

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770064

研究課題名(和文)アルツハイマー病初期に見られる嗅覚障害を引き起す脳内変化

研究課題名(英文)Olfactory dysfunction in early Alzheimer's disease

研究代表者

宮園 貞治 (MIYAZONO, Sadaharu)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：50618379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病は、記憶や学習障害が生じる神経変性疾患である。この疾患においては、記憶や学習の障害が目立たないごく初期から、嗅覚機能に障害が現れる。本研究では、この嗅覚障害を引き起される機序の解明を試みた。その結果、嗅覚一次中枢である嗅球における水溶性アミロイドのわずかな増加が長期に及ぶと、不溶性のアミロイドの蓄積が起こり、嗅球神経回路の異常、そして個体レベルで嗅覚機能障害を引き起されることが示唆された。また、現在アルツハイマー病の薬剤の1つとして知られているドネペジル(アセチルコリンエステラーゼ阻害剤)が嗅覚障害を回復・予防させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder associated with the progressive impairment of cognition. The olfactory dysfunction occurs early in AD. However, the mechanism behind the dysfunction remains largely unknown. In this study, we tried to understand how Amyloid-peptide (A β) induces the olfactory dysfunction, using transgenic mice deleting amyloid precursor protein binding protein, X11, that regulates amyloidogenesis. The young KO mice, that showed normal olfaction, have the higher level of soluble A β in the olfactory bulb (OB) than the wild-type mice. The KO mice accumulated the insoluble A β abundantly by aging. The A β aggregation might reduce an activity in the neural circuit of the OB and induce the olfactory dysfunction. Additionally, donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, prevented the A β aggregation in the OB, and improved the impaired olfactory function.

研究分野：感覚生理学

キーワード：嗅覚障害 神経回路 X11 アミロイド 嗅球 ドネペジル 経鼻投与 アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は、記憶や学習の障害が生じる神経変性疾患であり、現在、国内での患者数は260万人にもものぼり、65才以上の10人に1人は発症すると言われるほど高齢者にとって身近な病気である。この疾患の原因は、記憶や学習の中核である海馬に異常な蛋白質であるアミロイドβ (Aβ) が蓄積するためであると考えられているが、依然として不明な点が多い。この疾患では、記憶・学習障害が目立たないごく初期から嗅覚機能に障害が現れることが知られている。これを応用した嗅覚検査による早期診断の実用化が期待される。

嗅覚経路は、匂い分子が嗅上皮に存在する嗅細胞によって受容されることで始まる。その情報は嗅覚の一次中枢である嗅球を經由した後、嗅皮質内の梨状葉や扁桃体などの様々な脳部位に入力される。現在、アルツハイマー病モデルマウスは多数存在しているが、モデルマウスの嗅覚機能障害についての知見は意外にも少ない。近年ようやく、そのうち2種 (Tg2576マウスと3×Tg-ADマウス) のモデルマウスについて、嗅覚障害の発症時に、嗅球と梨状葉でAβの蓄積が見られることがそれぞれ報告された (Wesson et al., 2010; 2011; Cassano et al., 2011)。ただ、これらの報告から分かるように、モデルマウスの種類によって、Aβの蓄積部位が異なる。また、これらのモデルマウスは、脳内で多くのアミロイド斑ができるほどAβの蓄積が非常に強く引き起されるので、ヒトのアルツハイマー病の初期症状を必ずしも反映しているかは不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アルツハイマー病の最初期に見られる嗅覚障害の発生機序の解明である。実験には、Aβ産生の調節に関与しているタンパク質であるX11を欠損させた変異型マウスを用いた。このタンパク質は脳内に広く分布しており、その変異型マウスは、これまでに報告されているモデルマウスよりもAβ毒性が比較的弱いと考えられる。本研究では、この変異型マウスの嗅覚機能やそれに関わる脳部位が、加齢に伴ってどのように変化するかを検討した。具体的には、以下の(1)~(3)の変化について調べた。

- (1) マウス個体の匂いに対する認知・識別能。
- (2) 嗅覚機能に関わる脳部位におけるAβ量。
- (3) 嗅球内の匂いに対する神経回路の活性。

加えて、これらの変化に対する対処法を検討した。具体的には、以下について調べた。

- (4) 現在アルツハイマー病の薬剤の1つとして知られているドネペジル (アセチルコリンエステラーゼ阻害剤) の嗅覚障害に対する効果を調べた。

3. 研究の方法

(1) マウス個体の匂いに対する認知・識別能

①匂い認知能を調べるために、Y字迷路を用いてマウスが酪酸に対して示す忌避反応を評価した。

②匂い識別能を調べるために、匂いとしてカルボンの鏡像異性体およびオイゲノールを、また報酬として与える砂糖を用意した。そして、特定の匂いと報酬である砂糖の関連付け学習をマウスにさせた後、テストとしてマウスが匂いを識別して報酬を得ようとする行動 (具体的には穴掘り行動) を評価した。

(2) 嗅覚機能に関わる脳部位におけるAβ量

マウスから嗅覚一次中枢の嗅球および梨状葉に存在する水溶性および不溶性のAβ40とAβ42を定量するために、それぞれの脳部位を抽出してELISA解析を行った。

(3) 匂いに対する嗅球内の神経回路の活性

嗅球内の神経回路の活性を調べるために、酪酸の匂いに暴露したマウスの脳切片に対してFos免疫組織化学染色を行った。

(4) ドネペジルの嗅覚障害に対する効果

①ドネペジル (アセチルコリンエステラーゼ阻害剤) が嗅覚障害を改善させるかどうかを検討するために、既に嗅覚障害が起こった変異型マウスにドネペジルを経口および経鼻により投与し、匂いに対するそのマウスの認知能および嗅球神経回路活性を調べた。それぞれ、(1) ①および(3)の方法を用いた。

②ドネペジルが嗅覚障害の予防効果を持つかどうかを検討するために、嗅覚機能が低下する前から、マウスにドネペジルを飲水投与し、マウスの匂いに対する認知能、嗅球のAβ量および神経回路活性を調べた。それぞれ、(1) ①、(2)、(3)の方法を用いた。

4. 研究成果

(1) マウス個体の匂いに対する認知・識別能

①匂い認知能を調べるために、Y字迷路を用いた酪酸忌避実験を行った結果、X11欠損マウスは、6週齢では、野生型マウスと同程度の忌避反応を示した。ところが、加齢に伴って、欠損マウスの忌避反応は低下し、24週齢では半分程度になった。この結果により、欠損マウスでは、加齢に伴って、匂い認知能が低下することが示唆された。

②匂い識別能を調べるために、匂い学習・識別実験を行った結果、X11欠損マウスは24週齢では、(+)-カルボンとオイゲノールの識別能は維持されていたが、(+)-カルボンと(-)-カルボンの識別はほとんどできなかった。この結果は、匂い認知能が低下した欠損マウスでも、化学構造が大きく異なる匂い物質の識別は可能であるが、鏡像異性体のよう

な化学構造が非常に類似した匂い物質を厳密に識別することはできないことを意味する。これは、匂い識別の厳密性が低下することを示唆する。

(2) 嗅覚機能に関わる脳部位における A β 量

X11 欠損マウスにおいて、嗅覚機能に関連する脳部位である嗅球および梨状葉で A β の増加や蓄積が見られるかを調べた。その結果、梨状葉内の A β 量は野生型と変わらなかった。しかし、嗅球においては、6 週齢では水溶性の A β 40 と A β 42 が共に野生型マウスの 2~3 倍に増加していた。この時、不溶性 A β 量の増加はほとんど見られなかった。24 週齢になると、水溶性 A β の増加はわずかしき見られなくなっていたが、不溶性 A β は野生型の 1.3~1.7 倍も蓄積していた。この結果は、水溶性 A β の増加が野生型の 2~3 倍程度であっても、この状態が長く続くと、次第に不溶性 A β の蓄積が起こることを示唆する。

(3) 匂いに対する嗅球内の神経回路の活性

X11 欠損マウスでは、加齢に伴って嗅球内に不溶性 A β が蓄積することが分かった。次に、A β の蓄積が認められる 24 週齢の欠損マウスにおいて、嗅球内の匂いに対する神経回路の活性を調べるために、酪酸刺激に対する Fos 免疫組織化学染色を行った。その結果、Fos シグナルは、嗅球内のほぼすべての層において、欠損マウスでは野生型の半分以下に減少した (図 1)。この結果により、不溶性 A β が蓄積していると、嗅球への匂い情報の入力低下することが示唆される。その結果、提示した匂い物質の濃度が同じであっても、欠損マウスでは嗅球内の神経回路全体の活性が低下したと考えられる。

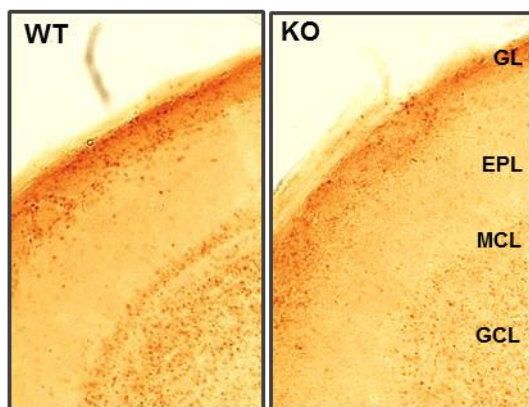


図 1. 酪酸刺激に対する嗅球の Fos 染色写真。X11 欠損マウス (KO) では全層においてシグナルが少なかった。

本研究の結果から、X11 欠損マウスにおいて、嗅覚の一次中枢である嗅球内で水溶性 A β がわずかに増加した状態が長期間続くと、不溶性 A β の蓄積が起こり、これが嗅球に入力する神経回路の機能を低下させた結果、個体レベルで嗅覚機能障害 (認知・識別能の低下) が生じることが示唆される。しかし、嗅球内において A β が神経回路の機能を低下させる機序はいまだ不明なままである。確かに、

24 週齢の X11 欠損マウスでは、不溶性 A β の蓄積と、神経回路の低下が同時に見られた。しかし、これらを直接リンクさせる結果は見出していない。今後の課題として、これを明らかにするために、「A β が嗅球内のどの部位に多く存在するか?」、そして「その部位に存在する神経細胞およびグリア細胞にどのような異常が生じているか?」を組織学的に詳細に解析する必要がある。その結果を元に、培養神経細胞または培養神経組織を用いて、A β を特定の場所に存在させた時に、細胞にどのような変化が起こるのかを *in vitro* で観察して、*in vivo* での変化との比較をする必要があると考える。

(4) ドネペジルの嗅覚障害に対する効果

①アルツハイマー病の薬剤の 1 つであるドネペジルが、X11 欠損マウスで生じた嗅覚障害を改善させるかを調べた。嗅覚障害を発症した 24 週齢の X11 欠損マウスに、通常の使用量のドネペジル (5 mg/kg) を経口投与しても、マウスの酪酸に対する忌避行動試験の成績は良くならなかった。ところが、ドネペジルを経鼻投与したところ、忌避行動試験の成績は正常値になった。また、この効果は 10 分の 1 の使用量 (0.5 mg/kg) でも見られた。この時の嗅覚一次中枢である嗅球内の神経回路活性を見たところ、回路全体の活性が低下していた。以上から、現在のところ嗅覚機能が回復した詳細な原因は不明であるが、ドネペジルが補完的に嗅覚機能を改善させること、薬物の経鼻投与の有用性が示唆された。②ドネペジルが、嗅覚障害の予防効果を持つかを調べた。嗅覚機能の低下が見られない 6 週齢の X11 欠損マウスに、通常の使用量のドネペジル (5 mg/kg) を飲水投与し続けると、24 週齢になっても忌避行動試験の成績は低下しなかった。この時、嗅球内では水溶性・不溶性 A β ともに異常な増加が見られなかった。以上のことから、ドネペジルが A β の異常な増加を抑制する作用をもつことが示唆された。

引用文献

- Cassano T, Romano A, Macheda T, Colangeli R, Cimmino CS, Petrella A, LaFerla FM, Cuomo V, Gaetani S (2011) Olfactory memory is impaired in a triple transgenic model of Alzheimer disease. *Behav Brain Res* 224:408-412.
- Wesson DW, Levy E, Nixon RA, Wilson DA (2010) Olfactory dysfunction correlates with β -amyloid plaque burden in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci* 30:505-514.
- Wesson DW, Borkowski AH, Landreth GE, Nixon RA, Levy E, Wilson DA (2011) Sensory network dysfunction, behavioral

impairments, and their reversibility in an Alzheimer's β -amyloidosis mouse model. *J Neurosci* 31:15962–15971.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Utsugi C, Miyazono S, Osada K, Sasajima H, Noguchi T, Matsuda M, Kashiwayanagi M: Hard-diet feeding recovers neurogenesis in the subventricular zone and olfactory functions of mice impaired by soft-diet feeding. *PLoS One* 9:e97309. 査読有. 2014.
2. Osada K*, Miyazono S*, Kashiwayanagi M: Pyrazine analogs are active components of wolf urine that induce avoidance and fear-related behaviors in deer. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8:276. 査読有. 2014. (*:equal contribution)
3. Utsugi C, Miyazono S, Osada K, Matsuda M, Kashiwayanagi M: Impaired mastication reduced newly generated neurons at the accessory olfactory bulb and pheromonal responses in mice. *Archives of Oral Biology* 59:1272–1278. 査読有. 2014.
4. Noguchi T, Sasajima H, Miyazono S, Kashiwayanagi M: Similar rate of information transfer on stimulus intensity in accessory and main olfactory bulb output neurons. *Neuroscience Letters* 576:56–61. 査読有. 2014.
5. 宮園貞治: 薬物の鼻腔内投与による脳内神経機能の制御. *旭川医科大学研究フォーラム* 13:54–56. 査読無. 2013.

[学会発表] (計 11 件)

1. 笹島仁, 宮園貞治, 野口智弘, 柏柳誠: マウス鼻腔内へのロテノン投与による嗅球内ドパミン神経および黒質緻密部ドパミン神経への影響. *日本味と匂学会第 48 回大会*. 静岡県・静岡市. 2014 年 10 月 2–4 日.
2. 宮園貞治, 長田和実, 柏柳誠: オオカミ尿中のピラジン化合物により引き起こされるエゾシカの忌避および警戒行動. *日本味と匂学会第 48 回大会*. 静岡県・静岡市. 2014 年 10 月 2–4 日.
3. 宮園貞治, 長田和実, 柏柳誠: オオカミ尿中の恐怖誘発物質ピラジン化合物のエゾシカに対する効果. *第 6 回北海道味覚嗅覚研究会*. 北海道・室蘭市. 2014 年 3 月 23 日.
4. 柏柳誠, 宮園貞治, 長田和実: オオカミ尿由来のピラジン誘導体が誘起するマウスおよびラットにおける忌避および恐怖行動とその脳内経路. *第 6 回北海道味覚嗅覚研究会*. 北海道・室蘭市. 2014 年 3 月 23 日.
5. Sasajima H, Miyazono S, Noguchi T, Kashiwayanagi M: Intranasally administered rotenone impairs olfactory functions and

dopaminergic neurons in the OB. *FENS Featured Regional Meeting*. Prague, Czech. 2013 年 9 月 11–14 日.

6. 宮園貞治, 笹島仁, 野口智弘, 鈴木利治, 柏柳誠: アミロイド β によるマウス嗅球における神経活動の低下. *日本味と匂学会第 47 回大会*. 宮城県・仙台市. 2013 年 9 月 5–7 日.
7. 笹島仁, 宮園貞治, 野口智弘, 柏柳誠: ミトコンドリア阻害剤ロテノンの嗅覚輸送による中枢嗅覚障害モデル. *第 93 回日本生理学会北海道地方会*. 北海道・旭川市. 2013 年 8 月 31 日.
8. 宮園貞治, 笹島仁, 野口智弘, Daniel Sallai, 鈴木利治, 柏柳誠: アダプター蛋白質 X11 の欠損がもたらす嗅覚機能への影響の性差による違い. *第 5 回北海道味覚嗅覚研究会*. 北海道・網走市. 2013 年 3 月 9 日.
9. Sasajima H, Miyazono S, Noguchi T, Kashiwayanagi M: Intranasal administration of rotenone to mice induces dysosmia through the lesion of A16 dopaminergic cells. *The 10th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2012)*. Fukuoka, Japan. 2012 年 11 月 3–4 日.
10. 笹島仁, 宮園貞治, 野口智弘, 柏柳誠: マウス鼻腔内ロテノン投与による嗅覚障害. *日本味と匂学会第 46 回大会*. 大阪府・吹田市. 2012 年 10 月 3–5 日.
11. 堀内至, 宮園貞治, 笹島仁, 野口智弘, 柏柳誠: 経鼻投与を用いた嗅覚機能における GABA の役割の検討. *第 26 回年北海道薬物作用談話会*. 北海道・札幌市. 2012 年 7 月 28 日.

[その他]

ホームページ:

<http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/physi2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮園 貞治 (MIYAZONO, Sadaharu)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号: 50618379