

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20692

研究課題名（和文）高速大規模解析が可能とするアルツハイマー病モデルにおける神経脱落様式の網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of neuronal loss in an Alzheimer's disease model by high-speed large-scale analysis

研究代表者

伊藤 祥吾 (Ito, Shogo)

順天堂大学・医学部・特任研究員

研究者番号：10966245

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、アルツハイマー病モデルマウスにおける神経細胞の変性および脱落の様式解明を目的とした。研究遂行過程において、内在性IgG抗体がAβプラーク近傍に集積していることを偶然にも見出した。この内在性IgGは免疫組織化学においてマウスモノクローナルIgG抗体を特異的に検出する障害となることを明らかにし、マウスIgGサブクラスに特異的な二次抗体の使用によってこの問題を回避できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、脳実質にはほとんど流入しないと考えられてきた内在性IgG抗体がADモデルマウス脳実質に集積しているという現象に着目し、これがマウスモノクローナルIgG抗体を用いた免疫組織化学の障害となることを示し、その解決法を確立したことである。将来的にはこれまでほとんど明らかにされていなかったアルツハイマー病理と液性免疫との関連に新たな知見を与えることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the patterns of neuronal degeneration and loss in a mouse model of Alzheimer's disease. In this study, I serendipitously discovered that endogenous IgG antibodies accumulate near Aβ plaques. I found that this endogenous IgG interferes with the specific detection of mouse monoclonal IgG antibodies in immunohistochemistry. I further showed that this issue can be circumvented by the use of secondary antibodies specific to mouse IgG subclasses.

研究分野：神経解剖学

キーワード：アルツハイマー病 神経脱落 軸索変性 内在性IgG IgGサブクラス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は認知症患者の半数以上を占める神経変性疾患であり、神経細胞の脱落が発症および進行の要因と考えられている。神経細胞は細胞体から長い神経軸索を標的領域へと投射させる。このため AD における神経脱落は、神経軸索と細胞体の間で脱落様式が異なる可能性がある。細胞体の脱落は軸索の脱落を伴うため、AD 症状が進行していることの多いヒトの死後脳解析ではこの問題に迫ることはできない。モデル動物を用いた経時的な解析が必要となる。アミロイド β ($A\beta$) 蓄積モデルマウスのノルアドレナリン (NA) およびアセチルコリン (ACh) 作動性ニューロンにおいて、神経軸索の脱落が細胞体脱落に先立つことが報告されてきた (文献 1, 2)。しかしながら、これら軸索が脳のいずれの領域で途絶しているのか、さらには軸索脱落が細胞体脱落に先行するという脱落様式が他の神経細胞でも見られる共通した現象であるかは不明である。

2. 研究の目的

本研究課題では、細胞体から軸索末端において、AD による神経細胞変性の部位、時期、様態を解明することを目的として研究を開始した。しかしながら、本研究課題を推進する過程において、採択者は偶然にも AD モデルマウスである *App^{NL-G-F}* の $A\beta$ プラーク近傍において内在性の IgG 抗体が集積していることを見出した。血液脳関門の存在により、血中の IgG 抗体はほとんど脳実質に流入しないと考えられている。このため、今回の発見はこれまでほとんど明らかとされていなかった AD 病理と液性免疫との関連を示唆する重要な知見と考えられる。また、 $A\beta$ プラーク近傍の内在性 IgG は抗マウス IgG 二次抗体によって認識されるため、AD モデルマウス脳切片に対するマウスモノクローナル抗体を用いた間接法による免疫組織化学において、特異的な染色が障害されることが想定される。本研究課題ではマウスモノクローナル抗体の使用も計画していたため、この問題は最優先で取り組むべき課題と考えた。そこで、AD モデルマウスにおけるマウスモノクローナル抗体を用いた特異的免疫染色法の開発を新たな研究目的として追加した。

3. 研究の方法

本研究では、「AD モデルマウスにおけるマウスモノクローナル抗体を用いた特異的免疫染色法の開発」を行い、これにより確立した手法を用いて「AD による神経細胞変性の部位、時期、様態の解明」に取り組んだ。以下に研究方法の詳細を記す。

(1) AD モデルマウスにおけるマウスモノクローナル抗体を用いた特異的免疫染色法の開発

内在性 IgG がマウスモノクローナル抗体を用いた染色の障害となることの検証

App^{NL-G-F} 固定脳の凍結切片において、一次抗体として抗 NeuN マウスモノクローナル抗体を使用し、抗マウス IgG (H+L) 二次抗体が NeuN と内在性 IgG の両者を認識するかを検証した。NeuN は神経細胞核のマーカである。また、抗マウス IgG (H+L) 抗体は IgG の重鎖および軽鎖を認識する、最も一般的に用いられる二次抗体である。

内在性 IgG が $A\beta$ プラーク周囲のミクログリアに集積しているかの検証

AD モデルマウス 5xFAD において、内在性 IgG がミクログリアまたは $A\beta$ プラークに集積することが報告されているが (文献 3, 4) 本研究で使用している *App* ノックインマウスにおいて内在性 IgG がどこに集積しているかは不明であった。そこで、*App^{NL-G-F}* および *App^{NL-F}* 固定脳の凍結切片において、内在性 IgG のシグナルがミクログリアマーカである Iba1 および CD11b、 $A\beta$ プラーク染色色素 FSB と一致するかを検証した。

従来法による off-target 結合の抑制効果検証

抗マウス IgG 抗体が内在性 IgG に対して結合すること (off-target 結合) が免疫組織化学において問題となる場合、ブロッキングと呼ばれる処理が一般的に行われる。これは、組織に対してあらかじめ非標識抗マウス IgG 抗体の Fab フラグメントを反応させておくことで、二次抗体である標識抗マウス IgG 抗体が内在性 IgG を認識するのを防ぐものである。App^{NL-G-F} における内在性 IgG の集積に対してもこのブロッキングが有効であるかを検証した。

抗マウス IgG サブクラス抗体の使用による off-target 結合の抑制効果検証

採択者は集積内在性 IgG のシグナルと IgG 受容体である FcγRI のシグナルが強く相関することを見出している。このため、内在性 IgG が FcγRI を介してミクログリアに集積していると想定している。IgG と FcγRI との相互作用部位は IgG サブクラスに特異的なアミノ酸領域を含むため、抗マウス IgG サブクラス抗体の認識部位は FcγRI によってマスクされているのではないかと考えた。そこで、抗マウス IgG サブクラスに特異的な二次抗体の使用によって off-target 結合が抑制されるかを検証した。

(2) AD による神経細胞変性の部位、時期、様態の解明

各種月齢の App^{NL-G-F} において、全脳を対象とし神経細胞の細胞体・軸索・変性軸索・Aβ を免疫組織化学によって染色、定量解析することにより、AD による神経細胞変性の部位、時期、様態を明らかにすることを狙った。AD における変性と脱落に関する知見がほとんど存在せず、軸索走行が解析可能な程度に疎であるセロトニン作動性ニューロンを系の確立のための解析対象として選択した。高速大規模な画像取得のため、高速スピニングディスク共焦点顕微鏡を使用した。さらに、より高速での画像取得のため、蛍光チラミド増感法である FT-GO 法 (文献 5) により染色のシグナルを増強し、露光時間を短縮することも狙った。

4. 研究成果

本研究において、AD モデルマウス脳切片に対して抗マウス IgG サブクラス二次抗体を使用することによってマウスモノクローナル抗体を用いた特異的な免疫染色が可能となることを見出し、プレプリント投稿を行った (文献 6)。現在は論文投稿中である。また、これら成果は学会報告も行った (Ito et al., 第 46 回日本神経科学大会, 第 129 回日本解剖学会総会全国学術集会)。「AD による神経細胞変性の部位、時期、様態の解明」に関しては、補助事業期間終了後も継続して研究を遂行している。以下に研究成果の詳細を記す。

(1) AD モデルマウスにおけるマウスモノクローナル抗体を用いた特異的免疫染色法の開発

App^{NL-G-F} 固定脳の凍結切片において、抗マウス IgG (H+L) 二次抗体が Aβ プラーク近傍の内在性 IgG に対して反応性を示し、これによりマウスモノクローナル抗体を用いた間接法による免疫染色が著しく障害されることを示した。この内在性 IgG のシグナルは Iba1 および CD11b のシグナルとよく一致し、FSB によって標識された Aβ プラークとも重なった。抗マウス IgG (H+L) 抗体の Fab フラグメントを用いたブロッキングは、二次抗体の off-target 結合を完全には抑制しなかった。採択者の仮説通り、マウス IgG サブクラスに特異的な二次抗体の中でも、IgG1, 2a, 2b, 3 に対する抗体は off-target 結合を示さなかった。一方で、IgG2c に対する二次抗体では off-target 結合は消失しなかった。抗マウス IgG1, 2a, 2b, 3 二次抗体の使用によって、off-target 結合を生じず、マウスモノクローナル抗体を特異的に染色可能であることを明らかにした。さらに、AD 研究において古くから使用されている抗 Aβ および抗リン酸化 tau マウスモノクローナル IgG 抗体を用いた間接法による免疫組織化学において、一般的な二次抗体である抗マウス IgG (H+L) 抗体と抗マウス IgG サブクラス抗体とでは染色のパターンが大きく異なることを示し、これら抗体の使用時における抗マウス IgG (H+L) 抗体の使用が誤った結果の解釈を生む危険性があることを示した。

(2) AD による神経細胞変性の部位、時期、様態の解明

野生型 C57BL/6J の固定脳を用いて系の構築を行った。セロトニン作動性ニューロンの軸索マーカーであるセロトニントランスポーター (HTT) および細胞体マーカーであるトリプトファン水酸化酵素 (TPH2) を効果的に染色可能な抗体を選定した。固定脳から冠状断切片を作製し、FT-GO 法により染色する方法を確立した。軸索定量のためには共焦点顕微鏡による光学切片画像の取得が必須であることが明らかとなったため、50 μm 厚の冠状断切片の全領域を一枚の光学切片として取得可能な系を確立した。これにより、取得画像の任意の領域を軸索トレースが可能な画質まで拡大可能な光学切片画像の取得方法を確立した。8 ヶ月齢の $App^{+NL-G-F}$ 固定脳を使用し、変性軸索と $A\beta$ に関しても同様の手法で画像取得が可能であることを確かめた。さらには、この手法によって取得した画像から、任意の領域において軸索長を定量する方法も確立した。加えて、脳領域ごとの比較を可能とするため、脳領域のレジストレーション法も確立した。しかしながら、高齢の App^{NL-G-F} では脳の萎縮のためにレジストレーションに問題が生じることが明らかとなった。補助事業期間終了後は、この課題の解決に取り組んでいる。なお、各種月齢の App^{NL-G-F} 固定脳はすでに取得済みであり、この課題が解決次第、解析用のデータ取得を計画している。

< 引用文献 >

1. Sakakibara et al., J Alzheimers Dis, 82:1513, 2021
2. Boncristiano et al., J Neurosci, 22:3234, 2002
3. Kim et al., Nat. Commun., 12:2185, 2021
4. Marsh et al., PNAS, 113:E1316, 2016
5. Yamauchi et al., Sci Rep, 12:14807, 2022
6. Ito et al., bioRxiv, doi: 10.1101/2024.04.25.591057, 2024

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤祥吾, 山内健太, 小池正人, 日置寛之
2. 発表標題 アルツハイマー病モデルマウスにおけるマウスモノクローナル抗体を用いた特異的染色法の開発
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shogo Ito, Kenta Yamauchi, Masato Koike, Hiroyuki Hioki
2. 発表標題 A method for specific indirect detection with mouse monoclonal IgG antibodies in Alzheimer's disease model mouse brains
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------