

Title	アルツハイマー病モデルマウスを用いたA β 蓄積から神経原繊維変化へ至る機構の解明
Sub Title	Investigation of an underlying mechanism of progression from accumulation of Abeta to neurofibrillary tangle formation using Alzheimer's model mice
Author	阿部, 陽一郎(Abe, Yoichiro) 新倉, 貴子(Niikura, Takako)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>アルツハイマー病の進行には様々な脳内環境の変化が関わると考えられる。アストロサイトは脳内環境を一定に保つことから、アストロサイトの機能低下が病態にどのような影響を及ぼすか調べるため、アストロサイトに発現するアクアポリン4遺伝子を破壊したアルツハイマー病モデルマウスを作製した。その結果、アクアポリン4を欠損させてもアミロイド斑の形成及び反応性アストロサイトのアミロイド斑周辺への集積は変化しなかったが、ミクログリアの集積が有意に減少していた。</p> <p>It has been suggested that progression of Alzheimer's disease is enhanced by a lot of changes in environment inside the brain. Since it is well known that astrocytes have a role in maintaining brain environment, we focused on the effect of astrocytic dysfunction in Alzheimer's model mice by disrupting their aquaporin-4 gene. Aquaporin-4 is a water channel in the brain expressed in astrocytes and has a role in water homeostasis in the brain. Although amyloid plaque formation and reactive astrocytosis surrounding the plaques were not altered, microgliosis around the plaques was significantly reduced in cortical area in the Alzheimer's model lacking aquaporin-4.</p>
Notes	研究種目：挑戦的萌芽研究 研究期間：2013～2014 課題番号：25670425 研究分野：神経科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25670425seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670425

研究課題名(和文)アルツハイマー病モデルマウスを用いたA 蓄積から神経原繊維変化へ至る機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of an underlying mechanism of progression from accumulation of Abeta to neurofibrillary tangle formation using Alzheimer's model mice

研究代表者

阿部 陽一郎 (Abe, Yoichiro)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10317331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の進行には様々な脳内環境の変化が関わると思われる。アストロサイトは脳内環境を一定に保つことから、アストロサイトの機能低下が病態にどのような影響を及ぼすか調べるため、アストロサイトに発現するアクアポリン4遺伝子を破壊したアルツハイマー病モデルマウスを作製した。その結果、アクアポリン4を欠損させてもアミロイド斑の形成及び反応性アストロサイトのアミロイド斑周辺への集積は変化しなかったが、ミクログリアの集積が有意に減少していた。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that progression of Alzheimer's disease is enhanced by a lot of changes in environment inside the brain. Since it is well known that astrocytes have a role in maintaining brain environment, we focused on the effect of astrocytic dysfunction in Alzheimer's model mice by disrupting their aquaporin-4 gene. Aquaporin-4 is a water channel in the brain expressed in astrocytes and has a role in water homeostasis in the brain. Although amyloid plaque formation and reactive astrogliosis surrounding the plaques were not altered, microgliosis around the plaques was significantly reduced in cortical area in the Alzheimer's model lacking aquaporin-4.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 アストロサイト ミクログリア アクアポリン4 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は大規模な神経細胞死による脳萎縮、細胞外へのアミロイド (A β) の沈着を主とする老人斑、神経細胞内への異常リン酸化タウの凝集による神経原繊維変化 (NFT) を特徴とする。我々は家族性 (F) AD に見いだされたアミロイド前駆体タンパク質 (APP) 変異 (V717I) を導入したマウス ES 細胞から分化誘導した神経細胞を用い AD 発症機序の解明を試みた (Abe, Niikura et al., J. Neurosci. 2003)。この神経細胞は A β 42 の産生こそ亢進していたものの、タウの異常リン酸化/NFT は見られず、野生型の神経細胞と比較して顕著な細胞死は見られなかった。また、これまで FAD 遺伝子変異を導入した多くのモデルマウスが報告されてきたが、現在までのところ A β は蓄積しても内在性タウから NFT を生じるマウスは得られていない。ヒトにおいても、老人斑が高度に形成されていても AD に至らない例が存在する。これらの知見は A β の蓄積だけでは NFT 形成には不十分であることを示している。申請者は NFT 形成には A β の蓄積に加え、不可逆的な脳内環境の変化が加わる必要があると考え、脳内恒常性の維持に重要な役割を果たすアストロサイトに着目した。即ち、A β の蓄積にアストロサイトの機能不全が加わることにより NFT 形成が促進される可能性を考えた。そこで、アストロサイトの機能不全マウスを得ることを期待し、2007 年よりアストロサイトの機能において重要な役割を担っているアクアポリン 4 (AQP4) のノックアウト (KO) マウスの作製に着手した。得られたマウスは一見野生型マウスと区別がつかないが、脳に損傷等の負荷をかけた時にアストロサイトの応答、更にはミクログリアの活性化が見られないことが分かってきた。(Ikeshima-Kataoka, Abe et al., Mol. Cell. Neurosci. 2013)

AD が初めて文献に記載されてから 100 年以上、また、初めて老人斑を生じるマウスが報告されてからおよそ 20 年が経過した現在においても AD を完全に再現する動物モデルは確立されていない。この間、複数の FAD 関連遺伝子変異を導入することにより A β の蓄積に要する期間は劇的に短縮され、最も短いものでは約 2 ヶ月でプラークが形成されるマウスが開発された。しかしながら、いくら A β (42) の産生を増加させてもマウスは NFT を形成せず、17 番染色体に連鎖したパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症 (FTDP17) という別の疾患の原因遺伝子変異をヒトタウに導入したトランスジェニックマウスを組み合わせない限り、老人斑と NFT 両方を生じるマウスモデルは存在しない。NFT が形成されるまでには、タウの過剰リン酸化、軸索輸送の障害、酵素的な切断、凝集、対らせん状線維の形成等複雑な過程が必要である。FTDP17 に関連したタウ遺伝子変異には選択的スプライシングの異常を生じるものが存

在することや、タウの異常が単独で出現する動物モデル (hTau, mTau) から得られる知見から考えると、タウのアイソフォームの存在比率 (特にエクソン 10 の有無による、微小管結合ドメインの数が 3 つか 4 つかの点) や発現量が変化することによっても NFT 形成のカスケードを促進すると考えられる。マウスとヒトのタウは 92% 相同で、特にリン酸化部位周辺は完全に一致しており、少なくとも *in vitro* では同様に凝集する。一方で、マウスタウが *in vivo* で NFT を形成するモデルはこれまでに無い。またエクソン 10 の選択的スプライシングにより生じるアイソフォームの存在比率はヒトとマウスでは異なっている (成体マウスでは全てエクソン 10 を含むがヒトでは 1:1)。注目すべき知見として、プロモーター領域及びイントロンを含む野生型ヒトタウ遺伝子そのものをトランスジェニックしても、マウスは NFT を形成しないが、更にマウスの内在性タウ遺伝子を KO するとヒトタウが NFT を形成する (hTau モデル)。このマウスに導入されたヒトタウ各アイソフォームの発現については、内在性のマウスタウの発現の有無に関わらず、大部分がエクソン 10 を欠いていた。このように、NFT の形成に至るか否かは種差による相違も含めて極めて複雑と考えられた。

AD においてプラーク周囲にアストログリオシス・ミクログリオシスが起ることはよく知られている。特に神経炎症の観点から AD におけるミクログリオシスの意義に関しては、多数報告があるが、AD におけるアストログリオシスの位置づけについては、A β のクリアランスに寄与することは示唆されているものの、これまでほとんど注目を集めてこなかった。特に細胞自律的に (リアクティブ) アストロサイトの機能低下を呈するマウスによる解析はこれまでに無かった。これに加えて、本研究は内在性タウからの NFT 形成に着目している。上述の通り未だ成功例は無く極めて困難ではあるが、達成されれば画期的な研究になると考えられた。

AD は最も頻度の高い認知症であり、今後我が国をはじめとする先進諸国においては少子高齢化社会が加速度的に進行し、AD 患者数は明らかに増加の一途をたどる。AD は患者のみならず、患者を介護する働き盛りの家族に対しても精神的・肉体的・経済的負担を強いことから社会全体を疲弊させ、我が国にとって極めて身近に迫った脅威であるといえる。従って AD の発症機構の解明は急務であり、本研究による、アストログリオシス (及びミクログリオシス) の意義、A β の蓄積から NFT に至るメカニズムが明らかになり、新たな治療法の開発につなげることができれば、その成果は計り知れない。本研究の成果は AD のみならず、老人斑を伴わない他のタウopathy の治療への貢献も期待できる他、AQP4 の KO によりアストログリオシス更にはミクログリアの活性化が障害されるメカニズムも

十分に解明されておらず、本研究により病態時におけるアストロサイト・ミクログリアの挙動に対する AQP4 の役割が理解されれば、外傷や炎症、脳腫瘍（アストロサイトーマ）等他の神経疾患の治療への応用も視野に入ると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の3点であった。

(1) $\text{A}\beta$ を高度に蓄積するマウスと AQP4 KO マウスを交配することにより、 $\text{A}\beta$ を過剰に産生するがリアクティブアストログリオシスが障害されたマウスを作製する。

(2) このマウスに NFT が形成されるか否かに関して リアクティブアストログリオシス・ミクログリオシス、 $\text{A}\beta$ の蓄積、神経炎症と、タウの異常との間の経時的な関係を組織学的かつ生化学的に解析し、更に行動試験により記憶・学習障害に対する評価を加える。

(3) $\text{A}\beta$ の蓄積から NFT 形成に至る過程を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) AQP4 ノックアウト 5xFAD マウスの作製
米国 Mutant Mouse Resource Research Centers (MMRRC)より C57BL/6J を遺伝的背景とする B6.Cg-Tg(APP^{SwFlon}, PSEN1^{M146L*L286V})6799Vas/Mmjax (5xFAD) マウス4匹を購入した。このマウスは2種類の家族性アルツハイマー病遺伝子であるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) 及びプレセニン1 (PS1) にそれぞれ3種類 (K670N/M671L, I716V, V717I) 及び2種類 (M146L, L286V) の原因遺伝子変異が導入されたダブルトランスジェニックマウスである。我々は既に理研 CDB との共同開発により AQP4 ノックアウトマウスを作製し、C57BL/6J 系統に対し、12代以上の戻し交配を終了していた。この系統のヘテロ個体どうしの交配により得られた野生型個体およびホモ個体に対し、5xFAD マウスを交配していくことにより AQP4 について野生型 (*aqp4*^{+/+}) あるいはノックアウト (*aqp4*^{-/-}) である 5xFAD マウスを作製した。本研究における解析は全て雄の個体を用い、23週齢で行動試験、24週齢で免疫組織化学のため脳を摘出した。

(2) 行動試験

行動試験はオープンフィールド (OF) 実験と Y-maze テストを行った。

OF 実験

底面に升目が引いてある観察箱内で5分間マウスに自由探索させ、升目を通過した回数で行動量を評価した。

Y-maze テスト

迷路内をマウスに7分間自由探索させ、アームへの侵入を記録し、総侵入数と正しいアームの選択をした数から Alternation%を算出した。

(3) 免疫組織化学

脳を摘出後、4%パラフォルムアルデヒド (0.1 M リン酸バッファー) で固定し、40 μm の矢状凍結切片を作製した。凝集したアミロイド斑の検出には Amylo-Glo (Biosensis)、活性型ミクログリア及び反応性アストロサイトはそれぞれウサギ抗 Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Ibal) 抗体 (Wako) 及びモノクローナル抗グリア繊維性酸性タンパク質 (GFAP) 抗体 (Sigma) を用い、蛍光抗体法により検出した。

4. 研究成果

(1) 行動試験

OF 実験、Y-maze テストともに AQP4 については野生型である23週齢の 5xFAD マウス (5xFAD/*aqp4*^{+/+}) において、野生型 C57BL/6J マウスと比較して顕著な行動異常・記憶低下が認められなかった。

(2) 免疫組織化学

24週齢雄マウスの脳の凍結切片のアミロイド蓄積を Amylo-Glo、アストログリオシスを抗 GFAP 抗体、ミクログリオシスを抗 Ibal 抗体で染色し評価した (図1)。本モデルマ

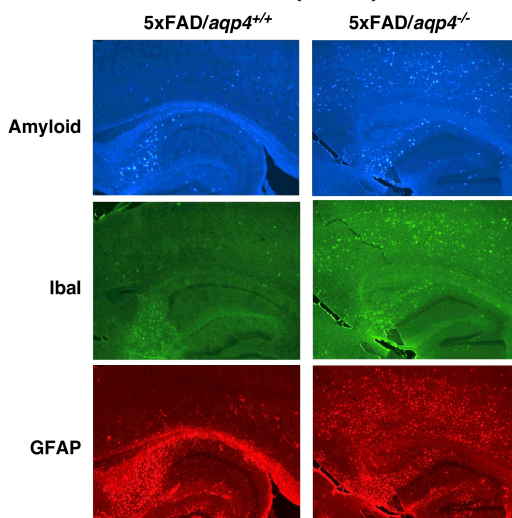


図1. アルツハイマーモデルマウスの大脳皮質・海馬領域におけるアミロイド蓄積・ミクログリオシス・アストログリオシス。5xFADマウス (左) 及びAQP4をノックアウトした5xFADマウス (右) の脳の40 μm 矢状凍結切片を amylo-Glo (青)、抗 Ibal 抗体 (緑) 及び抗 GFAP 抗体 (赤) を用いて蛍光染色した。

ウスでは24週齢で既にアミロイド斑の蓄積が観察され、その周囲に反応性アストロサイト及びミクログリアの蓄積が観察された (図1)。当初予想に反し、アミロイドの蓄積及び反応性アストロサイトの集積は AQP4 をノックアウトしても有意な変化は認められなかった (図2、A 及び B)。一方、ミクログリアの集積については AQP4 をノックアウトしたことにより皮質で有意に減少していた (図2、C) 海馬においても有意差は無かったものの、AQP4 ノックアウトにおいてミクログリアの集積が減少する傾向にあった。

(3) 考察 行動試験

本研究で行った2種類の行動試験(OF 実験

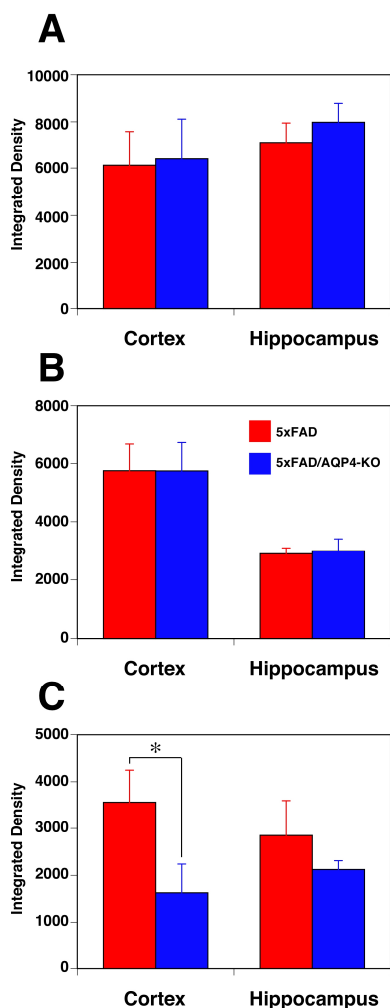


図2. アルツハイマーモデルマウスの脳におけるアミロイド蓄積・アストログリオシス・ミクログリオシスに対するAQP4発現消失の影響
5xFADマウス (赤) 及びAQP4をノックアウトした5xFADマウス (青) の皮質 (Cortex) および海馬 (Hippocampus) におけるアミロイド斑 (A)、GFAP (B)、およびIba1 (C) を蛍光染色し、その蛍光強度を示している。

及びY-mazeテスト)においては5xFAD/*aqp4*^{+/+}は野生型C57BL/6Jと比較して、有意な行動異常は認められなかった。5xFADマウスは、2006年にOakley等により発表された第一論文においては4~5ヶ月で既にY-mazeテストによって記憶障害が認められているが、その際には遺伝的背景はC57BL/6とSJLとのハイブリッドであった。従って本モデルにおけるアルツハイマー病様症状の進行過程にはマウスの遺伝的背景による影響を考慮する必要があると考えられる。現在C57BL/6Jの遺伝的背景の系統で、更に長期的な解析を行うとともに、C57BL/6とSJLとのハイブリッドでも同様の検討を行うべくAQP4ノックアウトマウスをSJLに戻し交配する作業を継続しており、現在N8まで到達している。12代以上の戻し交配が終了したらヘテロどうしの交配により、SJLのAQP4ノックアウトマウスを作製し、これと遺伝的背景がC57BL/6である5xFAD/*aqp4*^{-/-}と交配させることにより、C57BL/6JとSJLのハイブリッドである5xFAD/*aqp4*^{-/-}を得る。

アミロイド斑の形成とアストログリオシス・ミクログリオシス

C57BL/6Jの遺伝的背景を持った5xFADマウス24週齢の脳切片の組織学的解析により、このマウスに既にアミロイド斑が蓄積していることが示された。当初AQP4をノックアウトすることによりアストログリオシス・ミクログリオシスが抑制されれば、結果的にアミロイド斑の蓄積が増強されると予想された。ところがアミロイド斑の蓄積は24週齢ではAQP4のノックアウトによって影響を受けなかった。脳内の可溶性の β 量が変化している可能性があるため、現在ウェスタンブロットティングあるいはELISA法により脳抽出物中の可溶性 β を定量的に測定することを検討中である。また、上述のようにマウスの遺伝的背景の影響も考慮する必要があると考えられる。

上記アミロイド斑の蓄積と関連するように反応性アストロサイトのアミロイド斑周囲への集積もAQP4の有無による違いは認められなかった。脳損傷モデル等を用いたこれまでの報告では、AQP4をノックアウトすることにより損傷部位周囲の反応性アストロサイトの集積は抑制される。外傷モデルのような急性的な傷害と β の蓄積のような慢性的な傷害とではアストログリオシス誘導のメカニズムが異なる可能性もあることから、今後慎重に検討していきたいと考えている。

一方、本モデルではAQP4をノックアウトすることによりアミロイド斑周囲のミクログリアの集積が特に皮質領域で有意に減少していた。ミクログリアはIL-1, IL-6, TNF α 炎症性サイトカイン等を産生し、神経を傷害することが示唆されているが、一方で神経保護的なミクログリアの存在も報告されている。本モデルで集積がみられたミクログリアはいずれのサブタイプであるか、またAQP4を消失させた時に減少したミクログリアはいずれのサブタイプであるかについて現在解析を進めている。

神経原繊維変化

本研究では23週齢マウスでも記憶障害が認められなかったことからタウの病理については検討していない。今後マウスの遺伝的背景及び脳内環境の経時的変化、更に行動試験の結果を考慮しながら詳細に検討を加えていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

〔その他〕
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

阿部 陽一郎 (Abe, Yoichiro)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：10317331

(2)研究分担者

新倉 貴子 (Niikura, Takako)
上智大学・理工学部・准教授
研究者番号：10301491

(3)連携研究者

なし