

氏名	たにうち のぶひこ 谷内 信彦
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博乙第195号
学位授与の日付	平成27年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	アルツハイマー病モデルマウスにおけるニューロン新生制御 および記憶・行動障害に関する研究
審査委員	(主査)教授 竹谷 茂 教授 亀井加恵子 教授 中島敏博

## 論文内容の要旨

アルツハイマー病は、記憶障害などの認知機能障害を主な臨床症状とする進行性の神経変性疾患であり、アミロイドβタンパク質(Aβ)を主要構成成分とする老人斑の沈着、神経原線維変化、およびニューロンの脱落を病理学的な特徴としている。アルツハイマー病患者では認知機能障害の他に Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia (BPSD) と呼ばれる行動異常および精神症状が認められ、患者および介護者の QOL を大きく低下させる要因となっている。アルツハイマー病の発症機序は不明な点も多いが、海馬歯状回の顆粒細胞下層と側脳室外壁の脳室下帯において、一生を通してニューロン新生が起こっていることが明らかとなっている。しかし、アルツハイマー病の病態への関与については統一された見解が得られていない。そこで本研究は、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として同定されたアミロイド前駆体タンパク質のスウェーデン変異とプレセニリン1の欠損変異を過剰発現させた APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE</sup> トランスジェニックマウス (APP マウス)を用いて、アルツハイマー病の発症に中心的な役割を果たしている Aβ の蓄積と、ニューロン新生および記憶・行動障害との関係について検討を行い、以下の新知見を得た。

### 第一章 APP マウスを用いた海馬におけるニューロン新生に関する研究

ELISA 法を用いて脳内 Aβ 蓄積量を測定した結果、APP マウスは加齢に伴って脳内 Aβ (1-40) および Aβ (1-42) 蓄積量の増大を示した。蓄積している Aβ 分子種を比較したところ、Aβ (1-42) は Aβ (1-40) と比較して高い蓄積を示した。さらに、雌性 APP マウスは雄性のそれと比較して、高い脳内 Aβ 蓄積を示した。免疫組織化学により Aβ の沈着を検討した結果、5ヶ月齢 APP マウスは、海馬や大脳皮質においてわずかな Aβ 沈着しか観察されなかったのに対し、9ヶ月齢 APP マウスは、海馬や大脳皮質において多数の Aβ 沈着が観察された。少量の脳内 Aβ 蓄積と海馬でのわずかな Aβ 沈着を示した 5ヶ月齢 APP マウスと、多量の脳内 Aβ 蓄積と海馬での多数の Aβ 沈着を示した 9ヶ月齢 APP トランスジェニックマウスを用いて、海馬歯状回の顆粒細胞下層に存在する神経幹/前駆細胞のニューロン新生能を抗 BrdU 抗体および抗 DCX 抗体を用いた免疫組織化学により検討した。その結果、5ヶ月齢では APP トランスジェニックマウスと野生型マウスに BrdU 陽性細胞数および DCX 陽性細胞数に有意な差はなかったのに対し、9ヶ月齢 APP マウスは野生型マウスと比較して BrdU 陽性細胞数および DCX 陽性細胞数の有意な低下を示した。よって、9ヶ月齢 APP マウスでは海馬におけるニューロン新生が障害されていることが明らかとなった。また、APP マウスの海馬におけるニューロン新生の障害に雌雄差は認められなかった。以上の結果より、APP マウスは雌雄ともに Aβ の蓄積に伴って海馬歯状回の顆粒細胞下層におけるニューロン新生が障害されることが明らかとなった。

### 第二章 APP マウスを用いた二つの脳領域におけるニューロン新生制御に関する研究

9ヶ月齢 APP マウスを用いて、2つのニューロン新生領域である側脳室外壁の脳室下帯と海馬歯状回の顆粒細胞下層における神経幹/前駆細胞の増殖および短期的生存について抗 PCNA 抗体および抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学により検討した。その結果、PCNA 陽性細胞数はいずれのニューロン新生領域においても APP マウスと野生型マウスで有意な差はなかった。一方、BrdU 陽性細胞数は脳室下帯で有意な差がなかったのに対し、顆粒細胞下層では APP マウスにおいて有意な低下を示した。

PCNA はニューロン新生の増殖過程を、BrdU はニューロン新生の増殖および短期的生存過程をそれぞれ反映するマーカーであると考えられることから、9ヶ月齢 APP マウスの脳室下帯における神経幹/前駆細胞の増殖および短期的生存は正常であるのに対し、顆粒細胞下層における神経幹/前駆細胞の増殖は正常であるが短期的生存は障害されていることが示唆された。二つのニューロン新生領域における A $\beta$  沈着について免疫組織化学により検討した結果、9ヶ月齢 APP マウスの海馬では多量の A $\beta$  沈着が観察されたのに対し、側脳室周囲や線条体、脳梁では A $\beta$  沈着はほとんど観察されなかった。以上の結果より、APP マウスは A $\beta$  沈着に伴いニューロン新生過程のうちの短期的生存が障害されることが示唆された。

### 第三章 APP マウスを用いた記憶障害および行動異常に関する研究

小動物運動解析装置を用いて自発運動量を測定した結果、5ヶ月齢雄性 APP マウスは野生型マウスと比較して自発運動量に有意な差はなかったが、5ヶ月齢雌性 APP マウスは自発運動量の亢進を示した。また、9ヶ月齢 APP マウスは雌雄ともに自発運動量の亢進を示した。ロータロッド試験により運動協調性を評価した結果、5ヶ月齢および9ヶ月齢の APP マウスは、雌雄ともに運動協調性の障害を示さなかった。モリス水迷路試験により空間記憶力を評価した結果、APP マウスの空間記憶力は雌雄ともに5ヶ月齢の時点で正常であったが、9ヶ月齢で障害が認められた。以上の結果より、APP マウスは A $\beta$  の蓄積に伴って空間記憶障害および BPSD 様の行動異常を示すことが明らかとなった。

本研究によりアルツハイマー病モデルマウスは、A $\beta$  の蓄積に伴ってニューロン新生の障害、空間記憶力の低下および BPSD 様の行動異常を示すことが明らかとなった。本研究の成果はアルツハイマー病の発症機序および病態の解明に寄与するものであり、新たな治療法の開発など臨床応用に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

## 論文審査の結果の要旨

本研究はアルツハイマー病モデルマウスを用いて異常蛋白質アミロイド  $\beta$  タンパク質 (1-42) (A $\beta$ ) の蓄積の分子的解析と海馬におけるニューロン新生障害発生の知見に基づいて、記憶障害などの認知機能障害を引き起こす原因を見いだした新規性に富んだものである。アルツハイマー病は記憶障害などの認知機能障害を主な臨床症状とする進行性の神経変性疾患であり、A $\beta$  を主要構成成分とする老人斑の沈着、神経原線維変化、およびニューロンの脱落などの神経組織の異常を伴う事が知られている。本研究では、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として同定されたアミロイド前駆体タンパク質のスウェーデン変異と A $\beta$  切断酵素プレセニリン 1 の欠損変異を過剰発現させたアルツハイマー病モデルマウスである APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> トランスジェニックマウス (APP マウス) を用いて、アルツハイマー病の発症の原因分子 A $\beta$  の蓄積を解析している。同時にニューロン新生障害および記憶・行動障害との関係について次の三章に分けて検討を行っている。第一章では APP マウスは野生型マウスの A $\beta$  分子種を比較した。その結果、加齢に伴って脳内 A $\beta$  (1-40) および A $\beta$  (1-42) の蓄積量がともに増加し、A $\beta$  (1-42) が A $\beta$  (1-40) より多く蓄積する特徴がある事を見つけた。雌 APP マウスでは雄よりも A $\beta$  (1-42) が多く蓄積する事を示し、ヒトのアルツハイマー病患者が女性に多い事を支持する結果を得ている。9ヶ月齢 APP マウスは5ヶ月齢と比較すると海馬や大脳皮質において多数の A $\beta$  沈着が観察されるというヒトの老人性異常の特徴を良く示した。海馬歯状回の顆粒細胞下層に存在する神経幹/前駆細胞のニューロン新生能を抗 BrdU 抗体および抗 DCX 抗体を用いた免疫組織化学により検討したところ、9ヶ月齢 APP マウスでは海馬におけるニューロン新生が障害されていることを明らかにした。第二章では9ヶ月齢 APP マウスを用いて、ニューロン新生領域である側脳室外壁の脳室下帯と海馬歯状回の顆粒細胞下層の2カ所における神経幹/前駆細胞の増殖および短期的生存を調べた結果、9ヶ月齢の APP マウスの顆粒細胞下層での神経幹/前駆細胞の増殖の有意な低下と短期的生存の障害を発見し、海馬での多量の A $\beta$  沈着が観察された結果との因果関係を明らかにした。第三章では APP マウスを用いた記憶障害および行動異常に関する研究を行った。まず小動物運動解析装置を用いて APP マウスの自発運動量が亢進する事を見つけている。ロータロッド試験により運動協調性を評価した結果、5ヶ月齢および9ヶ月齢の APP マウスは、雌雄ともに運動協調性の障害を示さなかったが、モリス水迷路試験を行って空間記憶力を評価した結果、9ヶ月齢で障害が認められた。これらの結果から APP マウスは A $\beta$  の蓄積に伴って空間記憶障害および行動異常および精神症状を示すことを明らかにした。

これらの一連の研究は、アルツハイマー病の発症機序および病態の解明に寄与するものであり、新たな治療法や新薬の開発などの臨床応用に結びつく有用な基礎的知見を提供するに間違いない。また、これからの神経科学の進展に強く貢献すると判断した。これらの研究の成果は、申請者が筆頭著者 2 編を含む、下記の国際科学雑誌 6 編に掲載されている。

- (1) N. Taniuchi, T. Niidome, Y. Goto, A. Akaike, T. Kihara, H. Sugimoto. Decreased proliferation of hippocampal progenitor cells in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> transgenic mice NEUROREPORT, 18: 1801-1805 (2007)
- (2) T. Niidome, N. Taniuchi, A. Akaike, T. Kihara, H. Sugimoto. Differential regulation of neurogenesis in two neurogenic regions of APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> transgenic mice NEUROREPORT, 19: 1361-1364 (2008)
- (3) T. Tsuchida, S. Fukuda, H. Aoyama, N. Taniuchi, T. Ishihara, N. Ohashi, H. Sato, K. Wakimoto, M. Shiotani, A. Oku. MGAT2 deficiency ameliorates high-fat diet-induced obesity and insulin resistance by inhibiting intestinal fat absorption in mice. Lipids in Health and Disease. 11: 75 (2012).
- (4) N. Taniuchi, T. Niidome, H. Sugimoto. Fundamental study of memory impairment and non-cognitive behavioral alterations in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice. YAKUGAKU ZASSHI in press (2014).
- (5) C. Kuriyama, J. Z. Xu, S. P. Lee, J. Qi, H. Kimata, T. Kakimoto, K. Nakayama, Y. Watanabe, N. Taniuchi, K. Hikida, Y. Matsushita, K. Arakawa, A. Saito, K. Ueta, M. Shiotani. Analysis of the Effect of Canagliflozin on Renal Glucose Reabsorption and Progression of Hyperglycemia in Zucker Diabetic Fatty Rats. J. PHARMACOL. & EXP. THERA. in press (2014) .
- (6) Y. Watanabe, K. Nakayama, N. Taniuchi, Y. Horai, C. Kuriyama, K. Ueta, K. Arakawa, T. Senbonmatsu, M. Shiotani. Beneficial Effects of Canagliflozin in Combination with Pioglitazone on Insulin Sensitivity in Rodent Models of Obese Type 2 Diabetes. PLOS ONE in press (2015).