

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11251

研究課題名(和文) 自発運動と強制運動がアルツハイマーモデル動物の認知脳機能に与える影響の研究

研究課題名(英文) Study of the effects of spontaneous and forced exercise on cognitive brain function in an animal model of Alzheimer's disease.

研究代表者

山木 幸子 (YAMAKI, Sachiko)

金沢医科大学・医学部・特定助手

研究者番号：70837715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：3xTg-ADマウス脳内のアミロイド蓄積とタウリン酸化による神経原線維変化の時空間的变化について定量的に検証し、そのパターンを明らかにした。これらのデータを得たことで、3xTg-ADマウスの脳内での病理的变化パターンを確定したことで、運動のもたらす病理学的変化への影響を明らかにすることが可能となった。その結果、病理学的変化が顕著に出るメスの3xTg-ADマウスに対して2週間の運動のもたらす影響を検証したところ、2週間の運動では認知機能および病理学的変化の改善をもたらしことはできないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果により明らかになった3xTg-ADマウス脳内の基本的な病理学的変化についての知見はこの動物を用いたアルツハイマー病(AD)に対する様々な新規治療法を検証する際の基盤となる。3xTg-ADマウスは現時点においても神経原線維変化を生じる唯一のADモデルマウスであり有用である。また本研究から短期間の運動は、ADの病理変化に影響をもたらしことが明らかとなった。このことから、さらに長期間の運動がADの改善には必要であることが示唆されたことは有効な運動療法の確立に向けての重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Spatiotemporal changes in amyloid- accumulation and tau phosphorylation in the 3xTg-AD mouse brain were quantitatively examined and their patterns were determined. With these data, we were able to establish the pattern of pathological changes in the brain of 3xTg-AD mice and to determine the effects of exercise on the pathological changes. Based on these results, we tested the effects of 2 weeks of exercise on female 3xTg-AD mice, in which pathological changes are more pronounced, and found that 2 weeks of exercise could not produce improvements in cognitive function and pathological changes.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 モデル動物 運動

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎え、認知症対策は喫緊の課題である。高齢者コホートでの疫学調査では、意欲低下(アパシー)は認知症の増悪因子であり、身体機能低下(フレイル)とも密接に関連する。そしてフレイル対策として有効な運動習慣は認知機能低下を防ぐことも知られている。しかし、運動が脳血流を改善し、あるいは神経新生を促すという断片的知見はあるものの、機能的な認知改善メカニズムは十分に調べられていない。加えて、アパシー・認知症・フレイルの密接な関連を考慮すると、患者自身がフレイル対策として意欲的に行う自発的運動と、意志に反して強制されて行う場合では脳機能に与える影響が異なると予想されるがその効果も不明であった。

これまで申請者達はアルツハイマー病モデルマウスである 3xTg-AD マウスを用いて、その脳神経回路と行動における異常を研究してきた。その結果 3xTg-AD マウスでは AD 早期に相当する時期(7 か月齢)において空間学習能力が下がっていること、空間学習に関連する脳部位である背側海馬のシナプス形成に異常があること、さらに背側海馬での神経活動に異常があることが示唆された。3xTg-AD マウスの脳内では AD 原因タンパクであるアミロイド が異常発現しているが、その結果、神経回路と認知機能に異常が生じていると考えられる。3xTg-AD マウスに見られる行動異常はヒトの早期 AD でも見られる症状であり、それゆえ 3xTg-AD マウスは非常に優れた AD モデル動物であると言える。そこで本研究では 3xTg-AD マウスを用いた動物実験により自発・強制運動によって認知および神経回路網へどのような影響が生じるか、という問いの解明を目指した。

## 2. 研究の目的

超高齢化社会を迎えた現在、アルツハイマー病(AD)による認知症は大きな社会問題となっている。認知症の進行は身体的な機能低下と深く関わり、運動による身体能力向上は認知症の非薬物介入の中で重要な役割を占める。ただし、脳機能への影響という観点からは、AD 認知症の神経活動障害および、運動が脳機能に及ぼす影響については不明な点が多い。この現状を踏まえ運動の認知機能に与える影響を AD モデルマウスである 3xTg-AD マウスを用いて検証することとした。特に意欲に基づく自発運動、および強制による運動それぞれが神経回路と学習行動に与える影響を精査し、認知症の運動療法の最適化への指針とすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 3xTg-AD マウスの脳内での継時的病理学的変化の解析

研究開始時点においては 3xTg-AD マウスの基本的なアルツハイマー病様の病理変化については定見が存在しないことから運動の病理学的変化への影響の評価が困難であった。特にアミロイド の脳内蓄積による老人斑の出現時期については発表された論文の間でも大きな差異があった[1,2]。また 3xTg-AD マウスのアミロイド 蓄積には雌雄差があるとの報告もあったがこれについても異論が存在した[3]。そこで運動による病理学的変化への影響を評価する際の基礎となるデータ取得のために 3xTg-AD マウスの脳内での継時的病理学的変化を検証した。具体的にはアミロイド とその前駆タンパクである APP の蓄積、および異常タウタンパク質の蓄積と神経原繊維変化の継時的な 3xTg-AD マウス脳内での経過を免疫染色とステレオロジーを利用した定量的解析により検証した。

### (2) ゴルジ染色によるスパイン構造の解析

神経細胞自体の形態変化を検証するために 3xTg-AD マウスの脳標本を用いてゴルジ染色を行った。これまでの過去の研究から AD モデルマウスにおいては樹状突起上のシナプス形成部位であるスパイン構造に変化が見られることが示唆されていた。ゴルジ染色はスパイン構造を可視化する最も優れた染色法であることからこれを採用して 3xTg-AD マウス神経細胞のスパイン構造の解析を行った。

(3) 運動療法のみならず 3xTg-AD マウスの認知機能および病理学的変化への影響評価  
(1)(2)で述べた方法に加えてモリス水迷路による空間記憶能力の評価を行い、運動の認知機能および病理学的変化への影響の評価を行った。

#### 4. 研究成果

以下3で述べたそれぞれの研究方法についてそれらの成果について記述する。

##### (1) 3xTg-AD マウスの脳内での継時的病理学的変化の解析

3xTg-AD マウスはアミロイド 産生されやすい変異を持った APPswe が Thy1 プロモータの制御下で発現しておりその蓄積がアミロイド の過剰産生をもたらす[2]。そこで APPswe の細胞内蓄積と老人斑の出現の 3xTg-AD マウス脳内での時空間パターンについて抗 APPswe 抗体( rat anti-human APP antibody clone1D1, Sigma-Aldrich )と抗アミロイド 1-42 抗体( rabbit anti- -amyloid1-42 antibody, Sigma-Aldrich )を用いて検証した。その結果、APPswe は大脳皮質、嗅覚領域、海馬、扁桃核、大脳基底核のサブ領域、小脳核、中脳と後脳の多くの核(主に運動系)といった広範囲にわたって発現していることが分かった。ステレオロジーによる定量解析の結果、このうち特に海馬の CA1 領域後部および海馬台において多くの細胞体に早期から(1カ月齢程度でピークに到達) APPswe の蓄積が起こっていた。また大脳皮質においては主に5層と6層の細胞体に APPswe の蓄積が起こっていた。大脳皮質での APPswe の細胞体蓄積は海馬に比べて緩やかな時間経過をたどり(6カ月程度でピークに到達) APPswe 陽性細胞体密度も低かった。大脳皮質における APPswe 蓄積の特徴として顕著な雌雄差が見られたことがある。メスではオスに比べて約1.5-2倍程度の APPswe 陽性細胞体が見られた。一方、老人斑の出現は APPswe の蓄積に遅れて起こり、約9カ月齢で始まり12カ月齢で顕著になるという結果を得た。3xTg-AD マウスの初期の論文の結果[2]と異なり、老人斑は 3xTg-AD マウス脳内で海馬に主に見られ、大脳皮質においては12カ月齢ではほとんど見られないという特徴があった。また老人斑の形成にも雌雄差が存在しメスではオスよりも多くの老人斑の形成が見られた。加えて興味深いことに APPswe の細胞体蓄積が見られなかった中隔や橋核といった領域に老人斑の形成が見られた。これらの領域は海馬や大脳皮質といった APPswe の蓄積が起こる脳領域からの投射を受けていることから、アミロイド は軸索領域から少なからぬ量が放出されていることが示唆された。このことは海馬においてもアミロイド 蓄積細胞を多量に含む CA1 領域から多量の投射を受ける海馬台において顕著な老人斑の形成が見られることから、高い蓋然性を持っていると考えられる。これらの結果は査読付き論文として公表した[4]。

また 3xTg-AD マウスはリン酸化による神経原繊維変化を起こしやすい変異タウが APPswe と同じく Thy1 プロモータ制御下で導入されている[2]。変異タウの蓄積とそのリン酸化に関しても抗ヒトタウ抗体(mouse anti-Tau monoclonal antibody HT7, Invitrogen)、早期のリン酸化を検知する抗リン酸化タウ Thr-231 抗体 (mouse anti-Phospho-Tau monoclonal antibody AT180, Invitrogen)、および神経原繊維変化をもたらす後期のリン酸化を検知する抗リン酸化タウ Tau Ser 396 抗体 (rabbit anti-Phospho-tau polyclonal antibody, Invitrogen)を用いてその時空間パターンを検証した。変異タウの蓄積する細胞体は Thy1 プロモータ制御を反映して APPswe と同じ広範囲の領域にわたって見られた。ただしその数量には APPswe 蓄積と違いが見られた。中脳および脳幹部では同程度の APPswe と同程度の蓄積細胞体が見られたが、大脳皮質及び海馬では APPswe にくらべて少数の細胞体のみ変異タウの蓄積が見られた。特に大脳皮質では APPswe にくらべて変異タウの蓄積している細胞体の数は顕著に少なかった。また APPswe で見られたような雌雄差は変異タウの蓄積には見られなかった。脳全体においては変異タウは APPswe は海馬で最も蓄積が見られ時間経過も1カ月程度でピークに達するのが観察された。それを反映してタウのリン酸化は 3xTg-AD マウス脳内でほぼ海馬においてのみ見られた。タウのリン酸化の最終段階であり細胞死につながる神経原繊維変化も海馬においてのみ見られ、特に海馬台と CA1 の境界部分に見られる頻度が高かった。神経原繊維変化に関しては12カ月齢で初めて少数の細胞に観察された。これらの結果は現在論文投稿準備中である。

##### (2) ゴルジ染色によるスパイン構造の解析

ゴルジ染色については、当初重クロム酸カリウム水溶液と硝酸銀水溶液によって染色する古典的ゴルジ染色法を試みた[5]。しかし古典的ゴルジ染色法では染色に2週間程度要すること、標本がもろくなるためにエポキシ等で硬化して切片を作製する必要があり手間がかかるうえに切片のサイズがまちまちになり観察が難しいこと、神経細胞の染色の度合いが試行ごとにばらつきが多い、バックグラウンドの染色が強くS/Nが悪い、等の問題があり実験が難航した。そこで重クロム酸カリウム/クロム酸カリウム/塩化水銀の混合液を用いる Golgi-Cox 法を37-42 でのインキュベーションで行う Ultra-rapid Golgi (URG) 染色法[6]を古典的ゴルジ染色法に替えて試みた。その結果 200-300  $\mu$ m の PFA 固定脳切片に対して 36-48 時間程度のインキュベーションを行うことで良好な神経細胞染色像を得ることができた。またこの過程で URG 染色法では標本の固定の程度に依存して染色される細胞体の数、樹状突起の数、グリア細胞の数が大きく変化することが分かった。そこで後固定の時間を 0-24 時間の間で変えて神経細胞の観察に最も適した後固定時間の検証を行った。現在はその結果をもとに、ステレオロジーによる神経細胞体数、樹状突起数、グリア細胞数およびスパイン密度の定量解析をつうじて、目的に応じた神経細胞観察に最適な後固定時間の検証を行っておりその結果を論文投稿予定である。またこの方法により 3xTg-AD マウスの神経細胞のスパイン数の変化について検証を進めている。

### (3) 運動療法のもたらす 3xTg-AD マウスの認知機能および病理学的変化への影響評価

(1) で得た結果をもとに老人斑が形成されやすく加齢による病理学的変化が顕著なメスの 3xTg-AD マウスを用いて運動療法のもたらす認知機能および病理学的変化への影響を検証した。まず強制運動の影響を見るために、7 カ月齢のメス 3xTg-AD マウスに対して 2 週間トレッドミル上で 1 日 1 時間運動負荷しその影響を検証した。その結果、運動群と対照群で Morris 水迷路の成績、APP の細胞体蓄積、老人斑の形成、神経原線維化に違いは見られなかった。そこで、これらの動物からの脳標本を用いて、当初は予定に入っていなかった低酸素誘導性因子 HIF1- の発現の変化を検証した。近年の研究から HIF1- はアルツハイマー病の病理変化及び認知機能に影響を与えることが示唆されていること[7]に加えて、運動によって脳内で変化が見込まれることから、これについての発現変化を免疫組織学的に検証した。その結果、HIF1- は 3xTg-AD マウスの脳内で野生型のマウスに比べて多く発現しており、そのほとんどはミクログリアで発現していることが明らかとなった。また 3xTg-AD マウスの脳内では、ミクログリアの数および活性が亢進していることも明らかとなった。ただし HIF1- の発現もミクログリア動態も 2 週間の運動によって変化は見られなかった。これらの結果から 2 週間程度の運動では認知機能および病理学的変化に対する改善は見込めないことが明らかとなった。現在はより長い期間での運動がもたらす影響の検証を予定している。

また当初の研究計画では自発的運動の検証を行う予定であったが、ケージ内で複数で飼育されている動物のそれぞれの個体の運動量の測定が技術的に困難であること、それを避けて単頭飼育を行った場合には孤独によるストレスがかかってしまうこと、から期間内での実験を行うことができなかった。自発運動の計測に関しては生体認証チップを体内に埋め込んだうえで、チップを認識し個体識別を行いながら運動量を計測するトレッドミルによる自発運動計測システムの開発を考えている。

1. Oh KJ, Perez SE, Lagalwar S, Vana L, Binder L, et al. (2010) Staging of Alzheimer's pathology in triple transgenic mice: a light and electron microscopic analysis. *Int J Alzheimers Dis* 2010.
2. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, et al. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39: 409-421.
3. Dennison JL, Ricciardi NR, Lohse I, Volmar CH, Wahlestedt C (2021) Sexual Dimorphism in the 3xTg-AD Mouse Model and Its Impact on Pre-Clinical Research.

J Alzheimers Dis 80: 41-52.

4. Ono M, Ito T, Yamaki S, Hori Y, Zhou Q, et al. (2024) Spatiotemporal development of the neuronal accumulation of amyloid precursor protein and the amyloid plaque formation in the brain of 3xTg-AD mice. *Heliyon* 10: e28821.
5. Vints K, Vandael D, Baatsen P, Pavie B, Vernailen F, et al. (2019) Modernization of Golgi staining techniques for high-resolution, 3-dimensional imaging of individual neurons. *Sci Rep* 9: 130.
6. Kassem MS, Fok SY, Smith KL, Kuligowski M, Balleine BW (2018) A novel, modernized Golgi-Cox stain optimized for CLARITY cleared tissue. *J Neurosci Methods* 294: 102-110.
7. Wang YY, Huang ZT, Yuan MH, Jing F, Cai RL, et al. (2021) Role of Hypoxia Inducible Factor-1alpha in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 80: 949-961.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Furuyama Takafumi, Shigeyama Takafumi, Ono Munenori, Yamaki Sachiko, Kobayasi Kohta I., Kato Nobuo, Yamamoto Ryo	4. 巻 17
2. 論文標題 Vocalization during agonistic encounter in Mongolian gerbils: Impact of sexual experience	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0272402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Xu Feng, Ono Munenori, Ito Tetsufumi, Uchiumi Osamu, Wang Furong, Zhang Yu, Sun Peng, Zhang Qing, Yamaki Sachiko, Yamamoto Ryo, Kato Nobuo	4. 巻 529
2. 論文標題 Remodeling of projections from ventral hippocampus to prefrontal cortex in Alzheimer's mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 1486 ~ 1498
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.25032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Kenji, Yamamoto Ryo, Kato Nobuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Amyloid and Amyloid Precursor Protein Synergistically Suppress Large-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel in Cortical Neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Aging Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnagi.2021.660319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ono Munenori, Ito Tetsufumi, Yamaki Sachiko, Hori Yoshie, Zhou Qing, Zhao Xirun, Muramoto Shinji, Yamamoto Ryo, Furuyama Takafumi, Sakata-Haga Hiromi, Hatta Toshihisa, Hamaguchi Tsuyoshi, Kato Nobuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Spatiotemporal development of the neuronal accumulation of amyloid precursor protein and the amyloid plaque formation in the brain of 3xTg-AD mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e28821 ~ e28821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2024.e28821	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Uchiimi Osamu, Zou Jingyu, Yamaki Sachiko, Hori Yoshie, Ono Munenori, Yamamoto Ryo, Kato Nobuo	4. 巻 1835
2. 論文標題 Disruption of sphingomyelin synthase 2 gene alleviates cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 148934 ~ 148934
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2024.148934	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	加藤 伸郎  (KATO Nobuo)  (10152729)	金沢医科大学・医学部・教授    (33303)	
研究分担者	小野 宗範  (ONO Munenori)  (30422942)	金沢医科大学・医学部・教授    (33303)	
研究分担者	伊藤 哲史  (ITO Tetsufumi)  (90334812)	富山大学・学術研究部医学系・教授    (13201)	

#### 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
---------	---------