

論文の内容の要旨

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

アルツハイマー病 (AD) は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. 病理学的に海馬や新皮質を主とする大脳皮質の萎縮, 神経細胞死が見られ, 老人斑や神経原線維変化の出現を特徴とする. 老人斑の主な構成成分はアミロイドβタンパク質 (Aβ) であり, 神経原線維変化はリン酸化タウタンパク質の蓄積からなる.

AD の病因仮説としてアミロイド仮説が唱えられている. Aβ蓄積を上流としてリン酸化タウの蓄積が生じ, 神経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. Aβ蓄積の主な源として脳間質液中に分泌される Aβの関与が想定される. 脳内の Aβ産生は主に神経細胞が担っており, 薬理的や電気的な刺激による Aβ分泌増加が初代培養神経細胞や海馬器官培養, 脳における *in vivo* マイクロダイアリシス法により示されている. このような短期的な神経活動依存性の Aβ分泌に関しては種々の報告があるが, 長期的な神経活動の変化が Aβ分泌や蓄積に及ぼす影響は殆ど検討されていない.

そこで我々は AD の初期病変である嗅内皮質と海馬を結ぶ貫通線維路を, 光遺伝学を用いて長期刺激する実験系を確立し, モデルマウスにおいて長期的な貫通線維路の活性化が Aβ分泌や蓄積に与える影響を検討した.

貫通線維路は嗅内皮質 II 層の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外分子層へ投射する. 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すると海馬の Aβ蓄積が減少すること, 嗅内皮質にアミロイド前駆体タンパク質 (APP) を過剰発現すると同側海馬の Aβ蓄積が増加することが示されており, 海馬 Aβ蓄積への貫通線維路の密接な関与が示されている.

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により, 光を用いた神経活動制御を可能とする手法である. 非選択的陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシン 2 は短時間作用性であるが, 今回用いた改変体 Stabilized step function opsin (SSFO) は 1 回の光刺激で脱分極状態を 30 分間持続させる特性を有する.

本研究では, アデノ随伴ウイルスベクターを用いて, CaMKII α プロモーター下に SSFO-EYFP もしくは EYFP を発現させた. タイターは SSFO 3.5×10^{13} gc/mL, EYFP 3.4×10^{13} gc/mL に設定した. 定位脳手術装置で外側嗅内皮質 (AP -3.0 mm, L 4.5 mm, DV -2.5 mm) にウイルス液 1.0 μ L を注入し, 1 ヶ月間飼育してウイルスの安定化を待った. その後, 光カヌラを AP -3.0 mm, L 4.4 mm, DV -2.25 mm に, *in vivo* マイクロダイアリシスではダイアリシスカヌラを AP -2.8 mm, L 0.5 mm に 38 °, DV -1.3 mm で留置した. 発現の成功は右外側嗅内皮質と右海馬歯状回外分子層に EYFP の蛍光を認めることにより確認した. また, SSFO を発現させたマウス (SSFO マウス) では外側嗅内皮質への短期的な青色光照射により, 同側の歯状回顆粒細胞層に広範な c-Fos 陽性像を認めた.

AD モデルマウスとしては、*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とオーストリア型変異を併せ持つヒト *APP* を過剰発現したマウスである。A β 42 が主に産生され、雌においては A β 蓄積が雄よりやや早発し、11 月齢からびまん性の A β 斑が脳や海馬に見られる。

この A7 マウスの貫通線維路の短期刺激（473 nm, 4 mW, 毎分 2 秒, 連続 4 時間）により海馬間質液中 A β 濃度は 1 時間後に 24 %増加した。A β の上昇の程度は、既報の薬理的、電気的な刺激と同程度であり、光遺伝学を用いた神経細胞刺激により、A β の急性増加を招来可能であることが確認された。

貫通線維路の長期刺激が A β 蓄積に与える影響を検討するため、組織学的に A β 斑が形成される直前の 10.5 月齢から 1, 3, 5 ヶ月間、雌の A7 マウスに毎日 1 回光刺激（473 nm, 4 mW, 2 秒）を施行し、長期間の繰り返し刺激を行った。刺激を行った動物の総数は次の通りであった：1 ヶ月間 EYFP ; 6 例, SSFO ; 5 例, 3 ヶ月間 EYFP ; 5 例, SSFO ; 5 例, 5 ヶ月間 EYFP ; 10 例, SSFO ; 9 例。刺激終了後、脳を摘出し 4 % パラフォルムで 24 時間固定し、パラフィン包埋後に切片を作製し、免疫組織化学的に検討した。

まず、貫通線維路の長期刺激による神経活動の左右差を評価するため、神経活動に即応して活性化される前初期遺伝子の 1 つである *c-fos* を指標とし、抗 c-Fos 抗体で免疫染色した。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、左右差は見られず、歯状回顆粒細胞の陽性率は 1-3 %であった。一方、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、刺激側と非刺激側における神経活動の差を捉えることはできなかった。長期刺激による神経活動を計測、定量化する上では、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による検討が今後必要と考える。

続いて、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。1 ヶ月間刺激では 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). 3 ヶ月間刺激では約 1.0 %であり、同様に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). しかし、5 ヶ月間刺激では SSFO マウスの刺激側の A β burden は 24.0 ± 4.2 %と増加したのに対し、非刺激側では 9.7 ± 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 ± 3.4 %, 非刺激側 13.9 ± 3.9 %であり、左右差を見出せなかった（ $p = 0.98$, Student's t-test, mean \pm SEM).

さらに、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、A β burden は SSFO マウスの刺激側 11.2 ± 2.8 %, 非刺激側 10.7 ± 1.7 %, EYFP マウスの刺激側 11.5 ± 2.1 %, 非刺激側 9.1 ± 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 陽性面積比率に有意な左右差を見出せなかった（SSFO ; $p = 0.88$, EYFP ; $p = 0.37$, Student's t-test, mean

± SEM). 以上の結果から、貫通線維路の長期刺激により、投射先に A β 蓄積の増加を来すことが実験的に示された。

次に、長期刺激の開始時期および期間と A β 蓄積の関係について検討した。長期刺激が A β 蓄積開始を早めるか検討するため、より若齢の 5.5 月齢から 5 ヶ月間の刺激を試みた (EYFP; 5 例, SSFO; 4 例)。その結果、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)。また、刺激期間の影響を検討するため、海馬に A β 斑が出現した後の 12.5 月齢から 3 ヶ月間の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)。これらの結果から、貫通線維路の長期刺激に伴う A β 蓄積の促進には、刺激の時期および期間が影響する可能性が示唆された。

さらに、貫通線維路の長期刺激により A β 蓄積増加を来した要因を検討するため、長期刺激下における A β 分泌の評価として、光刺激による海馬間質液中 A β 濃度の変化を検討した。外側嗅内皮質に SSFO あるいは EYFP を発現させ、4-7 月齢から 3 ヶ月間、貫通線維路を刺激した雌の A7 マウスを用いて、*in vivo* マイクロダイアリシスで投射先の海馬間質液を回収し、ELISA で A β 濃度を測定した。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)。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 濃度は刺激前平均まで一旦低下した。一方で EYFP マウスでは光刺激による大きな変化を認めなかった (SSFO; $n=6$, EYFP; $n=4$)。以上の結果から、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 濃度が上昇することが分かり、A β 蓄積増加を来した因子の 1 つと考えられた。

また、貫通線維路の長期刺激の経過中、光刺激直後に痙攣発作を生じる SSFO マウスが出現し始め、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。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 秒間の無動や寡動、10-20 秒間の刺激対側への頭部回旋を主とする部分発作から始まり、2 週から 1 ヶ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。痙攣後、5-10 分間の無動・寡動状態が続き、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。これらの経過から、Stage 3 に相当するキンドリングが形成されたと考えられた。A β 蓄積への痙攣の影響を検討するため、A β 蓄積増加が見られた 10.5 月齢から 5 ヶ月間刺激した SSFO マウスに関して、刺激側海馬歯状回外分子層の A β 陽性面積比率と痙攣の総日数を検討したが、両者に明らかな相関を認めなかった ($R^2=0.0115$, $n=9$)。

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、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、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。*in vivo* マイクロダイアリシスの検討により、長期刺激下において海馬間質液中 A β 濃度の上昇を認め、A β 蓄積増加を来した原因の 1 つと考えられた。また、長期刺激の経過中に痙攣発作が誘発されたことから、痙攣発作が A β 蓄積に促進的な影響を

与えている可能性も考えられた。今後のさらなる検討により，神経活動の長期の亢進と $A\beta$ 蓄積の関係が明確にされ，どのような機序が両者を介するのか，解明が待たれる。