

アルツハイマー病モデルマウスの記憶機能低下における P2Y1 受容体欠損の影響に関する研究

細胞応答化学分野 学生証番号 47-146322 氏名 白井 隆貴
指導教員 久恒辰博准教授

【研究の背景・目的】

アルツハイマー病(AD)は、認知症の主要な原因の一つとして知られている神経変性疾患であり、認知機能の低下や脳萎縮などの特徴がある。AD 患者の脳内においては、アミロイド β ($A\beta$) の蓄積により老人斑が形成され、神経細胞死を引き起こすというアミロイド仮説が現在広く支持されている。この神経細胞死は、 $A\beta$ がグリア細胞に作用し、炎症性サイトカイン産生を促進させることが原因であると考えられている。また、近年の研究では糖尿病や高血圧などの生活習慣病が AD の危険因子として、発症や進行に関与していることが明らかになってきた。当研究室の先行研究では、AD の遺伝的要因を持つ Tg マウス (APP^{swe}/PS1^{dE9}) に高脂肪食 (HFD) を給餌させると、血中インスリン濃度が上昇して2型糖尿病を発症し、記憶機能低下が通常 (12 ヶ月齢) よりも早期 (6 ヶ月齢) に発症されることが示されている (Herculano *et al.*, 2013)。また、血小板凝集や炎症反応に関与している P2Y1 受容体 (P2Y1R) を欠損させた P2Y1 (-/-) マウスは、脳血管性認知症の原因でもある中大脳動脈閉塞 (MCAO) を施すと、野生型に比べて記憶機能の低下が軽減されることが示されている (Chin *et al.*, 2013)。以上のことから、4 ヶ月齢から 2 ヶ月間の HFD を給餌した 6 ヶ月齢の Tg マウス (以下、AD モデルマウスと表記する) においても P2Y1R を欠損させると、記憶機能の低下が抑制されるのではないかと考えた。本研究では、①P2Y1R の欠損が AD モデルマウスにおける記憶機能低下に対してどのように影響するのかということと、②その作用機序を明らかにすることを目的に研究を行った。そこで、AD モデルマウスと P2Y1 (-/-) マウスを交配させることで APP/P2Y1 (+/+) マウスと APP/P2Y1 (-/-) マウスを作製し、①行動実験により記憶機能を評価した後、②脳内 $A\beta$ 、血中の炎症マーカー、マウスの血圧を調べた。

【キーワード】 アルツハイマー病、P2Y1 受容体、 $A\beta$ クリアランス

【研究の方法・結果】

1. AD モデルマウスで P2Y1R を欠損させると、記憶機能の低下が抑制された

AD モデルマウスにおける恐怖記憶機能を評価するために、APP/P2Y1 (+/+) マウスと APP/P2Y1 (-/-) マウスを用いて文脈的恐怖条件付け試験 (CFC) を行った。これは箱の中にマウスを入れて電気ショックを与え、翌日にまた同じ箱に入れた時にマウスが恐怖記憶を想起して静止する時間 (Freezing time) を測定するものであり、Freezing time が長いほど恐怖記憶が形成されていることを表す (Contextual test)。これは海馬・扁桃体依存的な記憶を評価するものであり、APP/P2Y1 (+/+) 群と比較して APP/P2Y1 (-/-) 群の方が Freezing time の割合が有意に高かった (Fig. 1-1)。

次に、AD モデルマウスにおける空間記憶機能を評価するために、APP/P2Y1 (+/+) マウスと APP/P2Y1 (-/-) マウスを用いてモリス水迷路 (MWM) を行った。マウスを円形のプールで 60 秒間泳がせ、水面下のプラットフォームを探索させる試行を 5 日間 (4 trials/day) 行った (Acquisition test)。6 日目にプラットフォームを取り除いてマウスに自由探索を行わせた (Probe test)。プラットフォームがあった領域 (Target quadrant) にマウスが留まる割合が高いほど、空間記憶が形成されていることを表している。APP/P2Y1 (+/+) 群と比較して APP/P2Y1 (-/-) 群の方がこの領域に留まる割合が有意に高かった (Fig. 1-2)。

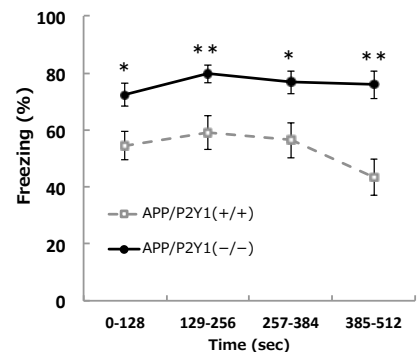


Fig.1-1 | Contextual testでの記憶機能評価
Student's t-test : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

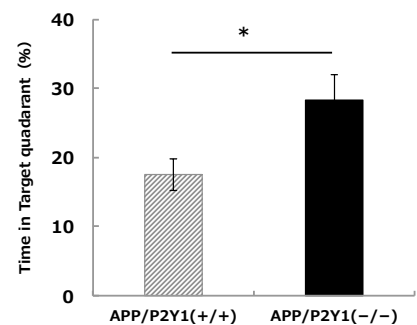


Fig.1-2 | Probe testでの空間記憶機能評価
Student's t-test : * $p < 0.05$

2. マウス脳内の可溶性 Aβ 42 量の低下が見られた

海馬の免疫染色を行うことで Aβ 凝集による老人斑の蓄積を確認した。マウスの脳内で発現している Aβ を定量的に測定するために、半球から抽出したタンパク抽出液を用いて ELISA を行うことで、可溶性 Aβ 40・Aβ 42 の発現量を調べた。一般的に、Aβ 42 は Aβ 40 に比べて凝集能及び神経細胞毒性が高いことが知られている。Aβ 40 濃度においては 2 群間に有意な差は見られなかったが、Aβ 42 濃度では APP/P2Y1(+/+)群と比較して、APP/P2Y1(-/-)群の方が有意に低い値を示した (Fig. 2)。

3. 炎症性ケモカイン CXCL12 量の低下が見られた

マウスの血中の炎症性ケモカイン CXCL12 の濃度を調べるために、マウスの血清を用いて ELISA を行った。CXCL12 は血管形成に関与しており、血小板が活性化し、凝集する際に多く放出されることが明らかとなっている。また、先行研究から、CXCL12 は認知機能低下の際に血清中で発現量が増加する炎症性マーカーであることがわかっている。APP/P2Y1(-/-)群は APP/P2Y1(+/+)群に比べて、血清中の CXCL12 濃度が有意に低い値を示した (Fig. 3)。

4. マウスの収縮期血圧や拡張期血圧の低下が見られた

HFD 給餌による糖尿病発症で生じる高血圧が AD の危険因子として挙げられることと、P2Y1R は血小板凝集に関与していることから、2 群間の血圧にはどのような差が見られるかを調べるために、Tail-Cuff 法により非観血で血圧を測定した。APP/P2Y1(+/+)群と比較して、APP/P2Y1(-/-)群の方が平均血圧、収縮期血圧、拡張期血圧のいずれにおいても有意に低い値を示した。 (Fig. 4)。

【研究の考察・結論】

本研究から、AD モデルマウスにおいて P2Y1R を欠損させると、海馬・扁桃体依存的な恐怖記憶機能だけでなく、海馬依存的な空間記憶機能の低下が抑制されることが示唆された (Fig.1-1, 1-2)。これは脳内での Aβ 量の減少によるものではないかと考え、Aβ 量を測定してみたところ、可溶性 Aβ 42 量が減少していた (Fig. 2)。また、血中の炎症性ケモカイン CXCL12 の量も APP/P2Y1(-/-)群のほうが有意に少なかった (Fig. 3)。この Aβ 量の減少には、動脈拍動を駆動力とする血管周囲ドレナージ経路による Aβ クリアランス機能が関係していると考えた。その理由の一つとしては、動脈硬化の指標とされる平均血圧が APP/P2Y1(-/-)群で低かったことが挙げられる (Fig. 4)。本研究で用いた AD モデルマウスは、2 ヶ月間の HFD 給餌によってインスリン抵抗性になり、アテローム性動脈硬化が起きていると考えられる。しかし、P2Y1R を欠損すると、血小板が凝集しにくくなり、これによって動脈硬化が緩和される。このことで血管周囲ドレナージ経路による Aβ クリアランス機能が維持され、可溶性 Aβ42 が減少したと考えた。また、P2Y1R にはアストロサイトの炎症反応にも関与しており、P2Y1R を欠損させるとアストロサイトの神経障害的な働きから神経保護的な働きへと正常化する。これにより炎症性サイトカインの産生が抑制されることで、記憶機能が維持されたと推測した。本研究の結果は、今後のアルツハイマー病治療のための P2Y1R をターゲットとした薬剤の開発に役立てることができるのではないかと考える。

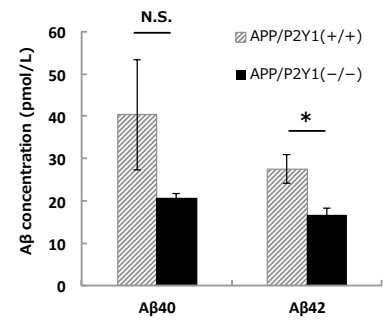


Fig.2 | ELISAによるAβ40・Aβ42濃度測定
Student's t-test : *p < 0.05

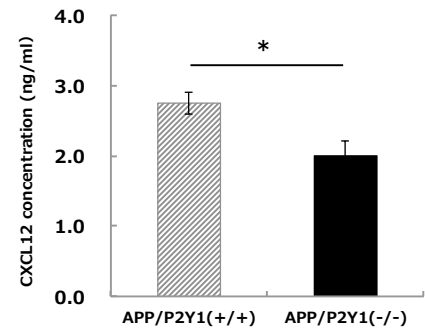


Fig.3 | ELISAによるCXCL12濃度測定
Student's t-test : *p < 0.05

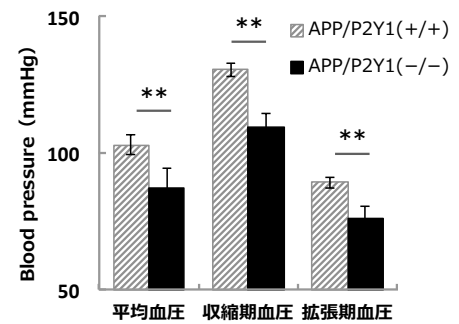


Fig.4 | Tail-Cuff法による血圧測定
Student's t-test : **p < 0.01