

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01416

研究課題名（和文）A 蓄積に伴う味覚障害の発症機序解明とアルツハイマー病早期診断法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenic mechanism of taste disorder associated with amyloid beta accumulation, and development of the early diagnosis method for Alzheimer's disease.

研究代表者

橋本 弘司（Hashimoto, Koji）

熊本大学・大学院生命科学研究部（保）・助教

研究者番号：20237936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、新たなMRI技術（位相差強調画像化法：PADRE）を用いて、脳内の amyloid beta沈着によるアルツハイマー型認知症による味覚障害を非侵襲かつ早期に見出す診断法の確立を目的とした。ヒト amyloid beta遺伝子導入トランスジェニックマウスのPADRE像と組織染色像とを比較した結果、鉄、老人斑の量、位置ともに月齢に応じた正の相関がみられた。

トレーサー実験の結果、ラット大脳皮質味覚野は従来の味覚野および味覚野に接した背側、尾側からも投射があることが分かった。また、リッキングテスト装置の改良に取り組み、効率的な味覚行動実験プロトコルを検索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー型認知症は根本的治療法はなく、発症すると短期間のうちに進行する。しかし、早期の発見は薬物治療により進行を緩やかにすることが次第に可能となってきた。従来のMRI撮像技術では出血部位、腫瘍など形態の観察に主眼が置かれていたが、磁性情報を従来のMRI撮像技術に加えたPADRE技術によりより鮮明に老人斑が描出できるようになり、平成25年頃よりMRIにPADREソフトウェアが実装されるようになってきている。一方、認知症の早期には味覚・嗅覚の異常が見られはじめることが指摘されているため、PADRE像での老人斑の量、位置情報を元に認知症の早期診断に利用できることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to establish a non-invasive and early detection method for diagnosis of taste disorder due to Alzheimer's disease by amyloid beta deposition in the brain using a new MRI technique (phase difference enhanced imaging: PADRE). As a result of comparing the PADRE image of the human amyloid beta transgenic mouse brain with histological staining sections, a positive correlation was observed with regard to the amount and position of iron and amyloid plaques according to the age.

As a result of the tracer experiment, it was suggested that the rat cerebral gustatory cortex also had projections from the conventional gustatory cortex and the dorsal and caudal sites. We also investigated to improve the licking test device and the effective taste behavior experimental protocol.

研究分野：味覚生理学

キーワード：アルツハイマー 老人斑 amyloid beta PADRE 味覚野 リッキングテスト装置 認知症 味覚障害

1. 研究開始当初の背景

米国 National Health Interview Survey [Hoffman, (1998) Ann. N. Y. Acad. Sci, 855:716-22.]が 18 歳以上の米国の成人 8 万人を対照に行った調査によると、米国全土では味覚障害が全人口の 0.6%、嗅覚障害が 1.4%と推定され、味覚・嗅覚に慢性的な問題を抱えている人のうち、40%が 65 歳以上である。わが国でも味覚障害診療の手引き[日本口腔・咽頭科学会, 2006]によると、味覚障害患者数は 2003 年に 24 万人と推定され増加傾向にあると考えられている。一方、味覚障害、嗅覚障害と認知症の関連性について、「生活の質」の観点から注目を集められるようになっており、近年、神経細胞に β アミロイド(A β)沈着を伴うアルツハイマー型認知症モデルマウスを用いた認知症と味覚障害の関係を明らかにする研究が徐々に始まっている。

申請者は 2011 年から 2 年間、米国フロリダ州立大学心理学部 Spector 教授の下、「ラットの味覚嫌悪学習と大脳皮質味覚野の関係」について Visiting Scientist として研究に従事する機会を与えられ、イボテン酸による大脳皮質味覚野の両側破壊が塩味に対する味覚嫌悪学習の保持に関与せず、また、甘味、苦味の認知閾値にほとんど影響を与えないことを明らかにした [Hashimoto and Spector, (2014) Chem Senses 39:57-71]。さらに、破壊領域の検索プログラムを開発し、大脳皮質味覚野周辺の両側破壊ラットの解析により、味覚野後方の内側部(腹部感覚投射部位)が塩味に対する味覚嫌悪学習の想起、および、甘味に対する味覚嫌悪学習の獲得に関与することを明らかにした [Schier, Hashimoto et al., (2014) PNAS, 111:1162-1167, equal contribution]。

また、2011 年より、崇城大学 國安明彦教授、本学科 米田哲也准教授(両研究分担者)との共同研究を始め、麻酔下、アルツハイマー型モデルマウス老人斑の MRI での検出に成功し、第 9 回アジア認知症国際学会(2015)での発表では共同研究者(N. Kurehana; 米田准教授付博士後期課程学生)が学会賞を受賞し、この非侵襲的早期老人斑検出技術の有用性が注目を集めている。

これまで、大脳皮質味覚野の吸引破壊あるいは電気破壊による広範囲な破壊実験が嫌悪学習の記憶を消失させる [Yamamoto et al., (1980) J Neurophysiol. 44:440-55]、あるいは苦味の検出閾値が上昇する [Benjamin and Pfaffmann, (1955) J Neurophysiol, 18:56-63] という知見があった。しかし、我々のイボテン酸による限局的な破壊法により、電気生理学的に同定されている大脳皮質味覚野が、一部の味質(塩味、苦味)の味覚認知や味覚嫌悪学習に必要な無ことが分かり、大脳皮質が味覚認知や嫌悪学習のメカニズムにどのように関与するのか不明となっている。従って、大脳皮質味覚野の役割を解明するには多面的な基盤研究が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、新たな MRI 画像化技術(位相差強調画像化法: PADRE)を用いて、アルツハイマー型認知症の味覚障害を非侵襲かつ早期に見出す診断法の開発を目的とした。老化および認知症による味覚障害患者数は増加傾向にあるにも関わらず、その機序の解明や検査法の開発は進んでいない。申請者はこれまでに、ラット大脳皮質味覚野が甘味、苦味の認知閾値および味覚嫌悪学習に関与せず、味覚野より尾側の内側部が味覚嫌悪学習に関与することを見出している。PADRE はアルツハイマー型認知症の原因である老人斑を生きた状態のまま描出できるため、味覚障害に限らず、各種認知障害の新たな早期診断法としての応用が期待できる。本研究は大脳皮質味覚野およびその周辺からの味覚経路のマッピングを完成させ、老齢マウス、アルツハイマー型モデルマウスを利用して老化および認知症と味覚障害の関連を明らかにし、味覚障害の新しい診断方法に MRI の利用を開発するための基礎となる以下の 4 つのテーマの研究を行った。

- (1) 免疫染色および鉄染色像と、麻酔下 MRI 画像での老人斑の位置の比較検討
- (2) 脳切片の自家蛍光の減弱処理法の確定
- (3) 逆行性蛍光標識を用いた大脳皮質味覚野およびその周辺からの味覚経路の確認
- (4) リッキングテスト装置を用いた味覚行動学の評価

3. 研究の方法

各研究テーマにより、以下の方法で研究を遂行した。

- (1) 免疫染色および鉄染色像と、麻酔下 MRI 画像での老人斑の位置の比較検討

①MRI 撮像: APP23swe トランスジェニックマウス(9-30 m/o)と同月令のワイルドタイプマウス(57BL/6JJ 9-16 m/o)を被験動物とし、7T-MRI (Biospec 70/20 USR, Bruker Biospin) を用いて T2*強調画像を位相差情報を含めて撮像し、PADRE 像を得た。撮像後、ホルマリン還流固定した脳の連続凍結切片を作成し、A β の免疫染色、鉄染色を行いプラークの位置および量の比較を行った。

②鉄染色法の改善: 脳切片の鉄染色像に関して、長期間にわたり染色ムラに悩まされていたため、MRI 像との定量的比較に支障があった。そのため APP23swe マウスおよび HeLa 細胞を用いて Berlin Blue 染色法の前処理法、後処理法を検討した。

- (2) 脳切片の自家蛍光の減弱処理法の確定

脳神経核のネットワークを調べるためには、一般に色素や酵素などのトレーサを脳内に微量注入し、順行性に軸索移動した神経終末、または、逆行性に軸索移動した細胞体を追跡し、それぞれの脳神経核の連絡様式を観察するトレーサ実験が用いられる。蛍光色素を用いたトレーサ実験での、蛍光顕微鏡下の観察では、色素の励起光の波長が脳切片の自家蛍光の波長と重なる場合、脳切片全体のバックグラウンドや、ある種の細胞が強烈な自家蛍光を発するため、本来観察したいものが見づらかったり、誤認が起きたりする。今回用いた逆行性トレーサ (fluosphere) の赤色励起光が脳の自家蛍光色と重なり蛍光顕微鏡下の観察で障害となっていた。そこで、水素化ホウ素ナトリウム (NaBH₄) と硫酸銅 (CuSO₄) を用いて、濃度と反応時間を変え、自家蛍光の効率的な減弱法の検討を行った。

(3) 逆行性蛍光標識を用いた大脳皮質味覚野およびその周辺からの味覚経路の確認

大脳皮質味覚野およびその周辺からの味覚経路のマッピングを完成させるため、逆行性トレーサである fluosphere を、麻酔下の雄性 SD ラットを脳固定装置に固定し、大脳皮質味覚野 dysgranular insular cortex (DI 野) とその周辺部にそれぞれ 0.1μl 注入した。2~3 週間後にホルマリン灌流固定し、取り出した脳を 20% sucrose 内で 72 時間以上クライオプロテクトした。その後、厚さ 50μm の連続凍結切片を作成し、自家蛍光減弱処理後、蛍光顕微鏡下で視床味覚野を中心に観察を行った。

(4) リッキングテスト装置を用いた味覚行動学の評価

味覚閾値検出装置 [Smith JC, (2001) *Appetite* 36:93-8.] がフロリダ州立大学で 1990 年代に開発されてからおよそ 30 年になる。これまで、この機械を用いたラットやマウスの味覚閾値や味覚嫌悪学習などの研究により、味覚と脳の関係や、記憶学習の機構が次第に明らかになってきている [Hashimoto, Spector, (2014) *Chem Senses* 39:57-71, Schier, Hashimoto et. al., (2014) *PNAS* 111:1162-1167]。しかしながら、味覚閾値を検出するための効率的な味溶液の提示方法に関しての詳細な検討はほとんど行われていない。

従来では、濃度の異なる味溶液の提示を random に行い、味溶液を 10sec 提示するごとに DW を 1sec 提示 (rinse) し、提示総時間 30min で実験を行ってきた。そこで、提示順やリンスの有無、時間の条件を変えて計測を行い、従来法で計測したデータと比較し有意差を調べ、どういったプロトコルが有効か以下の 3 つの項目について検討した。1: rinse の有り無しで有意差があるか、2: random か serial かで有意差があるか、3: 短時間で実験が成り立つか。もし、従来より計測時間を短くすることができればテストの回数や 1 日にテストする動物の数を増やすことができ、また、ラットへのストレスも減らすことができると考える。アルツハイマー型認知症が味覚障害に及ぼす変化を捉えるための基礎研究として、日本製 Davis Rig (MELQUEST, LKT-16) の評価と改良に取り組んだ。雄性 SD ラット被験動物とし、四基本味を中心に有効なプロトコルの検索およびハードウェア、ソフトウェアの改良に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) PADRE による老人斑検出法の確立と各種染色像

MRI は強磁性体に大きく反応し画像を描出する。また、老人斑の中心部分には強磁性体である鉄分子が老人斑の巨大化に応じて蓄積量が増すことが分かった (図 1)。

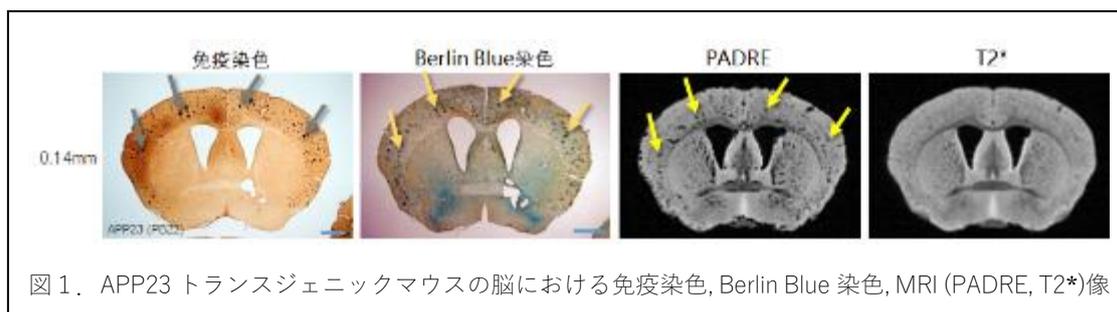


図 1. APP23 トランスジェニックマウスの脳における免疫染色, Berlin Blue 染色, MRI (PADRE, T2*) 像

麻酔下マウスでの撮像においても T2* 強調画像に磁性情報を加味した PADRE 画像では老人斑がより明瞭に描出できることが確認でき、その位置、大きさが Aβ 免疫染色、Berlin Blue 鉄染色像と一致することが確認された。2019 年 1 月 3 日に熊本西部で発生した震度 6 の地震の影響により熊本大学薬学部の動物用 MRI 装置がクエンチして故障し、2021 年初頭まで使用できなかったためその後の MRI 撮像が出来ず、このテーマの研究を期間内に終了できなかったが、PADRE の基礎的知見は得られたため、臨床用 MRI 装置に実装され始めている PADRE の基礎技術的有用性が裏付けされる理由の一つとなった。

Berlin Blue 染色における染色ムラの対処法として HeLa 細胞と APP マウスの脳切片を用いた染色法の改善に関して、脱脂を目的としたメタノール処理は染色性が低下してしまう事がわかり、Triton X-100 による浸潤処理が効果的であることが分かった。このことにより、一般的なホルマリン固定組織で鉄染色が可能であることを示した。

(2) 脳切片の自家蛍光の減弱法

逆行性トレーサ (fluosphere) の赤色励起光が脳の自家蛍光と重なり蛍光顕微鏡下の観察で大きな障害となっていたため、ラット味覚野の研究が先に進めなかった。そこで、脳切片の自家蛍光の効果的な減弱法を見出した(図 2)。

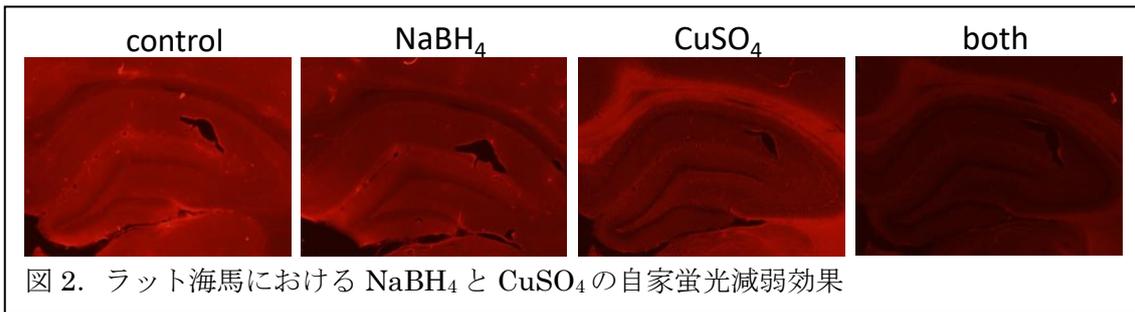


図 2. ラット海馬における NaBH₄ と CuSO₄ の自家蛍光減弱効果

未処理 (control) では脳全体が強い赤色励起光で覆われているが、NaBH₄ 処理後、皮質及び線維の蛍光強度が抑制されたが、血管及びその周辺の斑点状蛍光が残った。CuSO₄ 処理では大脳皮質と血管周囲の傾向はほぼ抑制することが出来たが、線維の蛍光強度は未処理のものより増強した。両処理後、血管周囲の斑点状蛍光と線維の蛍光強度が抑制され、自家蛍光がほぼ消失させられる方法を見出し、以後の逆行性トレーサ実験がスムーズに進めることが出来るようになった。本減弱法は他の蛍光色素にも応用できる可能性があるが、追実験が必要である。

(3) 逆行性トレーサを用いたラット大脳皮質味覚野の同定

電気生理学的あるいはトレーサ実験的に判明している味覚経路は、ラットでは舌、孤束核、結合腕周囲核、視床後腹側内側核を経て大脳皮質味覚野へと続いている [Norgren R. (1995) Academic Press, 751-771.]. 味覚認知、味覚行動、嫌悪学習に関与する大脳皮質の位置を特定しようとする多くの破壊実験があるが [Blonde et. al. (2015) PLoS One, 6:10(2)., Hashimoto and Spector AC. (2014) Chemical Senses 39:57-71., King et al. (2015) Brain Res. 1599:9-19., Schier et al. (2016) J Comp Neurol. 524(1):54-73., Schier LA et al. (2014) Proc Natl Acad Sci USA. 111:1162-1167.], 一次味覚野の機能は未だ多くの疑問を残している。また、大脳皮質味覚野の位置は研究者や研究目的により異なり、その範囲が確定されているとは言い難い。

そこで、我々が行った破壊実験と同条件で大脳皮質味覚野(DI 野)とその周辺部にトレーサを打ち込み、神経終末から取り込まれ、軸索の逆行性輸送によって神経細胞体へ出現する特性を利用して、視床味覚野への投射様式を確かめ、大脳皮質一次味覚野の範囲の同定を試みた(図 3)。視床の位置の各陽性細胞を赤色の点で示している。また、図の中央部のグラフは右大脳皮質を側面から見た地図を表している。視床後腹側内側核 (VPMpc) の内側 1/3 に大半のラベルが見られた大脳皮質味覚野周辺の注入部位を赤の楕円で示し、同部位に少数のラベルが見られたものを黄色の楕円で示している。

その結果、Bregma を基準として +0.2 ~ +2.3mm の DI 野からは確実に視床味覚野からの投射を受けていることが確認でき、我々が適用した味覚野が概ね正しかったことを確認できた。一方、GI 野の腹側、および DI 野の -0.3mm 尾側からの投射が確認され、これらの部位も味覚に関与している可能性があるため、破壊実験を行う際には、より広範囲を検討する必要性が示唆された。

(4) リッキングテスト装置を用いた Brief-Access Test の効率的なプロトコルの検索

雄性 SD ラットの味溶液に対する応答を日本製リッキングテスト装置を用いて観察した。味溶液の提示順、提示時間、提示と提示の間に rinse を適用するかどうかについて、サイクル数、EC50 値を得た(図 4)。

味質毎に各濃度での従来法とテスト条件とを比較し、リッキング回数に有意差があるか調べた。ANOVA 解析の結果、低濃度 NaCl に対してのみ有意差が認められたが、他の条件では有意差は無かった。

米国製の Davis Rig では NaCl および Sucrose の Brief-Access Test の結果は濃度依存的に右肩上がりシグモイド曲線を描くが、MELQUEST 社の日本製リッキングテスト装置では全く異なる結果となり、濃度依存的な曲線を示さなかった。クエン酸の酸味、及びキニーネの苦味における嫌悪応答のシグモイド曲線は米国製の Davis Rig と同様の結果が得られた。観察の結果、不具合の原因は飲み口の形状が大きく関与していることが分かり、改良に取り組んでいる。

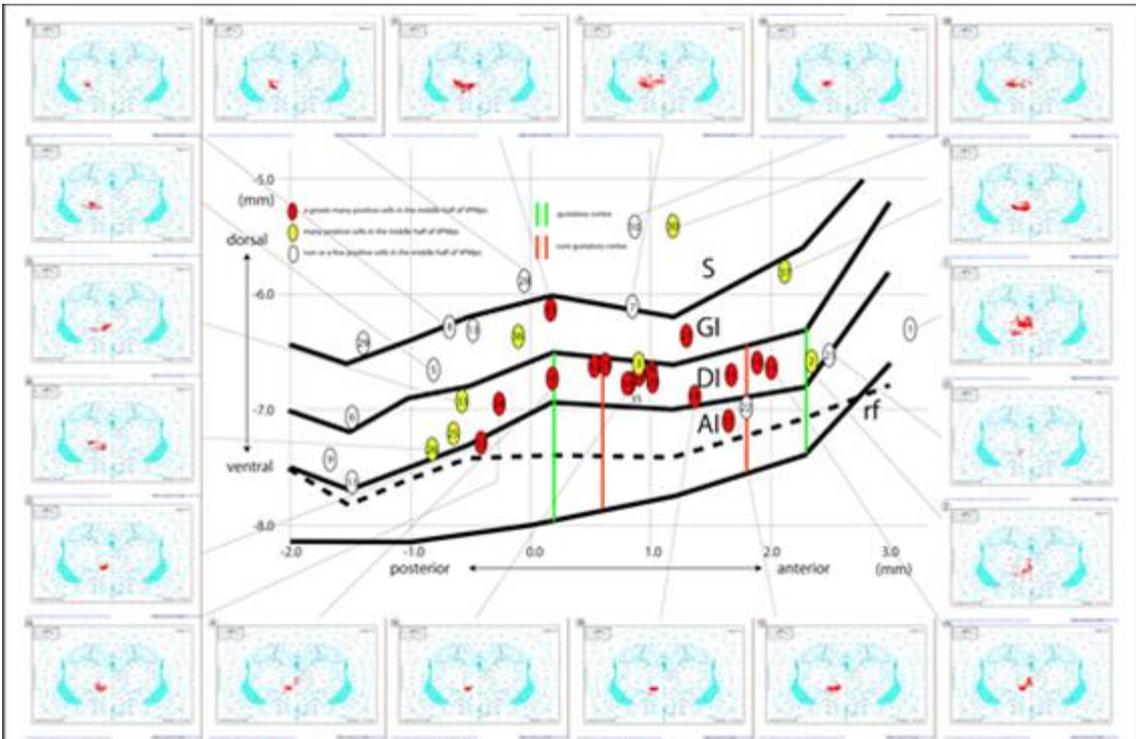


図3 大脳皮質へのトレーサ注入部位とラベル出現様式

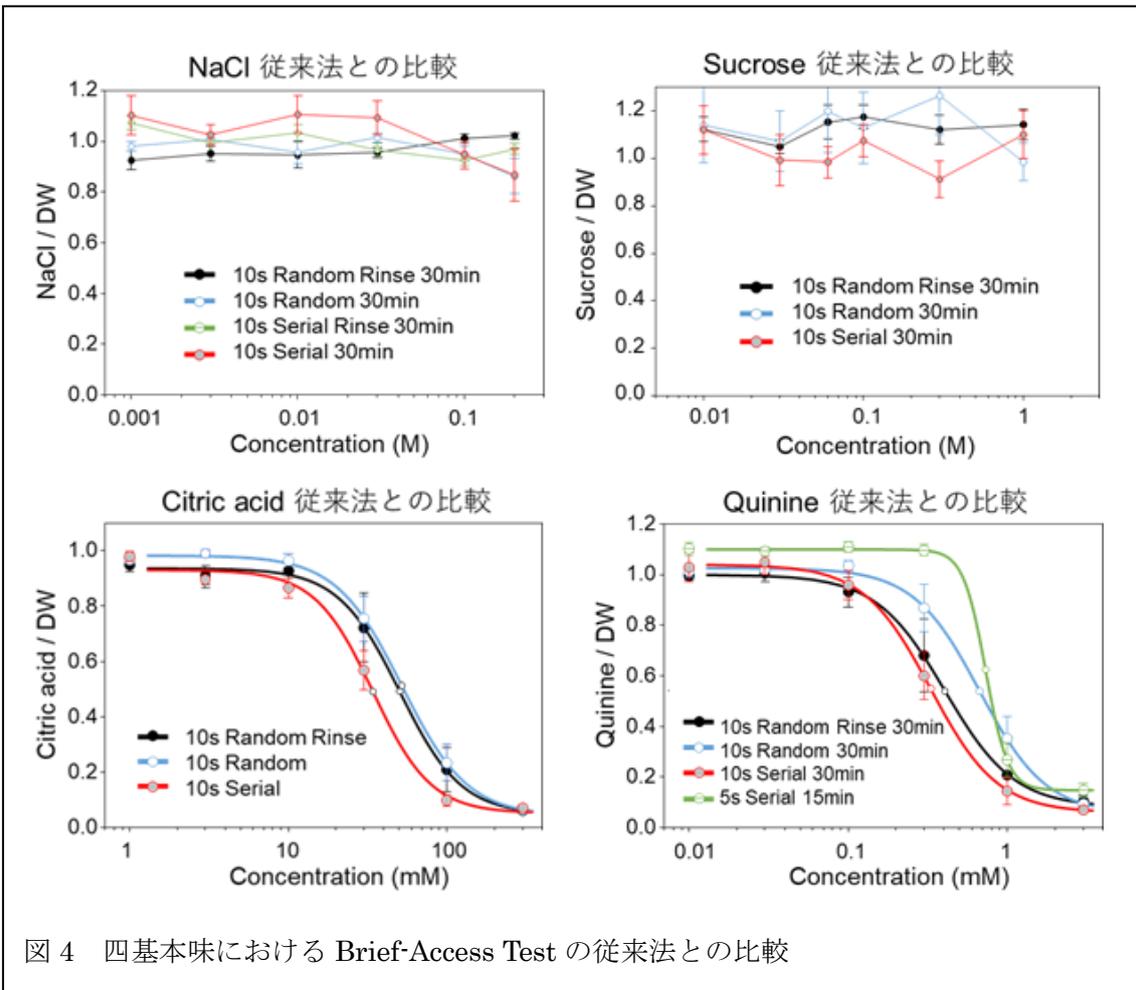


図4 四基本味における Brief-Access Test の従来法との比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 橋本弘司, Alan C. Spector
2. 発表標題 Histological identification of the range of primary gustatory cortex in using the fluorescent retrograde neuronal tracer in rats.
3. 学会等名 味と匂学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本弘司, Alan C. Spector
2. 発表標題 Histological identification of the range of primary gustatory cortex in using the fluorescent retrograde neuronal tracer in rats 2.
3. 学会等名 第18回国際シンポジウム “味覚嗅覚の分子神経機構, ISMNTOP2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Yoneda, Nan Kurehana, Hiroki Indo, Saki Tajima, Saki Nozoe, Miki Sawano, Koji Hashimoto, Akihiko Kuniyasu
2. 発表標題 Study on MR-Phase Distribution of Iron to Detect Amyloid-beta Plaque
3. 学会等名 The 11th Australian and New Zealand Society for Magnetic Resonance Conference; 4th Dec. 2017; (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 國安明彦, 高口友花, 福岡航海希, 柏尾美帆, 牧瀬正樹, 橋本弘司, 米田哲也, 岡崎祥子, 竹下啓蔵
2. 発表標題 中枢神経疾患モデルマウスにおける脳内レドックスイメージング
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	米田 哲也 (Yoneda Tetsuya) (20305022)	熊本大学・大学院生命科学研究部(保)・准教授 (17401)	
研究 分担者	國安 明彦 (Kuniyasu Akihiko) (90241348)	崇城大学・薬学部・教授 (37401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Department of Psychology	Program in Neuroscience	Florida State University