

脳－筋連関の観点からとらえた運動による認知症発症予防効果にかかわる分子メカニズムの同定

伊 藤 祐 規^{*,**} 武 田 朱 公^{*,**} 樂 木 宏 実^{***}
森 下 竜 一^{*}

IDENTIFICATION OF MOLECULAR MECHANISMS INVOLVED IN THE PREVENTIVE EFFECT OF EXERCISE ON THE ONSET OF DEMENTIA IN TERMS OF BRAIN-MUSCLE INTERACTIONS

Yuki Ito, Shuko Takeda, Hiromi Rakugi, and Ryuichi Morishita

Key words: dementia, brain-muscle interactions, microfluidic device, Alzheimer's disease, tau.

緒 言

超高齢社会である本邦においては、高齢者人口の増加に伴う認知症患者の増加が生じており、2040年には認知症患者数が800万人を超えると推定されている。Livingston ら⁶⁾の報告では、認知症発症のリスク因子の約35～40%は糖尿病などの生活習慣病を始めとする回避可能な要因であること、運動が認知症発症の抑制に効果的な介入手法の1つであることが示されている。これは、運動や糖尿病など全身のエネルギー代謝に関与する因子が認知症発症に強く関与することを示唆しており、動物モデルでは運動によるエネルギー代謝の変化が認知機能の低下を抑制することも報告されている⁷⁾。

一方で、運動はエネルギー代謝以外の因子（筋活動や神経活動、血液循環、等）にも影響を及ぼすため、多面的な構成因子を含む運動という行為

が認知機能に及ぼす影響を司る主要な因子は現時点で不明なままである。近年、各組織由来の液性因子を介して離れた臓器が相互調節を行う現象（臓器連関）が明らかとなり⁵⁾、この観点からみると運動により生じた筋組織の変化が液性因子を介して、認知機能（神経機能）の調節を行う可能性が考えられる。ヒトにおいても運動により神経保護因子である BDNF（brain-derived neurotrophic factor）¹⁾の血中濃度が増加することが報告されており、全身に存在する筋由来の液性因子が神経細胞へ直接影響を及ぼす可能性が考えられる。

認知症の約60%はアルツハイマー病（Alzheimer's disease; AD）が原因疾患であるが、ADの根本的治療法は確立されていない²⁾。AD患者の脳内では過剰なリン酸化修飾を受けた病的なタウタンパクが蓄積した神経原線維変化という脳内病理像がみられ、その蓄積量は神経変性や認知機能障害の程度と相関する³⁾。以上から、運動のもつ認

* 大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学

** 大阪精神医療センターこころの科学リサーチセンター

*** 大阪大学大学院医学系研究科老年・総合内科学

Department of Clinical Gene Therapy, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan.

Osaka Psychiatric Research Center, Osaka Psychiatric Medical Center, Osaka, Japan.

Department of Geriatric and General Medicine, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan.

知症発症予防効果の分子メカニズムとして、筋組織由来の液性因子が神経細胞および AD などの認知症疾患の脳内病理の形成に影響を与える可能性が考えられる。

しかしながら、筋細胞由来の液性因子が神経細胞および認知症疾患の脳内病理へ与える影響の分子メカニズムは未知である。その理由の 1 つとして、互いに離れた位置にある神経細胞と筋細胞間で生じる液性因子を介した相互調節を評価可能な系が存在しないことが挙げられる。培養細胞を用いた既存の神経-筋共培養モデルは、神経細胞と筋細胞が同一空間内に混在しているため各細胞由来の液性因子を独立して評価することが困難である。

そこで本研究では、マイクロ流路チップを用いた神経-筋共培養モデルを樹立することで、神経細胞と筋細胞を互いに独立した区画で共培養することを可能とし、筋組織由来の液性因子が神経細胞へ与える影響を担う主要な液性因子を同定することを目指した。また、神経細胞、特に AD 発症に関与するタウタンパクに着目し、同定した筋細胞由来の液性因子が認知機能へ及ぼす影響を AD マウスモデルおよびヒト検体を用いた解析によって明らかにすることを試みた。

方 法

A. マイクロ流路チップの作成

微細かつ任意の形状に加工可能な polydimethylsiloxane (PDMS) 製のマイクロ流路チップを用いて、神経細胞と筋細胞を別区画かつ培養液の連続性を保った状態で共培養することができる特殊培養チャンバーを作製する。

1. SU-8製のマイクロ流路の鋳型作成

SU-8は光照射により硬化するエポキシ樹脂であり、照射部をマスクにより制限することで目的とする形状の鋳型を作成することが可能である。鋳型の作成は SU-8が感光しない (500 nm 以下の波長をカットした) 長波長の蛍光灯が設置された暗室にて実施した。エタノール洗浄後のガラス基板に対してフォトレジスト (AZ 5206-E Photore-sist, Hoechst Celanese) を塗布し、作図した任意の流路パターンを LED 描画システム (PLS-1010,

PMT) によりフォトレジストに反映させた後、現像液を用いて余分なフォトレジストを取り除いた (フォトマスクの作成)。

原液、およびシクロロペンタンで 2 倍希釈した SU-8 (SU-8 50, Kayaku Advanced Materials) をガラスウエハに塗布し、スピンコーター上で回転させることで、SU-8を 2 種類の均一な厚さをもつ層に成形した (厚い層: 原液の SU-8を 500 rpm で 3 秒間回転した後、1200 rpm で 30 秒間回転; 薄い層: 2 倍希釈した SU-8を 500 rpm で 3 秒間回転した後、3500 rpm で 30 秒間回転)。その後、ホットプレート上で 10 分間加熱 (65℃で 5 分間加熱した後 95℃で 5 分間加熱) し、硬化させた。

フォトマスクを薄い SU-8層の表面に重ねた状態で、350~400 nm の波長をもつ UV ランプを用いて一定時間感光させた。ホットプレート上で 8 分間加熱 (65℃で 2 分間加熱した後 95℃で 6 分間加熱) した後、現像液 (SU-8 Developer, Y020100, Kayaku Advanced Materials) を用いて余分な SU-8を取り除いた。その後、フォトマスクを厚い SU-8層に重ねた状態で、薄い SU-8層の適切な位置に重ね合わせ、再度、感光・加熱・洗浄を実施した。ガラスウエハ上に残った SU-8製のマイクロ流路の鋳型はホットプレート上で 150℃、30 分間加熱し、硬化させた (図 1 A)。

2. PDMS 製のマイクロ流路チップの作成

マイクロ流路チップは SU-8により作成した流路の鋳型に対して、PDMS 液を流し込み固化することで作成した。SYLGARD 184 Silicone Elastomer Kit (3097358-1004, ダウコーニング) の主剤の A 液と、架橋剤である B 液を 10: 1 で混合した後、30 分間脱気をしたものを PDMS 原液とした。PDMS 原液は用時調整し、75℃で 30 分間加熱して硬化させた (図 1 B)。

3. スライドガラスへのマイクロ流路チップの貼り付け

PDMS 製マイクロ流路チップは、PDL コート後のスライドガラスへ貼り付けて使用した。培養チャンバーの inlet および outlet 部分に穴を開けた後、プラズマ照射処理したマイクロ流路チップの流路側の面をスライドガラスの PDL コート処理側の面と密着させ、ホットプレート上で 105℃、

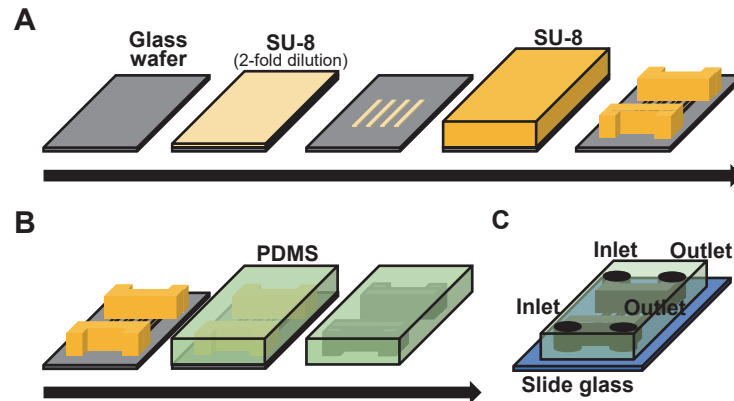


図 1. 神経細胞-筋細胞共培養系に用いる特殊培養チャンバー作成の模式図

Fig.1. Schematics diagram of the procedure for the creation of microfluidic device for culturing neuron and myoblast.

- (A) The procedure for the creation of SU-8 mold for PDMS microfluidic chip. SU-8 of different concentrations (light yellow and dark yellow) is placed on the glass wafer (gray) to the desired shape.
- (B) The procedure for the creation of PDMS microfluidic chip. PDMS (green) is poured onto SU-8 to make microfluidic channels in the mold.
- (C) Schematic of the microfluidic device for culturing neuron and myoblast. The PDMS with microfluidic channels was mounted on slide glass (blue) and punctured at the inlet and outlet.

PDMS; polydimethylsiloxane.

6 分間加熱することで特殊培養チャンバーを作成した (図 1 C)。チャンバー間の連結 (マイクロ流路内の液体の移動) は、緑色および赤色の蛍光色素を一方のチャンバーにアプラインすることで生じる蛍光の変化を観察することで確認した。

B. 各チャンバーでの細胞培養方法の確立

マイクロ流路チップを用いた特殊培養チャンバー内で細胞培養を行う際には、乾燥を防ぐ目的でマイクロ流路チップを 10 cm dish 内に設置した。また、マイクロ流路チップはセーフティーキャビネット内で紫外線を 1 時間照射することで滅菌した後、各細胞の培養に用いた。

1. Tau-biosensor 細胞の培養

Tau-biosensor 細胞は HEK293 細胞を基に作成された病的タウの凝集体形成が評価可能な細胞である⁴⁾。Tau-biosensor 細胞は CFP および YFP がタグ付けされたヒトタウタンパクを過剰発現しており、蛍光顕微鏡下において細胞の形態および細胞内タウ凝集が観察可能である。10 cm dish で継代培養を行った Tau-biosensor 細胞を 80% コンフルエントの時点でトリプシン処理により dish から剥離・回収した後、10% FBS (26140079, Gibco) + 1% PC/SM (26253-84, ナカライテスク) + 2 mM

GlutaMAX (35050061, Thermo Fisher Scientific) を含む DMEM 培地 (043-30085, 富士フイルム和光純薬) を加え、濃度を 1.2×10^6 cells/ml に調製した。調整後の細胞懸濁液はマイクロ流路チップの inlet を介して培養チャンバー部分にピペットマンを用いてアプラインした。培地はピペットマンを用いてマイクロ流路チップの outlet から古い DMEM 培地を回収し、その後、新たな DMEM 培地を inlet からアプラインすることで交換 (1 回/日) した。培養細胞の増殖および形態学的変化はスライドガラス側からの観察が可能な倒立型蛍光位相差顕微鏡 (BZ-900, KEYENCE) を用いて評価した。

2. マウス初代運動神経細胞の培養

市販のマウス初代運動神経細胞 (Primary Mouse Cortical Neurons, A15585, Gibco) を、B-27 Supplement (50X)、serum free (17504044, Gibco) と GlutaMAX を含む Neurobasal Medium (21103049, Gibco) を用いて特殊培養チャンバー内に、 1.0×10^6 cells/ml の濃度でアプラインした。その後、37°C の CO₂ インキュベーター内で培養を行い、細胞の形態学的変化は倒立顕微鏡 (Primovert photo, ZEISS) を用いて観察した。

3. マウス筋芽細胞の培養

市販のマウス筋芽細胞 (C2C12, CRL-1772, Gibco) を、10% FBS を含む DMEM 培地 (30-2002, ATCC) を用いて特殊培養チャンバー内に、 1.0×10^6 cells/ml の濃度でアプライした。その後、37℃ の CO₂ インキュベーター内で培養を行い、細胞の形態学的変化は倒立顕微鏡を用いて観察した。

C. 神経細胞へ影響を与える筋細胞由来の液性因子の同定

特殊培養チャンバーを用いた神経細胞と筋細胞の共培養系を用いて筋細胞側に電気刺激を加えることで筋収縮を筋細胞に促し、培養液中に筋細胞由来の液性因子を放出させる。静水圧を利用して一定期間、筋細胞由来の液性因子が神経細胞に一方向性に作用可能な状態とした後、細胞や細胞培養液をチャンバーごとに独立して回収し、刺激により変動した液性因子をプロテオーム解析または抗体アレイを用いて網羅的に解析する。各細胞の形態学的変化は各細胞マーカーを用いた免疫染色により評価する。以上により、神経細胞に対して生化学的・形態学的な変化を引き起こす筋細胞由来の液性因子群およびその主要な因子の同定を試みる。これらの実験の実施条件は現在検討中である。

D. 同定した液性因子が細胞内タウタンパクやマウス脳へ与える影響の解析

同定した筋細胞由来の液性因子を病的タウの凝集体形成が評価可能な Tau-biosensor 細胞に添加し、病的タウの凝集体形成に与える影響を解析する。病的タウの凝集体数はハイコンテンツイメージング装置による画像処理を用いて実施する。また、病的なタウは過剰なリン酸化修飾を受けていることが報告されているため、同定した筋細胞由来の液性因子が細胞内のリン酸化タウ量へ及ぼす影響については各リン酸化タウ抗体を用いた western blotting により評価する。また、脳内にタウ病理を呈する AD マウスモデル (タウ Tg, PS19 マウス) に対して同定した液性因子を投与することで、その薬効評価を行う。脳内のタウ病理が少ない若齢 (3~4 か月齢) 時点で投与を開始し、3 か月間程度の反復投与を行うことで習慣的な運動を模した投与モデルを樹立する。脳内に病的なタウタンパクが蓄積し始める月齢 (6~7 か月齢) で認知機

能評価 (open-field test, 概日リズム測定) と脳内タウ量の解析 (WB, ELISA) を行う。これにより、同定した液性因子が生体内でタウタンパクや認知機能へ及ぼす影響を明らかにする。

E. 同定した液性因子の血中・髄液中濃度と高齢者の認知機能との相関関係の解析

研究への同意が得られた大阪大学医学部附属病院老年・総合内科に入院、およびもの忘れ外来に通院している高齢者に対して、認知機能検査 (Mini-Mental State Examination; MMSE) と血液・脳脊髄液検体採取を実施した。同定した筋細胞由来の液性因子の血中および脳脊髄液中濃度と、認知機能検査結果や血中・脳脊髄液中の AD バイオマーカー濃度との相関関係を解析することで、同定した筋細胞由来の液性因子がヒトの認知機能や AD の脳内病理へ与える影響の検証を行う。

F. 倫理的配慮

ヒトを対象とした研究は、大阪大学医学部附属病院 (承認番号: 807-3) および大阪大学大学院医学系研究科 (承認番号: 16478) の倫理審査委員会の承認のもと、全対象者に対して研究の内容と目的を十分に説明し、書面によるインフォームドコンセントを得たうえで実施した。また、すべての処置・測定はヘルシンキ宣言、および人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針を遵守して実施した。

G. 統計解析

ヒトを対象とした研究に関しては、被験者の年齢、および MMSE スコア、脳脊髄液中の AD バイオマーカー値の群間差は Kruskal-Wallis test の後に Steel-Dwass multiple comparison tests を用いて検討した。各群における男女比は両側カイ二乗検定を用いて比較した。統計解析には、Statcel 4 ソフトウェア (OMS 出版) を使用した。結果は平均値 ± 標準偏差 (standard deviation; SD) で表し、 $P < 0.05$ を有意とした。

結 果

A. マイクロ流路チップの作成

マイクロ流路チップとして、外径は縦 1.5 cm × 横 1.0 cm の長方形、各細胞を培養するチャンバー部分は高さ 94 μm、各チャンバー間をつなぐマイ

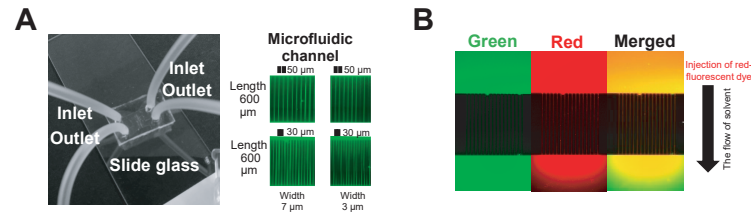


図 2. 神経細胞と筋芽細胞の培養用のマイクロ流路デバイスのイメージ図
Fig.2. Images of a microfluidic device for culturing neuron and myoblast.
(A) The images show the outside of a home-made microfluidic device (left) and the pattern of microfluidic channels (right).
(B) Fluorescent images of microfluidic channel show the distribution of red-fluorescent dye in the upper compartment after green fluorescent dye was applied to both compartments.

クロ流路は、高さ $2.4\ \mu\text{m}$ 、長さ $600\ \mu\text{m}$ 、流路幅が $3\ \mu\text{m}$ もしくは $7\ \mu\text{m}$ 、流路間隔が $30\ \mu\text{m}$ もしくは $50\ \mu\text{m}$ の形状のチップを作製した (図 2 A)。また、蛍光色素を用いた肉眼的な観察の結果、各チャンバー間および各マイクロ流路間が互いに独立していること、色素をアプライしたチャンバーから反対側のチャンバー方向へ一方向的な水流が生じることが確認できた (図 2 B)。

B. 各チャンバーでの細胞培養方法の確立

Tau-biosensor 細胞を用いたマイクロ流路チップのチャンバー内での細胞培養に関しては、アプライ後の Tau-biosensor 細胞がスライドガラス上に接着し、その後チャンバー内で増殖する様子が観察された。一方で同じ細胞濃度かつ同量の細胞懸濁液をアプライした場合であっても、培地交換の頻度を 2 日ごとに減少させた場合では、培養開始から 3 日目の時点で細胞の増殖が認められなかった (データ非表示)。以上から、マイクロ流路チップのチャンバー内という微小空間においても Tau-biosensor 細胞は生着・増殖が可能であること、およびマイクロ流路チップのチャンバー内での細胞培養においては培地交換の頻度が細胞の生存率へ影響を及ぼすことが示唆された。

マウス初代運動神経細胞の培養に関しては、 $0.25 \times 10^6\ \text{cells/ml}$ 以上の濃度において 96 well plate への細胞の接着、および軸索の伸長がみられた。一方で、マイクロ流路チップのチャンバー内での細胞培養に関しては、 $1.0 \times 10^6\ \text{cells/ml}$ の濃度でチャンバー内へアプライしたマウス初代運動神経細胞であっても、培養開始から 2 日目の時点においてスライドガラス上への細胞の接着が確認でき

なかった (データ非表示)。以上から、自作したマイクロ流路チップのチャンバー内でマウス初代運動神経細胞を培養する場合は、細胞濃度および培地交換の条件を更に高濃度・高頻度へと変更する必要があることが示唆された。また、マウス筋芽細胞の細胞培養に関しては、96 well plate 内での培養条件の検討を現在実施中である。

C. 神経細胞へ影響を与える筋細胞由来の液性因子の同定

前述の結果から、特殊培養チャンバーを用いたマウス初代運動神経細胞とマウス筋芽細胞の共培養系を樹立するための細胞濃度、および培地交換頻度の必要条件を確認することができた。今後これをマウス初代運動神経細胞とマウス筋芽細胞それぞれにおいて最適化し、神経細胞へ影響を与える筋細胞由来の液性因子の同定を実施する予定である。

D. 同定した液性因子が細胞内タウタンパクやマウス脳へ与える影響の解析

Tau-biosensor 細胞を用いた病的タウの凝集体形成評価のプロトコールは既に確立しており、解析に必要な AD マウスモデルは既に必要数確保できている。そのため今後は、神経細胞へ影響を与える筋細胞由来の因子の絞り込みを上記の神経-筋細胞共培養系を用いて実施した後に、同定した筋細胞由来の因子が細胞内タウタンパクや AD マウス脳へ及ぼす影響を検討予定である。

E. 同定した液性因子の血中・髄液中濃度と高齢者の認知機能との相関関係の解析

2021年4月から2022年12月の間で、同意が得られた高齢者118名の血液・脳脊髄液検体の採取と

表 1. 参加者の特徴
Table 1. Participant characteristics.

Clinical diagnosis	HC	MCI	Dementia	P value
No.	7	76	35	
Age, years, mean (SD)	74.1 (8.5)	76.4 (7.0)	79.6 (7.6)	0.05
Sex, male, n (%)	6 (85.7)	35 (46.1)	8 (22.2)	< 0.0001
MMSE	28.9 (1.1)	23.7 (4.4) ^a	17.8 (5.9) ^{a,b}	< 0.0001
CSF biomarkers for AD diagnosis				
Aβ42, pg/ml, mean (SD)	1212.9 (370.9)	717.1 (301.5) ^a	582.0 (208.7) ^a	< 0.0001
Phosphorylated tau, pg/ml, mean (SD)	49.3 (23.7)	74.7 (36.2)	76.2 (41.4)	0.21
p-tau/Aβ42, mean (SD)	0.043 (0.020)	0.125 (0.090) ^a	0.144 (0.087) ^a	< 0.05

Age was compared by the Tukey-Kramer test followed by ANOVA. MMSE and, CSF biomarkers for AD diagnosis were compared by the Kruskal-Wallis test followed by Steel-Dwass multiple comparison tests. The sex ratio was analyzed using the Chi-square independence test. ^a $P < 0.01$ compared to control, ^b $P < 0.01$ compared to MCI. ANOVA; analysis of variance, CSF; cerebrospinal fluid, AD; Alzheimer's disease, HC; healthy controls, MCI; mild cognitive impairment, MMSE; Mini-Mental State Examination, SD; standard deviation.

認知機能検査を実施した。また、専門医による認知症の臨床診断、および脳脊髄液中の AD バイオマーカー (Aβ42, リン酸化タウ) 量の測定も全被験者を対象に実施した (表 1)。その結果、軽度認知機能低下 (mild cognitive impairment; MCI) の方、および認知症患者が全被験者の 90% 以上を占め、そのなかには、AD バイオマーカーが陽性となる (AD の脳内病理の存在が強く疑われる) 患者が含まれていることが確認できた。この結果から、各臨床診断区分間の筋由来の液性因子量の比較や、認知機能や AD バイオマーカーと筋由来の液性因子量の関係の検討に必要な検体は既に十分量確保できていると考えられる。

考 察

本研究により、特殊培養チャンバーを用いたマウス初代運動神経細胞とマウス筋芽細胞の共培養系を樹立するための細胞濃度、および培地の交換頻度の必要条件を確認することができた。今後、微小空間におけるマウス初代運動神経細胞、およびマウス筋芽細胞における培養方法の最適化を行うために、細胞濃度や培地交換頻度の追加検討が必要であると考え。特にマウス初代運動神経細胞においては、同じ細胞濃度であっても 96 well plate を用いた場合では細胞培養が可能であるが、マイクロ流路チップを用いた場合では細胞の生着がみられなかった。この結果は、マイクロ流路チップを用いた培養では細胞の生存に十分な量の栄養

や水分が確保できていないことを示唆していると考えられる。そのため今後は、最適な培地の交換頻度の検討を中心としたマウス初代運動神経細胞の培養条件の検討を実施し、神経-筋細胞の共培養系の樹立、および各培養チャンバー内の液性因子の解析を行う予定である。現時点で既に十分量のマウスおよびヒト検体が確保できているため、上記の細胞系を樹立し、標的となる筋細胞由来の液性因子を絞り込むことができれば、本研究課題は飛躍的に進展すると考えられる。

総 括

特殊培養チャンバーを用いたマウス初代運動神経細胞とマウス筋芽細胞の共培養系を樹立するための細胞濃度、および培地の交換頻度の必要条件が確認できた。今後は、最適な培地の交換頻度の検討を中心としたマウス初代運動神経細胞の培養条件の検討を実施し、マイクロ流路チップを用いた神経-筋共培養系の樹立、および各培養チャンバー内の液性因子の解析を行う。

運動による認知症発症予防効果の分子生物学的な根拠を得ることができれば、運動習慣や生活内容の改善による健康寿命延伸を目指すための重要な科学的裏付けとなる。

謝 辞

本研究は、公益財団法人明治安田厚生事業団による第 37 回若手研究者のための健康科学研究助成のご支援により実施いたしました。本研究課題をご採択・ご支援いた

だいた関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Erickson KI, et al. (2011): Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**(7), 3017-3022.
- 2) Ferri CP, et al. (2005): Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, **366**(9503), 2112-2117.
- 3) Gómez-Isla T, et al. (1997): Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **41**(1), 17-24.
- 4) Holmes BB, et al. (2014): Proteopathic tau seeding predicts tauopathy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**(41), E4376-4385.
- 5) Imai J, et al. (2008): Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science*, **322**(5905), 1250-1254.
- 6) Livingston G, et al. (2017): Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet*, **390**(10113), 2673-2734.
- 7) Shima T, et al. (2017): Moderate exercise ameliorates dysregulated hippocampal glycometabolism and memory function in a rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia*, **60**(3), 597-606.