

アルツハイマー病で認められる血管過剰増生への 糖尿病病態の関与

脳血管過剰増生機序解明チーム（課題番号：147108）

研究期間：平成 26 年 7 月 29 日～平成 28 年 3 月 31 日

研究代表者：渡辺拓也 研究員：高田美友子

〈背景および目的〉

Alzheimer's disease (AD) は認知症の一つであり、Amyloid β ($A\beta$) の脳内蓄積が病因とされている。これまで $A\beta$ 凝集過程の後期段階である老人斑が細胞を障害・死滅させ、記憶障害を誘発すると考えられていた。しかし、最近の AD 研究では、老人斑を形成していない $A\beta$ でも神経機能を低下させ記憶障害を発症させることが示唆された^{1), 2), 3)}。これらの研究は、AD の発症予防・治療において、 $A\beta$ を AD 病態の早期段階で脳内から除去する重要性を提起している。

脳内からの $A\beta$ 除去には、 $A\beta$ に対する抗体やワクチンなどの免疫療法が有望であると考えられ、現在多くの機関・製薬企業が研究開発を行っている。基礎・臨床試験において免疫療法は認知機能の改善傾向やアミロイド沈着の減少を示し、有用性が期待されている。しかし、その一方で、血管原性浮腫や脳微小出血という副作用があることが明確となってきた⁴⁾。血管原性浮腫や脳微小出血は、脳と血液の間に存在する血液脳関門 (BBB) の透過性亢進に起因する。AD 患者や AD モデルマウスは BBB の透過性が高いことが報告されており、抗 $A\beta$ 抗体により誘発された炎症反応が BBB 透過性をさらに亢進させ、血管原性浮腫や脳微小出血を引き起こしていると考えられている。すなわち、AD 病態での BBB 透過性亢進をあらかじめ抑制しておくことにより、免疫療法の副作用である血管原性浮腫や脳微小出血を軽減・回避することが可能であると予想される。しかし、その AD 病態下における BBB 透過性亢進の詳細な機序は明らかではない。

BBB 透過性亢進は、脳血管内皮細胞が密着結合した Tight Junction (TJ) が離開することによって起こる。これまで AD での BBB 透過性亢進の原因は脳血管内皮細胞の損傷や細胞死による TJ の離開であると考えられてい

た。しかし、2011 年に Biron らは AD モデルマウスにおいて血管密度の増加とともに、TJ 蛋白である occludin (OCN) や ZO-1 の発現・局在の変化が認められることと、また AD 患者においても血管密度が増加していることを見出した⁵⁾。これは、血管過剰増生による TJ の離開が、AD 病態下の BBB 透過性亢進の原因であることを示唆する新知見である。しかし、この血管過剰増生のメカニズムは明らかではない。

脳血管は脳血管内皮細胞と脳ペリサイトを含むグリア細胞によって構成されており、脳ペリサイトは脳血管内皮細胞による血管新生を調節している。すなわち、脳血管内皮細胞と脳ペリサイトの機能的バランスの破綻が血管過剰増生を誘導すると考えられる。スカベンジャー受容体である CD36 は脳血管内皮細胞と脳ペリサイトに発現しており、thrombospondin-1 (TSP1) の CD36 への結合は vascular endothelial growth factor (VEGF) 誘発血管新生を抑制する⁶⁾。また、CD36 は AD 病因分子 amyloid- β ($A\beta$) とも結合することが報告されている⁷⁾。これらのことから、脳血管内皮細胞と脳ペリサイトへの CD36 を介した $A\beta$ の作用が血管新生に関与することが考えられる。

近年、糖尿病は AD の危険因子であることが示唆されており、in vitro 研究では、高濃度グルコースや酸化 LDL の負荷が CD36 の発現を増加させることが報告されている。また、申請者らはペリサイトへの高濃度グルコースの負荷が TJ の離開を誘発する MMP-9 の産生を増大させることを予備実験結果として得ている。このことから、糖尿病病態は AD における血管過剰増生に促進的に働くことが示唆される。

そこで、糖尿病併発 AD における血管過剰増生機序解明を最終目標とし、VEGF 誘発血管新生に対する $A\beta$ -CD36 の作用について検討を行った。

〈方法〉

使用細胞

bEND.3 cell (マウス脳血管内皮細胞株: ATCC, Manassas, VA)を用いた。10% fetal bovine serumを含むD-MEM培地を用いて、37℃、5% CO₂条件下で培養した。

Mouse CD36 (mCD36) 遺伝子のクローニング

マウスcDNAライブラリーから下記のprimerを用いて、CD36遺伝子をpIRES-EGFPのSalIとBamHI認識部位へ組み込んだ。コンピテントセルDH5 *a* に形質転換し、必要量のpIRES-EGFP-mCD36を得た。HEK293細胞にX-TremeGene HP Transfection Reagent (Roche)を用いて遺伝子導入し、48時間後に蛋白を回収し、western blotにて発現を確認した。

mCD36/pIRES-EGFP Fwd:

ATAGTCGACCatgggctgtgatcggaactgtggg

mCD36/pIRES-EGFP Rev:

TATGGATCctattttccattcttgatttgc

mCD36標的shRNAの作製

mCD36を標的としたshRNAテンプレートを下記primerを用いて増幅し、pLB2_CAG_P2GmのXhoIとEcoRI認識部位に組み込んだ。コンピテントセルNEB stable Competent E. coliに形質転換し、2種のコロニーから必要量のpLB2_shCD36 (#2と#8)を得た。HEK293細胞にX-TremeGene HP Transfection Reagentを用いて、pIRES-EGFP-mCD36と共に遺伝子導入し、72-96時間後に蛋白を回収し、western blotにて発現を確認した。

shCD36テンプレート

TGCTGTTGACAGTGAGCGCTTTCATATTGTGCTT
GCAAATTAGTGAAGCCACAGATGTAATTTGCAA
GCACAATATGAAATTGCTACTGCCTCGGA
標的配列

miR30 Fwd:

GATGGCTGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACA
GTGAGCG

miR30 Rev:

GTCTAGAGGAATTCCGAGGCAGTAGGCA

mCD36-adenovirus (AAV) 粒子の作製

pIRES-EGFP-mCD36からSalIとBamHIによりmCD36挿入断片を切り出し、pAAV-CMVベクターへ組み込んだ。コンピテントセル E. coli HST08 premium Competent Cellsに形質転換し、必要量のpAAV-mCD36を得た。

Lenti-X™ 293T CellにTrans IT-293 Transfection

Reagent (Takara bio)を用いて、pAAV-mCD36と共にpRCベクターとpHelperベクターを遺伝子導入した。72時間後にAAV Extraction Solution kitを用いて、AAV-mCD36粒子を抽出した。

bEND.3 cellにおけるVEGFのシグナル解析

bEND.3 cellにAAV-mCD36粒子を処置し、48時間後に無血清D-MEMに入れ替え、 β 42 (最終濃度1 μ M)を処置した。4時間後に培地を取り除き、50ng/ml VEGFを含んだ無血清D-MEM培地を添加した。10分後に1x SDS sample bufferで細胞を溶解し、10分間100℃でボイルした。VEGFシグナルの下流に存在するAkt、ERK、p38、JNKのリン酸化体の発現割合をwestern blotにより解析した。

〈結果〉

mCD36発現調節システムの構築

bEND.3細胞ではCD36の発現が認められなかった。作製したpIRES-EGFP-mCD36は、HEK293細胞においてmCD36を発現した(Fig.1)。また、pLB2_shCD36はmCD36のknockdown効果を示した(Fig.2)。

AAV-CD36粒子によるmCD36の発現

X-TremeGene HP Transfection Reagentを用いて、pIRES-EGFP-mCD36をbEND.3細胞へ導入を試みたが、western blot解析ではその発現は認められなかった(data not shown)。そこで、AAV粒子を利用して、bEND.3細胞へmCD36遺伝子導入を行った。AAV-mCD36粒子の滴下量に依存して、CD36発現量は増加した(Fig.3)。

CD36発現bEND.3細胞におけるVEGFシグナル活性

VEGF処置は、JNK、ERK、p38のリン酸化レベルを増加させた(Fig.4)。しかし、Aktのリン酸化増加は認められなかった(data not shown)。CD36は、ERK、p38の

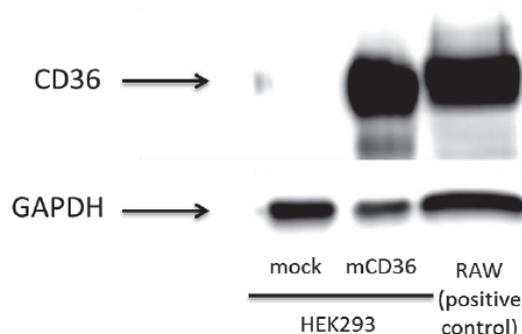


Figure 1. HEK細胞におけるmCD36の強制発現。pIRES-EGFP-mCD36をHEK細胞に遺伝子導入した。CD36のpositive controlとしてマクロファージ由来株化細胞RAW細胞を用いた。

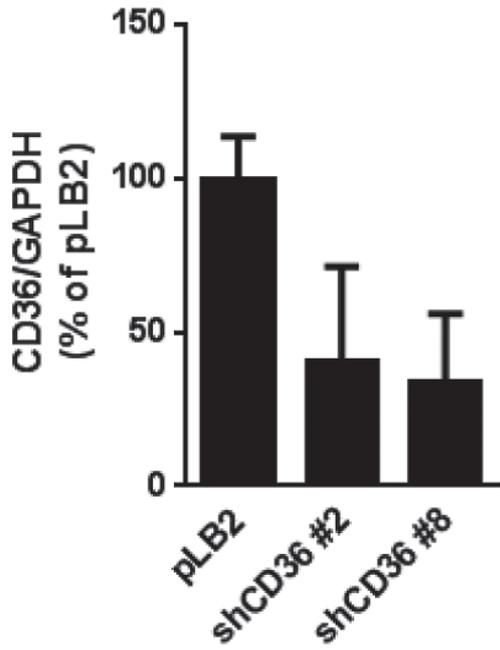


Figure 2. HEK細胞におけるmCD36の強制発現とshRNAによる knockdown。pIRES-EGFP-mCD36とpLB2_shCD36 (#2, #8)をHEK細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入72時間後のknockdown効果を評価した。

リン酸化レベルには影響しなかった。JNKでは、46kDaのJNKのリン酸化レベルがCD36発現により減少傾向が認められた。しかし、JNK、ERK、p38のリン酸化レベルはCD36の有無に関わらず、Aβの影響を受けなかった。

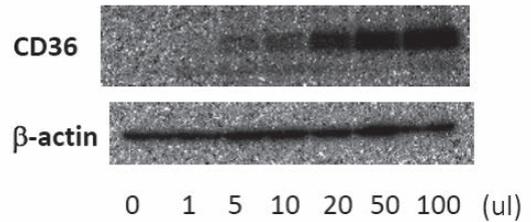
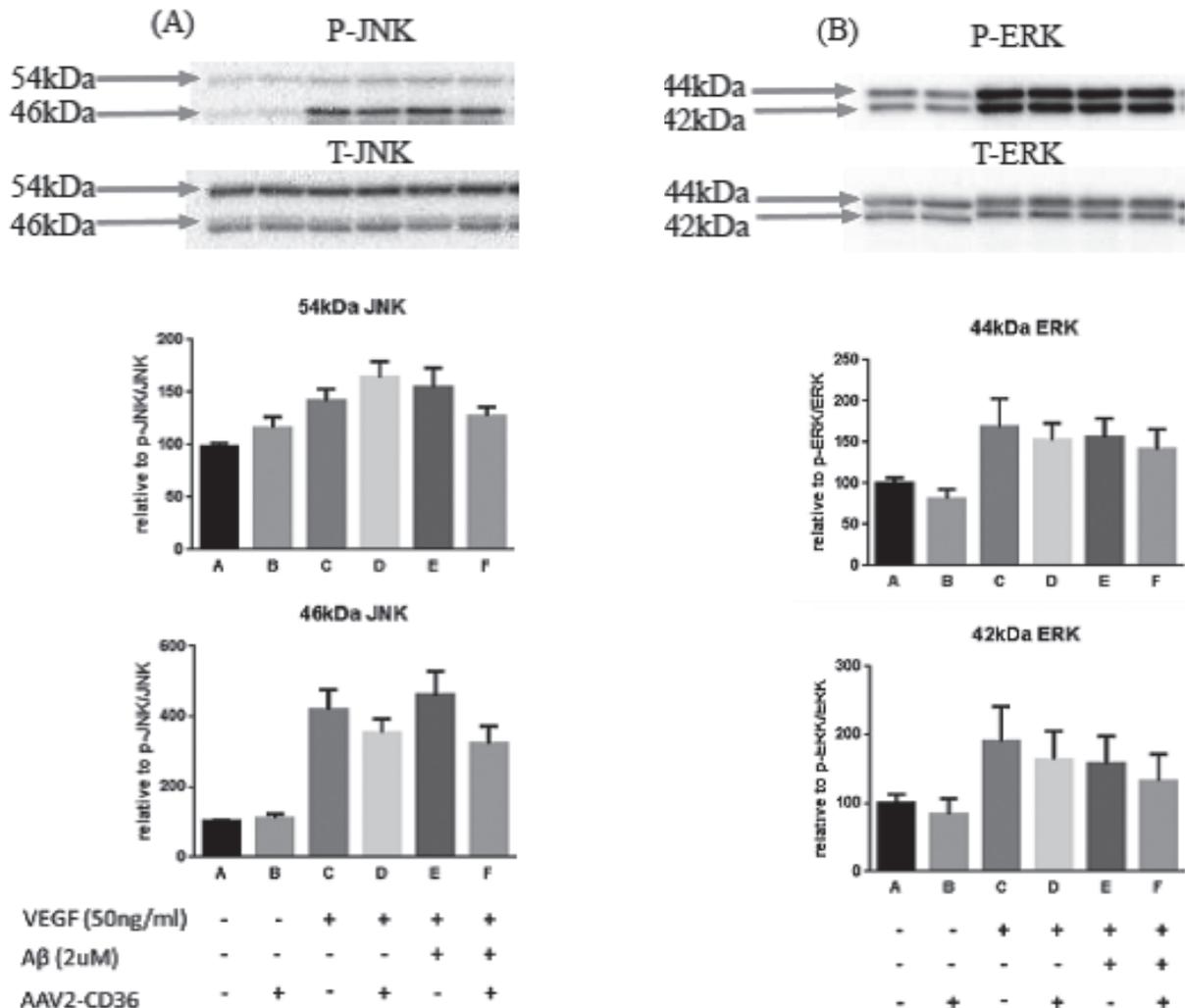


Figure 3. bEND.3細胞におけるmCD36の強制発現。AAV-CD36粒子をbEND.3細胞に感染させた。粒子溶液は1-100ul滴下した。感染48時間後のmCD36発現を評価した。



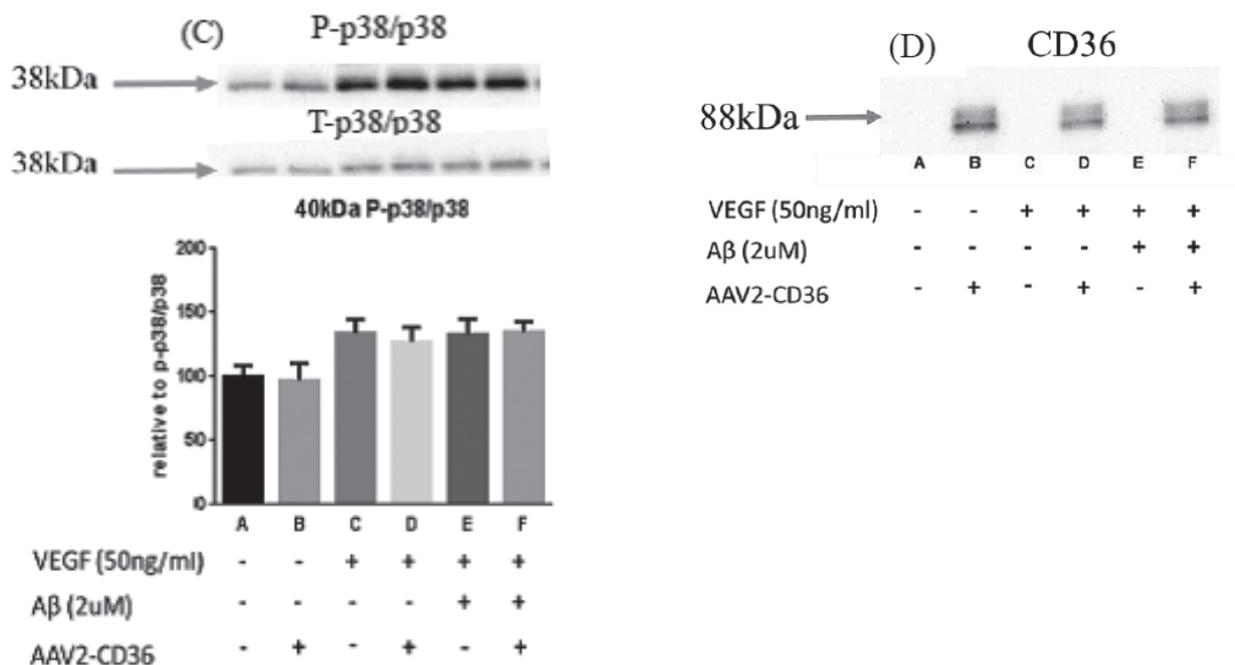


Figure 4. bEND.3細胞におけるVEGFシグナル。mCD36強制発現bEND.3細胞にAβを添加した後、VEGFを処置した。(A)JNKのリン酸化、(B)ERKのリン酸化、(C)p38のリン酸化、(D)CD36発現。

〈考察〉

本研究では、脳血管内皮細胞株におけるVEGFシグナルへのCD36-Aβ相互作用について検討した。糖尿病病態下を模倣するため、bEND.3細胞にCD36の強制発現を行った。通常の遺伝子導入剤ではCD36発現が認められなかったため、AAV粒子を利用して、bEND.3細胞にCD36を強制発現させた。CD36発現はVEGFにより誘導されたリン酸化JNK (46kDa) レベルの減少傾向を示した。このことから、CD36を介したシグナルがVEGFシグナルに影響することが示唆された。Aβの処置は、VEGF誘導シグナルには影響しなかったため、本研究でCD36強制発現細胞では、VEGFによる46kDa JNKの抑制傾向が認められた。JNKリン酸化はアポトーシスの誘導に関与していることから、CD36発現はアポトーシス誘導抑制に寄与することが示唆された。サイズの異なるJNKに対して、それぞれをリン酸化するリン酸化酵素が存在していることから、46kDaのJNKのリン酸化酵素もしくはそのリン酸化酵素の上流分子が、CD36発現により、影響を受けた可能性が考えられる。JNKの上流シグナルの同定は今後の検討課題である。

本研究では、AβによるVEGFシグナルの増強作用を確認することが出来なかった。本実験ではCD36の過剰発現系を用いたが、CD36の発現局在は確認しておらず、CD36が細胞膜上に発現していない可能性があり、AβがCD36に結合できていないことが考えられた。今後は、CD36の発現局在を確認すると共に、AβのCD36への結合の有無も含めてCD36-Aβの相互作用を検討する必要

がある。

本研究結果から、糖尿病病態はCD36を介して、VEGFシグナルのJNKリン酸化に影響することが示唆された。今後は、AβとCD36の結合を確認後、VEGFのシグナルを解析する必要がある。

〈謝辞〉

本研究の一部は福岡大学研究推進部の研究経費によるものである。(課題番号：147108)

〈参考文献〉

1. Watanabe T. et al., Spatial memory impairment without apoptosis induced by the combination of beta-amyloid oligomers and cerebral ischemia is related to decreased acetylcholine release in rats. *J Pharmacol Sci.* 2008 106(1):84-91.
2. Watanabe T. et al., Decreased acetylcholine release is correlated to memory impairment in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2009 16;1249:222-8.
3. Watanabe T. et al., Dynamin 1 depletion and memory deficits in rats treated with Aβ and cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* 2010 88(9):1908-17.
4. Wilcock DM. et al., Activation of matrix metalloproteinases following anti-Aβ immunotherapy; implications for microhemorrhage occurrence. *J Neuroinflammation.*

2011 8:115.

5. Biron KE. et al., Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease. PLoS One. 2011;6(8):e23789.
6. Sun J. et al. Thrombospondin-1 modulates VEGF-A-mediated Akt signaling and capillary survival in the developing retina. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009 296(5):H1344-51.
7. Miller TW. et al., Amyloid- β inhibits No-cGMP signaling in a CD36- and CD47-dependent manner. PLoS One. 2010 Dec 22;5(12):e15686.