

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591809

研究課題名(和文)モデルマウスPETによる脳循環・神経活動変化とアミロイド沈着の因果関係解明

研究課題名(英文)Relationship between cerebral perfusion/neuronal activity and amyloid deposition

研究代表者

関 千江 (Seki, Chie)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：40443080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病患者では発症前から脳血流低下や微小循環障害が認められ、循環機能低下がAD発症の背景にあることが示唆されている。本研究ではアミロイド前駆体蛋白遺伝子改変(APP-Tg)マウスで慢性片側脳低灌流モデルを作製し、アミロイドPETとMRIによるインビボイメージング技術によって、病態変化をモデル作製前から最長6ヶ月に渡り追跡した。そして、低血流領域のA β 沈着進行は健常領域と明瞭な違いは無く、脳血流低下はA β 沈着の進行を加速しないことが示唆された。PETやMRIのインビボイメージング技術によって、モデル動物脳内のA β 沈着進行と脳血流状態の長期に渡る変化を可視化することが出来た。

研究成果の概要(英文)：It has been considered that decreased cerebral blood flow may accelerate Alzheimer's disease (AD) related pathologies. To investigate the impact of lowered regional cerebral blood flow (rCBF) on the formation of amyloid beta (A β) deposition, unilateral cerebral hypoperfusion model was made on amyloid precursor protein transgenic (APP Tg) mice by the ligation of the left common carotid artery. The progression of A β depositions and rCBF were quantitatively monitored with [11C]PIB-PET and MRI over months. The rCBF of ipsilateral neocortex sustained up to 84% of that of contralateral neocortex. The A β deposition increased and expanded over time without laterality related to hypoperfusion. The current results indicate that chronic cerebral hypoperfusion is not considered to accelerate deposition of A β plaques.

In vivo imaging technologies such as PET and MRI have advantageous to visualize alterations of A β depositions and rCBF in living model mouse brains longitudinally.

研究分野：放射線医学

科研費の分科・細目：核医学(PETを含む)

キーワード：放射線 脳神経疾患 痴呆 老化

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は神経変性疾患の中では最も多く、初老期から潜在的に発症し、認知機能低下が徐々に進行する疾患で、確実な予防法も根本的治療法も確立していない。病理学的観点からは、脳内アミロイドβ蛋白(Aβ)の細胞外沈着が、アルツハイマー病の他の病理であるタウ蛋白の異常蓄積や神経原線維変化の形成などの引き金と考えられることから、Aβ異常が病理形成の中核とされている。

最近、アルツハイマー病患者では発症前から脳血流低下や微小循環障害が認められ、循環機能低下がアルツハイマー病発症の背景にあることが示唆されている。Aβは、正常脳においても産生細胞から細胞外へ分泌され、いくつかのルートで除去されていて、分泌と除去の動的平衡状態がほぼ保たれていれば、Aβは脳内に顕著に蓄積していくことはなく、生涯アルツハイマー病を発症することは無いと考えられる。Aβ除去ルートのうち、血管系ルートは脳循環がその機能に関わっている。従って、脳循環機能の低下により、Aβ除去が不十分になり細胞外濃度が上昇することがアルツハイマー病発症の一つの要因とも考えられる。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、Aβ分泌と除去バランスの観点から、血管系への除去機能に関わる脳循環のAβ沈着に対する影響を、Aβを脳内に産生・分泌・蓄積する動物モデルであるアミロイド前駆体蛋白遺伝子トランスジェニック(APP-Tg)マウスを用いて検証することとした。そして、慢性的な脳血流低下のAβ沈着病理変化に対する影響を検証するため、APP-Tgマウスに対し個体内で局所的な脳血流低下を呈する片側脳低灌流モデルを作製することで、局所的にAβ沈着病理変化が生ずるかが確認可能な病態モデルとした。そして、生体内で非侵襲・定量的に評価可能なインビボイメージング法であるポジトロン断層撮像法(PET)および核磁気共鳴画像法(MRI)を用い、個々のモデルマウスでの長期的なrCBF低下とAβ沈着病理進行の変化をイメージングにより明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 若年野生型マウスを用いた予備検討

まず、片側脳低灌流モデルの作製と、Aβ沈着PETマーカー¹¹C]PIBを用いたPET撮像(以下、PIB-PET)によるAβ沈着と局所脳血流(rCBF)分布の同時定量評価法を、若年野生型モデルマウスを対象に検討を行った。実験はすべてイソフルラン麻酔下で行った。

① 慢性片側脳低灌流モデルマウスの作製法の確立

APP-Tgマウスと同系統の若年C57BL/6Jマウス(4ヶ月齢)を用い、左総頸動脈を縫合糸

で永久結紮した。rCBF測定はMRI撮像で行った。MRI撮像は小動物用7T MRI装置を用い、結紮前、結紮3日後以内、その後約1ヶ月ごとに最長6ヶ月まで行った。rCBF測定はFAIR法で、Bregma-2 mm、-7 mmの冠状断断面で撮像を行い、それぞれ結紮側、対側の脳新皮質、小脳のrCBFを求めた。次項PIB-PETによるrCBF評価法に合わせ、結紮側のrCBFを小脳のrCBFとの比(rCBFR)で評価し、結紮から最長6ヶ月のrCBFR変化を得た。

MRI撮像では、脳形態情報と虚血性脳梗塞等病変の有無の確認のためT2強調画像、拡散強調画像も撮像した。

② PIB-PETによる局所脳血流量評価の検討
PIB-PETはMRI撮像の一両日中(結紮1ヶ月後以内)から5日以内(結紮1ヵ月後以降)に実施した。PETは尾静脈からの¹¹C]PIB(約37MBq)を投与と同時に60分間撮像を行い29フレームのダイナミック画像データを作成した。

使用したAPP-TgマウスのAβ蓄積病理は脳新皮質や海馬が顕著な一方小脳にはほとんど見られないので、PIB-PETによる関心領域でのAβ蓄積病理の定量評価は小脳を参照領域とした、¹¹C]PIBの分布容積比(DVR)で評価を行う。DVR定量法は、関心領域と小脳との脳内移行率の比 R_1 が算出可能なSimplified reference tissue model (SRTM)法がある。ここではSRTM法を野生型マウスに適用し、 R_1 がどの程度rCBFRを反映するか、結紮側脳新皮質の R_1 を算出し、rCBFRと比較した。

また、¹¹C]PIB脳内移行を反映するPETの初期画像もrCBFを反映することから、PET開始から2分までの、小脳に対する関心領域の¹¹C]PIB集積比(SUVr)もrCBFRの指標になると考えられる。そこで、結紮側脳新皮質のSUVrがどの程度相関するか検討した。

(2) APP-Tgマウスを用いた片側脳低灌流モデルマウスの作製とインビボイメージング評価

APP-Tgマウスを用いた片側脳低灌流モデルマウス作製ではすでにPIB-PETでAβ蓄積病理が検出可能な18-22ヶ月齢のマウス6匹を用いた。モデル作製2週間前にMRI、PIB-PET撮像を行い、左総頸動脈の永久結紮術を施した。脳形態異常、早期死亡、脳梗塞発症の個体を除いた3匹につき4-6ヶ月間、PIB-PETとMRIでAβ蓄積とrCBF変化を約1か月に測定した。PIB-PETによるAβ蓄積定量評価パラメータは(1)で述べた、小脳を参照領域とするSRTM法によりDVRを用いた。また、PIB-PETの後半画像(30-60分積算画像)の小脳を基準としたPIB集積比(SUVr)画像でAβ蓄積病理の脳内分布を確認した。血流低下に対するAβ蓄積病理の影響は、脳新皮質と海馬の左右の比較で検討した。

(3) 摘出脳による Aβ 蓄積病理評価

APP-Tg マウスの片側脳低灌流モデルは最終撮像終了後、Aβ 蓄積病理解析を行い PIB-PET の結果を検証するため、脳を摘出した。その後、ホルマリン固定を行い脱水、凍結し、厚さ 20 μm の冠状断薄切片標本作製した。切片は、Aβ 蓄積の分布を可視化するため色素 FSB を用いたアミロイド染色と、Aβ 亜種で脳内炎症に関わるとされる N 末端が切断・修飾されピログルタミン化した Aβ (Aβ_{N3pE}) の免疫化学染色を行った。さらに隣接切片で [¹¹C]PIB のインビトロオートラジオグラフィ (ARG) を実施した。

4. 研究成果

(1) 若年野生型マウスを用いた予備検討

① 慢性片側脳低灌流モデルマウスの作製

野生型マウス 10 匹に対し、左総頸動脈永久結紮術を施し、片側脳低灌流モデルマウスを作製した。10 匹中 1 匹、実験中死亡したため残り 9 匹につき MRI と PET によるイメージング評価を行った。MRI にて小脳、結紮側、対側大脳新皮質の rCBF を計測した。このモデルでは、小脳の血流分布に左右差が生じないことを確認し、小脳を基準とした rCBFR を結紮側、対側大脳新皮質で算出した。最長 6 ヶ月間測定を行い、結紮側 rCBFR の推移を個別別に図 1 に示した。モデル作製前の rCBFR の平均値は結紮側、健側ともに 1.06 であった。モデル作製 1-3 日後の結紮側大脳新皮質の rCBFR は平均 0.34 で、その後徐々に CBF は回復し、術後 5 ヶ月以上経過したモデルマウスの結紮側 rCBFR は 0.78 となった。一方、健側の最終の平均 rCBFR 値はモデル作製前と同程度の 1.02 であった。また、T2 強調画像および拡散強調画像から、脳梗塞等 MRI で確認可能な病変は、測定期間中では見られなかつ

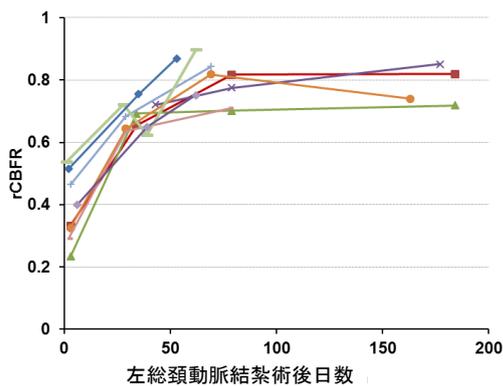


図 1. 片側脳低灌流モデルマウスの結紮側大脳新皮質脳血流の推移

た。従って、片側総頸動脈永久結紮法による片側脳低灌流モデルは約 6 ヶ月に渡り、健側に対して結紮側大脳皮質が 80%未満の低血流量状態を維持し、脳梗塞等 MRI で検出可能な病変を呈さない慢性片側脳低灌流モデルであることが確認された。

② PIB-PET による局所脳血流量評価

片側脳低灌流モデルマウス作製後、MRI と並行して PIB-PET 撮像を行った。[¹¹C]PIB 投与から 3 分間の PET 画像 (水平断) は図 2 のような結果 (左) 側の脳での広範な [¹¹C]PIB の脳内取り込み低下が見られ、[¹¹C]PIB の脳内移行と rCBF が相関することが示された。

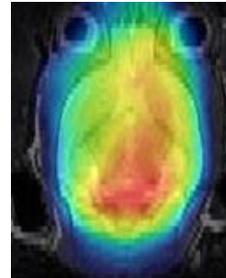


図 2. 結紮2日後のPIB-PET初期画像 (水平断、0-3分、T2強調画像との融合画像)

また、MRI の FAIR 法による rCBF 画像と冠状断の画像と PIB-PET 初期 SUVR 画像とを比較すると図 3 の結果となった。

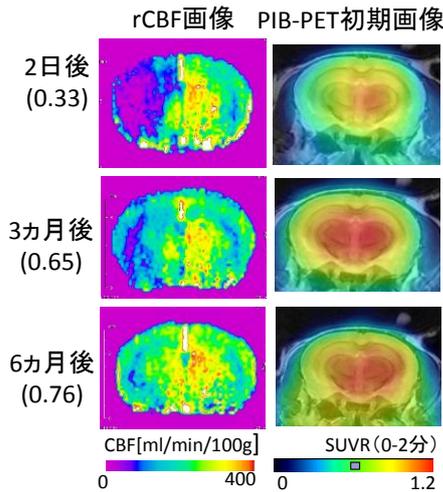


図3. FAIR法によるrCBF画像とPIB-PET初期画像のモデル作製後の変化 (冠状断、PET はT2強調画像との融合画像、括弧内数値は 大脳新皮質rCBFの結紮側/健側比)

[¹¹C]PIB の脳内移行を表す PET 初期画像は、特に結紮側 (左)、健側 (右) の血流量の差が大きいモデル作製直後は SUVR の左右差が明瞭であるが、その後は不明瞭となった。[¹¹C]PIB の脳内移行率がどの程度脳血流量の指標となるか、小脳を基準とした 0-2 分積算画像の初期 SUVR 値と SRTM 法で算出される R1 を、FAIR 法で求めた rCBFR と比較した (図 4)。

R1 の方が rCBFR との相関が若干良好なもの、どちらもばらつきが多く、rCBFR 変化に対する感度は高くなかった。一方、FAIR 法での rCBF 測定は選択した冠状断のみの定量情報となる。従って、片側脳低灌流モデルマウス作製では、作製後間もない時点で PIB-PET による低灌流領域を検出、MRI を用いた選択冠

状断での rCBF 定量測定を行うことで、片側脳低灌流モデルの評価が可能であることがわかった。

以上、若年野生型モデルマウスを用いた予備検討から、左総頸動脈永久結紮術による片側脳低灌流モデルマウスは結紮側大脳半球で広範に脳血流が低下し、6ヶ月間対側大脳の80%未満の低灌流を維持する、慢性モデルであることが確認された。

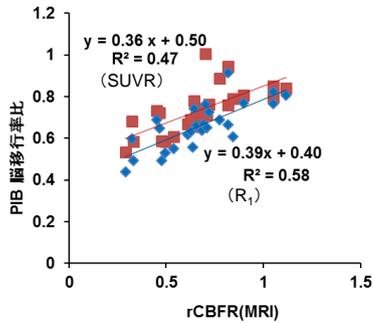


図4. PIB脳移行率比とrCBFRの相関 (青：初期SUVR、赤：R₁)

(2) APP-Tg マウスの片側脳低灌流モデルマウスの作製とインビボイメージング評価

①APP-Tg 片側脳低灌流モデルマウスの脳血流量

APP-Tg マウスのモデル作製3日後のMRIによる rCBF 画像と PIB-PET 初期 SUVR 画像から、どの個体も図5のような、野生型マウスのモ

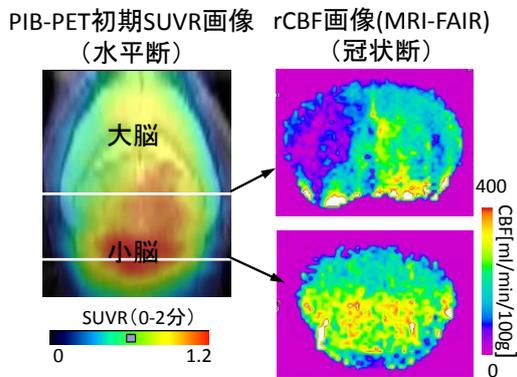


図5. APP-Tgマウスの片側脳低灌流モデル作製3日後の脳血流量の分布状態

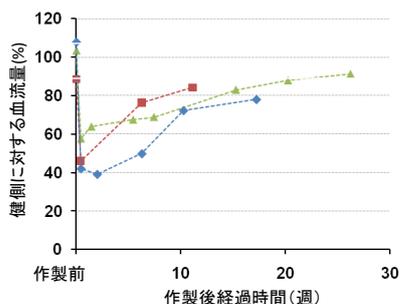


図6. APP-Tgマウスの片側脳低灌流モデル作製後の健側に対する結紮側大脳新皮質脳血流量の推移 (#1-#3は個体番号)

デルと同様結紮 (左) 側の大脳半球全体に低血流領域を呈していた。また、T2 強調画像、拡散強調画像により確認可能な脳梗塞などの脳病変は測定期間を通して見られなかった。

次に、モデル作製後の健側に対する結紮側大脳新皮質 rCBF の推移を個別に図6に示した。月齢とともに健側大脳新皮質の rCBF も低下するため若年野生型マウスと比較すると、高齢の APP-Tg マウスで左右差が小さくなる傾向があった。

③ PIB-PET による Aβ 蓄積病理進行の評価

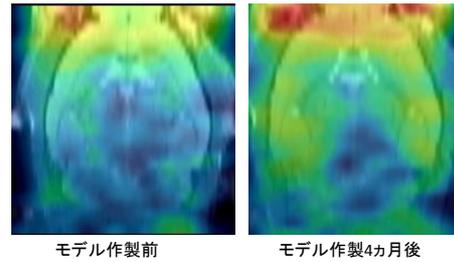


図7. APP-Tgマウスの片側脳低灌流モデル作製後のPIB-PET後期SUVR画像によるAβ蓄積病理の変化の例 (個体番号#1)

片側低灌流モデル作製から4ヵ月後の [¹¹C]PIB 集積は、モデル作製前に比べると両側でほぼ同程度に増加していた (図7)。また、モデル作製前から繰り返し PIB-PET を実施し、左右の大脳新皮質と海馬の DVR を SRTM で求めた。PIB-PET による Aβ 蓄積病理進行は、DVR の経時変化を直線回帰して求めた、DVR 増加率として評価した (図8)。左右の増加率は個体差が大きく、結紮側と具側の増加率には一定の傾向は見られなかった。

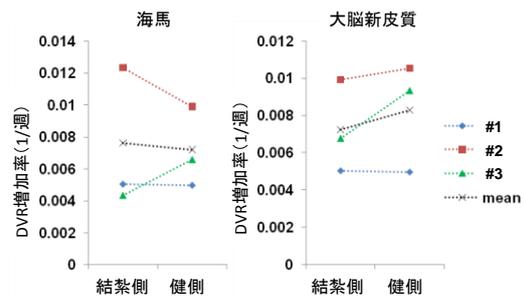


図8. APP-Tgマウス片側脳低灌流モデルの PIB-PETで測定されたAβ蓄積病理進行 (個別データ、黒：平均値)

(3) 摘出脳による Aβ 蓄積病理評価

最後に、イメージング評価を行った APP-Tg マウスの片側脳底還流モデルの脳切片の Aβ 蓄積病理を PIB-PET 後期画像と比較した典型例を図9に示した。結紮側 (左) と健側には、アミロイド沈着病理、切断・修飾された炎症との関連が示唆される Aβ 分子種 N3pE とともに健側 (右)、結紮側 (左) に明瞭な違いは無く、ARG による [¹¹C]PIB の結合分布にも左右差は無かった。PIB-PET 画像はこれらの病理解析結果と矛盾が無いことが分かった。

以上から、APP-Tg マウスでは、脳梗塞などの脳病態を呈しない程度の慢性的脳低灌流は A β 蓄積病理の進行を加速しないことが示唆された。

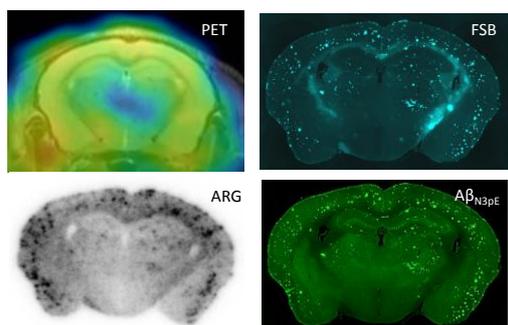


図9. APP-Tgマウス片側脳低灌流モデルのPIB-PET画像と同一個体の脳切片病理像

本研究では、局所的な脳血流低下の A β 蓄積進行に対する影響を、イメージング技術を用いた長期経過観察により明らかにすることを試みた。従来、モデルマウスを用いた病態研究は、一時点での摘出脳組織を用いた病理解析情報の集積が主流であったので、個々のモデル動物でモデル作製前から数ヶ月に渡る病態変化の追跡行った例は本研究が初めてである。

今回の結果からは、単なる脳血流低下は A β 蓄積進行に影響しないことが示唆されたが、APP-Tg マウスはアルツハイマー病の部分的モデル動物であり、またこの研究ではその A β 蓄積病理に焦点をあてたものである。一方、アルツハイマー病は認知機能低下、神経原線維変化等の病理も伴うことから他の病理への影響を検証することも、今後必要である。PET や MRI 等インビボイメージング技術と、摘出組織の詳細な病理解析の組み合わせは、各モデル動物の病態・生理状態の経過観察情報を得た上で、その結果呈する病理を詳細に解析できるため、疾病のメカニズムを研究する上で有用な研究手段として今後更に発展させたい。

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)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 関千江, 小野麻衣子, 季斌, 徳永正希, 丸山将浩, 須原哲也, 樋口真人, 伊藤浩「アルツハイマー病モデルマウス脳切片を用いた [11C]PIB の異なるアミロイド β 蓄積病理への結合評価」第 53 回日本核医学会学術総会, 2013 年 11 月 8-10 日、福岡国際会議場、福岡市
- ② Seki C, Higuchi M, Tokunaga M, Maruyama M, Ono M, Jin B, Maeda J, Nitta N, Aoki I, Suhara T, Ito H. Chronic cerebral hypoperfusion did not accelerate

[11C]PIB-reactive Abeta deposition in amyloid precursor protein transgenic mice. XXVIth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function. May 20-23, 2013, Shanghai, China.

- ③ 関千江, 徳永正希, 丸山将浩, 小野麻衣子, 季斌, 前田純, 須原哲也, 樋口真人, 伊藤浩。アミロイド前駆体蛋白遺伝子導入マウスでのアミロイド β 蓄積と [11C]PIB の動態パラメータの関係。第 52 回日本核医学会学術総会、2012 年 10 月 11-13 日、ロイトン札幌、札幌市。
- ④ Seki C, Tokunaga M, Hattori S, Murayama M, Ono M, Ji B, Maeda J, Suhara T, Higuchi M, Ito H. Relationship between kinetic parameters of [11C]PIB and amyloid β deposition studied in amyloid precursor protein transgenic mouse brains. Neuroreceptor Mapping Congress, August 9-11, 2012 Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, U. S. A.
- ⑤ Seki C, Higuchi M, Saito S, Tokunaga M, Maruyama M, Okauchi T, Aoki I, Ito H, and Suhara T. Evaluation of regional cerebral blood flow using [11C]PIB in unilateral cerebral hypoperfusion model mice. Annual Meeting of Society for Neuroscience 2011, Nov 12-16, 2011, Washington Convention Center, Washington, D. C., USA.
- ⑥ 関千江, 樋口真人, 齋藤茂芳, 徳永正希, 丸山将浩, 岡内隆, 青木伊知男, 伊藤浩, 須原哲也。「[11C]PIB による片側脳低灌流モデルマウスの局所脳血流量評価」第 51 回日本核医学会学術総会、2011 年 10 月 27-29 日、つくば国際会議場、つくば市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 千江 (SEKI, Chie)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員
研究者番号：4 0 4 4 3 0 8 0

(2) 連携研究者

樋口 真人 (HIGUCHI, Makoto)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・チームリーダー
研究者番号：1 0 3 7 3 3 5 9