると考えられる。また、ADの病理学的特徴である老人斑の主要構成成分であるアミロイドβタンパク質 (Aβ) は神経新生を抑制することが報告されているが、その詳細は不明である。本研究では成体マウスの海馬におけるAβの神経新生障害メカニズムの解明、また神経新生障害を抑制する候補化合物として、腸内において抗炎症作用をもつ腸内細菌由来の脂肪酸に着目して検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章 Aβによる海馬神経新生抑制メカニズムの解析

Aβが海馬における神経新生に与える影響について、詳細は未だ明らかとなっていない。そこで、成体マウスの海馬におけるAβの神経新生障害作用およびそのメカニズムについて検討した。野生型と比較して高い凝集能と強い細胞毒性をもつE22P-Aβ42をマウス側脳室に投与したところ、海馬歯状回における神経幹細胞数が増加する一方で、新生幼若ニューロン数および新生成熟ニューロン数の有意な減少が観察された。また、E22P-Aβ42の投与によりミクログリアのマーカーであるIba1陽性細胞の増加が認められた。ミクログリアは脳内の免疫担当細胞であり、老人斑の周囲で活性化していることが報告されている。そこで、ミクログリアの活性化に着目しAβ42による神経新生障害のメカニズムについて検討したところ、ミクログリア活性化抑制薬であるミノサイクリンの腹腔内への投与によりAβ投与後に見られた神経幹細胞の増殖や幼若ニューロン数の減少が抑制された。以上の結果より、Aβは成体マウスの海馬歯状回において、ミクログリア活性化を介して神経幹細胞を増殖させニューロンへの分化を抑制することが示唆された。

第二章 腸内細菌産生脂肪酸による培養ミクログリア活性化抑制作用メカニズムの解析

Aβによるミクログリアの活性化を抑制することで神経新生抑制を回復できることが示唆されたため、ミクログリア活性化抑制物質の探索を行った。10-Oxo-trans-11-octadecenoic acid (KetoC) および10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (HYA) は腸内細菌により産生される脂肪酸の一種であり、消化管内において腸管バリア機能制御、腸管免疫制御機能、炎症抑制作用など免疫に対して重要な働きをもつことが報告されているが、脳内における作用についての報告はない。そこでミクログリア

の活性化抑制物質として上記の脂肪酸に着目し、マウスミクログリア細胞株を用いて両脂肪酸のミクログリア活性化に対する作用及び作用機序を検討した。LPSによる一酸化窒素 (NO) 産生をミクログリア活性化の指標とし、KetoCおよびHYAの作用を検討したところ、両脂肪酸はLPS誘発NO産生を抑制すると共に誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) のmRNA発現並びにタンパク質発現を抑制した。さらに、KetoCおよびHYAはLPS誘発のERKのリン酸化を有意に抑制したが、NF- κ Bの活性化、P PAR α ・ γ およびMAPKであるp38、JNKの活性化に対して影響を与えなかった。以上の結果より、KetoCおよびHYAはERKのリン酸化を抑制することでミクログリアの活性化を抑制することが示唆された。

第三章 A β による成体マウス海馬神経新生抑制に対する腸内細菌産生脂肪酸の作用解析

腸内細菌産生脂肪酸であるKetoCにミクログリア活性化抑制作用があることが明らかになったため、成体マウスの海馬歯状回におけるA β 誘発ミクログリア活性化や神経新生障害に与えるKetoCの影響について検討した。マウス側脳室へのE22P-A β 42の投与によりIba1陽性のミクログリア細胞数が増加したが、KetoCの投与によりその数が有意に減少した。さらにKetoCは、A β 誘発の神経幹細胞増殖、新生幼若ニューロン数の減少及び新生成熟ニューロン数の減少を有意に抑制した。以上の結果より、KetoCは脳内においてミクログリアの活性化を抑制することにより、A β により惹起される新生幼若ニューロンや新生成熟ニューロン数の減少を抑制することが示唆された。

以上、本研究ではA β が成体マウスの海馬歯状回においてミクログリア活性化を介して神経幹細胞の増殖を亢進する一方、ニューロンへの分化を抑制することを明らかにした。また、腸内細菌産生脂肪酸であるKetoCおよびHYAのミクログリア活性化抑制作用にERKのリン酸化抑制が重要であることを明らかにし、KetoCは成体マウスの海馬においてもミクログリアの活性化を抑制することで、神経新生を正常化させることを明らかにした。本研究の成果は、神経新生の異常が認知機能障害の一因であると考えられるADにおいて、A β 誘発ミクログリア活性化抑制が新規治療標的となり得ること、さらに腸内細菌産生脂肪酸の中枢における有用性を示唆するものである。

よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成31年2月21日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、2019年4月30日までの間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 2019年 5月 1日以降