

博士論文

論文題目 神経活動とアミロイド β 蓄積の相互作用に関する
実験病理学的研究

氏 名 種井 善一

論文題目：神経活動とアミロイド β 蓄積の相互作用に関する実験病理学的研究

所属： 病因・病理学専攻 人体病理学・病理診断学分野

指導教員： 深山 正久 教授

申請者： 種井 善一

要旨

アルツハイマー病モデルマウスに対し、光遺伝学（オプトジェネティクス）を用いて海馬貫通線維路を 5 ヶ月間にわたって繰り返し刺激したところ、軸索投射終末にあたる海馬歯状回外分子層にアミロイド β ($A\beta$) 蓄積の増加を認めた。長期間の神経活動亢進に伴う $A\beta$ 蓄積の促進には、刺激の時期（マウス月齢）と期間が影響する可能性が考えられた。また、長期間刺激の経過中には、てんかん発作が誘発され、 $A\beta$ 蓄積に部分的に関与した可能性も推定された。本研究の結果から、長期間の神経活動の亢進が $A\beta$ 蓄積増加を来す可能性が実験的に示された。

目次

	頁
要旨	3
序文	6
目的	12
方法	
アルツハイマー病モデルマウスを用いた貫通線維路の長期刺激実験	
1. アルツハイマー病モデルマウス (A7 マウス)	13
2. アデノ随伴ウイルスベクター (AAV1) の作成	14
3. マウス大脳皮質初代培養神経細胞への AAV 感染	16
4. A7 マウスの右外側嗅内皮質への AAV 注入手術	19
5. A7 マウスの右外側嗅内皮質への光カヌラ埋め込み術	21
6. <i>in vivo</i> マイクロダイアリシス法	22
7. 脳間質液中 A β 濃度の定量	23
8. 光刺激	24
9. マウス脳の摘出	25
10. c-Fos 染色による神経活動の免疫組織化学的な評価	26
11. A β 蓄積量の免疫組織化学的な評価	29

	頁
結果	
1. マウス大脳皮質初代培養神経細胞を用いたウイルスの導入遺伝子の確認	31
2. 免疫組織化学を用いたウイルス導入遺伝子の確認と光刺激の成否に関する判定	31
3. 海馬歯状回外分子層（OML）における A β 蓄積	33
4. 外側嗅内皮質における A β 蓄積	36
5. SSFO マウスに見られた痙攣発作	37
6. A β 産生因子の免疫組織化学的な検討	38
7. 長期刺激個体における海馬間質液中の A β 42 濃度変化	38
考察	
1. 光遺伝学を用いた長期刺激における神経活動の評価	40
2. 長期の神経活動の亢進と A β 蓄積	41
3. 長期の神経活動の亢進と A β 分泌	43
4. 貫通線維路の長期刺激で生じた全身性痙攣	43
結論	46
引用文献	47
図表	56
謝辞	77

序文

アルツハイマー病は、記憶障害を中心とした認知機能障害を来す認知症で、認知症の原因の第一位を占める進行性の神経変性疾患である。認知症は、獲得された認知機能が後天的な障害によって進行性に低下し、日常生活や社会生活に支障を来たした状態¹と定義される。2012年の日本における認知症の有病率は15%、推定有病者数は462万人で、アルツハイマー病は認知症の原因の67.6%を占めると報告^{2,3}されていることから、患者数は300万人以上と推測されている。病理学的には海馬や新皮質を主とする大脳皮質の萎縮と神経細胞死を認め、老人斑 (senile plaque) や神経原線維変化 (neurofibrillary tangle)、ニューロピルスレッド (neuropil thread) の出現を特徴とする。老人斑はニューロピル (神経細胞や神経膠細胞などの細胞体の間に見られる網状の領域 (間質)) に出現する球状の構造物で、主な構成成分はアミロイドβタンパク質 (Aβ) である。また、神経原線維変化およびニューロピルスレッドは、リン酸化タウタンパク質の蓄積からなる嗜銀性構造物である。神経原線維変化は神経細胞内および細胞外に、火炎状や渦巻き状を呈する構造物として認められ、細胞外に存在するものは細胞死に陥った神経細胞の跡に残存したものと考えられている。ニューロピルスレッドはニューロピルに見られる糸状の構造物で、神経突起にリン酸化タウタンパク質が蓄積したものである。臨床病理学的には、神経原線維変化の広がりを評価する Braak stage (I/II : 嗅内野, III/IV : 辺縁系, V/VI : 新皮質) が認知機能と関連することが周知されている^{4,6}。一方で老人斑に関しては、その蓄積や広がり⁷

は認知機能低下に関連しないとの考え方が大勢を占めているが、近年の臨床病理学的な研究では神経原線維変化に比べると軽度であるものの、老人斑の量が認知機能低下の独立した危険因子であることを示す報告もある⁸。

アルツハイマー病の病因仮説としてアミロイド仮説が唱えられている⁹。A β 蓄積を上流の原因として、その下流でリン酸化タウの蓄積を含む神経変性が生じ、神経機能の障害や神経細胞死を来すという因果関係を主張するものである。この仮説はA β 蓄積が神経変性疾患ではアルツハイマー病に特異性の高い現象であること、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子がA β 産生に関わるタンパク質（アミロイド前駆体タンパク質APP¹⁰、プレセニリン1^{11,12}、プレセニリン2¹³）をコードし、その変異がいずれもA β の産生・凝集を高めること、また逆にアルツハイマー病の発症に抑制的に関与するAPPの変異（A673T）がA β 産生を低下させることから¹⁴、広く支持されている。タウは17番染色体に連鎖するFTDP-17（Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17）の病因遺伝子として同定されている^{15,16,17}。FTDP-17では、アルツハイマー病と異なりA β の蓄積は生じないが、リン酸化タウタンパク質が神経細胞内に蓄積し、細胞死を来す。これはリン酸化タウタンパク質の蓄積に伴って神経細胞死が生じることを意味し、アルツハイマー病における神経細胞死も細胞内に蓄積したリン酸化タウタンパク質に起因する可能性が考えられている。

A β はAPPから β セクレターゼ次いで γ セクレターゼによる二段階切断によって切り出され、細胞外へと分泌される。A β には、一次構造（末端長のバリエーション）

の異なる複数の分子種が見出されており、40 アミノ酸からなる A β 40が9割、A β 42が1割を占める。この中でC末端が僅かに長く、凝集性および毒性の強いA β 42が早期から老人斑に蓄積することが知られている¹⁸。

アルツハイマー病における老人斑（A β 斑）の形成時期に関しては、128名の家族性アルツハイマー病患者の縦断的研究から、認知症症状の出現する約15年前から脳アミロイドイメージングを用いてA β 蓄積が検出されることが示されている¹⁹。この縦断研究では、症状出現の約5年前からMini-Mental State ExaminationやClinical Dementia Rating scaleを用いて認知機能障害が認められ、症状出現の平均3年後に認知症の診断基準を満たすことも示されており、認知機能障害の出現やアルツハイマー病発症の10年以上前から、A β 蓄積が生じていることが明らかとなった。さらに、FDG-PETや脳アミロイドイメージングなどを用いた764名のアルツハイマー病患者の縦断的な臨床画像研究から、楔前部や後部帯状回などの安静時に神経活動の高いdefault mode networkと呼ばれる領域に、多量のA β 蓄積を認めることが報告されている²⁰。

以上のような細胞外腔におけるA β の蓄積には、脳間質液中におけるA β 濃度の上昇が関与するものと想定されてきた²¹。脳内のA β 産生は、主に神経細胞が担っていると考えられている²²。神経細胞からのA β 分泌には、実験的に神経活動の関与が考えられており、薬理的あるいは電気的な刺激により神経活動を上昇させると、分泌量が20-30%増加することが、初代培養神経細胞、海馬器官培養、また本研究におい

でも応用した，脳間質液を半透膜プローブで回収する *in vivo* マイクロダイアリシス法により示されてきた^{23,24}。また，神経活動依存的な A β 分泌は，エンドサイトーシスを介することも *in vivo* マイクロダイアリシス法により示されている²⁵。このように，神経細胞からの短期的な A β 分泌に関しては種々の検討が重ねられてきたが，A β の蓄積は慢性の経過で生じるものであり，長期的な神経活動の変化が A β の分泌や蓄積に及ぼす影響については，実験的知見が殆ど存在しない。近年，アルツハイマー病モデルマウスの髭を毎日刺激することにより，感覚神経の入力部位である体性感覚野バレル皮質に A β 沈着の増加を認めたという報告²⁶ がなされているが，A β 蓄積と神経活動亢進の生じた標的部位の対応関係などの詳細には不明の点が多い。

そこで我々は投射関係が確立されており，アルツハイマー病モデルマウスにおいて A β 蓄積が見られる貫通線維路 (perforant pathway) に着目し，この経路に長期間の反復刺激を与え，投射先に生じる病理組織学的変化に着目することにした (図 1)。刺激方法としては，光遺伝学 (オプトジェネティクス) を用いることで，脳領域および細胞種特異的に長期間刺激する方法を新たに確立し，*APP* を神経細胞特異的に発現したアルツハイマー病モデルマウスを用いて，長期間の貫通線維路の活性化が A β の分泌と蓄積に与える影響を検討した。貫通線維路は嗅内皮質の II 層の大型錐体神経細胞が海馬歯状回分子層へ投射する経路であり，外側嗅内皮質から起始する線維は歯状回外分子層へ投射する²⁷。アルツハイマー病モデルマウスを用いた過去の報告では，貫通線維路を外科的に切断や傷害すると海馬の A β 蓄積が減少すること²⁸⁻³⁰，嗅内皮

質に *APP* を過剰発現すると同側海馬の $A\beta$ 蓄積が増加することが示されており³¹, 貫通線維路が海馬の $A\beta$ 蓄積に密接に関与することが分かっている.

光遺伝学は遺伝学的手法を用いて神経細胞に光感受性開口チャネルを発現させることで, 光を用いた神経活動制御を可能とする実験手法である. 神経細胞に発現させる光感受性タンパク質の種類により, 神経細胞活動を増加もしくは抑制することが可能で, 発現する細胞種や部位の特異性, 時間分解能に優れている. 最も汎用されるチャネルロドプシン 2 はクラミドモナスから発見された光開口性陽イオンチャネルで, 開口時間は 13.5 ms と短時間作用性であるが³², 今回用いたその改変体 (C128S, D156A) である Stabilized step function opsin (SSFO) は 1 回の光刺激で脱分極状態を約 30 分間持続させる特性を有し, 活動電位の発生確率を長時間に亘って上昇させることが示されている³³. 我々は 1 回の光照射で高効率に $A\beta$ 分泌を促すため, この長時間作用性の陽イオンチャネルである SSFO を使用した.

私と共同研究を展開してきた, 東京大学大学院薬学系研究科 臨床薬学教室の山本薫氏の研究において, 外側嗅内皮質に SSFO を発現させたアルツハイマー病モデルマウスを短期的に光刺激し (473 nm, 4 mW, 毎分 2 秒, 連続 4 時間), *in vivo* マイクロダイアリシス法で海馬間質液を回収した場合, $A\beta$ 濃度が約 24 %増加することが分かった. この増加の程度は, 既報の薬理的および電氣的な刺激による $A\beta$ 分泌と同程度であり, オプトジェネティクスを用いた系により, 同程度の効果を持つ短期刺激を再現することが可能であるものと考えられた. 本研究においては, 山本薫氏と筆

者が確立した本実験系を用いて長期的な神経活動刺激を系統的に行い，病理組織学的に A β 斑蓄積を検討した結果を主に報告する．また，刺激時期（マウス月齢）や刺激期間と A β 斑蓄積の関係，さらに *in vivo* マイクロダイアリシス法を用いた長期刺激下における A β 分泌の検討に関しても報告する．

目的

本研究の目的を改めて要約する.

光遺伝学を用いて, 長期的な神経活動の亢進が $A\beta$ 蓄積病理に及ぼす影響を調べる.

方法

本研究は東京大学動物実験実施規則に則って施行した。試薬は特級もしくはそれに準ずるものを用いた。

アルツハイマー病モデルマウスを用いた貫通線維路の長期刺激実験

1. アルツハイマー病モデルマウス (A7 マウス)

神経病理学分野で作製された *APP* トランスジェニックマウスである A7 マウスを用いた。A7 マウスは、神経細胞特異的発現の得られる Thy 1.2 プロモーター下に、家族性アルツハイマー病変異であるスウェーデン型変異 (K670N/M671L) およびオーストリア型変異 (T714I) を併せ持つヒト *APP* を過剰発現したマウスである³⁴ (図 2)。スウェーデン型変異は A β の N 末端側に位置し、 β セクレターゼと *APP* の親和性を高めて、A β 総産生量を増加させる。また、オーストリア型変異は A β の C 末端側に位置し、 γ セクレターゼによる切断を変化させて、凝集性の高い A β 42 比率を増加させる変異である。

作出にあたっては、Thy 1.2 プロモーターを含む pTSC21K ベクター (Novartis Pharma. AG 社より供与) に、上記の 2 変異を併せ持つヒト APP695 cDNA コンストラクトを接合させて、transgene が作製された。C57BL/6J 系統と BDF1 系統を交配させた雌マウスから前核期胚を得、予め Not I で消化した transgene 直鎖 DNA を顕微注入し、偽妊娠させた CD-1 系統のレシピエントマウスの卵管内に移植した。このレシピエントマウスの出産予定日前日に子宮切断術を用いて胎仔を摘出し、特定の

病原生物が存在しない環境である SPF (specific pathogen free) 環境下にて飼育した。

A7 マウスでは、内因性マウス *APP* の約 1.4 倍のヒト *APP* 発現が見られ、 $A\beta$ 42 が主に産生され、E15.5-E17.5 胎仔の脳皮質初代培養神経細胞にて培養 5-7 日目に産生された $A\beta$ 分子種を解析すると、 $A\beta$ 42 量は $A\beta$ 40 量の 3.5 倍であることが確認されている（東京大学大学院薬学系研究科 臨床薬学教室 堀由紀子博士の博士論文を参照）。免疫組織化学的には 9 月齢頃から脳皮質などに加齢依存的に $A\beta$ の蓄積が見られ、雌においては $A\beta$ の蓄積が雄よりやや早発し、11 月齢頃より海馬にびまん性の $A\beta$ 斑を認める。本研究では $A\beta$ 蓄積の早い、雌マウスを使用した。

2. アデノ随伴ウイルスベクター (AAV1) の作成

2-1. バキュロウイルス用 AAV ベクターの作成（山本薫氏による）

pAAV-CaMK II α -SSFO-EYFP（Stanford 大学, Karl Deisseroth 教授供与）から SSFO-EYFP 配列を切り出し、マルチクローニングサイトを持つ pBluescript-CaMK II α -GFP-WPRE（神経生化学教室, 尾藤晴彦教授供与）の GFP 配列と組み換えた。次に CaMK II α -SSFO-EYFP-WPRE 配列をバキュロウイルス用 AAV ベクター pFBAAV-CAG-EGFP-WPRE（尾藤教授供与）の CAG-EGFP 配列と組み換え、pFBAAV- CaMK II α -SSFO-EYFP-WPRE を作成した。また、コントロールとして EYFP のみが接続された pFBAAV- EYFP-WPRE を作成した。

2-2. バキュロウイルスの産生（山本薫氏による）

pFBAAV ベクターを DH10Bac（バクミド作成用 *E.coli*）へ形質転換し、pFBAAV 内の発現カセットを bacmid DNA へ転位した。組換え bacmid DNA の選択は、大腸菌中での Blue/White スクリーニングで行った。この bacmid DNA を Sf9 細胞（尾藤教授供与）に Cellfectin II（Life Technologies）によってトランスフェクションし、SSFO リコンビナントバキュロウイルスを産生した。ウイルスのタイターを qPCR で確認し、SSFO-EYFP は 1×10^8 pfu/mL、EYFP は 8×10^7 pfu/mL であった（LightCycler3, Roche, 関係式：バキュロウイルス DNA 濃度が Y genome copy/mL の時、PEG-ProK 法の場合、タイターは Y/100 pfu/mL）。

2-3. AAV 大量産生と精製・濃縮

上記のバキュロウイルスと RepCap1 リコンビナントバキュロウイルス（尾藤教授供与）を MOI = 2 で Sf9 細胞へ重感染させ、遮光した 27 °C 振盪器で 3 日間培養して rAAV1 を大量産生した。バキュロウイルスを 60 °C、20 分の熱処理で不活化した後、AAV 精製用アフィニティー担体 (AVB Sepharose, GE ヘルスケア) で精製した。続いてウイルス溶出画分を限外濾過 (Amicon Ultra 100K-15, Millipore) で濃縮した。ウイルスのタイターを qPCR で確認し、SSFO-EYFP は 3.5×10^{13} genome copy (gc) /mL、EYFP は 3.4×10^{13} gc/mL であった (LightCycler3, Roche) (図 3)。ウイルス液は分注の上、-80 °C で保存した。

3. マウス大脳皮質初代培養神経細胞への AAV 感染

3-1. マウス大脳皮質初代培養神経細胞

実験医学, CLOSE UP 実験法「マウス海馬錐体細胞初代培養法」³⁵を参考にした.

3-1-a. カバーガラスの洗浄

500 mL ガラスビーカーに数百枚単位でカバーガラス (ϕ 12 mm, 丸型, 松浪硝子) を入れ, 50 mL のキシレンで 30 分以上, 振盪器上で洗浄した. キシレンを捨てた後, 50 mL のアセトンで 30 分以上洗浄する操作を 2 回行った. アセトンを捨てた後, 100 % エタノールを 100 mL 加えて 30 分以上洗浄し, 次に 70 % エタノールで一晩洗浄した. カバーガラスをピンセットで 1 枚ずつ取り分けて, キムタオル上で風乾させ, 50 mL の遠沈管数本にまとめた後, 数枚のオートクレーブバッグに包んで, オートクレーブした.

3-1-b. カバーガラスの PDL コート

洗浄したカバーガラスを 1 枚ずつ, 24 well プレートに置き, 滅菌蒸留水で調製し, 20 mM Tris-HCl を添加した 25 μ g/mL ポリ-D-リジン溶液 (354210, BD Bioscience) をカバーガラス 1 枚当たり 150 μ L スポットし, インキュベーター内で一晩静置した.

その後, ポリ-D-リジン溶液を除去し, 滅菌蒸留水で 3 回洗浄後, クリーンベンチ内で自然乾燥させ, 初代培養に用いた.

3-1-c. マウス大脳皮質初代培養神経細胞

胎生 15-16 日目の野生型マウス胎仔を用いた。頸椎脱臼した母体マウスから子宮を摘出し、氷冷した Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Ca, Mg free, 14175, Life Technologies) に浸し、子宮を切開して胎仔を摘出した。以下、作業は実体顕微鏡下、氷冷した溶液内で行った。胎仔を断頭して 20 % Fetal Bovine Serum (FBS) 添加 HBSS に浸し、脳を摘出した。クモ膜を除去した後、大脳皮質を分離して、20 % FBS 添加 HBSS を入れた 15 mL チューブ内に回収した。次に大脳皮質を 13 mL の HBSS で 3 回洗浄し、FBS 成分を除去した。酵素消化緩衝液 1 mL (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 7 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 25 mM HEPES を混合し、pH 7.2 に調製したもの)、酵素消化緩衝液で 20 mg/ml に調製したトリプシン溶液 1 mL (T1005, ≥6,000 BAEE units/mg protein, Sigma), MilliQ 水で 1 mg / 20 μL に調製した DNase I 溶液 20 μL (D5025, ≥2,000 Kunitz units/mg protein, Sigma) を混合し、0.22 μm フィルターを通して大脳皮質に添加した。時折タッピングしながら室温で 10 分間インキュベートした。その後、20 % FBS 添加 HBSS を 10 mL 加え、トリプシンによる消化反応を停止させた。13 mL の HBSS で 3 回洗浄した後、細胞分離緩衝液 2 mL (HBSS に 12 mM MgSO₄ · 7H₂O を添加)、DNase I 溶液 20 μL を混合し、0.22 μm フィルターを通して大脳皮質に添加した。P1000 チップで 15 回、P200 チップで 10 回程度緩徐にピペッティングし、大脳皮質を分離させた。その後、20 % FBS 添加 HBSS を 10 mL 加えて反応を完了させ、1,000 rpm, 4 °C で 5 分間遠心した後、

上清を除去してから、FBS medium 5 mL (Neurobasal medium (21103, Life Technologies) に 10 % FBS, 1 % ペニシリン/ストレプトマイシン, 1 % GlutaMAX (35050-061, Life Technologies) を添加) を加え緩徐にピペッティングして細胞を分散させた。細胞数を数え、 $6-8 \times 10^6$ cells/mL に希釈して、100 μ L ずつカバーガラスにスポットした。20 分間インキュベーター内に静置した後、カバーガラスに細胞が接着したことを確認して、37 $^{\circ}$ C に温めた FBS medium を 400 μ L/well ずつ加え、インキュベーター内で培養した。尚、培地の蒸発による浸透圧変化を避けるため、端の well は培養には使用せず、端の well および well 間の溝に温めた滅菌蒸留水もしくは Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline を満たした。Div 1 に 4 μ M シタラビン (Ara-C) を添加した Neuronal medium (Neurobasal medium に 2 % B27 (17504044, Life Technologies), 1 % ペニシリン/ストレプトマイシン, 1 % GlutaMAX を添加) に全量交換した。

3-2. AAV 感染

Div 4 にウイルスを感染させた。培地を半量に減らした後、細胞数の 5 倍量の genome copy のウイルスを培地に添加した。Div 26 に培地を除去して直ぐに 4 % Paraformaldehyde (PFA) を加え、10 分間静置して固定した。

3-3. 免疫細胞化学

細胞の接着したカバーガラスを Phosphate buffered saline (PBS: 8 mM Na₂HPO₄ (192-02815), 2 mM NaH₂PO₄ (196-02835), 131 mM NaCl, pH 7.4) で 5 分間, 3 回洗浄した後, ブロッキング液 (3 % Calf serum, 0.2 % Triton X-100) を 1 mL/well ずつ加えて室温で 15 分間インキュベートした. PBS で 5 分間, 3 回洗浄した後, 3 % Calf serum 添加 PBS で希釈した一次抗体 (表 1) をパラフィルム上でカバーガラスに 4 °Cで一晩反応させた. 次に PBS で 5 分間, 3 回洗浄し, 3 % Calf serum に希釈した二次抗体 (Alexa 標識抗マウス IgG 抗体, 抗ラビット抗体, 抗チキン抗体, Life Technologies , 2 µg/mL) および DRAQ5 (DR50200 , ImmunoChemistry Thechnologies, 2.5 µM) を室温で 1 時間反応させた. その後, PBS で 5 分間, 3 回洗浄し, 水溶性封入剤 PermaFluor (TA-030-FM, Thermo scientific) で封入した. 蛍光は共焦点顕微鏡で観察した.

4. A7 マウスの右外側嗅内皮質への AAV 注入手術

生理食塩水に溶解した抱水クロラール (C0073, 東京化成工業) 400 mg/kg を腹腔内投与して麻酔を導入・維持した. 数分後, 疼痛刺激への無反応を確認して, 眼科用白色ワセリン (丸石製薬) を両眼に塗布した. 70 %エタノールを頭部に散布して消毒後, 頭髪を剃毛し, 頭皮に 2 %キシロカインゼリー (アストラゼネカ) を塗布して頭部固定台 (502063, World Precision Instrument) に三点固定した. 手術中の体温低

下を防ぐため、38 °C前後に設定したヒートパッド (MP908-N, 真上電子) を敷いて保温した。以下の操作時には拡大鏡 (SZ61-60, オリンパス) を併用した。デジタルディスプレイ (942-B, Kopf) の付属した脳定位固定装置 (マウス用, 900LS, Kopf) に設置後、メスで頭皮正中を切開し頭蓋骨を露出した。前後軸 (矢状縫合) および水平軸 (前後左右の高さ) を合わせた上で (誤差範囲は 0.05 mm 以内に留めた), Bregma から後方 3.0 mm, 右側方 4.5 mm の頭蓋骨に歯科用ドリル (NE120, ナカニシ, 先端に超硬カッター ϕ 0.4 mm (BC1401, Minitor) を装着) で 0.5 mm 大程度の孔をあけた。フッ素系不活性液体フロリナート (3283, 3M) を充填した 10 μ L マイクロシリンジ (801N, Hamilton) をシリンジポンプ (KDS101, Kd Scientific) に設置し、同じくフロリナートを満たしたチューブとガラスキャピラリー (PG10165-4, World Precision Instrument) をシリンジに接続, 脳定位装置に固定した。ガラスキャピラリーは予めマイクロピペット・プレー (P-97, Sutter) と研磨器 (EG-400, ナリシゲ) を用いて先端径 100 μ m かつ先端角 40 ° に調製したものをを用いた。次にガラスキャピラリー先端にウイルス液を 1.0 μ L 充填した。ウイルス液には 10 %量の青色色素 (Fast blue) を混ぜ、注入量およびガラスキャピラリー刺入部からの漏出の有無を目視で確認するための目安とした。脳表に出血がないことを確認し、ガラスキャピラリーを脳表から深さ 2.5 mm まで垂直に緩徐に刺入し、2-3 分静置した後、ウイルス液 1.0 μ L を流速 0.1 μ L/分で注入した (図 4)。ガラスキャピラリー抜去時の逆流を防ぐため、注入後 10 分間静置してから緩徐に抜去した。最後に頭皮を 6-0 絹

糸で縫合して閉創した。マウスが覚醒するまでは 38 °C のヒートパッド上 (MP-916-N, 真上電子) にケージを置いて保温した。その後, ウイルス発現が十分に生じるまで, 4 週間以上飼育した (昼夜 12 時間サイクル, 室温 23-24 °C)。

以後, AAV1 (CaMKII α -EYFP) を右外側嗅内皮質に注入した A7 マウスを EYFP マウス, AAV1 (CaMKII α -SSFO-EYFP) を注入した A7 マウスを SSFO マウスとして記載する。

5. A7 マウスの右外側嗅内皮質への光カメラ埋め込み手術

ウイルス注入術から 4 週間以上をあけて, 光カメラ埋め込み手術を施行した。ウイルス注入術時と同様に麻酔後, 頭部を三点固定し, 頭皮を切開した。前回手術により増生した結合織を頭蓋骨から除去し, 脳定位固定装置で前後軸および水平軸を合わせた。Bregma から後方 3.0 mm, 右側方 4.4 mm の位置を確認し, 歯科用ドリルでウイルス注入時の頭蓋骨の小孔を 1.0 mm 大程度まで拡大して, 光カメラ (MFC_200/240-0.22_4.0 mm_ZF1.25_FLT, Doric) を脳表から深さ 2.25 mm まで垂直に緩徐に刺入した (図 4)。数分静置してから歯科用セメント (Super-Bond C&B, Sun Medical) を頭蓋骨全体に塗布し, 光カメラを固定した。

6. *in vivo* マイクロダイアリス法

6-1. 海馬へのガイドカメラ固定手術

「5. 光カメラ埋め込み手術」と同時に施行した。脳定位固定装置で前後軸および水平軸を調整後、Bregma から後方 2.8 mm, 右側方 0.5 mm の頭蓋骨に歯科用ドリルで 1.0 mm 大程度の孔をあけ, 38 ° の角度でダイアリスカメラを脳表から深さ 1.3 mm まで緩徐に刺入した (図 18-A)。数分静置してから歯科用セメントで光カメラと共に固定した。尚, 上記のダイアリスカメラはガイドカメラ (外筒, PEG-8, Eicom) にダミーカメラ (内筒, PED-8, Eicom) を装着し, キャップナット (AC-5, Eicom) で固定したものである。

6-2. 海馬間質液の回収

用時調製した artificial CSF (1.3 mM CaCl₂ (039-00475, 以下全て和光純薬), 1.2 mM MgSO₄ (131-00405), 3.0 mM KCl (163-03545), 0.4 mM KH₂PO₄ (169-04245), 25 mM NaHCO₃ (191-01305), 122 mM NaCl (1320-34, ナカライテスク)) に 0.15 % BSA (A9576, Sigma) を添加し, 0.1 μm PVDF フィルター (SLVV033RS, Millipore) で濾過した (以下, aCSF として記載)。流路をつなぐ FEP チューブ (φ 0.25 mm, Eicom) への Aβ 吸着を予防するため, aCSF を 2 時間還流して, BSA をコーティングした。脳間質液を回収する半透膜である 1,000 kDa プローブ (PEP-8-02, EiCOM) は MilliQ 水を通し, 100 % エタノールに 1 秒間浸

漬して再度超純水を還流して前処理とした。続いて 1,000 kDa プローブを流路に接続し, aCSF を還流した。流路は, シリンジポンプ (KDS101, Kd Scientific, 1.3 μ L/min) にセットし aCSF を充填したシリンジから, 1,000 kDa プローブ (マウス脳内) を経てローラーポンプ (ERP-10, Eicom, Speed 30, 約 1.3 μ L/min) を介し, 自動サンプル回収装置 (820Microsampler, Univentor) に至る。使用するマウスは抱水クロラル 400 mg/kg で麻酔し, 留置済みのダイアリス用ガイドカメラ (外筒) からダミーカメラ (内筒) を外して, 1,000 kDa プローブをゆっくり刺入した。また, 頭部に埋め込んである光カメラに光ファイバーを接続し, 光刺激当日はファイバーと電気刺激発生装置の接続のみでマウスに触れずに刺激を行えるようにした。マウスは全て回転ケージ (Raturn, BASi) で飼育し, 自由に行動可能な条件下で脳間質液を回収した (24 時間蛍光灯下)。自動サンプル回収装置には 0.25 mL チューブ (503-Q, QSP) をセットし, 4 $^{\circ}$ C に設定の上, 1 チューブあたり 30 分間隔で回収した。回収したサンプルはチューブにシールを貼付し, 解析まで 4 $^{\circ}$ C で保存した。

長期間刺激における海馬間質液中 A β 濃度の検討にあたっては, 光刺激 (473 nm, 4 mW, 2 秒) 前後 24 時間回収し, A β の定量には光刺激前4 時間と刺激後 9 時間のサンプルを用いた (図 18-B)。

7. 海馬間質液中 A β 濃度の定量

海馬間質液サンプルに等量の 1 M グアニジン塩酸塩溶液 (17319-85, ナカライテ

スク) を加えて室温で 1 時間以上インキュベートし, A β 凝集体の単量体化処理を行った. その後, A β 42 特異 ELISA (Human/Rat β Amyloid (42) ELISA Kit Wako, 和光純薬) を用いて A β 42 を検出した. キットの使用方法の概要を下記に示す.

予め室温に戻した BNT77 固相化マイクロプレートに, 上記の通りグアニジン塩酸塩でインキュベートしたサンプルを 100 μ L/well ずつ加え, プレートシールを貼付して 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた. シールをはがしてデカントで well 内の液体を捨てた後, キットに付属する洗浄液を 200 μ L/well 加えて捨てる洗浄操作を 5 回行った. 続いて HRP (Horseradish peroxidase) 標識抗体 (BC05) 溶液を 100 μ L/well 加え, シールを貼って 4 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた. その後, 洗浄操作を 5 回行い, TMB (tetramethylbenzidine) 溶液を 100 μ L/well 加え, シールして室温暗所で 2 時間程度反応させた. 反応停止液を 100 μ L/well 加えて酵素反応を停止させ, プレートリーダー (SpectraMax M2^e, Molecular Devices) で各サンプルおよびスタンダードの吸光度 (OD: 450 nm) を測定した.

8. 光刺激

光カヌラ埋め込み手術から 1 週間程飼育して, 長期間光刺激を開始した (ウイルス注入からは約 5 週後, 図 4). 光刺激の装置は, 電気刺激発生装置 (Master-8, A.M.P.I.) を 473 nm 青色レーザー (SDL-473-070 MFL, Shanghai Dream Lasers) に接続し, レーザーからマウス頭部に埋め込んである光カヌラまでを光ファイバーコード

(MFP_200/240/900-0.22_1 m_FC-ZF1.25(F), Doric) で繋いだ。マウスはディスプレイケージ (CT-S, ICM, 207 x 138 x 70 mm) で個別飼育し (昼夜 12 時間サイクル, 室温 23-25 °C), 毎日 1 回, 光刺激を施行した。光刺激の強度は, 光ファイバーコードの先端部を光パワー・メータ (8230E, ADCMT) で確認して 5.5 mW に調整し, 光カメラ先端部で 4 mW 相当の青色光を 2 秒間照射した (473 nm, 4 mW, 2 秒)。この光刺激を 3-5 ヶ月間, 毎日継続した (図 5)。

また, 長期刺激下 *in vivo* マイクロダイアリシスにおいては, 前日までの光刺激と同時刻に刺激を行い, その前後 12 時間の海馬間質液を回収した (図 18-B)。

9. マウス脳の摘出

光刺激による神経活動の変化を c-Fos 染色にて評価するため, 光刺激から 90 分後に還流固定し, 脳を摘出した。還流固定は, ジエチルエーテルで麻酔を導入後, 直ちに左心室から氷冷した PBS を 3 分間還流して右心房から脱血し, 続いて氷冷した 4 % PFA (P001, TAAB, PBS で調製, pH 7.4) を 7 分間還流した (Perista Pump, SJ-1211H, ATTO, 流速 4 mL/分)。その後, 断頭して頭蓋骨を除去し, 嗅球から延髄までを一塊として摘出し, 4 °C の 4 % PFA で更に一晩浸漬固定した。

10. c-Fos 染色による神経活動の免疫組織化学的な評価

10-1. パラフィン切片の作成

溝が付いた切り出し台であるブレインマトリックス (RBM-200C, ASI) を用い、固定脳を冠状断にて 2-3 mm 幅で 7 分割した。個体毎にサンプルパック (KA-1000, 栄研) に収納し、70 %, 90 %, 99 % (2 回) のエタノール (056-06967, 和光純薬) で脱水後 (各 2 時間, 最後の 99 % で overnight), キシレン (242-00087, 和光純薬) に置換し (3 時間, 2 回), 続いて 67 °C の液体パラフィン (165-14051, 和光純薬) に浸透した (3 回 : 2 時間 x 2 回 + overnight)。パラフィンに包埋してブロックを作成し、ミクロトーム (HYRAX S30, Zeiss) で 4 µm 厚に薄切し、MAS コートスライドガラス (FF-904, 松浪硝子) に貼付した。約 50 °C の湯浴で切片を数秒間伸展し、45 °C に設定した伸展板 (PS-53, Sakura Finetek) で 1 時間乾燥させた。切片とスライドガラス間の水分の残存を防ぐため、湯浴後は伸展板上でスライドガラスを数分間傾斜させて水分を切った後、水平に設置して乾燥させた。その後、37 °C のドライオーブン (PM-401, Sakura Finetek) で一晩乾燥させた。標本は 10 連続切片を 100 µm 毎に 5 セット作製した。

10-2. ヘマトキシリン・エオジン染色

パラフィン切片に脱パラフィン処理を行い (キシレン 3 回, 99 %, 99 %, 90 %, 80 %, 70 % エタノール, 切片を十分に溶液に馴染ませた上で各 2 分), 流水で 5 分

間洗浄した。カラッチヘマトキシリン液 (0.125 % ヘマトキシリン (088-07461, 和光純薬), 6.25 % 硫酸カリウムアルミニウム (011-02035, 和光純薬), 0.025 % 過ヨウ素酸ナトリウム (37233-30, 関東化学), 25 % グリセリン (075-00616, 和光純薬) を蒸留水に希釈, ヘマトキシリンは少量の純アルコールに溶解して添加) で 10 分間染色し, 流水で 10 分間色出しした。続いて 0.2 % エオジン液 (1 % エオシン Y 溶液 (051-06515, 和光純薬) を蒸留水で希釈) で 5 分間染色し, 脱水 (70 %, 80 %, 90 %, 99 %, 99 % エタノール, 各数秒), 透徹 (キシレン 3 回, 十分に馴染ませた上で各 1 分) を行った。最後にカバーガラス (0.12-0.17 mm 厚, 松浪硝子) と HSR 液 (10200, シスメックス) にて封入, 乾燥した。

10-3. 酵素抗体法による免疫組織化学

「10-2. H.E 染色」と同様にパラフィン切片に脱パラフィン処理を行い, 流水で 5 分間洗浄後, 各一次抗体に適した前処理を施した (表 1)。

Microwave 処理は 10 mM クエン酸緩衝溶液 (1.8 mM 無水クエン酸 (030-05525, 和光純薬), 8.2 mM 無水クエン酸三ナトリウム (203-13605, 和光純薬) を蒸留水に溶解, pH 6.0) もしくは 100 mM トリス塩酸緩衝溶液 (100 mM Tris-HCl (15504-020, Life Technologies) を蒸留水に溶解, pH 9.2) を電子レンジで沸騰させた後, 切片を浸して更に 10 分間沸騰させた。その後, 4 °C で常温まで冷まし, 流水で 10 分間洗浄した。

Proteinase K 処理は 37 °C の 100 µg/mL Proteinase K 溶液 (Proteinase K (9034, Takara) をトリス塩酸緩衝液 TS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6 に希釈) に 6 分間浸し, 流水で 10 分間洗浄した.

続いてブロッキングとして 10 % Calf serum 液 (非働化済ウシ胎仔血清 (26010-066, Life technologies) を PBS に希釈) を切片に載せ, 30 分間室温でインキュベートした. この際, 抗 GFP 抗体, 抗 c-Fos 抗体を使用する切片には, ブロッキング液に 0.1 % Triton-X100 (194854, MP Biomedicals) を添加した. そしてブロッキング液で至適濃度に希釈した一次抗体を載せ, 室温で一晩静置した (表 1). TS で 5 分間, 3 回洗浄し, 10 % Calf serum 液で 500 倍に希釈 (3 µg/mL) したビオチン化二次抗体 (抗マウス IgG 抗体 (BA-2000, Vrcctor) もしくは抗ラビット抗体 (BA-1000, Vector)) を載せ, 室温で 2 時間インキュベートした. TS で 5 分間, 3 回洗浄し, HRP を結合した avidin-biotin complex (ABC elite, PK-6100, フナコシ) と室温で 1 時間反応させ, TS で 5 分間, 3 回洗浄した. 220 µg/mL DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (347-00904, Dojindo)), 0.012 % 過酸化水素 (081-04215, 和光純薬) を含む TS 溶液に 5 分間浸して発色した. 流水で 5 分間洗浄後, カラッチヘマトキシリン液で 10 分間染色, 流水で 10 分間色出しし, 脱水, 透徹の上, HSR 液で封入した.

10-4. 組織観察

光学顕微鏡 (BX51, オリンパス) で観察し, CCD カメラ (DP71, オリンパス) で撮影した (4080 x 3072 ピクセル, 432 dpi, ISO-200, TIF ファイル).

10-5. 外側嗅内皮質および海馬歯状回における c-Fos 陽性細胞数の定量

酵素抗体法を用いた c-Fos 免疫組織化学において, 弱陽性から強陽性まで全てを陽性細胞として数え, 明らかに染色像の見られない細胞を陰性と判定した. また, 脳の還流固定や光カメラの刺入などに伴うアーチファクトと考えられる, 核濃縮の見られる神経細胞は評価対象から除外した.

外側嗅内皮質においては, II/III層の神経細胞を評価した. 海馬は歯状回顆粒細胞に関して評価した. いずれも刺激側および非刺激側を評価し, 総細胞数に占める陽性細胞数比率 (%) を算出した.

11. A β 蓄積量の免疫組織化学的な評価

「10. c-Fos 染色による神経活動の免疫組織化学的な評価」と同様にして, 免疫組織化学を施行した後, 下記の方法で, 歯状回外分子層および外側嗅内皮質における A β 蓄積面積を定量した.

貫通線維路の投射先である海馬歯状回外分子層に占める A β 陽性面積を, フリー画像解析ソフト Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いて定量した. 各個体 100 μ m

毎に 5 切片の両側海馬および外側嗅内皮質を「10-4. 組織観察」に記載した光学顕微鏡で撮影した(接眼 x10, 対物 x4). Image J に画像を取り込み, 「Freehand selection」ツールで各領域を選択した. 齒状回外分子層は hippocampal fissure を背外側縁, 海馬と間脳の境界を腹内側縁とし, 齒状回分子層の表層 1/3 の領域として選択した. 外側嗅内皮質はマウス脳アトラス³⁶を参照した. 「Analyze > Measure」機能で選択領域の面積を測定した後, 二値化を「Image > Adjust > Threshold」機能を用いて行い, 「Analyze > Analyze particles」機能で A β 陽性面積を測定した. A β 陽性面積/選択領域面積 x 100 から A β 陽性面積比率 (%) を計算し, 100 μ m 間隔 5 切片の平均値を算出した (図 7).

結果

アルツハイマー病モデルマウスを用いた貫通線維路の長期刺激実験

1. マウス大脳皮質初代培養神経細胞を用いたウイルスの導入遺伝子の確認

培養中の神経細胞を蛍光顕微鏡で観察すると、ウイルス感染 1 週間前後から EYFP の蛍光を示す神経細胞が少数認められた。ウイルス感染 3 週間には SSFO-EYFP (SSFO), EYFP 共に約 20 %の神経細胞に EYFP の蛍光を認めた。この結果から、作製したアデノ随伴ウイルスベクターが機能することが確認された (図 3)。

2. 免疫組織化学を用いたウイルス導入遺伝子の確認と光刺激の成否に関する判定

2-1. ウイルス導入遺伝子の発現範囲

ウイルス導入遺伝子の発現を待つため、ウイルス注入術から 4 週間以上マウスを飼育した。長期刺激を終えたマウスは、還流固定後、パラフィンに包埋し、パラフィン切片を作製した。ウイルス感染による EYFP の発現範囲を確認するため、パラフィン切片に抗 GFP 抗体 (A11122, Life Technologies) を用いて免疫染色を行った。EYFP の発現範囲には手術操作に伴う多少の個体差が見られたが、ウイルス注入部である Bregma から後方 3.0 mm の冠状断面においては、外側嗅内皮質を中心として背側は聴覚野から腹側は大脳皮質腹側端の皮質扁桃核付近まで (上下約 4.0 mm)、内側は海馬アンモン角 CA まで (左右約 2.5 mm) GFP 陽性像を認めた。前後方向へは約 3.0 mm の広がりをも認めた。また、外側嗅内皮質からの投射先に相当すると考えられる陽性像

がウイルス注入側の海馬歯状回外分子層や網状分子層をはじめとして、乳頭体、外側膝状体、視床後外側核、脳梁、帯状束、対側大脳半球などに見られた（図 6-A）。

2-2. ウイルス注入術の成否に関する判定

右外側嗅内皮質およびその投射先の右海馬歯状回外分子層に GFP 陽性像を認めるものを貫通線維路へのウイルス注入成功と判断した。10.5 月齢から 1 ヶ月間刺激群 EYFP : 6 例中 6 例, SSFO : 6 例中 5 例, 3 ヶ月間刺激群 EYFP : 6 例中 5 例, SSFO : 6 例中 5 例, 5 ヶ月間刺激群 EYFP : 10 例中 10 例, SSFO : 13 例中 11 例, 5.5 月齢から 5 ヶ月間刺激群 EYFP : 5 例中 5 例, SSFO : 4 例中 4 例, 12.5 月齢から 3 ヶ月間刺激群（SSFO のみ）6 例中 5 例を標的部位におけるウイルス導入遺伝子の発現が成功した例と判定した（図 5, 図 6-A）。

2-3. 長期刺激後の c-Fos 陽性像

c-Fos 染色（K-25, Santa Cruz）では EYFP マウスでは外側嗅内皮質、海馬歯状回顆粒細胞ともに少数の陽性細胞が散見される程度で、左右差を認めなかった（海馬歯状回の陽性細胞は全数の 1-3 %であった）。

SSFO マウスでは、光刺激後に痙攣を伴い、両側海馬歯状回顆粒細胞にびまん性（100 %）の陽性像を認めた（図 6-B）。また、両側大脳皮質にも広範な陽性像が見られた。

2-4. 貫通線維路の長期刺激の成否に関する判定

上記の免疫組織化学的な GFP および c-Fos の陽性所見を判定基準として、ウイルス導入遺伝子の発現成功例に加えて SSFO マウスでは刺激側海馬歯状回のびまん性 c-Fos 陽性例をウイルス注入術および光刺激の成功例として以下の解析に用いた。その内訳は 10.5 月齢から 1 ヶ月間刺激群 EYFP : 6 例中 6 例, SSFO : 6 例中 5 例, 3 ヶ月間刺激群 EYFP : 6 例中 5 例, SSFO : 6 例中 5 例, 5 ヶ月間刺激群 EYFP : 10 例中 10 例, SSFO : 13 例中 9 例, 5.5 月齢から 5 ヶ月間刺激群 EYFP : 5 例中 5 例, SSFO : 4 例中 4 例, 12.5 月齢から 3 ヶ月間刺激群 (SSFO のみ) 6 例中 4 例であった (図 5, 図 6-C)。

3. 海馬歯状回外分子層 (OML) における A β 蓄積

パラフィン切片を抗 A β 抗体で免疫染色し、歯状回外分子層に占める A β 陽性面積の比率 (A β burden) を算出した。

本研究で用いたアルツハイマー病モデルマウスである A7 マウスは、神経細胞特異的発現の得られる Thy 1.2 プロモーター下に、家族性アルツハイマー病変異であるスウェーデン型変異 (K670N/M671L, 総 A β 産生量を増加) およびオーストリア型変異 (T714I, 凝集性の高い A β 42 比率を増加) を併せ持つヒト APP を過剰発現したマウスである。免疫組織化学的には 9 月齢頃から大脳皮質などに加齢依存的に A β の蓄積が見られ、雌においては A β の蓄積が雄よりやや早発し、11 月齢頃より海馬

にびまん性の A β 斑を認める。参考までであるが、月齢毎の雄の A7 マウスにおける歯状回外分子層の A β burden を提示する。5.5 月齢および 10.5 月齢では 0 %, 11.5 月齢では 0.8 ± 0.6 %, 15.5 月齢では 7.0 ± 3.4 % の A β 蓄積を認めた (5.5 月齢 : n = 6, 10.5 月齢 : n = 5, 11.5 月齢 : n = 4, 15.5 月齢 : n = 13, 図 11)。本研究では雌マウスを使用しており、11.5 月齢以降の A β burden の実測値はやや増加すると推測される。

貫通線維路の長期刺激の結果、10.5 月齢から 1 ヶ月間刺激では、免疫組織化学的に A β 蓄積が僅かに見られる個体と、殆ど認められない個体が混在していた (図 8)。SSFO マウス、EYFP マウスの刺激側、非刺激側共に A β burden は約 0.1 % で、蓄積量の左右差を見出せなかった (SSFO : 刺激側 0.04 ± 0.02 %, 非刺激側 0.05 ± 0.02 %, $p = 0.73$, EYFP : 刺激側 0.13 ± 0.05 %, 非刺激側 0.12 ± 0.08 %, $p = 0.86$, Student's t-test, mean \pm SEM, 図 11)。

3 ヶ月間刺激では、個体間で蓄積量にばらつきが見られるものの、免疫組織化学的に歯状回分子層に斑状から帯状を呈する少量の A β 蓄積を認めた (図 9)。定量の結果、A β burden は約 1.0 % であり、蓄積量の左右差を見出せなかった (SSFO : 刺激側 1.3 ± 0.7 %, 非刺激側 0.8 ± 0.1 %, $p = 0.52$, EYFP : 刺激側 1.4 ± 0.8 %, 非刺激側 1.2 ± 1.0 %, $p = 0.88$, Student's t-test, mean \pm SEM, 図 11)。 (上記, 1, 3 ヶ月間の刺激結果は、山本薫氏の平成 24 年度修士論文にも収載されている。本論文では再解析を行った結果を提示した)。

続いて5ヶ月間刺激では、免疫組織化学的に歯状回外分子層に帯状のA β 蓄積を8割の個体に認め、海馬全体の蓄積量に増加が見られた。EYFPマウスでは刺激側、非刺激側に同程度の蓄積が見られたが、SSFOマウスには刺激側に蓄積の増加した個体が混在していた(図10)。3ヶ月間刺激と同様に、蓄積量には個体間のばらつきが見られた。定量の結果、SSFOマウス刺激側のA β burdenは $24.0 \pm 4.2\%$ と増加したのに対し、非刺激側では $9.7 \pm 2.5\%$ であり、刺激側で有意にA β 蓄積の増加を認めた($p < 0.01$, Student's t-test, mean \pm SEM)。一方、EYFPマウスでは刺激側 $14.0 \pm 3.4\%$ 、非刺激側 $13.9 \pm 3.9\%$ と、有意差は見られなかった($p = 0.98$, Student's t-test, mean \pm SEM, 図11)。これらの結果から、長期の貫通線維路の刺激が、投射先におけるA β 蓄積の増加を来すことが示された。

既述の通り、A β 斑の蓄積量にはマウスの個体差が大きく、15.5月齢におけるOMLに占めるA β 陽性面積比率は10%から40%台までのバリエーションが認められた。

次に、刺激開始時期とA β 蓄積の関係について検討した。より若齢からの刺激によっても同じく5ヶ月間に及ぶ貫通線維路の刺激がA β 斑の蓄積を促進するか(蓄積開始を早めるか)検討するため、5.5-10.5月齢の間の刺激を試みた(EYFP:5例, SSFO:4例)。その結果、免疫組織化学的に歯状回外分子層におけるA β 蓄積は僅かか殆ど認められなかった。定量の結果、SSFOマウスの刺激側 $0.13 \pm 0.1\%$ 、非刺激側 $0.21 \pm 0.07\%$ 、EYFPマウスの刺激側 $0.05 \pm 0.02\%$ 、非刺激側 $0.41 \pm 0.26\%$ と蓄積の総量はいずれも僅少で、左右差を見出せなかった(SSFO: $p = 0.55$, EYFP: $p =$

0.21, Student's t-test, mean \pm SEM, 図 13). また, 海馬に A β 斑が出現した後の 12.5-15.5 月齢の 3 ヶ月間についても刺激を試みたが, 左右差を見出せなかった (SSFO:4 例, 刺激側 10.2 \pm 1.6 %, 非刺激側 14.2 \pm 5.4 %, $p = 0.50$, Student's t-test, mean \pm SEM, 図 14). これらの結果から, 長期の貫通線維路の刺激による A β 蓄積増加には, 刺激の時期および期間が関与する可能性が示唆された.

4. 外側嗅内皮質における A β 蓄積

上記のように貫通線維路の長期刺激により, その投射先において A β 蓄積の増加が見られたため, 貫通線維路の起始である神経細胞体が存在する, 外側嗅内皮質における A β 蓄積を検討した. A β 蓄積の増加の見られた 10.5 月齢から 5 ヶ月間刺激を検討したところ, 免疫組織化学的には EYFP マウス, SSFO マウスとも, 刺激側・非刺激側ともに不整形斑状から一部球状を呈する A β 蓄積を認めた. 定量の結果, A β burden は SSFO マウスの刺激側 11.2 \pm 2.8 %, 非刺激側 10.7 \pm 1.7 %, EYFP マウスの刺激側 11.5 \pm 2.1 %, 非刺激側 9.1 \pm 1.5 %で, SSFO マウス, EYFP マウス共に外側嗅内皮質における A β 陽性面積比率には, 有意な左右差は見出されなかった (SSFO : $p = 0.88$, EYFP : $p = 0.37$, Student's t-test, mean \pm SEM, 図 12).

5. SSFO マウスに見られた痙攣発作

光刺激 (473 nm, 4 mW, 2 秒) を毎日繰り返す中で, 光刺激直後に痙攣発作を生

じる SSFO マウスが刺激 1 月前後から出現し始め、3-5 ヶ月間の経過中に全ての SSFO マウスに痙攣発作を認めるようになった (図 15)。EYFP マウスでは光刺激に伴う痙攣の出現は見られなかった。

痙攣は 20-40 秒間程の無動や寡動、刺激直後の瞬目や刺激側顔面の軽微な痙攣、10-20 秒間程の點頭や刺激対側への頭部回旋を主とする部分発作から始まり、刺激開始 2 週から 1 月の間に全般発作へ移行した。初期の全般発作では光刺激から 15 秒程の潜時を経て約 15 秒間の痙攣で終息したが、約 1-1.5 ヶ月間の経過で潜時は 5 秒前後まで短縮し、持続時間は 30-40 秒間に延長した。全般発作では、光刺激直後に閉眼や瞬目、刺激側顔面痙攣を認め、頭部および前肢の間代性痙攣から始まり、挙尾と共に全身性の間代性痙攣を認めた。一部の個体では全身痙攣中に転倒を認めた。また、一部の個体は数秒間の running や跳躍を経て終息した。痙攣後、5-10 分間程度の無動・寡動状態が続き、時折、立位で洗顔する動作が見られた。光刺激から 20-30 分後には刺激前と同程度の活動に戻った。以上の経過は、扁桃体や海馬などへの電気刺激で見られるような、閾値以下の刺激を繰り返すことで部分発作から全身性痙攣が生じる、キンドリングモデル³⁷に合致すると考えられた。

A β 蓄積への痙攣の影響を検討するため、10.5 月齢から 5 ヶ月間、貫通線維路を慢性刺激した SSFO マウスに関して、痙攣の日数と刺激側海馬歯状回外分子層における A β 陽性面積比率を個体毎にプロットした。その結果、痙攣の日数と A β 蓄積量に明らかな相関を認めなかった ($R^2 = 0.0115$, $n = 9$, 図 16)。

6. A β 産生因子の免疫組織化学的な検討

長期刺激により A β 蓄積増加を来した因子を検討するため、A β の産生に関わる APP と二段階切断の律速段階である β セクレターゼのタンパク質発現量を、APP の C 末端に対する抗体と BACE1 (beta-site APP-cleaving enzyme 1) に対する抗体を用いて検討した。長期刺激により A β 蓄積増加の見られた 10.5 月齢から 5 ヶ月間刺激したマウスのパラフィン切片を用いて免疫組織化学的な検討を行った。

その結果、APP (C) 抗体では大脳皮質の一部の神経細胞や A β 斑周囲の変性神経突起と考えられる部位に陽性像を認めた。しかし、貫通線維路の投射先の海馬歯状回外分子層には陽性像は見られず、また外側嗅内皮質 II 層の神経細胞体にも SSFO マウスと EYFP マウス間や刺激側と非刺激側の左右間で明らかな差は見られなかった。また、BACE1 抗体では、海馬門に淡い陽性像が見られたが、歯状回外分子層や外側嗅内皮質 II 層の神経細胞体に陽性像は認められず、免疫組織化学的に検出可能な範囲でのタンパク質発現量に変化は認められなかった (図 17)。

7. 長期刺激個体における海馬間質液中の A β 42 濃度変化

4-7 月齢から 3 ヶ月間、貫通線維路を長期刺激した雌の A7 マウスを使用した。

海馬間質液回収日も、前日までと同時刻に光刺激を行い、刺激前後 12 時間の海馬間質液を *in vivo* マイクロダイアリシス法により回収し、A β 42 濃度を定量した。光照射後には、長期刺激期間の前日までと同様の全身性間代性痙攣を認めた。

海馬間質液中 A β 42 濃度に関しては，光刺激前 3 時間の平均値を 100 %として相対値で表した (図 18-C). 刺激前の平均値と，光刺激後 9 時間内の最高値を比較すると，SSFO マウスでは 63 %の有意な増加を認めた (95 %信頼区間 21-105 %, $p = 0.0124$, Paired t-test, 図 18-D). 一方で EYFP マウスでは有意な増加を認めなかった ($p = 0.10$, Paired t-test). また，SSFO マウスでは光刺激 1.5 時間後から 8 時間後まで 20-30 %の増加傾向を認め，3.5 時間後に A β 42 は 100 %前後まで一旦低下した (SSFO : $n = 6$, EYFP : $n = 4$).

考察

本研究において、私は次のことを明らかにした。

- (1) 光遺伝学を用いた海馬貫通線維路の長期刺激により、投射先の海馬歯状回分子層における A β 蓄積が増加した。
- (2) 貫通線維路の長期刺激による A β 蓄積増加には、刺激の時期および期間の影響が示唆された。
- (3) 貫通線維路の長期刺激により、投射先の海馬間質液中の A β 濃度が上昇した。
- (4) 光遺伝学を用いた貫通線維路の長期刺激により、キンドリングが形成された。

以下、各知見について考察を加える。

1. 光遺伝学を用いた長期刺激における神経活動の評価

本研究では光遺伝学（オプトジェネティクス）を用いて、アルツハイマー病モデルマウスに対して長期的な貫通線維路の刺激を行い、A β 蓄積への影響を検討した。

光遺伝学による神経活動の評価としては、神経活動に即応して活性化される前初期遺伝子（immediate early gene）の一つである *c-fos* を指標とし、抗 c-Fos 抗体を用いて免疫組織化学的に評価を行った。その結果、EYFP マウスでは外側嗅内皮質、海馬歯状回顆粒細胞ともに少数の陽性細胞が散見される程度で、左右差を認めず、歯状回顆粒細胞の陽性率は 1-3 %であった。しかし、SSFO マウスでは、両側海馬歯状回顆粒細胞にびまん性（100 %）の陽性像を認め、両側大脳皮質にも広範な陽性像が見ら

れた。ウイルス注入術から 1 ヶ月間飼育して、ウイルス導入遺伝子の発現を待った直後の短期光刺激では、刺激側の歯状回のみにはびまん性の陽性像を確認しており、両側歯状回の c-Fos 陽性結果には、苔状線維を經由した対側歯状回内分子層への興奮性線維の投射³⁸や SSFO マウスを長期刺激することで出現した全身性痙攣（キンドリング）の関与が考えられる。本研究では約 30 分と開口時間の長い SSFO を使用しており、刺激側と非刺激側で貫通線維路の神経活動に差が生じることを想定していた。貫通線維路の投射先である歯状回顆粒細胞の c-Fos 陽性率を用いて神経活動を定量化し、刺激側と非刺激側の差を評価しようと試みたが、両側陽性となり神経活動の左右差を捉えられなかった。その原因としては、c-Fos の感度が高く、キンドリングなどにより指標が飽和してしまったことが考えられる。今後、長期的な神経活動の亢進と A β 蓄積の関係をより明確にし、そこに関わる因子を検討して行く上で、より直接的に神経活動を捉えられ、時間分解能の高い電気生理学的な手法を用いた評価を行いたいと考える。

2. 長期刺激と A β 蓄積

光遺伝学を用いて長期的な貫通線維路の刺激を行った A7 マウスの内、A β 斑が形成される直前の 10.5 月齢から 5 ヶ月間を刺激した SSFO マウスにおいて、投射先である刺激側の海馬歯状回外分子層に有意な A β 蓄積の増加を認めた（刺激側 24.0 ± 4.2 %，非刺激側 9.7 ± 2.5 %， $p < 0.01$ ，Student's t-test, mean \pm SEM）。一方で

EYFP マウスでは左右差は見出されなかった。また、貫通線維路の起始となる神経細胞体が存在する外側嗅内皮質においても左右差は見出されなかった。以上の結果から、貫通線維路の長期刺激により投射先の A β 蓄積の増加を来すことが実験的に示された。

長期刺激が A β 蓄積に与える影響に関しては、10.5 月齢からの 1, 3 ヶ月間の刺激では A β 蓄積の増加は見出せず、長期刺激の「期間」は蓄積の決定要因の 1 つとなる可能性が考えられた (図 19)。但し、10.5 月齢からの 1, 3 ヶ月間刺激は n 数が 5-6 個体と限られており、「期間」の影響を判断するには、n 数の増加の他、A7 マウスを用いた 1, 3, 5 ヶ月間以外の期間の検討や他の *APP* トランスジェニックマウスを用いた更なる検討が必要と考えられる。

また、貫通線維路の長期刺激が A β 蓄積の開始時期に及ぼす影響を検討するため、より若齢の 5.5 月齢から同じく 5 ヶ月間にわたる刺激を試みた。その結果、海馬歯状回外分子層における A β 蓄積は、SSFO マウスの刺激側 0.13 ± 0.1 %, 非刺激側 0.21 ± 0.07 %, EYFP マウスの刺激側 0.05 ± 0.02 %, 非刺激側 0.41 ± 0.26 %といずれも僅少で、A β 蓄積の開始時期の早期化は認められなかった。このことより、長期刺激の「時期」も蓄積の決定要因の 1 つとなると考えられた (図 19)。

A β 蓄積の増加を来す因子としては、大まかに A β 産生・分泌の増加、凝集性の促進、A β 除去の低下などが考えられる。貫通線維路の長期刺激がどのような因子を変化させ、A β 蓄積の増加を来すのか検討して行きたい。

3. 長期刺激と A β 分泌

本研究において、貫通線維路の投射先である海馬間質液中 A β 濃度を *in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて検討したところ、光刺激前 3 時間の平均値を 100 % とし、光刺激後 9 時間内の最高値と比較すると、SSFO マウスでは 63 % の有意な増加を認め ($p=0.0124$, Paired t-test), 長期刺激下においても A β 分泌が刺激依存性に増加することが確かめられた。従って、本研究において貫通線維路の長期刺激が A β 蓄積の増加を来した原因の一つとして、A β 分泌の増加が考えられる。しかし、海馬間質液中 A β 濃度の変化は個体間差が大きく、長期刺激に対する A β 分泌動態の変化は不明な点が多い。最近では、抗 A β 抗体をプローブに吸着させて、30 秒間隔まで時間分解能を高めたプローブを用いる方法により、GABA_A チャンネル阻害薬であるピクロトキシンを *in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて投与すると、投与 3-15 分後から A β 濃度が上昇することが北米神経科学学会にて報告された³⁹。このような短期刺激との比較により、長期刺激下において、刺激に対する A β 濃度の上昇までの応答時間や、A β 濃度増加の持続時間に差はないか、すなわち A β 分泌動態に変化を来していないか検討することは、長期刺激による A β 蓄積増加機序の解明の一端となりうると思われる。

4. 貫通線維路の長期刺激で生じた全身性痙攣

貫通線維路の長期間刺激の経過中に見られた痙攣発作に関しては、キンドリング状

態が形成されたと考えている。痙攣の様子を観察すると、痙攣が出現し始める初期には無動や寡動、刺激直後の瞬目や刺激側顔面の軽微な痙攣、10-20 秒間程の點頭や刺激対側への頭部回旋を主とする部分発作を認め、約 1-1.5 ヶ月間の経過で全般発作へ移行した。これらの現象はキンドリングの発作段階とほぼ一致している。Racine, R. J. による辺縁系キンドリングの分類⁴⁰では、口部や顔面の痙攣は Stage 1 に相当し、點頭は Stage 2、前肢の間代性痙攣が Stage 3、立ち上がり行動が Stage 4、立ち上がり行動と転倒が Stage 5 に分類され、さらに強い所見として Pinel JP, Rovner LI. により、繰り返す転倒が Stage 6、疾走や跳躍が Stage 7、強直性痙攣が Stage 8 として分類されている⁴¹。本研究では長期刺激の初期段階において、個体間差は伴うが、Stage 1-3 に相当する痙攣が見られた。Stage 4 の立ち上がり行動は明らかでなかったため、大部分の SSFO マウスで認められた痙攣発作は Stage 3 に相当するキンドリングであったと考える。しかし、一部の SSFO マウスでは痙攣中の転倒や、時として痙攣の終息時に疾走や跳躍が認められ、Stage 5-7 に相当するマウスも含まれていたと考えられる。

キンドリングモデルの形成方法は、扁桃核や海馬を主とする辺縁系に対する電気刺激や薬理刺激が主体で、光遺伝学による実験例は少ない。SSFO を用いた例が 1 報告あり、ウイルスもしくは SSFO を発現させたトランスジェニックラットの海馬を 20 mW の青色光で短期刺激すると痙攣を来したことが示されている⁴²。本研究では海馬へ投射する貫通線維路を、光遺伝学を用いて刺激することでキンドリングが形成され

ることが確認された。キンドリングの形成にあたっては、SSFO マウスに光刺激を与えると、海馬歯状回顆粒細胞に広範な c-Fos 陽性像が認められており、痙攣の焦点として海馬が関与した可能性が考えられる。また、光刺激は青色光で行っているため、組織透過による減衰の程度は大きいですが、光の強度は 4 mW、2 秒と、SSFO を発現している神経細胞であれば光カメラから 1 mm 範囲は十分に発火を誘発できる強さがあると考えられ^{43,44}、嗅内皮質周囲の大脳皮質の神経細胞や一部の海馬錐体細胞などが長期間発火したことによるキンドリング形成への関与も考えられる。

近年、Doric 社などにより、電極と光カメラが一体となったハイブリッドカメラが開発されている。麻酔下では痙攣自体が抑制されることから、電気生理学的な検討の際にはハイブリッドカメラなどを用いた自由行動下での脳波測定が有用と考えられる。また、本研究では光の強度を 4 mW に固定したが、刺激強度に関する急性期の検討や、「1. 光遺伝学を用いた長期刺激における神経活動の評価」で述べたように、長期刺激における神経活動の定量・評価において、ハイブリッドカメラを用いた検討が今後有用と考えられる。

結論

A β 斑を有するアルツハイマー病モデルマウスにおいて、貫通線維路の長期刺激により、投射領域に A β 蓄積の促進を認め、長期間の神経活動の亢進が A β 蓄積増加を来す可能性が実験的に示唆された。

引用文献

1. 日本神経学会監修, 「認知症疾患治療ガイドライン」作成合同委員会編集, 認知症疾患治療ガイドライン 2010, 医学書院, 1-3, 2010.
2. 研究代表者 朝田隆, 厚生労働科学研究費補助金 認知症対策総合研究事業, 都市部における認知症有病率と認知症の生活機能障害への対応, 平成 23 年度～平成 24 年度総合研究報告書, 2013.
3. 池嶋千秋, 朝田隆, 認知症疫学の現状, 老年精神医学雑誌, 第 25 巻増刊号 - I , 81-84, 2014.
4. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239-59, 1991.
5. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 112, 389-404, 2006.
6. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kövari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, Mackenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, Beach TG. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive

- status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol.* 71, 362-81, 2012.
7. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 58, 1791-800, 2002.
 8. Serrano-Pozo A, Qian J, Monsell SE, Frosch MP, Betensky RA, Hyman BT. Examination of the clinicopathologic continuum of Alzheimer disease in the autopsy cohort of the National Alzheimer Coordinating Center. *J Neuropathol Exp Neurol.* 72, 1182-92, 2013.
 9. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297, 353-6, 2002
 10. Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science.* 264, 1336-40, 1994.
 11. Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S. Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature.* 383, 710-3, 1996.
 12. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T,

- Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG, Sisodia SS. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*. 17, 1005-13, 1996.
13. Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Kume H, Shinozaki K, Tokuhiko S, Capell A, Walter J, Grünberg J, Haass C, Iwatsubo T, Obata K. The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 2025-30, 1997.
14. Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J, Hoyte K, Gustafson A, Liu Y, Lu Y, Bhangale T, Graham RR, Huttenlocher J, Bjornsdottir G, Andreassen OA, Jönsson EG, Palotie A, Behrens TW, Magnusson OT, Kong A, Thorsteinsdottir U, Watts RJ, Stefansson K. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. 488, 96-9, 2012.
15. Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt WC, Raskind M, Schellenberg GD. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol*. 43, 815-25,

- 1998.
16. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 393, 702-5, 1998.
 17. Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 7737-41, 1998.
 18. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*. 13, 45-53, 1994.
 19. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS,

- Cairns NJ, Xie X, Blazey TM, Holtzman DM, Santacruz A, Buckles V, Oliver A, Moulder K, Aisen PS, Ghetti B, Klunk WE, McDade E, Martins RN, Masters CL, Mayeux R, Ringman JM, Rossor MN, Schofield PR, Sperling RA, Salloway S, Morris JC; Dominantly Inherited Alzheimer Network. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 367, 795-804, 2012.
20. Buckner RL, Snyder AZ, Shannon BJ, LaRossa G, Sachs R, Fotenos AF, Sheline YI, Klunk WE, Mathis CA, Morris JC, Mintun MA. Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. *J Neurosci.* 25, 7709-17, 2005.
21. Meyer-Luehmann M, Stalder M, Herzig MC, Kaeser SA, Kohler E, Pfeifer M, Boncristiano S, Mathews PM, Mercken M, Abramowski D, Staufenbiel M, Jucker M. Extracellular amyloid formation and associated pathology in neural grafts. *Nat Neurosci.* 6, 370-7, 2003.
22. Fukumoto H, Tomita T, Matsunaga H, Ishibashi Y, Saido TC, Iwatsubo T. Primary cultures of neuronal and non-neuronal rat brain cells secrete similar proportions of amyloid beta peptides ending at A beta40 and A beta42. *Neuroreport.* 10, 2965-9, 1999.

23. Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R. APP processing and synaptic function. *Neuron*, 37, 925-37, 2003.
24. Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC, Schoepp DD, Paul SM, Mennerick S, Holtzman DM. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron*, 22, 913-22, 2005.
25. Cirrito JR, Kang JE, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, Bu G, Mennerick S, Holtzman DM. Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. *Neuron*. 58, 42-51, 2008.
26. Bero AW, Yan P, Roh JH, Cirrito JR, Stewart FR, Raichle ME, Lee JM, Holtzman DM. Neuronal activity regulates the regional vulnerability to amyloid- β deposition. *Nat Neurosci*. 14, 750-6, 2011.
27. Charles Watson, George Paxinos, Luis Puelles. *The Mouse Nervous System*. Elsevier, 122-123, 2012
28. Lazarov O, Lee M, Peterson DA, Sisodia SS. Evidence that synaptically released beta-amyloid accumulates as extracellular deposits in the hippocampus of transgenic mice. *J Neurosci*. 22, 9785-93, 2002.
29. Sheng JG, Price DL, Koliatsos VE. Disruption of corticocortical connections ameliorates amyloid burden in terminal fields in a transgenic model of Abeta

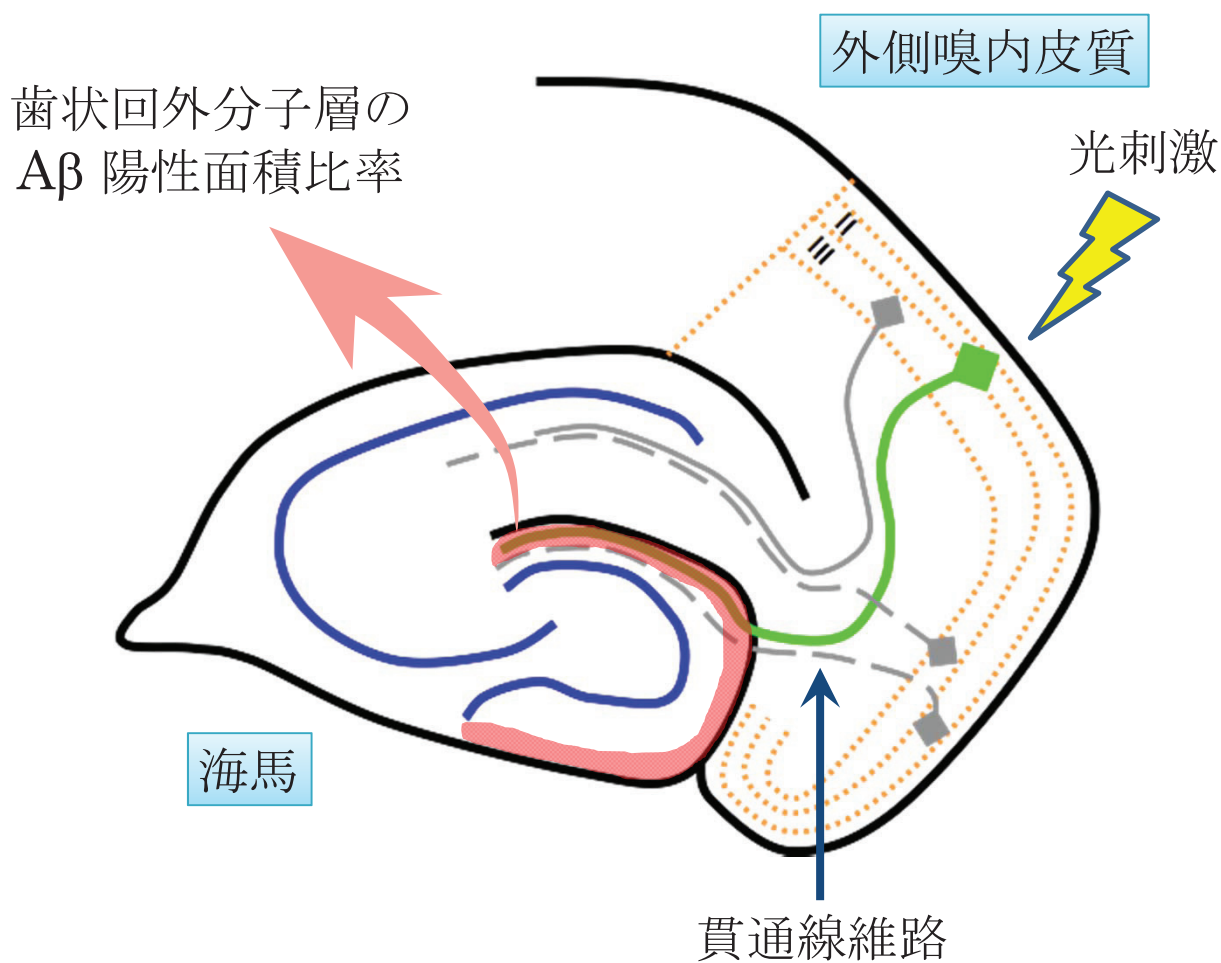
- amyloidosis. *J Neurosci.* 22, 9794-9, 2002.
30. van Groen T, Liu L, Ikonen S, Kadish I. Diffuse amyloid deposition, but not plaque number, is reduced in amyloid precursor protein/presenilin 1 double-transgenic mice by pathway lesions. *Neuroscience.* 119, 1185-97, 2003.
31. Harris JA, Devidze N, Verret L, Ho K, Halabisky B, Thwin MT, Kim D, Hamto P, Lo I, Yu GQ, Palop JJ, Masliah E, Mucke L. Transsynaptic progression of amyloid- β -induced neuronal dysfunction within the entorhinal-hippocampal network. *Neuron.* 68, 428-41, 2010.
32. Edward S Boyden, Feng Zhang, Ernst Bamberg, Georg Nagel, Karl Deisseroth. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8, 1263-8, 2005.
33. Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, O'Shea DJ, Sohal VS, Goshen I, Finkelstein J, Paz JT, Stehfest K, Fudim R, Ramakrishnan C, Huguenard JR, Hegemann P, Deisseroth K. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature.* 477, 171-8, 2011.
34. Yamada K, Yabuki C, Seubert P, Schenk D, Hori Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Hashimoto T, Iwatsubo T. Abeta immunotherapy: intracerebral sequestration of Abeta by an anti-Abeta monoclonal antibody 266 with high affinity to

- soluble A β . *J Neurosci.*, 29, 11393-8, 2009.
35. 尾藤晴彦, 古屋敷智之, 竹本-木村さやか, 荒川芳輝, 成宮周. マウス海馬錐体細胞初代培養法. *実験医学*. 20, 2247-52, 2002.
36. Franklin KBJ, Paxinos G. *The Mouse Brain in Stereotactic Coordinates*, third edition. Elsevier Science Publishing Co Inc, 2008
37. Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Progress in Neurobiology*, 73, 1-60, 2004.
38. Buckmaster PS, Strowbridge BW, Kunkel DD, Schmiede DL, Schwartzkroin PA. Mossy cell axonal projections to the dentate gyrus molecular layer in the rat hippocampal slice. *Hippocampus*. 2, 349-62, 1992.
39. Cirrito JR, Measuring Rapid Changes in Brain A β in Live Mice, ALZFORUM, <http://www.alzforum.org/news/conference-coverage/measuring-rapid-changes-brain-av-live-mice>, 26 Nov 2014.
40. Racine, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 32, 281-94, 1972.
41. Pinel JP, Rovner LI., Electrode placement and kindling-induced experimental epilepsy. *Exp Neurol*. 58, 335-46, 1978.

42. Osawa S, Iwasaki M, Hosaka R, Matsuzaka Y, Tomita H, Ishizuka T, Sugano E, Okumura E, Yawo H, Nakasato N, Tominaga T, Mushiake H. Optogenetically induced seizure and the longitudinal hippocampal network dynamics. *PLoS One*. 8, e60928, 1-14, 2013.
43. Yizhar O, Fenno LE, Davidson TJ, Mogri M, Deisseroth K. Optogenetics in neural systems. *Neuron*. 71, p9-34, 2011.
44. Brain tissue light transmission calculator, Deisseroth Lab, Stanford University: <http://web.stanford.edu/group/dlab/cgi-bin/graph/chart.php>

図1

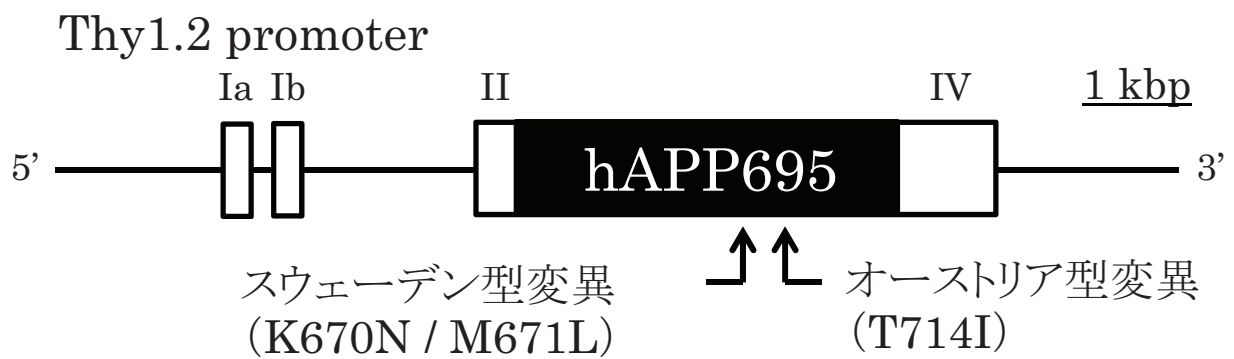
貫通線維路



貫通線維路は嗅内皮質のII層の神経細胞が海馬歯状回外分子層へ投射する経路で、外側嗅内皮質に起始する線維は歯状回外分子層へ投射する。この外側嗅内皮質の神経細胞に **Stabilized step function opsin (SSFO)** を発現させ(緑色の神経細胞)、毎日青色光を照射することで長期刺激を行った。そして長期的な神経活動の増加が Aβ 蓄積に与える影響を評価するため、投射先の歯状回外分子層(赤色部)における Aβ 陽性面積を定量した。

図2

A7 マウス

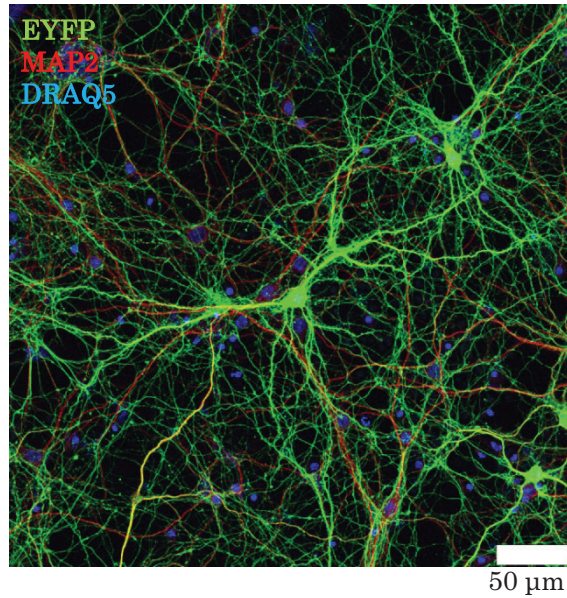
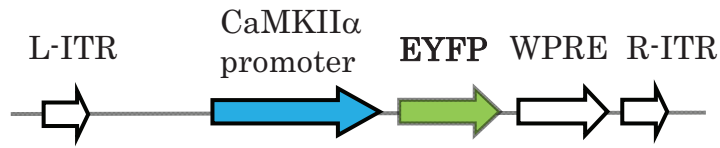


A7 マウスに発現させた transgene のコンストラクト図. 神経細胞特異的なプロモーターである Thy1.2 プロモーターの下流に, 2 種類の家族性アルツハイマー病変異 (スウェーデン型変異 (総 A β 量を増加) とオーストリア型変異 (A β 42 比率を増加)) を併せ持つ human APP695 cDNA が接続されている.

図3

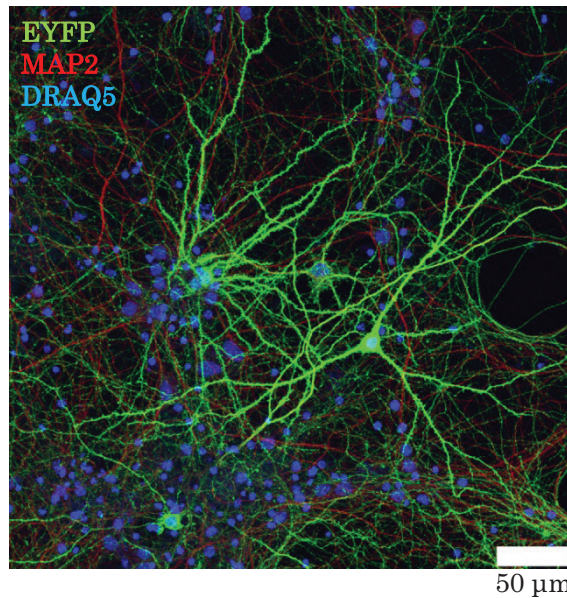
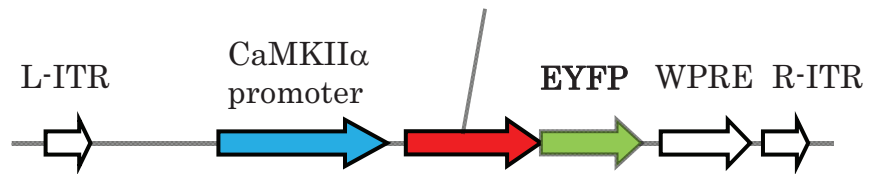
EYFP

アデノ随伴ウイルスベクター



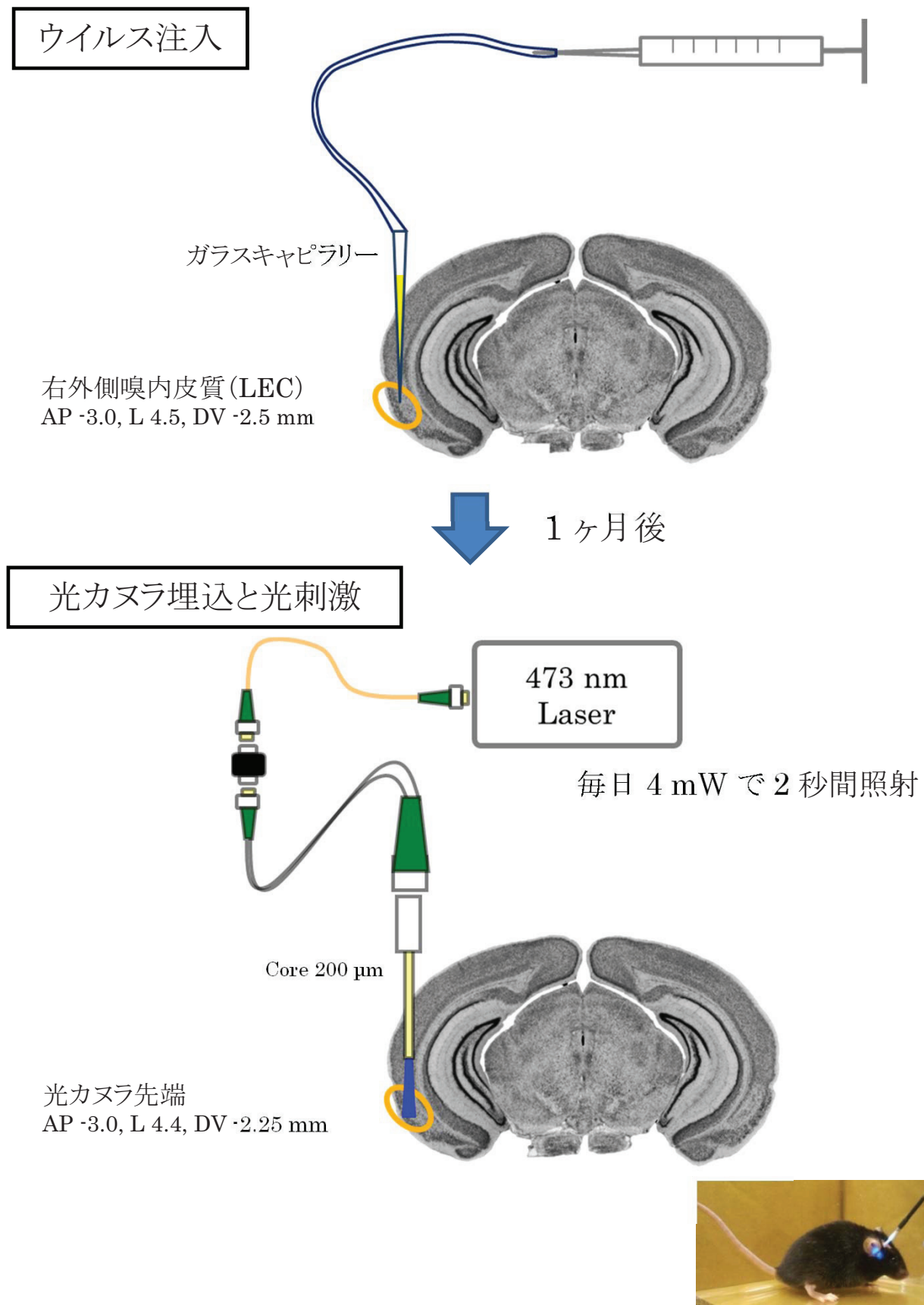
SSFO

hChR2 (C128S, D156A)
Stabilized step function opsin (SSFO)



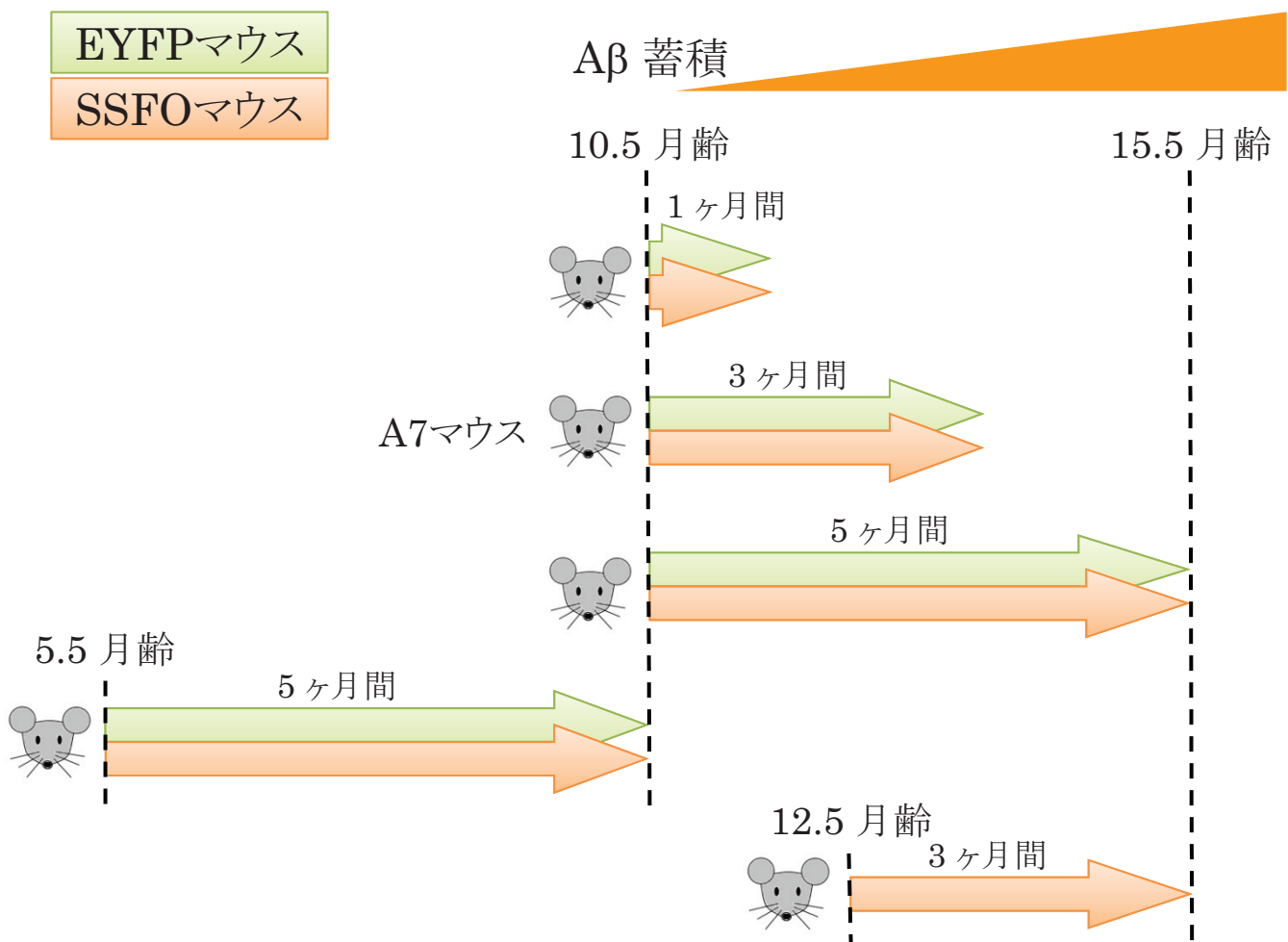
興奮性神経細胞特異的な発現の得られる CaMKII α プロモーター下に、EYFPもしくは SSFO-EYFP を組込んだ AAV1 ベクターを使用した。ウイルスのタイターは EYFP は 3.4×10^{13} gc/mL, SSFO は 3.5×10^{13} gc/mL。写真はいずれもマウス大脳皮質初代培養神経細胞に div 4 でウイルスを感染させ、div 26 で免疫細胞化学を施行して、ウイルス導入遺伝子である EYFP の蛍光を確認したものである(緑:EYFP, 赤:MAP2, 青:DRAQ5)。

図4 ウイルス注入術, 光カメラ埋込術と光刺激



ウイルス注入術から 1 ヶ月後に, 光カメラを外側嗅内皮質直上に埋め込み, 473 nm, 4 mW, 2 秒間の光刺激を 1 日 1 回行った.

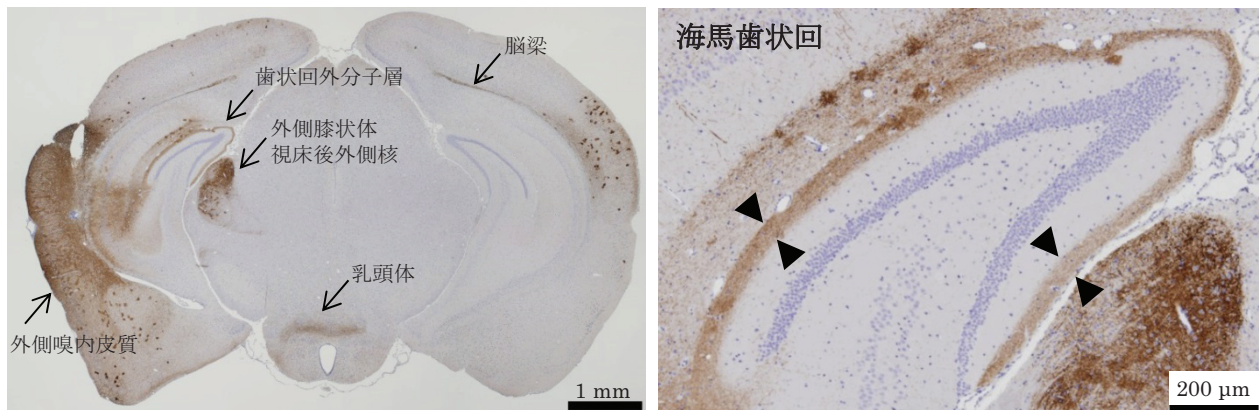
図5 貫通線維路の長期刺激の時期と期間



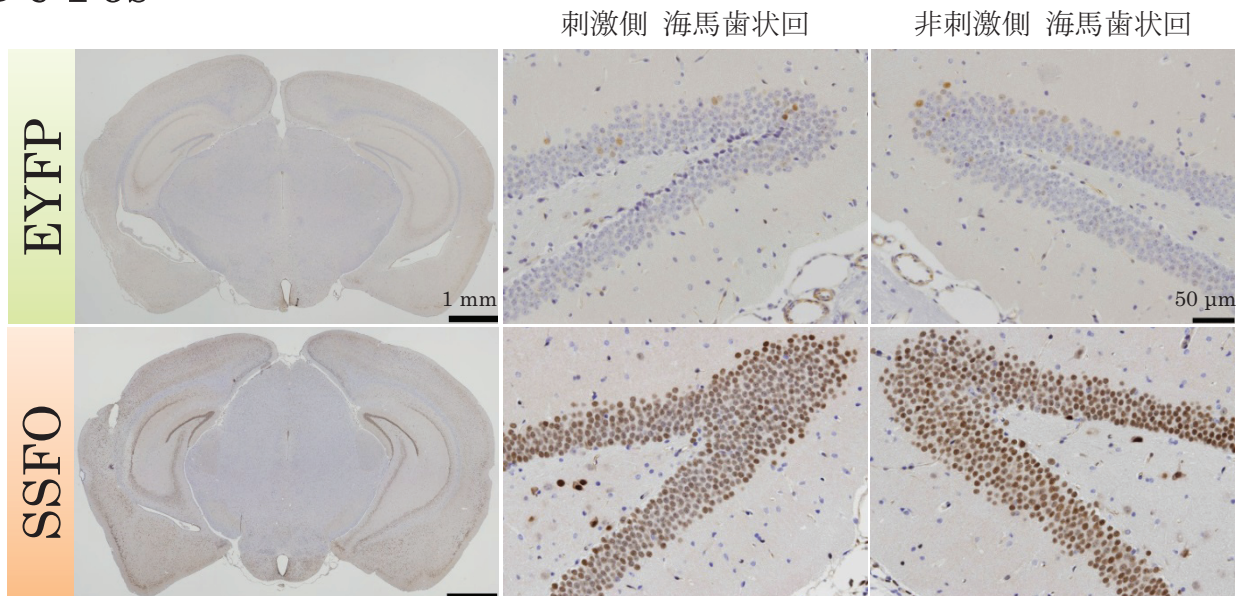
海馬に Aβ 斑が蓄積する直前の 10.5 月齢から 1, 3, 5 ヶ月間, 貫通線維路を亢進させ, Aβ 蓄積過程における長期刺激の影響を検討した. また, 長期刺激が Aβ 蓄積開始を早めるか検討するため, 5.5 月齢から 5 ヶ月間の刺激を施行した. さらに, 刺激期間の影響を検討するため, 15.5 月齢直前の 3 ヶ月間の刺激を行った.

図6 ウイルス注入および光刺激の成否に関する確認

A GFP



B c-Fos



C

刺激期間	10.5 月齢から			5.5 月齢 から5ヶ月間	12.5 月齢 から3ヶ月間
	1ヶ月間	3ヶ月間	5ヶ月間		
EYFP	6/6	5/6	10/10	5/5	なし
SSFO	5/6	5/6	9/13	4/4	4/6

注入術および光刺激の成功例/ウイルス注入術数

A:免疫組織化学(GFP). ウイルス注入部である右外側嗅内皮質を中心として約 3 mmの範囲に GFP 陽性像を認めた. また, 投射先の右海馬歯状回外分子層(右図矢頭)や乳頭体, 外側膝状体, 視床後外側核, 脳梁, 帯状束, 対側大脳半球などに陽性像を認めた.

B:免疫組織化学(c-Fos). EYFP マウスでは, 海馬歯状回顆粒細胞の陽性率は 1-3%であった. SSFO マウスでは, 光刺激後に全身痙攣を伴い, 両側歯状回顆粒細胞にびまん性(100%)の陽性像を認め, 大脳皮質にも広範な陽性像を認めた.

C:各刺激期間において, ウイルス注入術を施行したマウス数と注入術および光刺激の成功例数.

図7 海馬歯状回外分子層の A β 陽性面積の定量法

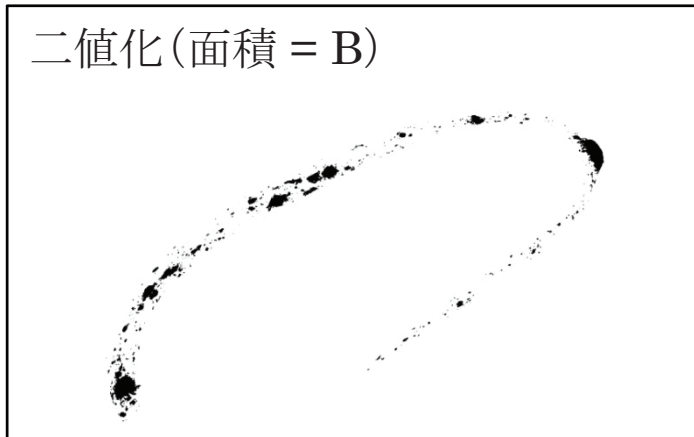
A 歯状回外分子層の選択



B 外分子層切り抜き(面積 = A)



C 二値化(面積 = B)



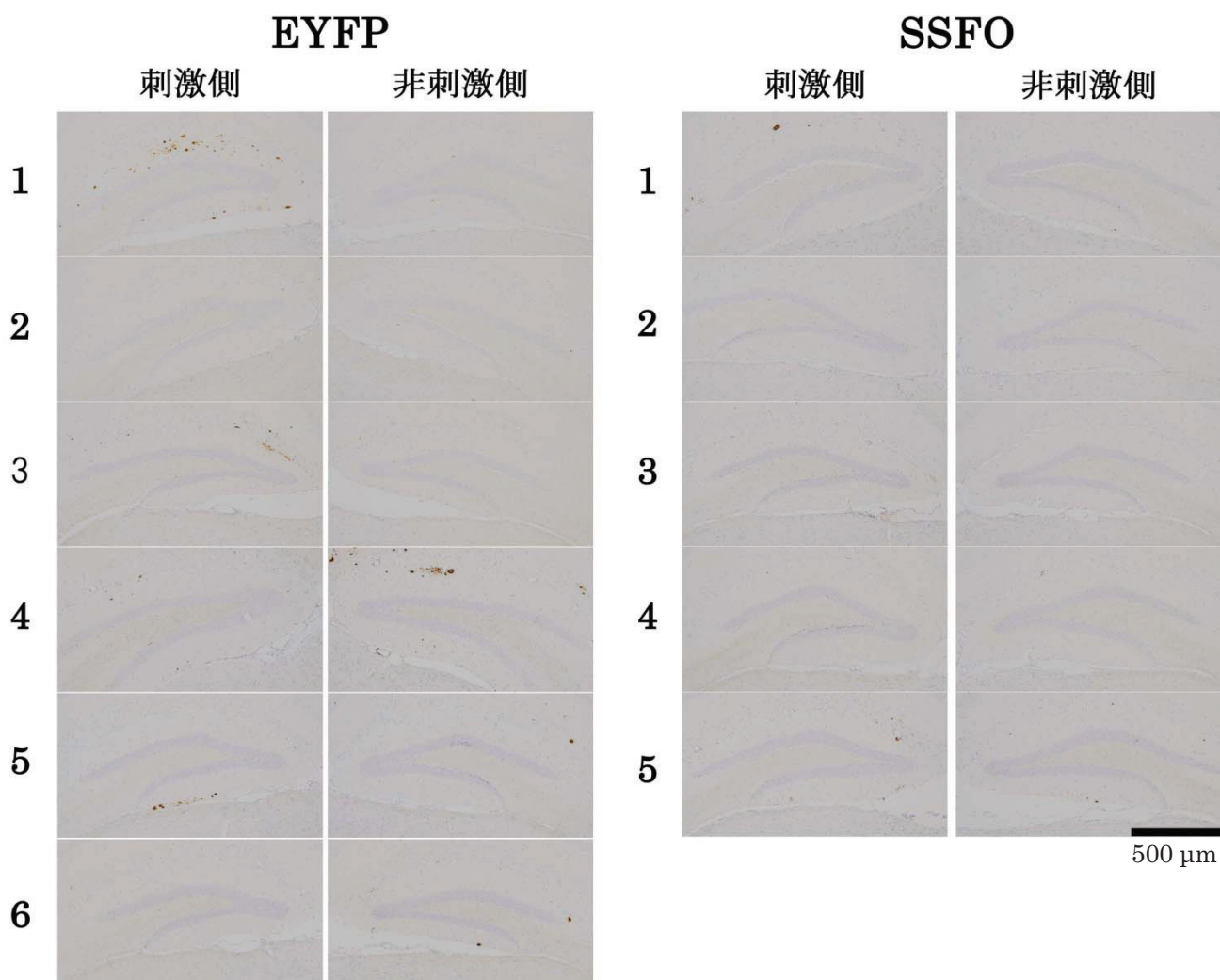
海馬歯状回外分子層の A β 陽性面積比率 = $B / A \times 100$ (%)

A:フリー画像解析ソフト Image J を使用. 歯状回外分子層は hippocampal fissure を背外側縁, 海馬と間脳の境界を腹内側縁とし, 歯状回分子層の表層 1/3 の領域として選択した(赤点線).

B:選択領域の面積を測定.

C:二値化を行い, 上記の式から A β 陽性面積比率(%)を計算した. 各個体につき 100 μ m 間隔 5 切片の平均値を算出した.

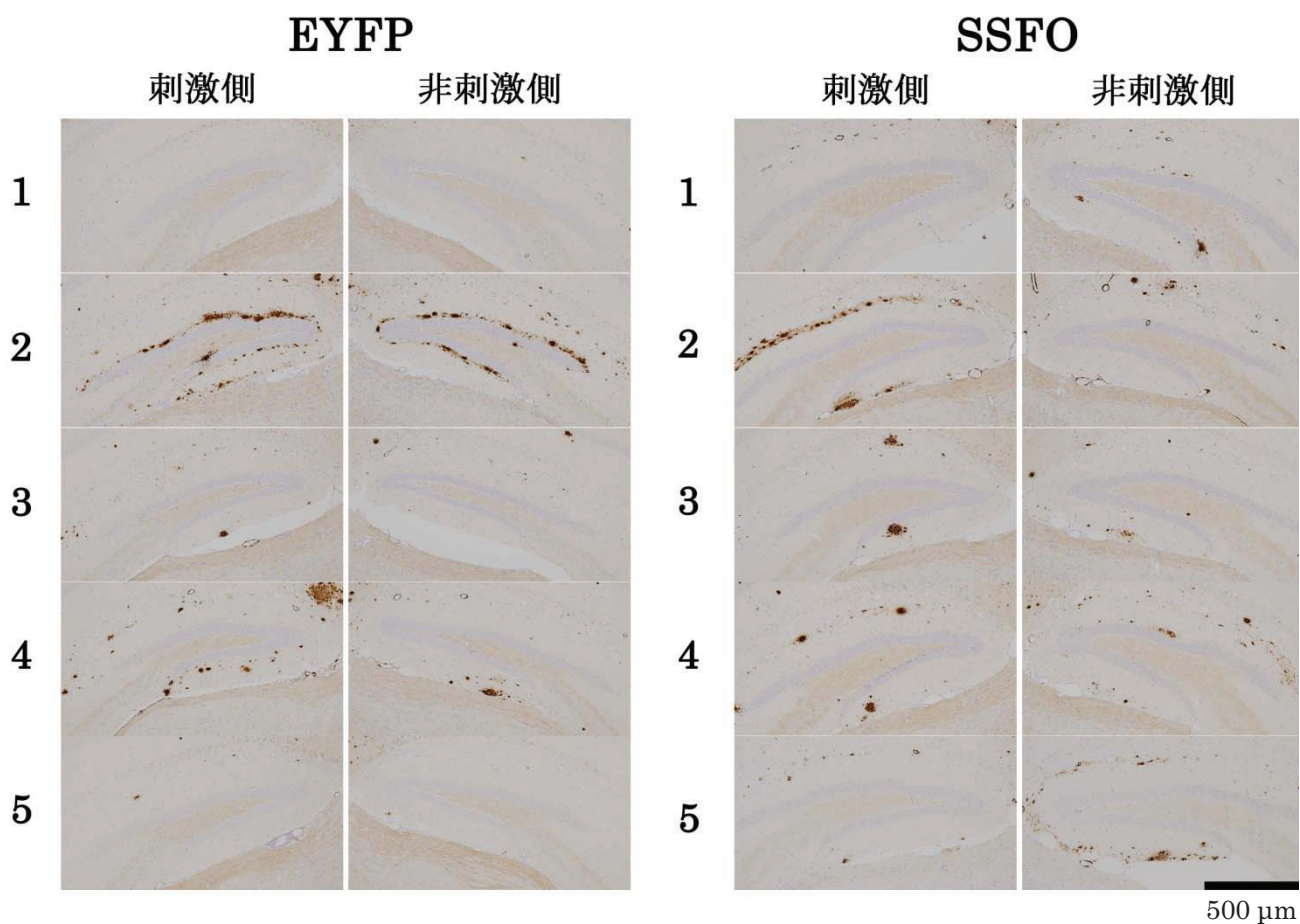
図8 貫通線維路の長期刺激(10.5 月齢から 1 ヶ月間)



10.5 月齢から 1 ヶ月間刺激した EYFP マウスおよび SSFO マウスの免疫組織化学(Aβ, 82E1). 各個体の海馬代表組織像. 一部の個体にて, 茶色顆粒状に見られる Aβ 蓄積が僅かに見られるが, 殆ど蓄積の見られない個体も多い.

(EYFP マウス:n = 6, SSFO マウス:n = 5)

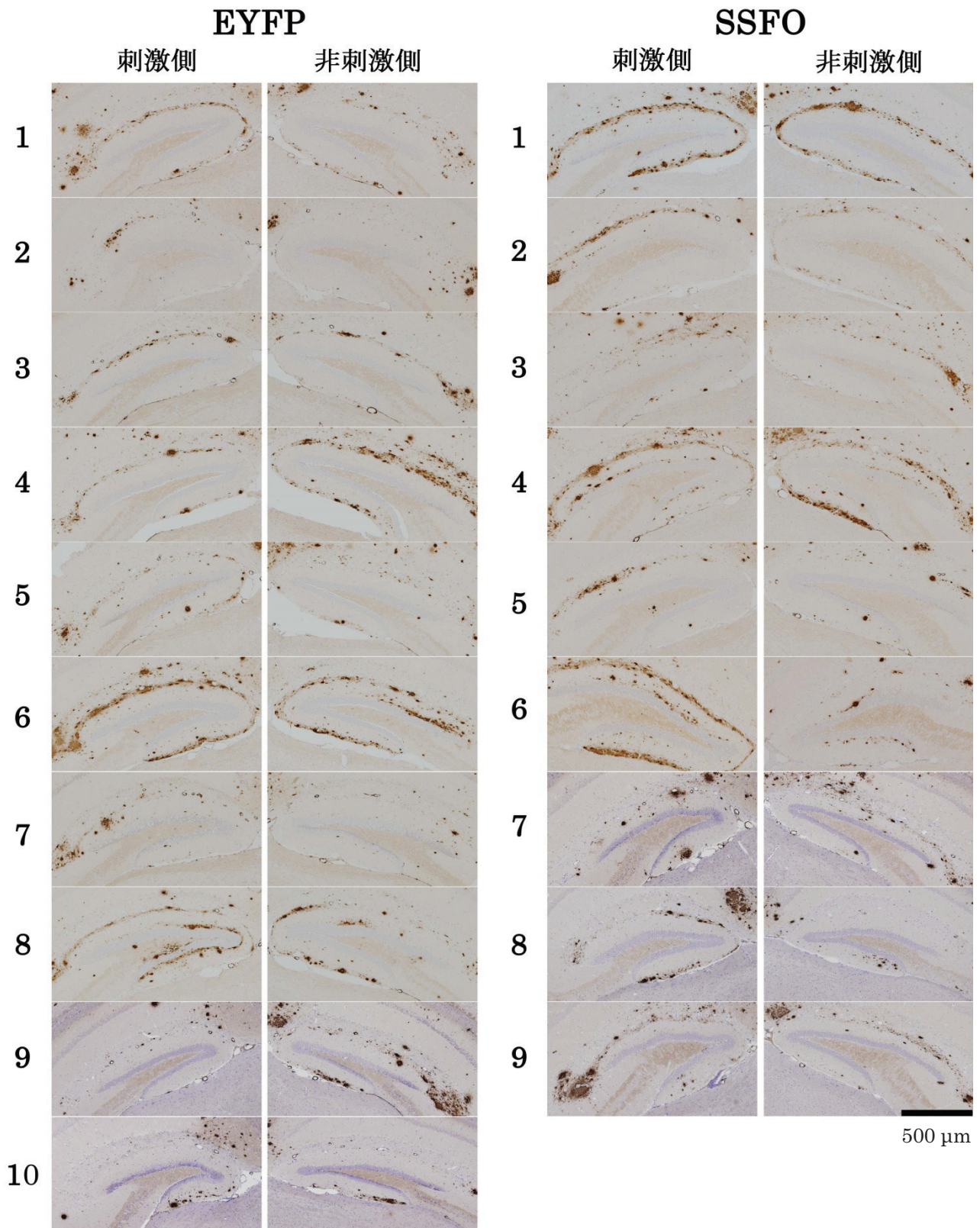
図9 貫通線維路の長期刺激(10.5 月齢から 3 ヶ月間)



10.5 月齢から 3 ヶ月間刺激した EYFP マウスおよび SSFO マウスの免疫組織化学(Aβ, 82E1). 各個体の海馬代表組織像. 個体間で蓄積量にばらつきが見られるが, 歯状回分子層に顆粒状, 斑状から帯状の Aβ 蓄積を認める.

(EYFP マウス:n = 5, SSFO マウス:n = 5)

図10 貫通線維路の長期刺激(10.5 月齢から 5 ヶ月間)



10.5 月齢から 5 ヶ月間刺激した EYFP マウスおよび SSFO マウスの免疫組織化学(A β , 82E1). 各個体の海馬代表組織像. 歯状回外分子層に帯状の A β 蓄積を多数の個体に認める.

EYFP マウスでは刺激側, 非刺激側に同程度の蓄積が見られるが, SSFO マウスには刺激側に蓄積の増加した個体が混在する. 3 ヶ月間刺激と同様に, 蓄積量には個体間のばらつきを認める.

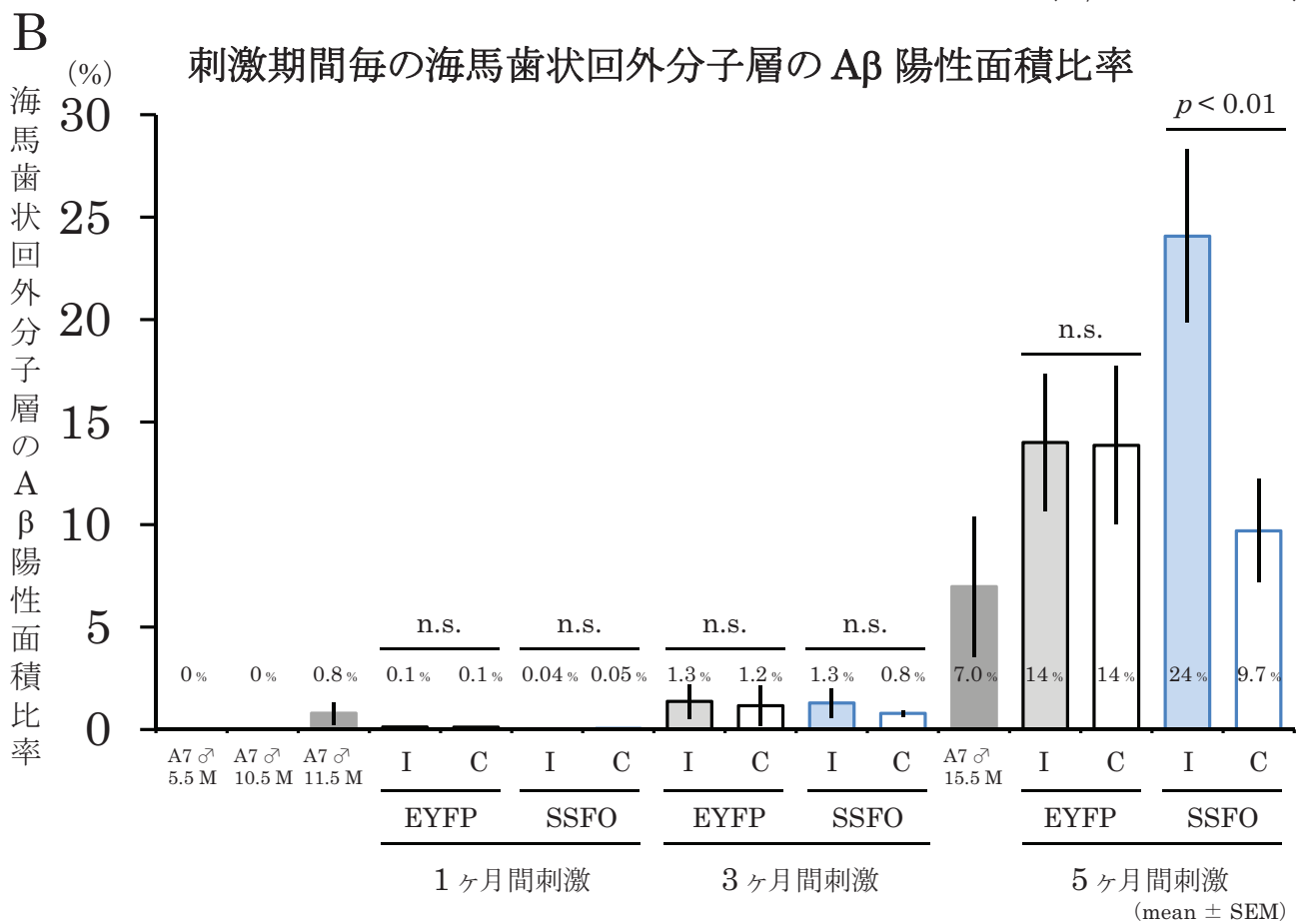
(EYFP マウス:n = 10, SSFO マウス:n = 9)

図11

貫通線維路の長期刺激と Aβ 蓄積 (10.5 月齢から 1, 3, 5 ヶ月間)

A	海馬歯状回外分子層の Aβ 陽性面積比率					歯状回顆粒細胞の c-Fos 陽性率			
	5.5 M	10.5 M	11.5 M	13.5 M	15.5 M	11.5 M	13.5 M	15.5 M	
A7 マウス, ♂	0	0	0.8 ± 0.6	-	7.0 ± 3.4	-	-	-	
EYFP	刺激側	-	-	0.13 ± 0.05	1.4 ± 0.8	14.0 ± 3.4	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.2	2.5 ± 0.4
	非刺激側	-	-	0.12 ± 0.08	1.2 ± 1.0	13.9 ± 3.9	1.8 ± 0.3	1.3 ± 0.2	2.6 ± 0.4
SSFO	刺激側	-	-	0.04 ± 0.02	1.3 ± 0.7	24.0 ± 4.2	100	100	100
	非刺激側	-	-	0.05 ± 0.02	0.8 ± 0.1	9.7 ± 2.5	100	100	100

(% , mean ± SEM)

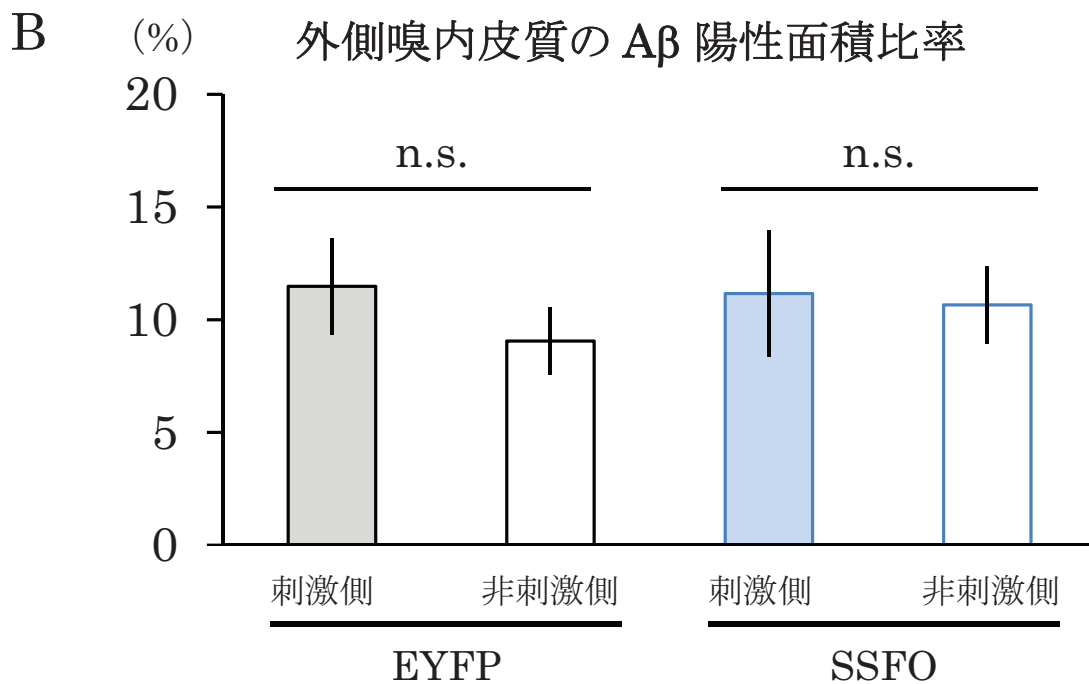
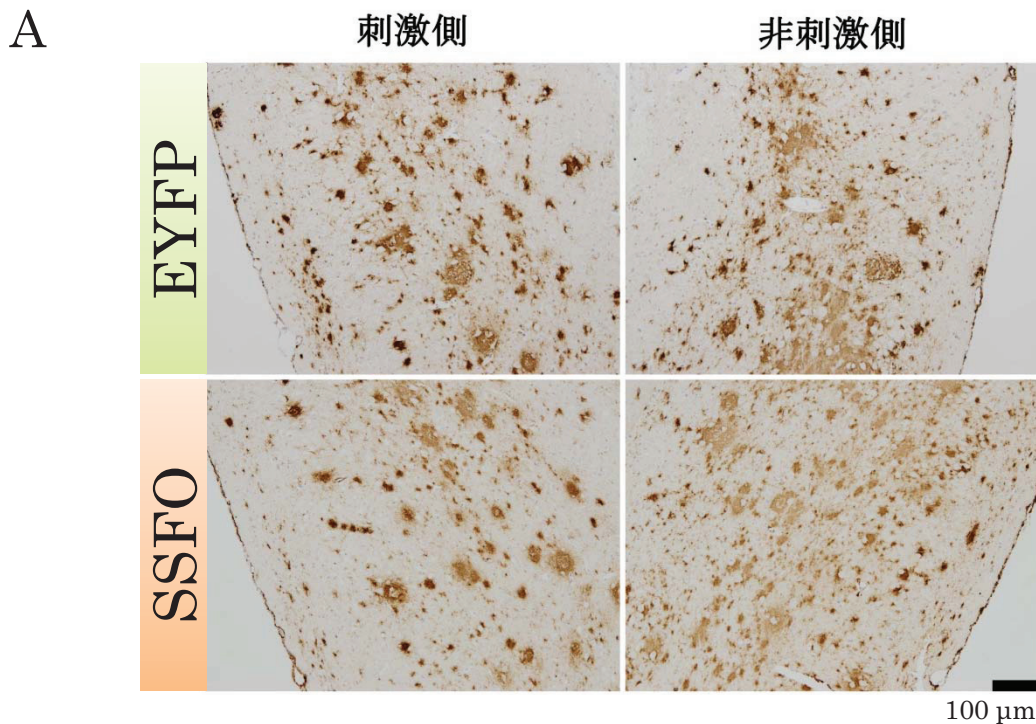


図表の説明は次頁に記載.

I: Ipsilateral, 刺激側
C: Contralateral, 非刺激側

- A:海馬歯状回外分子層の A β 陽性面積比率に関して, 10.5 月齢から 1, 3, 5 ヶ月間刺激した EYFP マウスおよび SSFO マウスの刺激側, 非刺激側の定量結果をまとめた. 参考として雄の A7 マウスの定量値を掲載した(本研究では雌の A7 マウスを使用). また, 歯状回顆粒細胞の c-Fos 陽性率を各刺激期間毎にまとめた. SSFO マウスでは両側に 100 %の陽性像を認めた.
- B: 刺激期間毎に刺激側および非刺激側の海馬歯状回外分子層における A β 陽性面積比率を棒グラフで示した. 参考として 5.5-15.5 月齢の雄の A7 マウスの A β 陽性面積比率を併記した. SSFO マウスでは 5 ヶ月間の刺激後に, 刺激側で有意な A β 蓄積の増加を認めた($p < 0.01$, Student's t-test). その他の期間の SSFO マウスおよび EYFP マウスには有意な左右差を見出せなかった.

図12 貫通線維路の長期刺激(10.5 月齢から 5 ヶ月間)
外側嗅内皮質における A β 蓄積

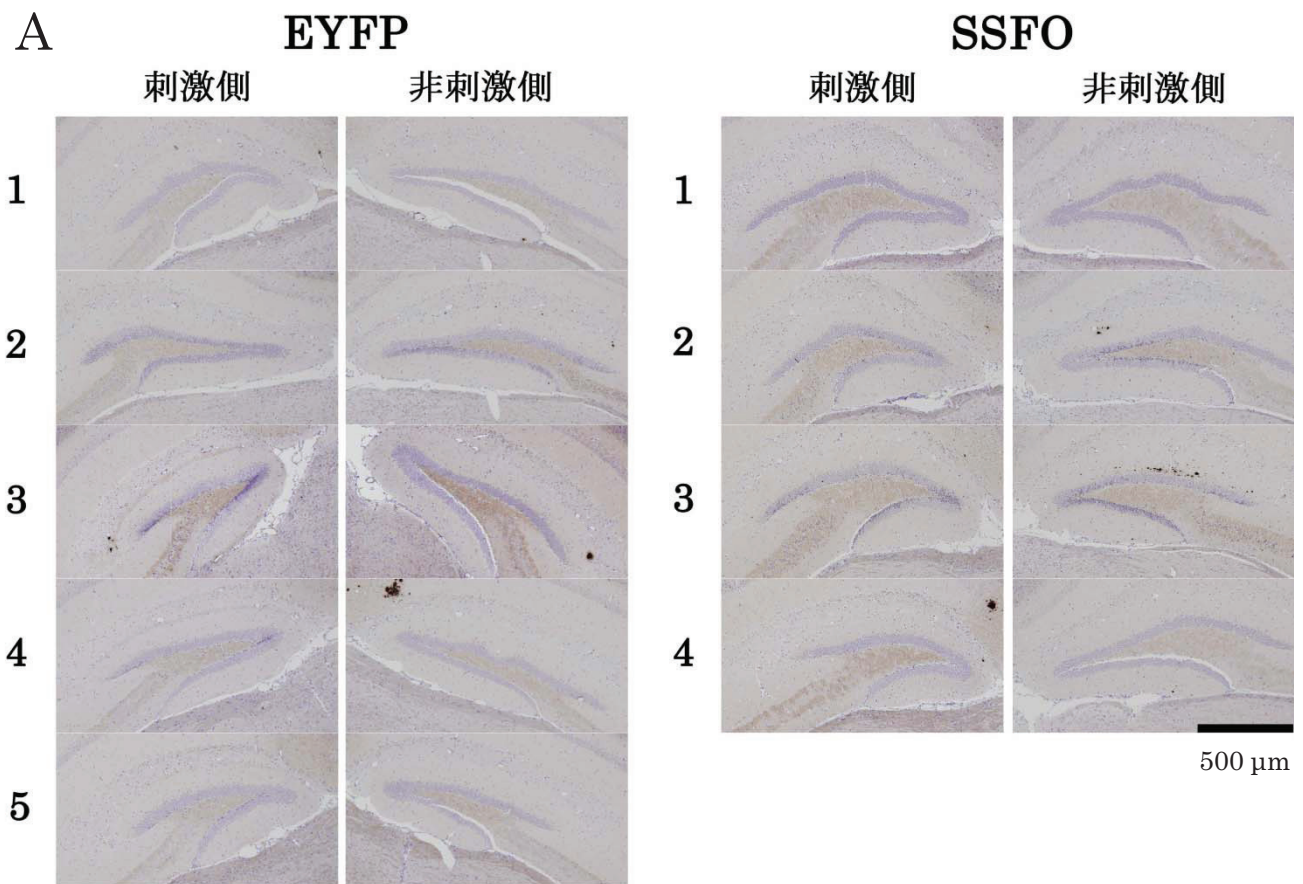


A: 10.5 月齢から 5 ヶ月間刺激した EYFP マウスおよび SSFO マウスの免疫組織化学(A β , 82E1). 貫通線維路の起始である外側嗅内皮質における A β 蓄積を検討した. 刺激側, 非刺激側ともに不整形斑状から一部球状を呈する A β 蓄積を認めた.

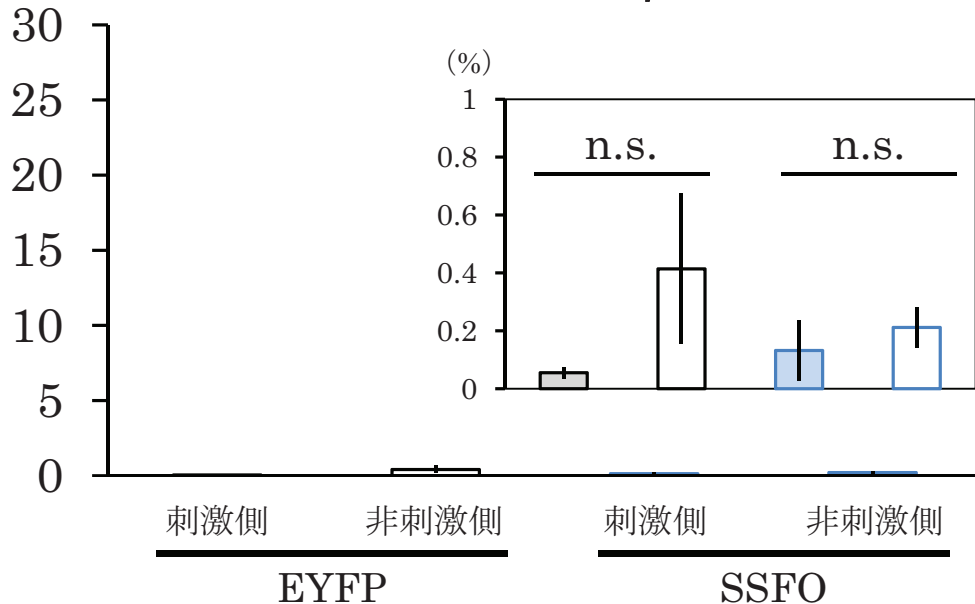
B: 外側嗅内皮質の A β 陽性面積比率. 10.5 月齢から 5 ヶ月間の刺激にて SSFO マウスの刺激側 11.2 \pm 2.8 %, 非刺激側 10.7 \pm 1.7 %, EYFP マウスの刺激側 11.5 \pm 2.1 %, 非刺激側 9.1 \pm 1.5 %に A β 蓄積を認めた. SSFO マウス, EYFP マウスともに有意な左右差を認めなかった(SSFO: $p = 0.88$, EYFP: $p = 0.37$, Student's t-test, mean \pm SEM).

(EYFP マウス: $n = 10$, SSFO マウス: $n = 9$)

図13 貫通線維路の長期刺激(5.5 月齢から 5 ヶ月間)



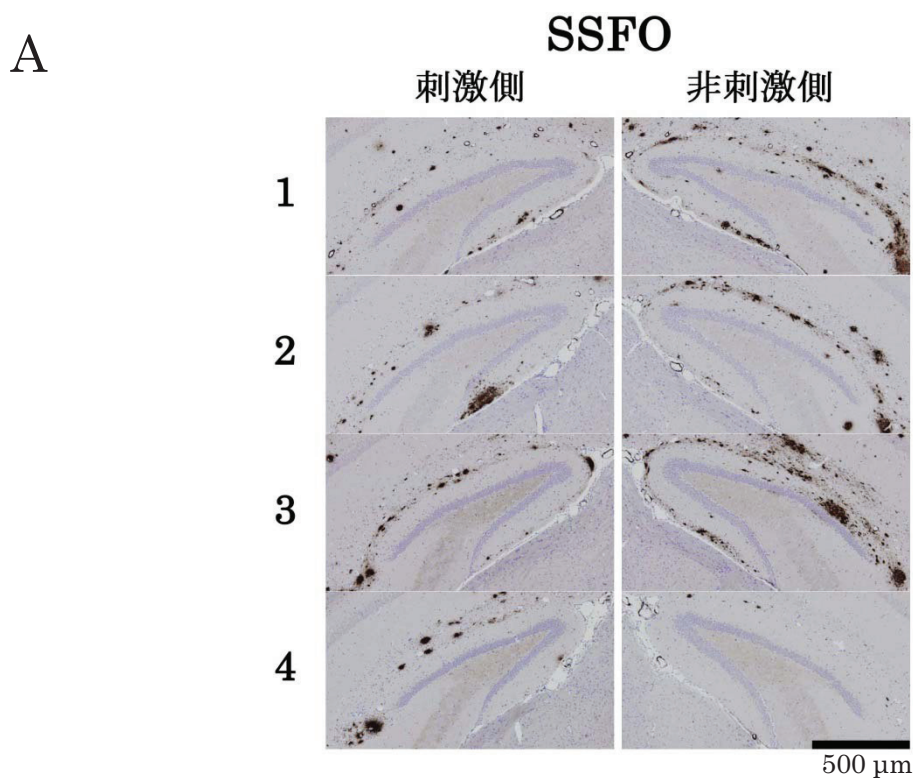
B (%) 海馬歯状回外分子層の Aβ 陽性面積比率



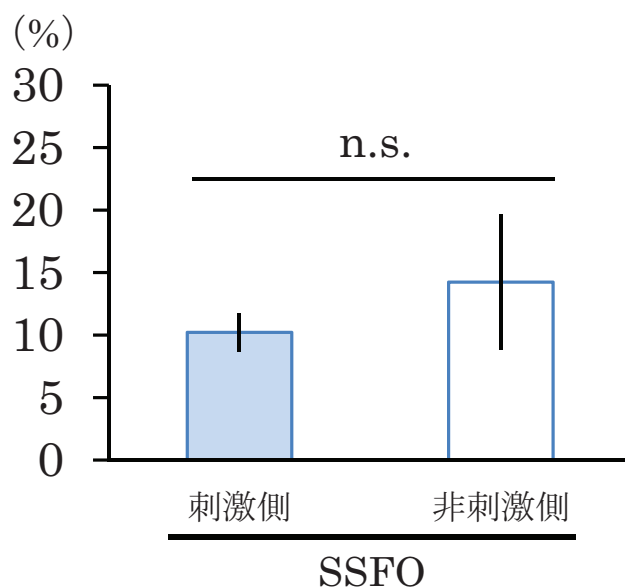
A: 5.5 月齢から 5 ヶ月間刺激した EYFP マウスおよび SSFO マウスの免疫組織化学 (Aβ, 82E1). 各個体の海馬代表組織像. 歯状回外分子層の Aβ 蓄積は僅かか殆ど認められない.

B: 海馬歯状回外分子層の Aβ 陽性面積比率は, SSFO マウスの刺激側 0.13 ± 0.1 %, 非刺激側 0.21 ± 0.07 %, EYFP マウスの刺激側 0.05 ± 0.02 %, 非刺激側 0.41 ± 0.26 % で, 左右差を見出せなかった (SSFO: $p = 0.55$, EYFP: $p = 0.21$, Student's t -test, mean ± SEM). 挿入図は縦軸を最大値 1 % まで拡大したもの. (EYFP マウス: $n = 5$, SSFO マウス: $n = 4$)

図14 貫通線維路の長期刺激(15.5 月齢の直前 3 ヶ月間)



B 海馬歯状回外分子層の A β 陽性面積比率



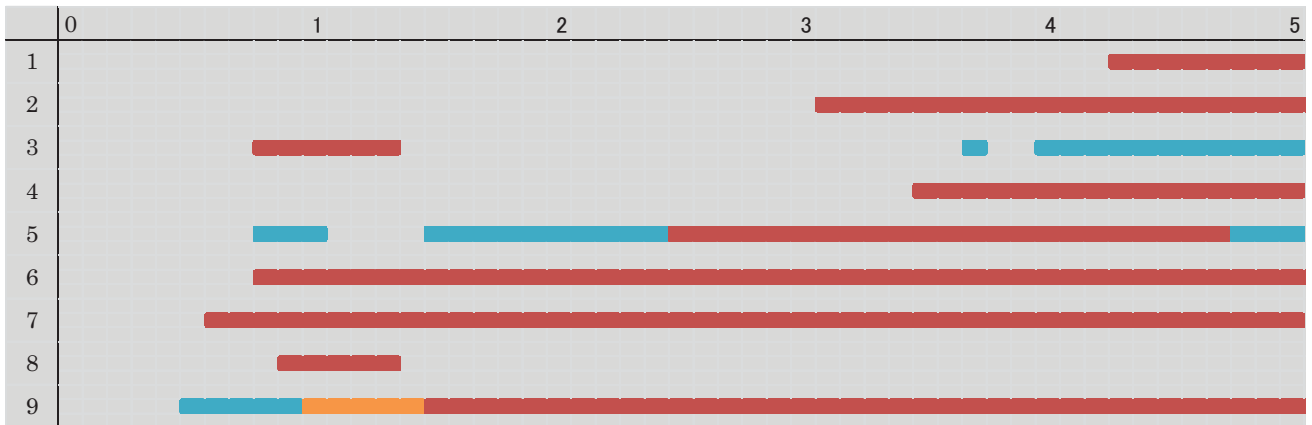
A: 15.5 月齢直前 3 ヶ月間を刺激した SSFO マウスの免疫組織化学(A β , 82E1).
各個体の海馬代表組織像. 歯状回外分子層に带状の A β 蓄積を認める.

B: 海馬歯状回外分子層の A β 陽性面積比率は, 刺激側 $10.2 \pm 1.6\%$, 非刺激側 $14.2 \pm 5.4\%$ と左右差を見出せなかった ($n = 4$, $p = 0.50$, Student's t-test, mean \pm SEM).

図15 長期刺激中, 光照射直後に見られた痙攣発作

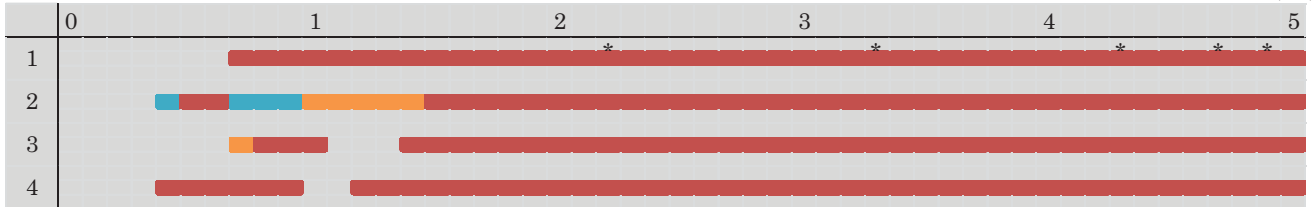
A 10.5-15.5 月齢

(月)



B 5.5-10.5 月齢

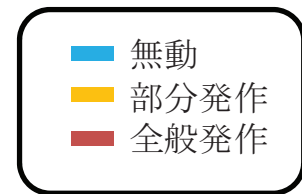
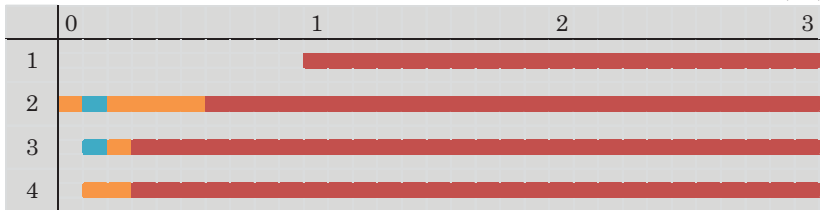
(月)



* 自発痙攣

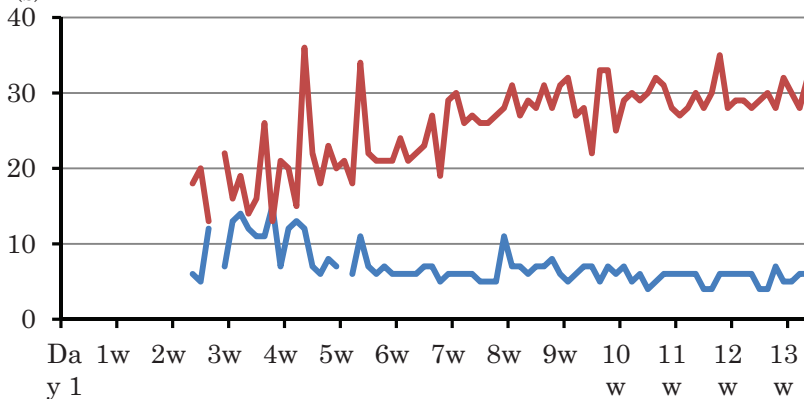
C 12.5-15.5 月齢

(月)



D 全般発作の経過詳細

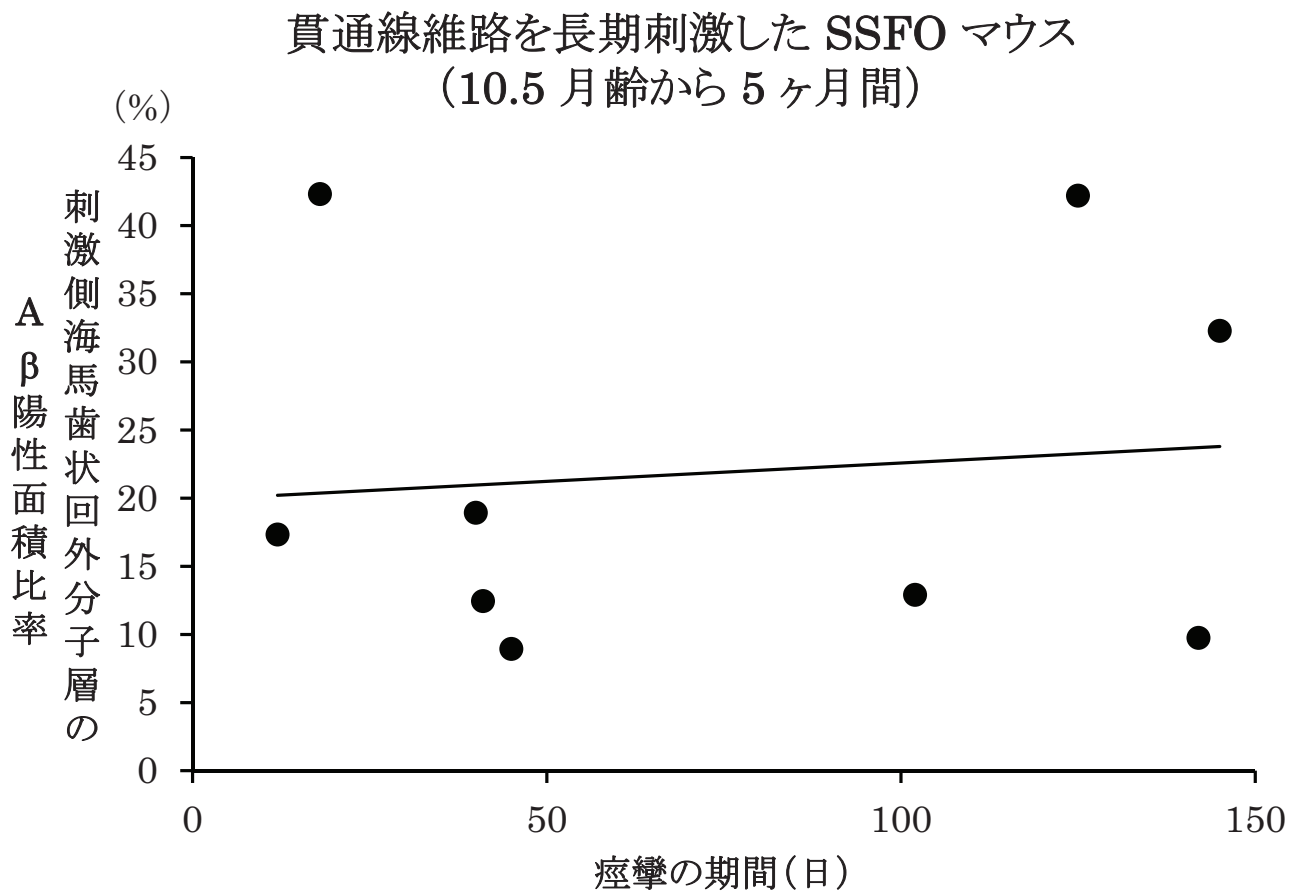
(s)



A-C: 長期刺激中に見られた各個体の痙攣の変化. SSFO マウスでは刺激開始から 2 週から 1 月前後で光刺激に伴う痙攣発作を認め, 部分発作から全般化する個体を認めた.

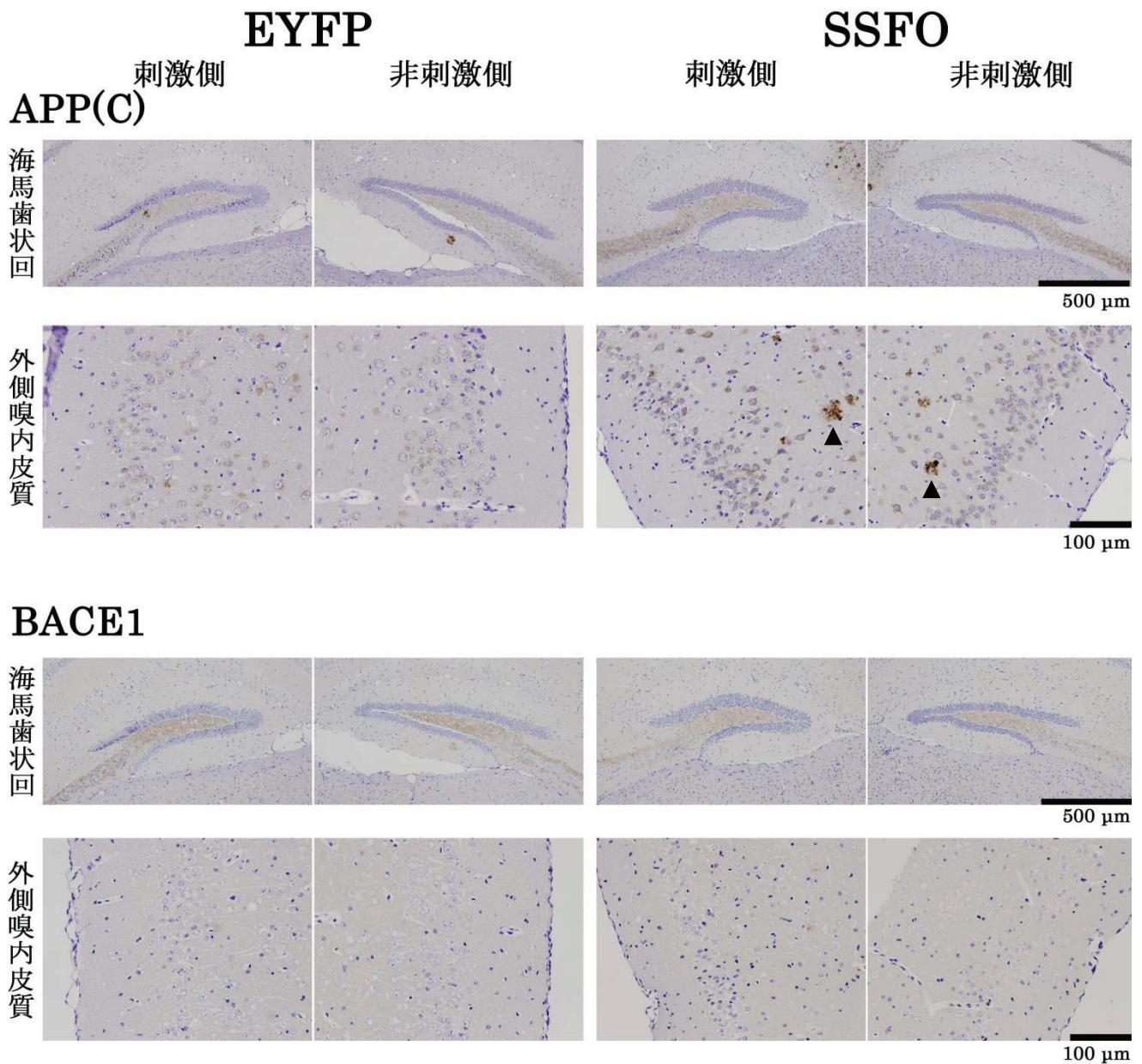
D: 全般発作の経過詳細として, 12.5 月齢から 3 ヶ月間刺激した 1 個体を代表例に図示した. 初期の全般発作では光刺激から 15 秒程の潜時を経て約 15 秒間の痙攣で終息したが, 約 1-1.5 ヶ月間の経過で, 潜時は 5 秒前後まで短縮し, 持続時間は 30-40 秒間に延長した.

図16 痙攣の日数と海馬歯状回外分子層の A β 蓄積



10.5 月齢から 5 ヶ月間, 貫通線維路を長期刺激した SSFO マウスに関して, 痙攣の持続期間 (日数)と刺激側海馬歯状回外分子層における A β 陽性面積比率を個体毎にプロットした. 黒線は線形近似曲線を示し, 両者に明らかな相関を認めなかった ($R^2 = 0.0115$, $n = 9$).

図17 $A\beta$ 産生因子の免疫組織化学的な検討



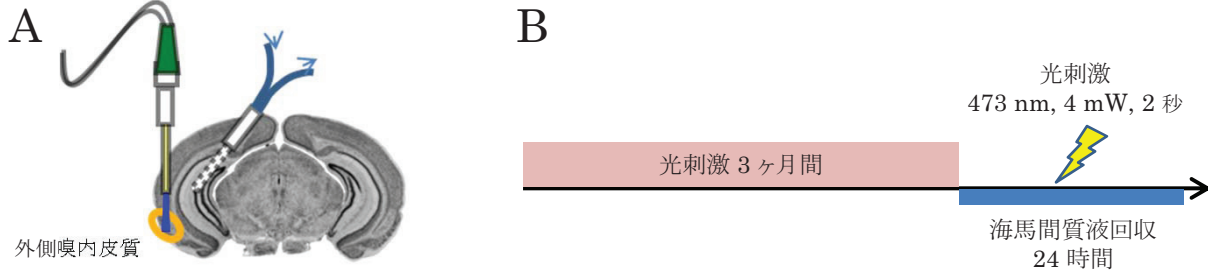
10.5 月齢から 5 ヶ月間、貫通線維路を長期刺激した SSFO マウスおよび EYFP マウスに関して、免疫組織化学的に APP と BACE1 のタンパク質発現量を検討した。

APP(C): 大脳皮質の一部の神経細胞や $A\beta$ 斑周囲の変性神経突起と考えられる部位 (矢頭) に陽性像を認めた。しかし、貫通線維路の投射先の海馬歯状回外分子層に陽性像は見られず、また外側嗅内皮質 II 層の神経細胞体にも SSFO マウスと EYFP マウス間や刺激側と非刺激側の左右間で明らかな差を認めなかった。

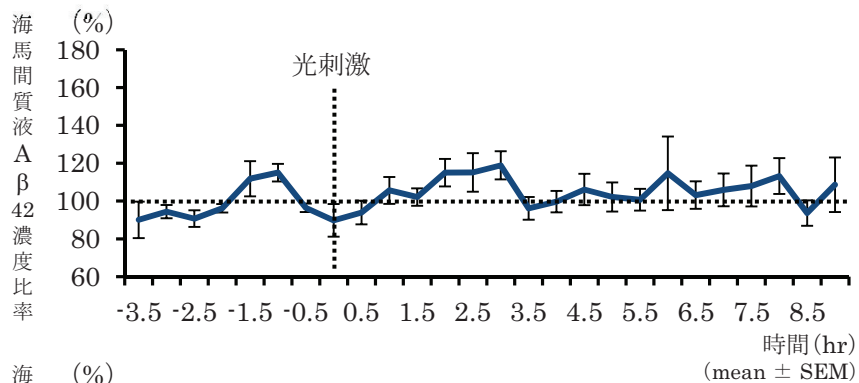
BACE1: 海馬門に淡い陽性像が見られたが、歯状回外分子層や外側嗅内皮質 II 層の神経細胞体に明らかな陽性像を認めなかった。

以上の結果から、免疫組織化学的に検出可能な範囲で、APP と BACE1 タンパク質の発現量が長期刺激に伴う変化を認めなかった。(EYFP マウス: n = 10, SSFO マウス: n = 9)

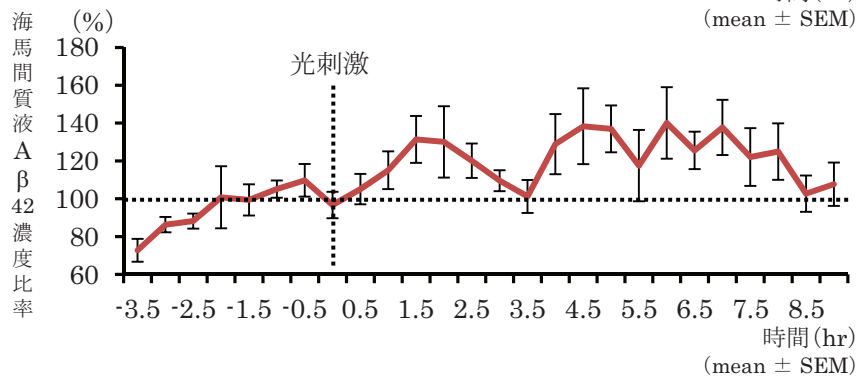
図18 長期刺激時の海馬間質液 A β 濃度



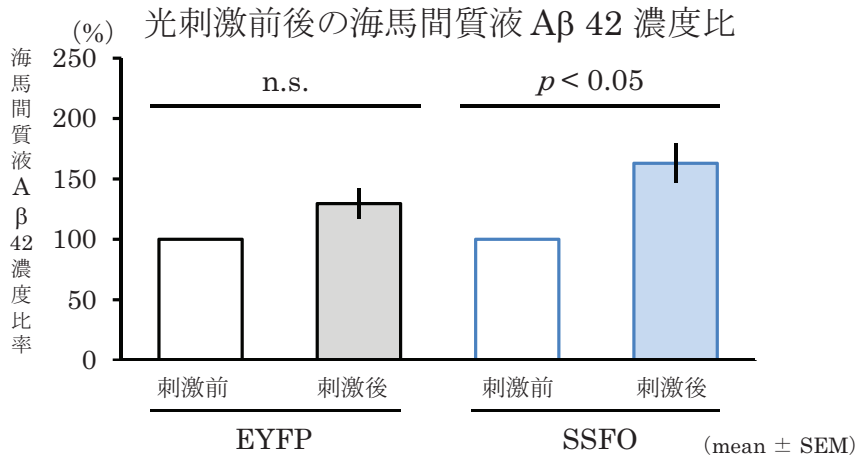
C EYFP (n = 4)



SSFO (n = 6)



D



4-7 月齢から 3 ヶ月間、貫通線維路を長期刺激した雌の A7 マウスを使用した。

A: SSFO もしくは EYFP を発現させた右外側嗅内皮質を光刺激し, *in vivo* マイクロダイアリス法を用いて同側海馬から間質液を回収した。

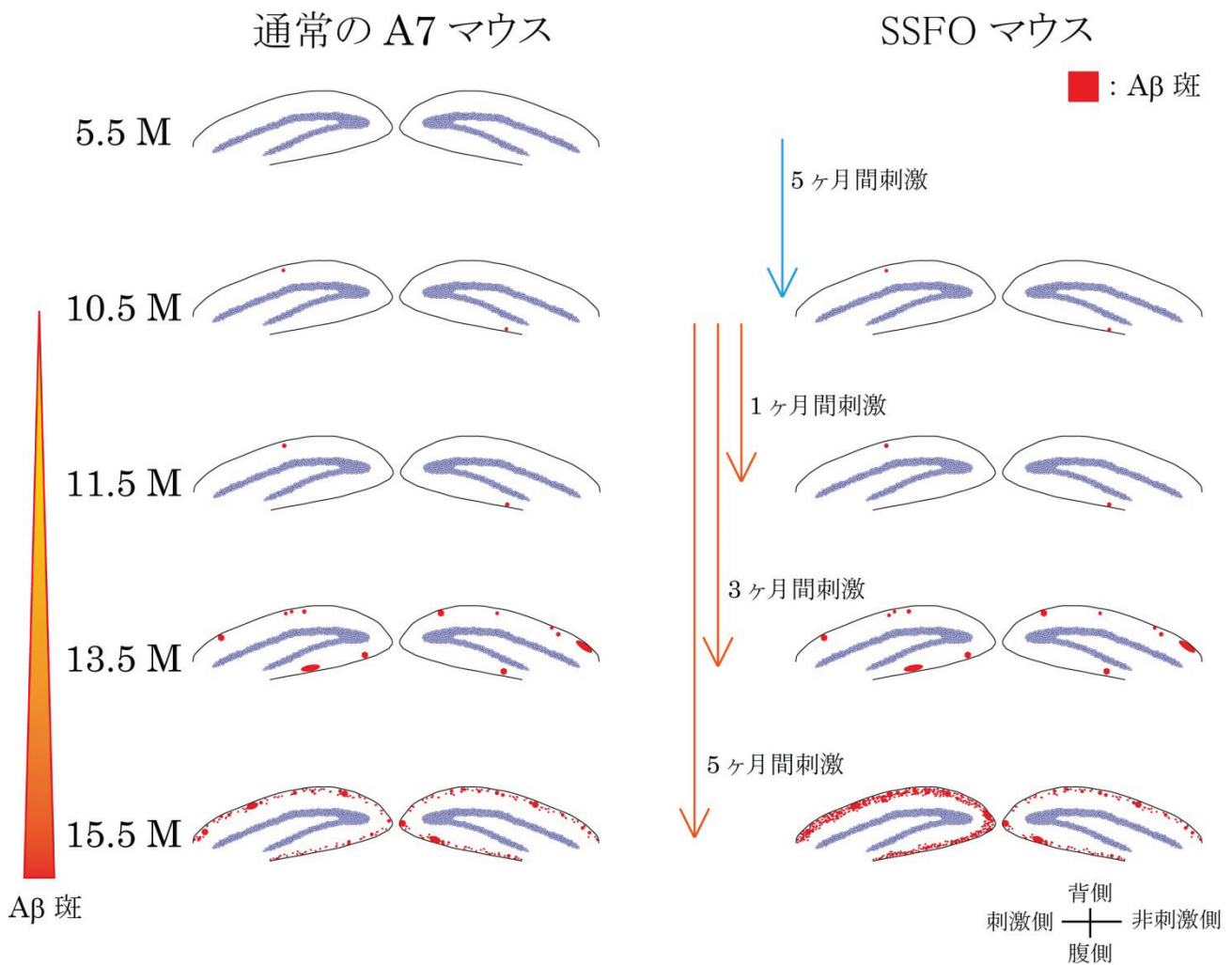
B: 3 ヶ月間の長期刺激後に、海馬間質液を 24 時間回収し、その間に光刺激 (473 nm, 4 mW, 2 秒) を 1 回施行した。

C: 海馬間質液中 A β 42 濃度比率。光刺激前 3 時間の平均値を 100 % とした。光刺激により、EYFP マウスでは大きな変化を認めなかったが、SSFO マウスでは光刺激後 8 時間、A β 42 濃度の増加傾向を認めた。

D: 光刺激前 3 時間の平均値と刺激後 9 時間の最高値を比較した。SSFO マウスでは光刺激後に約 63 % の有意な増加を認めた (95 % 信頼区間 21-105 %, $p = 0.0124$, Paired t-test)。EYFP マウスでは有意な増加を認めなかった ($p = 0.10$, Paired t-test)。

図19 貫通線維路の長期刺激と A β 蓄積

長期刺激の時期(月齢), 期間と A β 蓄積



A7マウスでは、11月齢前後から加齢依存的に海馬にA β 蓄積の増加を認める。本研究では、光遺伝学を用いた貫通線維路の長期刺激により、10.5月齢から5ヶ月間の刺激において、SSFOマウス(SSFOを外側嗅内皮質に発現させたA7マウス)の刺激側の投射先にA β 蓄積の有意な増加を認めた。1, 3ヶ月間および5.5月齢から5ヶ月間の刺激では、有意な増加を見出せなかった。これらの結果から、A β 蓄積に長期刺激の「期間」と「時期」が影響したと考えられる。

表1

本研究に用いた抗体一覧

標的分子	抗体名	販売元	Host	Subclass	酵素抗体法		蛍光抗体法
					前処理	希釈濃度	希釈濃度
A β	82E1	IBL	Mouse	IgG, monoclonal	Microwave (クエン酸)+ Proteinase K	1:1,000 (0.1 μ g/mL)	1:5,000 (0.02 μ g/mL)
GFP	A11122	Life Technologies	Rabbit	IgG, polyclonal	Microwave (Tris-HCl)	1:500 (4 μ g/mL)	1:1,000 (2 μ g/mL)
c-Fos	K-25	Santa Cruz	Rabbit	IgG, polyclonal	Microwave (クエン酸)	1:1,000 (0.2 μ g/mL)	—
APP	APP(C)	IBL	Rabbit	IgG, polyclonal	Microwave (クエン酸)	1:1,000 (0.1 μ g/mL)	—
BACE1	D10E5	Cell Signaling	Rabbit	IgG, monoclonal	Proteinase K	1:1,000	—
c-Fos	Ab-5	Millipore	Rabbit	IgG, polyclonal	—	—	1:4,000 (0.025 μ g/mL)
MAP2	M4403	Sigma	Mouse	IgG, monoclonal	—	—	1:1,000

謝辞

本研究は神経病理学分野, 岩坪威教授, 橋本唯史講師の下で遂行させて頂きました。3 年間, 日々御指導を賜りましたことを厚く御礼申し上げます。また, 尾藤晴彦教授, 奥野浩行前講師 (京都大学大学院医学系研究科メディカルイノベーションセンター SK プロジェクト特定准教授) をはじめ神経生化学教室の皆様にはアデノ随伴ウイルスの大量精製や注入手術, マウス大脳皮質初代培養神経細胞などの多岐に亘る実験技術に関して御指導を賜りました。本論文中には記載しておりませんが, 蛍光ユニット付 LMD の使用や組織片からの RNA 抽出に関しては, 健康環境医工学部門の遠山千春教授, ベナー聖子氏に御指導を賜りました。薬学系研究科薬品作用学教室の池谷裕二教授と阿部麗実氏には, 長期間の貫通線維路の刺激によりキンドリングを来した SSFO マウスの電気生理学的な検討のため, 多大なる御尽力を賜りました。指導教員の深山正久教授には神経科学の研究を始める土台となる人体病理の基礎を教わり, 神経病理学分野での研究の間も激励を賜りました。そして 3 年間の日々では神経病理学分野および薬学系研究科臨床薬学教室の皆様に変にお世話になりました。本研究は, 山本薫氏と実験を進めながら, 仲泰史氏と引き継いで参りました。仲泰史氏には *in vivo* マイクロダイアリシス法を用いた海馬間質液 A β 濃度測定等で大変お世話になりました。お二方の実験へ取り組む熱心な姿勢から学ぶことが多々あり, 共に研究する機会を賜りましたことを感謝致しております。最後に二人の幼子を育てつつ, 基礎実験を行う時間を与えてくれました妻と, 育児を支えてくれました父母に感謝致します。