

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：20101  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2015～2017  
 課題番号：15K19288  
 研究課題名(和文) アルツハイマー病病理におけるEPRイメージングを用いた酸化ストレス評価と病態解明

研究課題名(英文) Evaluation of oxidative stress and elucidation of pathogenesis in Alzheimer disease by in vivo electron paramagnetic resonance imaging

研究代表者  
 松村 晃寛 (Matsumura, Akihiro)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：20464498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はADモデル動物を用いて神経変性時および治療介入時の脳内酸化ストレスの動態を“in vivo EPRイメージング法”で解析し、行動評価、組織学的評価と比較してADの病態解明と治療応用を目的に開始した。結果は、認知行動評価novel objective recognition test(NOR)において超早期ガランタミン投与群で認知機能の改善を認めた。また、脳組織学的評価においてガランタミン投与群でA $\beta$ 沈着面積が減少していた。in vivo EPRイメージングによる解析では超早期ガランタミン投与により脳内酸化ストレス軽減傾向が示唆されたが研究期間内に有意差を証明するには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to analyze the mechanism of Alzheimer disease (AD) and apply the result to new therapeutic strategy, by evaluating the change of oxidative stress, cognitive function and histopathology in the brain when therapeutic intervention was given to AD model animals. I used in vivo electron paramagnetic resonance (EPR) imaging in order to evaluate the oxidative stress in the brain of model animals. APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice (AD mice) and their littermates (Wild mice) were orally dispensed 5mg/kg of galantamine or distilled water from very early stage (3 months of age) or from early stage (6 months of age) of AD. The results of behavioral assessment by novel object recognition (NOR) test indicated the improvement in cognitive function. A $\beta$  deposition in the cortex decreased in the galantamine-administered group compared with control group. EPR imaging tend to visualize the less oxidative stress in the galantamine treatment group.

研究分野：神経内科

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド トランスジェニック 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)は認知症性疾患の中で有病率が最も高く、病理学的にアミロイド  $\beta$ ( $A\beta$ )を主成分とする老人斑の形成、リン酸化タウを主成分とする神経原線維変化および著しい神経細胞死を特徴とし、アミロイドカスケード仮説において  $A\beta$  が最上流の原因とされる。しかしその病因は未だ不明であり、根治療法は無く対症療法に限られている。

$A\beta$  に対する生体反応としては、脳内免疫細胞であるミクログリアが  $A\beta$  により活性化して炎症性サイトカインや活性酸素種(reactive oxygen species:ROS)などを産生してADを増悪させるという報告がある<sup>1)</sup>。一方、ROSなどの酸化ストレスは  $\beta$ -secretase や  $\gamma$ -secretase 活性を上昇させて  $A\beta$  産生を増加させるという報告<sup>2)</sup>もあり、AD脳において脳内  $A\beta$  増加 酸化ストレス増加  $A\beta$  増加という悪循環が生じている可能性が考えられる。また、ADでは病初期から酸化ストレスマーカーが観察されるとの報告もあり<sup>3)</sup>、ADと酸化ストレスの関連について注目している。

脳内酸化ストレスの評価法としては従来、抗酸化物質や過酸化産物を生化学的に評価する手法が試みられてきたが、これらは脳内に複数存在する抗酸化ストレス機構の一部を反映するに過ぎない。そこで近年、非侵襲的に酸化ストレスを視覚化する新規画像技術“*in vivo* EPR(electron paramagnetic resonance:電子常磁性共鳴法)イメージング法”が開発されている<sup>4)</sup>。これはイメージングプローブとしてナイトロオキシド化合物を体内に投与し、生体のもつ抗酸化作用によりプローブが還元され消失する反応速度をモニタリングすることで酸化ストレスと抗酸化能のバランスを包括的に評価する検査法である。

他方、これまでミクログリアが  $A\beta$  除去作用を有することを示す基礎データが報告されている<sup>5)</sup>。また、初期のびまん性  $A\beta$  沈着部に集積するミクログリアは静止型の形態・表現型を持つものが多いという報告<sup>6)</sup>や、ミクログリアには作用の異なる subtype が存在するという仮説もある<sup>7)</sup>。申請者らも ADトランスジェニックマウス脳において、病態進行によりミクログリア活性化マーカー CD68 やニコチン性アセチルコリン受容体  $\alpha 7$  サブユニット( $\alpha 7nAChR$ )発現率が変化することを確認している<sup>8)</sup>。 $\alpha 7nAChR$  刺激によるミクログリアの  $A\beta$  貪食能亢進や ROS 減少効果が報告されており<sup>9)10)</sup>、AD病初期において病態を増悪させないタイプのミクログリアも存在する可能性が考えられる。

このようにADにおいては  $A\beta$  増加、酸化ストレス、ミクログリアによる神経免疫・炎症反応が密接に相互作用しながら進行することが推定される。

## 2. 研究の目的

**上記背景から、**  $A\beta$  増加、酸化ストレス、ミクログリアによる神経免疫・炎症反応について動態を解析することにより、病態解明につながるような基礎的データを得られることが期待できる。そこで、本研究では、ADモデル動物を用いて(1)EPR測定実験を行い、脳内酸化ストレスおよび抗酸化ストレス反応の経時的推移を包括的に解析し、病態進行との関係を検証する。また(2)グリア細胞を中心とした脳免疫組織学的評価も経時的に行い、EPR測定実験の経時的推移と比較検証する。さらに(3)各種治療介入による脳内酸化ストレスの変化をEPR測定により解析し、また認知行動評価や免疫組織学的評価の結果と比較検証して病態解明を試みる。

## 3. 研究の方法

ADモデル動物として家族性アルツハイマー病の変異型APP遺伝子および変異型プレセニン1遺伝子を導入したAD-Tgマウス(APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>:APdE9マウス)を用いた。

生後3、6、9、12、18ヶ月のAPdE9マウスにおいて*in vivo* EPRイメージング法で脳内酸化ストレスを評価した。また、APdE9マウス脳において  $A\beta$  や Iba1、CD68、 $\alpha 7nAChR$ 、Ym1、Arginase1による蛍光多重染色像を観察した。得られた脳組織画像は画像解析ソフト Image J を用いて染色陽性領域面積などを測定し、定量的に評価した。

APdE9マウスを(A)ガラントアミンを投与しないコントロール群、(B)  $A\beta$  が沈着し始める生後6ヶ月という早期からガラントアミンを投与した群、(C)脳の病理的变化がほとんど認められない生後3ヶ月という超早期からガラントアミンを投与した群の3群に割り振った。各群いずれも生後9ヶ月目に認知行動評価を行った。novel objective recognition test(NOR)では、25cm×25cm×25cmの不透明な箱の中にマウスを入れて実験を行った。1日目と2日目は環境に慣らすために箱内には物体は入れずに20分間放置した。3日目は、まず二つの同じ形の物質を平面の対角線上に壁から等距離になるように設置し、5分間マウスを放置し、それぞれの物質を探索する時間を記録した。その後、マウスを一旦取り出した。1時間経過した後、今度は一方の物質を他の物質に入れ替えた状態にして、再度マウスを箱内に入れて、それぞれの物質を探索する時間を記録した。Recognition index(RI)は二つの物質を探索した総時間における新規物質の探索時間の割合である。その後、*in vivo* EPRイメージング法にて脳内酸化ストレスを評価し、また脳組織学的評価を行った。得られた脳組織画像は画像解析ソフト Image J を用いて染色陽性領域面積などを測定し、定量的に評価した。

#### 4. 研究成果

*in vivo* EPR イメージング法において生後9ヵ月以降のAPdE9マウス脳において同月齢のWild typeマウスより有意に還元能が低下していることを示唆する結果を得た。その背景として、生後9ヵ月以降のAPdE9マウスにおいて脳内酸化ストレスが亢進している可能性が推察された。また、APdE9マウス脳の免疫組織学的評価においては、A 沈着像は経時的に増加していたが、特に生後12ヵ月以降で急増していた。Iba1で染色されるミクログリア陽性面積は生後9ヶ月から有意に増加し、生後12ヶ月まで経時的に増加した後、18ヶ月ではやや低下していた。CD68発現は生後6~9ヵ月の早期では軽度増強した後、生後12ヵ月以降の進行期では著明に増強し、2段階の変化を示した。7nAChR陽性面積は生後6ヶ月で著明な増加を示した後、9ヶ月以降では経時的に減少した。ミクログリアにおいてM2 phenotypeのマーカであるYm1、Arginase1については、Ym1は生後3~9ヵ月では不変で12ヵ月以降に発現が増強していた。またArginase1は生後9ヶ月で一旦減弱した後、12ヵ月以降で再び発現が増強した。

NORでは生後3~9ヶ月超早期ガラントミン投与群および生後6~9ヶ月早期ガラントミン投与群で共にガラントミン非投与群と比較してRIが増加しており、認知機能改善が認められた。*in vivo* EPR イメージング法においては、生後3~9ヶ月の超早期ガラントミン投与群において脳内酸化ストレス軽減傾向が示唆されたが、研究期間内に統計学的有意差を証明するには至らなかった。抗A抗体によるA染色解析では皮質に占めるAの面積の割合が生後3~9ヶ月投与群および生後6~9ヶ月投与群で共にガラントミン非投与群と比較して減少していた。海馬でも有意差は認めなかったものの早期投与群ではAの割合が減少している傾向にあった。

今回、*in vivo* EPR イメージング法において生後9ヶ月のAPdE9マウスで脳内酸化ストレスの亢進が示唆され、同時期にM2マーカーArginase1の発現が減弱していた。Arginase1はiNOSと競合してNO産生を減少させることが知られており<sup>11)</sup>、病初期においてEPRの動態とArginase1の動態が相似する点は興味深い結果であった。また同じM2マーカーでもYm1とArginase1で病初期に異なる動態を示した点も興味深い結果であった。これらの知見の原因について今回解明するには至らなかったが、Arginase1発現減弱および酸化ストレス亢進が認められる生後9ヵ月までに何らかの要因が存在する可能性が推察され、より病初期からの治療介入の可能性が検討された。

この点について、他疾患も含めた臨床的な知見としても近年、様々な疾患で早期治療介入の重要性が指摘され、ADに関しても臨床

症状が出始める頃にはすでに大量のAが沈着しているため、より早期の治療介入が必要であると指摘されている。本研究ではガラントミンの早期投与によって認知機能改善およびA病理の抑制が認められた。これは、ガラントミンが疾患修飾作用を有していることを示しており、その機序として脳内のA貪食に関与しているミクログリアのガラントミンによる7nAChRの刺激がAの貪食を亢進させ<sup>9)</sup>、これが疾患修飾として有効である可能性を推察している。また、ガラントミンはnAChR作動薬としての働きの他にnAChRに対するallosteric potentiating ligand(APL)作用を持つことから、受容体感受性および発現のダウンレギュレーションを生じにくい可能性が推察され、その結果、長期間薬剤の効果が持続する可能性が考えられる。他にもガラントミンは神経保護作用、神経伝達物質の調節、血管内皮保護作用を有するといった報告もなされていることから、本研究による長期ガラントミン投与モデルの結果を更に詳細に分析することによって今まで知られていなかったガラントミンの役割やADの病態解明に迫る新たな知見を発見することが出来る可能性がある。

今回、ガラントミン投与により*in vivo* EPR イメージング法で脳内酸化ストレス軽減傾向が示唆されたが、研究期間内に統計学的有意差を示すには至らなかった。しかし本研究において超早期治療介入による疾患修飾の可能性が示された点で、今後の研究に繋がる相応の成果が得られたと考える。

#### <引用文献>

- 1) Combs CK, Karlo JC, Kao SC et al. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 21(4), 2001: 1179-1188.
- 2) Guglielmotto M, Giliberto L, Tamagno E et al. Oxidative stress mediates the pathogenic effect of different Alzheimer's disease risk factors. *Front Aging Neurosci.* 2, 2010: 3.
- 3) Nunomura A, Perry G, Aliev G et al. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60(8), 2001: 759-767.
- 4) Fujii HG, Sato-Akaba H, Emoto MC et al. Noninvasive mapping of the redox status in septic mouse by *in vivo* electron paramagnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging.* 31(1), 2013: 130-138.
- 5) Takata K, Kitamura Y, Yanagisawa D et al. Microglial transplantation

increases amyloid-beta clearance in Alzheimer model rats. *FEBS Lett.* 581(3), 2007: 475-478.

- 6) Akiyama H, Mori H, Saito T et al. Occurrence of the diffuse amyloid beta-protein (Abeta) deposits with numerous Abeta-containing glial cells in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Glia.* 25(4), 1999: 324-331.
- 7) Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C et al. Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci.* 28(45), 2008: 11650-11661.
- 8) Matsumura A, Suzuki S, Iwahara N et al. Temporal Changes of CD68 and alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Expression in Microglia in Alzheimer's Disease-Like Mouse Models. *J Alzheimer Dis.* 44(2), 2015: 409-423.
- 9) Takata K, Kitamura Y, Saeki M et al. Galantamine-induced amyloid- $\beta$  clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem.* 285(51), 2010: 40180-40191.
- 10) Parada E, Egea J, Buendia I et al. The microglial alpha7-acetylcholine nicotinic receptor is a key element in promoting neuroprotection by inducing heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid-2-related factor 2. *Antioxid Redox Signal.* 19(11), 2013: 1135-1148.
- 11) Cherry JD, Olschowka JA, O' Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation.* 11, 2014: 98.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Matsumura A, Emoto MC, Suzuki S, Iwahara N, Hisahara S, Kawamata J, Suzuki H, Yamauchi A, Sato-Akaba H, Fujii HG, Shimohama S. Evaluation of oxidative stress in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer disease by in vivo electron paramagnetic resonance imaging. *Free Radic Biol Med.* 85, 2015: 165-173. 査

読有り.

DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.013. Epub 2015 Apr 23.

〔学会発表〕(計2件)

松村晃寛「ミクログリアをターゲットとした治療法の開発」第35回日本神経治療学会総会. 2017年11月17日. 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市).

松村晃寛, 鈴木紘美, 藤倉舞, 岩原直敏, 真部建郎, 松下隆司, 鈴木秀一郎, 久原真, 川又 純, 下濱 俊「Temporal changes of the marker of microglial activation in APdE9 mice.」第57回日本神経学会学術大会 2016年5月18日. 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松村 晃寛 (MATSUMURA, Akihiro)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20464498

##### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号:

##### (4) 研究協力者

藤井 博匡 (FUJII, Hirotada)