

## 論文の内容の要旨

論文題目 慢性脳虚血がアルツハイマー病における

アミロイド  $\beta$  の蓄積を亢進させる機序について

モデルマウスを用いた検討

氏名 坂内 太郎

【序文】 認知症の原因疾患は、アルツハイマー病（AD）が最も多く、レビー小体病がそれに次ぐ。しかし、高齢者においては特に、それらの変性疾患が単独で存在することはほとんどなく、もう一つの脳の老化現象である「慢性脳虚血」の併発が確実といえる。ヒトでは、慢性脳虚血の併発は認知症の症状を悪化させる事が広く知られており、その分子的基盤として慢性脳虚血状態にさらされたアルツハイマー病モデルマウスの脳では、アミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) の蓄積が促進されることが知られている。ところが、慢性脳虚血が脳内で  $A\beta$  の代謝をどのように変化させるのかという根本的なメカニズムについては依然不明である。本研究の目的は、脳内における  $A\beta$  の代謝に及ぼす慢性脳虚血の影響について、モデルマウスを用いて検討し、慢性脳虚血が AD における  $A\beta$  蓄積を亢進させる機序を解明することである。

【方法】 1. 野生型マウス（C57BL/6J マウス）に対し両側総頸動脈狭窄（BCAS）術を施行し、慢性虚血状態が保たれていることを、脳表血流の測定、および、脳梁粗鬆化の病理学的評価により確認した。2. AD モデルマウス（APP/PS1 マウス）に対して BCAS 術を施行し、Y-maze test により空間作業記憶を評価した。3. APP/PS1 マウスに対して BCAS 術を施行し、慢性脳虚血下で脳内  $A\beta$  の蓄積が亢進することを確認した。4.  $A\beta$  産生量を制御する  $\beta$  セクレターゼ・ $\gamma$  セクレターゼ、 $A\beta$  の特異的分解酵素である Neprilysin 等の変動を測定し、 $A\beta$  代謝に関わる因子を評価した。5. 慢性脳虚血が脳内の  $A\beta$  代謝に与える影響を直接測定すべく、脳微小透析法を用いて慢性脳虚血下における脳内  $A\beta$  代謝の動的な変化を解析した。6. 慢性脳虚血下で  $A\beta$  の凝集が促進されていることを直接確認するため、脳抽出液の PBS 可溶性画分のゲル濾過クロマトグラフィーを行った。7. BCAS 術後の AD モデルマウスの髄腔内注入した蛍光トレーサーの動態を 2 光子顕微鏡で観察することで、慢性脳虚血により脳間質液のフローが停滞することを確認した。

【結果・考察】 1. C57BL/6J マウスに対して BCAS 術を施行し、レーザードップラー血流計での

脳表血流の測定、および、脳梁の粗鬆化の病理学的評価により、BCAS 術による慢性脳虚血モデルマウスの作成が、問題なく再現できていることを確認した。さらに、APP/PS1 マウスに対して BCAS 術を施行し、術後 5 週の段階では空間作業記憶が低下しないことを示し、BCAS 術により脳内での A $\beta$  蓄積が亢進することを、病理学的に確認した。一方で、脳内 A $\beta$  量を変動しうる因子が、BCAS 術により変化しないことを、生化学的に確認した。さらに、BCAS 術後の APP/PS1 マウスにおいて、段階的脳抽出液中の不溶性画分における A $\beta$  量が増加していること、および、脳間質液中の A $\beta$ 40, 42 の総量が減少し、A $\beta$ 42 の半減期が短縮していることを見出した。BCAS 術後の AD モデルマウスにおいて、不溶性画分における A $\beta$  量が増加していること、および、脳内 A $\beta$  単量体の総量が減少しクリアランスが亢進していることから、慢性脳虚血が脳内 A $\beta$  の凝集を亢進させる、すなわち、モノマー $\rightarrow$ オリゴマー $\rightarrow$ プロトフィブリル $\rightarrow$ フィブリル $\rightarrow$ プラークの平衡が右に傾くことにより、A $\beta$  の沈着が促進されるのではないかと仮説を立て、その検証のために以降の実験を行なった。

2. 慢性脳虚血により脳内 A $\beta$  の凝集が促進される：上記仮説の検証のため、まず、脳抽出液 PBS 可溶性画分のゲル濾過クロマトグラフィーを行い、各フラクション中の A $\beta$ 42 量を ELISA 法により測定したが、BCAS 術後 15 週（25 週齢）では、より高分子量の分子種の状態へシフトする傾向にあり、慢性脳虚血により A $\beta$  の凝集が促進されることが示唆された。さらに、慢性脳虚血状態が、A $\beta$  沈着を促進させる環境であることを確認するため、BCAS および sham 術後の AD モデルマウスの海馬に A $\beta$  抽出液を注入し、その後の沈着の程度を病理学的に確認したが、sham 術後に比して BCAS 術後では、A $\beta$  の沈着が亢進し、慢性脳虚血状態そのものが、A $\beta$  の蓄積を促進する環境であることが示唆された。さらに、脳槽に注入した脳脊髄液トレーサの血管壁に沿った脳内への流入、脳実質への拡散を、2 光子顕微鏡を用いて観察した。sham 術後マウスでは、脳脊髄液トレーサーが流入し始めてから 25 分程度で蛍光強度がプラトーに達したのに対し、BCAS 術後マウスでは、プラトーに達するまでに 60 分程度を要し、sham 群に比して著明に延長していた。これらの結果から、BCAS 術後マウスでは、sham 術後マウスに比して、脳間質液のフローが停滞していることが示唆された。以上のことから、慢性脳虚血下では、脳間質液のフローが停滞することで、脳間質での A $\beta$  の凝集が促進され、結果として脳内における A $\beta$  の沈着が亢進する可能性が考えられた。

【結論】 本研究ではまず、APP/PS1 マウスに対し BCAS 術を施行し、慢性脳虚血状態を誘導することで、脳内で A $\beta$  の沈着が促進することを示した。脳抽出液の不溶性画分における A $\beta$ 40, 42 量が増加する傾向にあること、脳間質液中の A $\beta$ 40, 42 量が低下し、A $\beta$ 42 の半減期が短縮していたことから、慢性脳虚血が脳内 A $\beta$  の凝集を促進させるのではないかと仮説を立てた。その検証のため、慢性脳虚血により、脳抽出液中の可溶性高分子量 A $\beta$  分子種が増加する傾向にあること、および、慢性脳虚血下では脳間質液のフローが停滞することを確認した。以上から、慢性脳虚血により、脳間質液のフローが停滞し、脳内 A $\beta$  の凝集が促進されることで、脳内 A $\beta$  の蓄積が亢進する可能性が考えられた。