

論文の内容の要旨

論文題目 アルツハイマー病モデルマウスの神経炎症に対するアセチルコリン系改善作用

氏名 松田 孟士

【序論】

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) は、現在、高齢化に伴う爆発的な患者数の増加が懸念されているが、いまだに根本的な治療法・予防法は確立されていない。臨床では、AD 患者に対して、脳内のアセチルコリン系のはたらきを高めるコリンエステラーゼ阻害剤が投与されているが、その作用メカニズムは不明な点が多い。また、これまでの研究により、AD の病態は大まかに、アミロイド病変、リン酸化タウ病変、神経細胞死のように進行すると一般的に考えられているが、いつ・どのように AD の主要な臨床症状である記憶機能障害が引き起こされるかは依然として未解明な部分が多いままである。近年の研究で、AD 病態に密接に関わる $A\beta$ ・リン酸化タウに次ぐ第三の因子として、神経炎症が注目されている。また、最近、その神経炎症に対して、脳内のアセチルコリンシステムの関与が示唆されている。そこで本研究では、記憶障害発症機構と神経炎症の関わり、および神経炎症に対するアセチルコリン系の作用を調べ、AD の記憶障害をもたらす病態メカニズムとその改善メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】

本研究では、2型糖尿病併発型 AD (type 2 diabetes mellitus-AD, T2DM-AD) モデルマウスに対し、アセチルコリン系薬剤であるコリンエステラーゼ阻害剤 Rivastigmine を長期間投与し、記憶機能と神経炎症の動態を解析した。過去の数多くの疫学研究により、2型糖尿病が AD 発症の強力なリスクファクターであることが確認されており、本研究では高脂肪食 (high fat diet, HFD) を長期間給餌することにより、その病態を誘導した。

具体的に、本研究では、野生型 (wild type, Wt) マウスに通常食 (normal diet, ND) を給餌した Wt-ND、家族性 AD の原因遺伝子変異を有するトランスジェニック (transgenic, Tg) マウスに ND を給餌した Tg-ND、Tg マウスに 4 か月齢から 8 週間 HFD を給餌し、生理食塩水を皮下投与した T2DM-AD-Vehicle、コリンエステラーゼ阻害剤 Rivastigmine を皮下投与した T2DM-AD-Rivastigmine の 4 群で比較・解析を行った (Figure 1)。なお、Rivastigmine は 4.5 か月齢にて皮下に浸透圧ポンプを埋め込み、6 週間継続投与した (2 mg/kg/day)。AD はその病態の進行とともに徐々に中枢神経系ニューロンの障害が起こるが、その一方で、海馬で産生される新生ニューロンはその補填的機能を果たす。また、その新生ニューロンは神経炎症の影響を多大に受け、その産生プロセスおよび成熟プロセスが変調するとされている。よって、海馬新生ニューロンの解析のため、5 か月齢にてマウスに BrdU あるいはレトロウイルスを注入して海馬新生ニューロンを標識した。マウスは 6 か月齢にて記憶試験を行った後、サンプリングし、各種実験を行った。

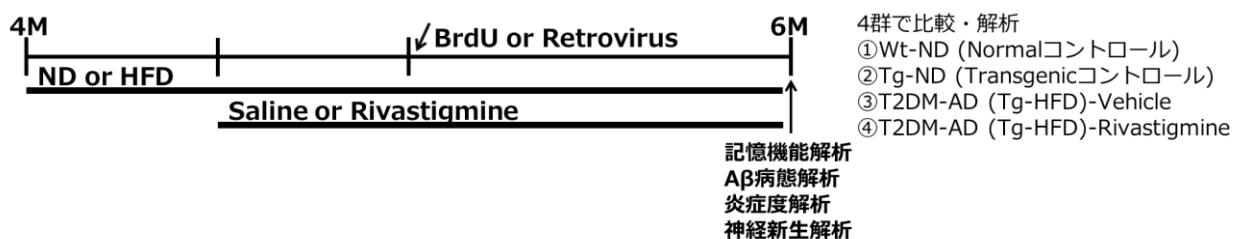


Figure 1. 本研究のタイムライン

上記 4 群のマウスに対し、6 か月齢にて、記憶機能、 $A\beta$ 病態、神経炎症度、海馬ニューロン新生を調べた。

【結果・考察】

1. アルツハイマー病モデルマウスにおける記憶機能低下とそのアセチルコリン系薬剤による改善

Wt-ND、Tg-ND、T2DM-AD-Vehicle、T2DM-AD-Rivastigmine の4群に対し、モリス水迷路試験・文脈恐怖条件づけ試験の2種類の行動試験を行った。その結果、T2DM-AD-Vehicle 群で Wt-ND 群に比べ、海馬に依存する空間記憶機能の障害が有意に認められた。また、Rivastigmine 投与群ではその記憶障害が回避されていた (Figure 2)。これらの結果から、T2DM-AD モデルマウスの海馬では、海馬依存性記憶課題の遂行が難しくなること、およびその記憶機能の障害は Rivastigmine の投与により改善されることを見出された。

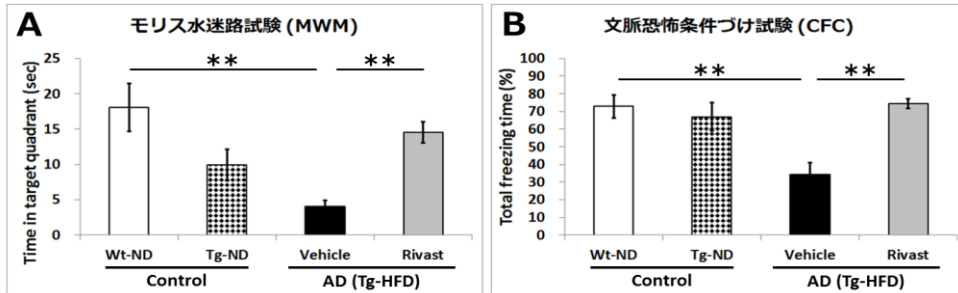


Figure 2. アセチルコリン系薬剤により、T2DM-AD マウスの障害された海馬依存性記憶は回復する
(A) モリス水迷路試験。(B) 文脈恐怖条件づけ試験。**: $p < 0.01$ 。

2. 記憶障害マウスの海馬における炎症反応はアセチルコリン系の薬剤により抑えられる

アストロサイト、ミクログリアといったグリア細胞は脳内の炎症により活性化し、その炎症部位に速やかに集積する。そこで、アストロサイトとミクログリアを蛍光標識し、グリア細胞の応答から炎症の度合いを評価した。その結果、Wt-ND 群に対し、T2DM-AD-Vehicle 群ではグリオースがみられ、活性化したアストロサイト・ミクログリアの細胞数が海馬で有意に増大していた。また、その活性化グリア細胞の増加は Rivastigmine の投与により有意に減少した (Figure 3)。さらに、グリア細胞の応答だけでなく、炎症性サイトカインの変動も同様に認められた (Figure 4)。よって、これらの結果から、T2DM-AD モデルマウスにおいてグリオースを中心とした神経炎症が海馬において顕著に見られること、またそれがアセチルコリン系薬剤 Rivastigmine によって抑制されることを見出された。

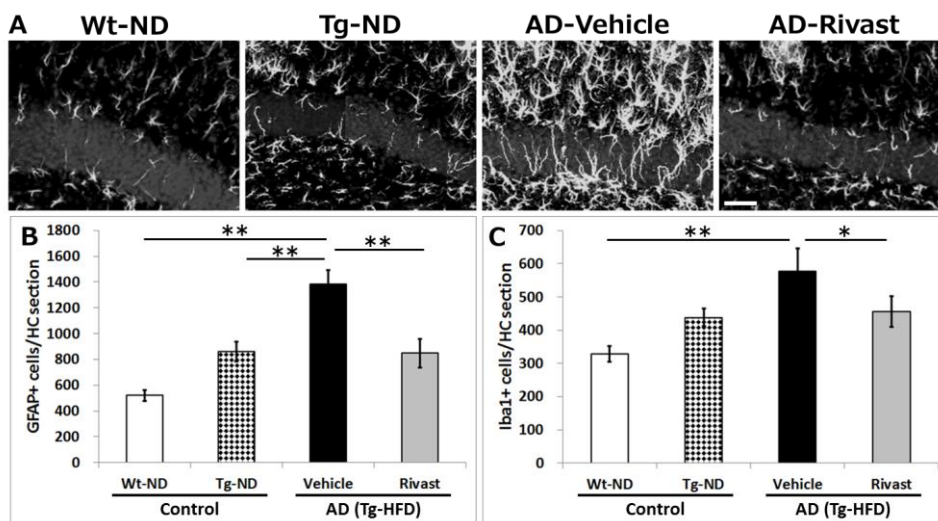


Figure 3. Rivastigmine により、グリア性炎症反応は抑制される

(A) 代表的な海馬アストロサイトの画像。(B) GFAP+アストロサイトの数。(C) Iba1+ミクログリアの数。

**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$. Scale bar, 50 μm .

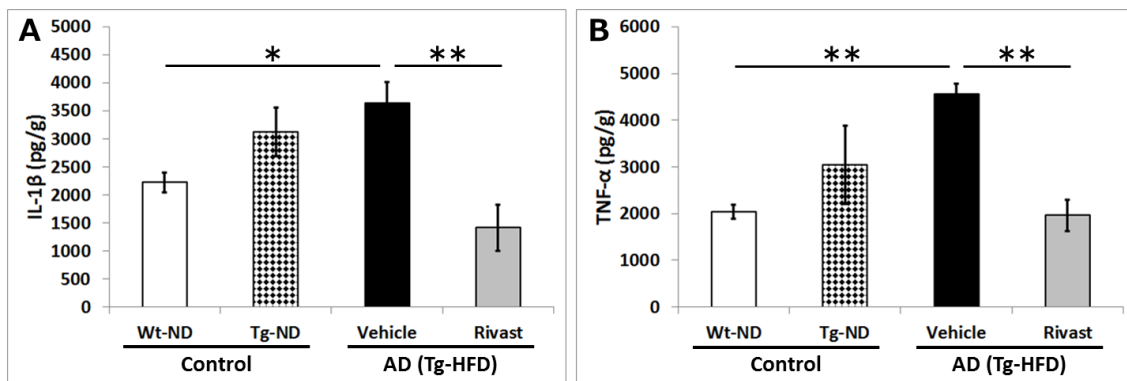


Figure 4. アセチルコリン系賦活により、海馬の炎症性サイトカインは野生型レベルまで減少する
(A) IL-1 β 。 (B) TNF- α 。 **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ 。

3. 炎症反応による海馬ニューロン新生の成熟障害とそのアセチルコリン系薬剤による改善

局所的な神経炎症により、成体海馬歯状回における新生ニューロンの産生・成熟プロセスは変調する。そこで、海馬で新生した細胞を BrdU で標識し、BrdU+/NeuN+細胞を測定することで海馬新生ニューロンの数を計測した。その結果、記憶機能が正常である野生型 Wt-ND 群に比べ、双方の T2DM-AD 群で有意に新生ニューロン数が増加していた (Figure 5)。しかし、その増加した新生ニューロン数は Rivastigmine の投与により変化していなかった。

次に、海馬の神経前駆細胞および未成熟ニューロンを doublecortin (DCX) 染色により標識し、それらの主要樹状突起の長さから、各新生顆粒細胞の成熟度を評価した。その結果、T2DM-AD-Vehicle 群で、Wt-ND 群に比べて DCX 陽性細胞の成熟度が有意に低いことが認められた (Figure 6)。また、Rivastigmine はその新生顆粒細胞の成熟障害を野生型マウスと同程度まで回復させていた。

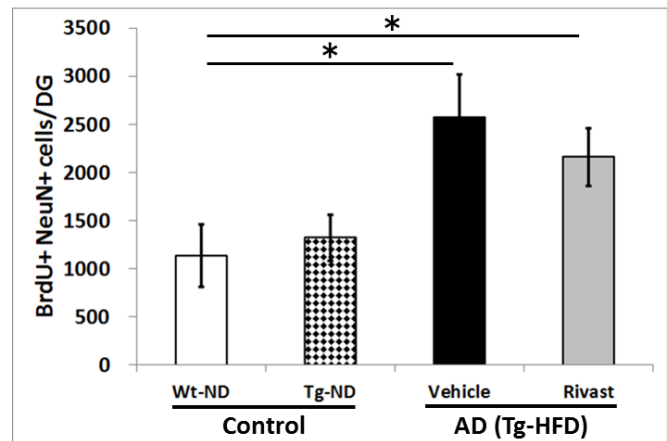


Figure 5. T2DM-AD マウスでは海馬新生ニューロンが増加する。新生ニューロン (BrdU+/NeuN+細胞) 数。
*: $p < 0.05$ 。

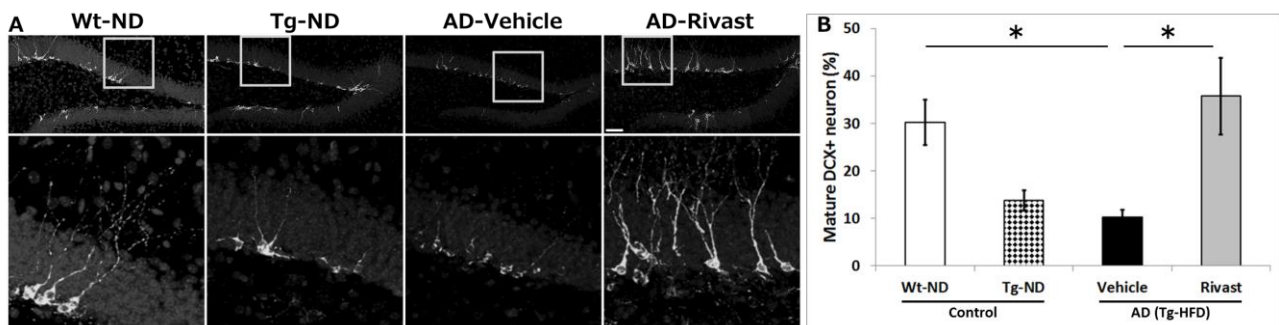


Figure 6. 新生顆粒細胞の成熟度は Rivastigmine により向上する

(A) 代表的な海馬歯状回の DCX+細胞。 (B) 成熟型 DCX+細胞の割合。 *: $p < 0.05$ 。 Scale bar, 50 μ m。

さらに、新生ニューロンの成熟度を詳細に調べるため、レトロウイルスで樹状突起 spine を GFP でラベルし、その成熟度を測定した。これらのマウスでは、海馬で分裂した細胞のみがレトロウイルスに感染して GFP で標識されるため、新生ニューロン特異的な微小細胞構造の観察が可能になる。その観察の結果、T2DM-AD-Vehicle 群の樹状突起 spine は野生型 Wt-ND 群に比べ、著しくその数と成熟度が障害されていた。また、Rivastigmine の投与により、それらの障害は回避されていた (Figure 7)。

これらの結果から、T2DM-AD モデルマウスの海馬において、神経炎症の悪化により、海馬で産生された新生ニューロンの数は有意に増大するが、その成熟度は障害され、それらの新生ニューロンは十分に成熟することができないまま、正常な新生ニューロンの機能を発揮できていない可能性が示唆された。

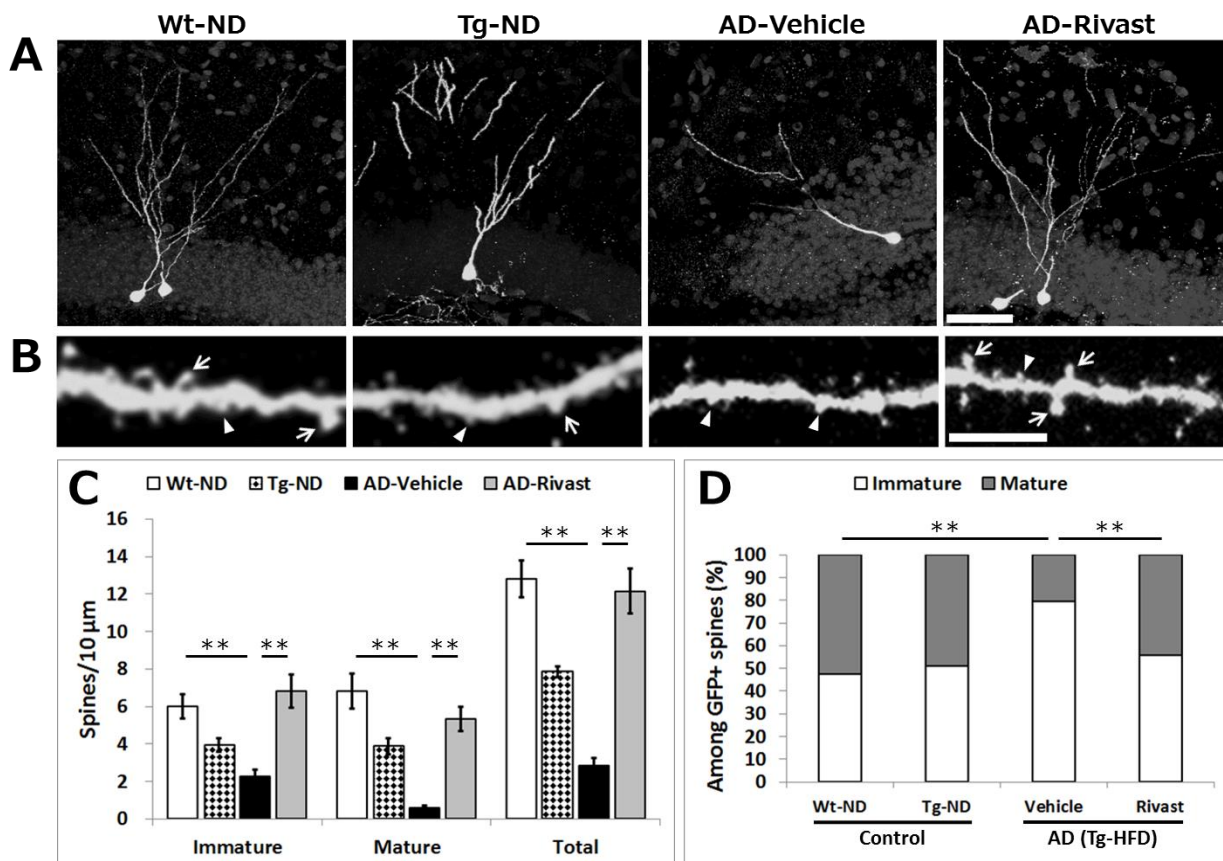


Figure 7. 海馬新生ニューロン樹状突起 spine の成熟度はアセチルコリン系調節により改善する代表的な新生ニューロン (A) と spine (B)。 (C) spine 密度。 (D) 成熟型 spine の割合。矢印: 成熟型 spine, 矢頭: 未成熟型 spine。 **: $p < 0.01$ 。 Scale bar, 50 μm (上), 5 μm (下)。

【結論】

6か月齢の Tg マウスは通常、野生型に比べて有意な記憶障害を示さないが、高脂肪食を長期間摂取させることではじめて記憶障害が誘導される。この結果は、2型糖尿病が AD の強力なリスクファクターであるという多数の疫学調査結果と合致しており、このモデルは 2型糖尿病病態により進行が加速されて記憶障害が引き起こされた AD の初期段階の病態をその表現型として有していると考えられる。この T2DM-AD モデルマウスで認められた海馬依存性記憶の障害は Rivastigmine によって回避されること見出されたが、それは神経炎症の悪化が抑制されることによることが示された。また、その T2DM-AD マウスの海馬の Aβ 病態は Rivastigmine の投与により有意に変化せず、早期の AD 様記憶障害は神経炎症のみを調節することにより、改善が望めることが示唆された。また、それらの T2DM-AD マウスとその薬剤治療マウスにおいて、海馬ニューロン新生の変動も観測され、AD の海馬依存性記憶障害の発症機序・回復機序の一部にニューロン新生が関与していることも推察された。