



## 【序論】

アルツハイマー病 (AD) は進行性の神経変性疾患であり、病理学的にはアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) の凝集・蓄積を特徴とする。家族性 AD の研究を通じて、 $A\beta$  の凝集・蓄積が AD 発症を引き起こすというアミロイド仮説が提唱され現在まで広く支持されている。一方、AD の 99% を占める孤発性 AD の患者においては  $A\beta$  の脳内クリアランスの低下が示されており (Mawuenyega et al., Science, 2010)、 $A\beta$  代謝の破綻が AD 発症に繋がることが考えられているが、その具体的な機序は不明である。近年、大規模なゲノムワイド解析により、AD の発症に関連する遺伝子の多くはミクログリアに高発現していることが明らかとなり、AD 発症におけるミクログリアの重要性が示唆された。ミクログリアは  $A\beta$  を貪食し代謝することが知られていることから、その分子機序を明らかにすることにより、AD 発症と  $A\beta$  代謝の関連性の解明につながると考えた。

## 【方法と結果】

### 1. $A\beta$ 線維の貪食は TREM2/DAP12 により制御される

$A\beta$  は脳内ではモノマー以外にオリゴマーや線維として存在する。私はこれまでに、凝集状態の異なる  $A\beta$  分子種をそれぞれ蛍光誘導体化したものを基質として、ミクログリア培養細胞株 MG6 による内在化をフローサイトメトリーで定量化する実験系を確立し、①モノマーおよびオリゴマー  $A\beta$  の内在化にはクラスリン依存性エンドサイトーシスとマクロピノサイトーシスが関与し、スカベンジャー受容体 (MSR1、CD36) が重要であること、②  $A\beta$  線維の内在化はファゴサイトーシスによること、を明らかにしていた。そこでさらにこの実験系を用いて、AD の遺伝学的リスク因子 (Abca7、Abi3、Cd2ap、Inpp5d、Plcg2、Trem2) の発現抑制による各種

$A\beta$  分子種の内在化への影響を解析した。その結果、TREM2 のノックダウンにより  $A\beta$  線維の内在化が特異的に減少することを見出した (図 1)。Trem2 をノックダウンした初代培養ミクログリアにおいても、顕著に  $A\beta$  線維の内在化が減少した。また CRISPR/Cas9 により作製した Trem2 欠損 MG6 ではほぼ完全に消失した。そこで以後は TREM2 が  $A\beta$  線維の貪食をどのように制御しているかについて詳細に解析を行った。

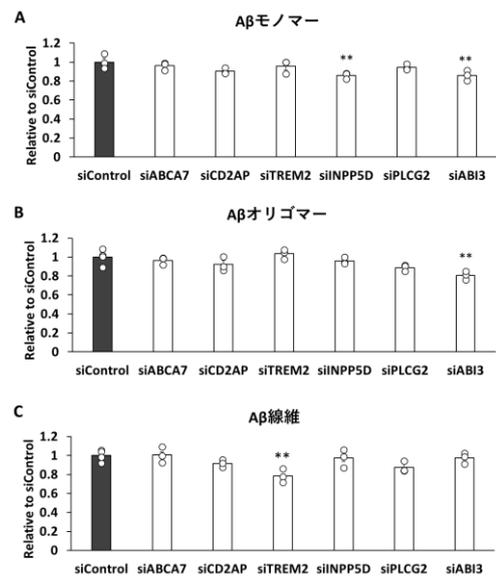


図1 AD リスク因子のスクリーニング  
MG6 に対して siRNA 処理を行い、(A)  $A\beta$  モノマー、(B)  $A\beta$  オリゴマー、(C)  $A\beta$  線維の取り込みをそれぞれ定量化した。(N=3-4, Error bar = SE, Dunnett test compared to siControl \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

TREM2 は様々な細胞外リガンドを認識する受容体分子であり、A $\beta$ オリゴマーや線維と結合することや、リガンド結合により種々の遺伝子発現を制御すること

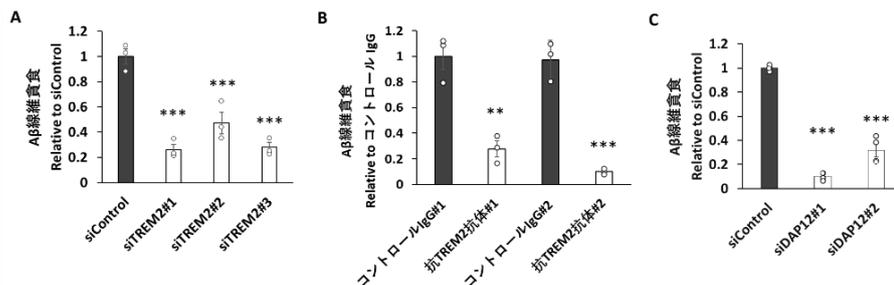


図2 初代培養ミクログリアにおける TREM2/DAP12 阻害による A $\beta$  線維貪食への影響  
 (A) TREM2 ノックダウンによる効果 (N=3, Error bar = SE, Dunnett test compared to siControl \*\*\*p<0.001)  
 (B) 抗 TREM2 抗体投与による効果 (N=3, Error bar = SE, Student t test \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)  
 (C) DAP12 ノックダウンによる効果 (N=3, Error bar = SE, Dunnett test compared to siControl \*\*\*p<0.001)

が知られている。TREM2 による A $\beta$  内在化の制御が、A $\beta$  との直接結合によるものか、または遺伝子発現制御によるものかを区別するため、TREM2 の細胞外領域に対する抗体について A $\beta$  内在化への影響を検討したところ、2 種の抗 TREM2 抗体がコントロール IgG 処理群に比べて内在化を阻害した (図 2B)。このことは、TREM2 細胞外領域が A $\beta$  線維の認識に直接的または間接的に重要であることを示唆している。TREM2 はまた、免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) をもつアダプタータンパク質 DAP12 と複合体を形成する。DAP12 をノックダウンまたはノックアウトした初代培養ミクログリアにおいても A $\beta$  線維の貪食が有意に減少したことから (図 2C)、ミクログリアによる A $\beta$  線維の内在化は TREM2/DAP12 シグナル経路によって制御されていることが示唆された。

## 2. A $\beta$ 線維の貪食に関与する TREM2 下流シグナルの探索

TREM2 がリガンドに結合すると、DAP12 の ITAM のリン酸化依存的に Syk が膜動員され、PI-3 キナーゼ (PI3K) などの下流分子が活性化することが知られている。実際に、A $\beta$  線維で処理した初代培養ミクログリアでは Syk や、PI3K により活性化される Akt のリン酸化が亢進した一方

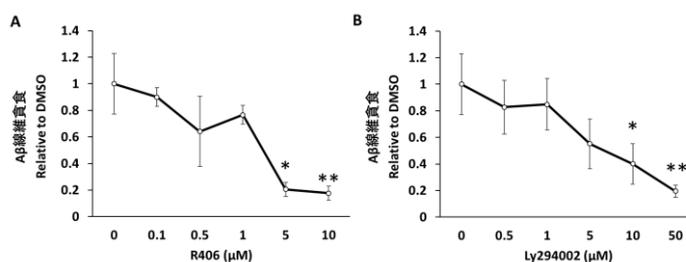


図3 Syk、PI3K 阻害剤による A $\beta$  線維貪食への影響  
 (A) R406 投与による効果 (N=3, Error bar = SE, Dunnett test compared to DMSO control \*p<0.05, \*\*p<0.01)  
 (B) Ly294002 投与による効果 (N=3, Error bar = SE, Dunnett test compared to DMSO control \*p<0.05, \*\*p<0.01 )

で、Trem2 欠損 MG6 では A $\beta$  線維による Akt のリン酸化亢進は認められなかった。そこで、A $\beta$  貪食におけるこれら分子の関与を調べるために阻害剤・ノックダウンによる解析を行った。初代培養ミクログリアによる A $\beta$  線維の貪食は、Syk 特異的阻害剤 (R406) の処理または Syk 発現抑制

により有意に減少した (図 3A)。さらに、PI3K 阻害剤 (LY-294002、Pictilisib、Ompalisib) の処理もまた A $\beta$  線維の貪食を有意に阻害した (図 3B)。これらのデータから TREM2/DAP12 下流における Syk、PI3K の活性化が A $\beta$  線維の貪食において重要な役割を果たしていることが示唆された。

### 3. A $\beta$ 線維の貪食における PIP3 ホスファターゼ INPP5D の関与

PI3K はホスホイノシチド PI(4,5)P<sub>2</sub> をリン酸化し PI(3,4,5)P<sub>3</sub> を産生することで下流シグナルを活性化する。PI(3,4,5)P<sub>3</sub> はホスファターゼである INPP5D (SHIP1)、INPL1 (SHIP2)、PTEN により代謝されることから、これら分子の A $\beta$  線維貪食における関与について検討した。すると、初代培養マイクログリアにおいては INPP5D を発現抑制した場合においてのみ、A $\beta$  線維の貪食亢進が認められた (図 4)。また、A $\beta$  線維による Akt

のリン酸化は、INPP5D を発現抑制した場合に亢進した。これらのことから INPP5D は PI3K 経路を介して A $\beta$  の貪食を負に制御していることが示唆された。

#### 【総括】

本研究により、マイクログリアにおいて TREM2/DAP12 が Syk、PI3K を介して A $\beta$  線維の貪食を正に制御している一方で、PI(3,4,5)P<sub>3</sub> の代謝酵素である INPP5D がこれを負に制御にしていることが示唆された。INPP5D は TREM2 と同様に AD の遺伝学的リスク因子であることが報告されており、この経路の異常が AD 発症に関与している可能性が考えられる。TREM2 は現在、AD の創薬標的として

注目されており、実際に TREM2 の活性化抗体が臨床治験中であるが、中枢神経疾患に対する抗体医薬の実現には困難が予想される。一方で本研究の結果は、INPP5D の活性阻害により、マイクログリアによる A $\beta$  線維の貪食活性を高めることができることを示唆している。今後、INPP5D の役割をより詳細に解明することにより、AD 治療への応用が期待される。

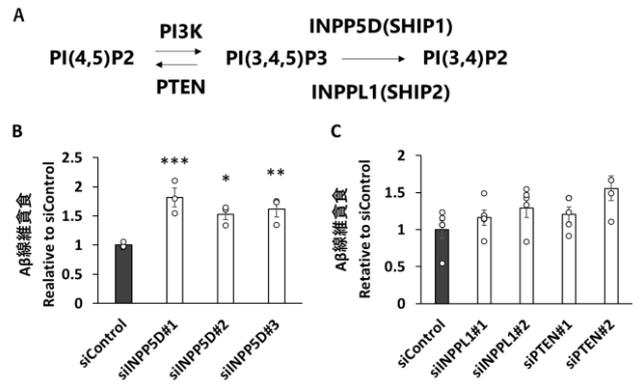


図 4 PIP3 phosphatase のノックダウンによる A $\beta$  線維貪食への影響 (A) 各種 phosphatase の PIP3 代謝の模式図 (B) INPP5D ノックダウンによる効果 (N=3, Error bar = SE, Dunnett test compared to siControl \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001) (C) INPL1、PTEN ノックダウンによる効果 (N=3-5, Error bar = SE, Dunnett test compared to siControl \*\*\*p<0.001)

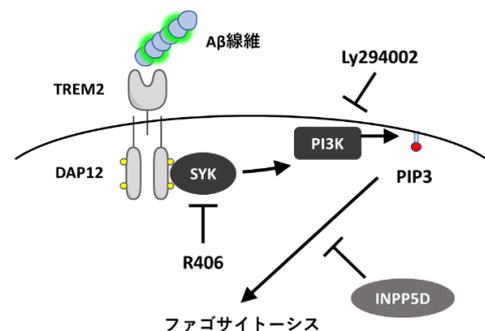


図 5 ミクログリアにおける A $\beta$  線維貪食の制御