

令和元年6月13日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12944

研究課題名(和文) アミロイドオリゴマーによる認知機能障害に対する習慣的な運動の効果の解析

研究課題名(英文) Behavioral and electrophysiological analyses of new Alzheimer's disease model mouse that express amyloid beta oligomer intraneuronally

研究代表者

落石 知世(OCHIISHI, TOMOYO)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：30356729

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)：アルツハイマー病(AD)などにより低下した認知機能が運動によって改善されることが報告されている。本研究では、ADにおいてシナプス機能や認知機能により強い毒性を持つ低分子量のアミロイドタンパク質(A $\beta$ )オリゴマーを神経細胞内のみ発現するトランスジェニックマウスを用いて解析を行った。このモデルマウスは、軽度認知障害(MCI)の病態を表す可能性が高く、認知症発症初期の習慣的な運動の効果の解析に有効である。回転かごによる自発的な運動負荷を行い、認知機能の変化を解析した結果、オリゴマーによって低下した認知機能が運動によって改善される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

高齢化社会とあいまって、認知症の半数以上を占めるADの原因解明、治療法の確立は社会的要請となっている。MCIの患者における習慣的な運動の効果のメカニズムの解明は、認知症の予防や運動が効果を示す病理学的な時期の予想、また、非薬物的介入のみでなく運動による効果を高める物質等、薬物的治療法の開発など全く新しい治療法の開発に大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Soluble amyloid  $\beta$  protein (A $\beta$ ) oligomers in neurons are neurotoxic and play crucial roles in synaptic transmission and cognitive function in Alzheimer's disease (AD) patients. In this study, using GFP-fused human A $\beta$ , which only forms low molecular weight oligomers, we developed a new mouse model that expresses A $\beta$  oligomers throughout their life. They exhibit memory and long-term potentiation impairments already in young age. However, these mice showed improvement in cognitive function due to the spontaneous load of running wheel for about 2 months. Thus, the A $\beta$ -GFP Tg mouse is a unique tool specialized to investigate the toxicity of A $\beta$  oligomers inside neurons and the effect of exercise against the impairment of cognitive function induced by A $\beta$  oligomer.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド タンパク質 シナプス オリゴマー トランスジェニックマウス 運動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトは加齢とともに記憶力や学習効率が低下するが、運動によって高齢者の認知機能が改善されることはよく知られている。アルツハイマー病(AD)患者でもこれは例外ではないことから、薬によるAD治療法が未だに確立しない中、習慣的な運動は新たな治療的介入の一環として注目を集めている。ADの発症原因として、神経細胞から細胞外に分泌されたA $\beta$ が異常凝集し老人斑を形成することに起因するとするアミロイド仮説が提唱されてきた。しかし最近、遺伝子改変動物で細胞外A $\beta$ の沈着以前に神経症状を呈する事例が報告され、またヒトでも、細胞内にA $\beta$ 数分子が重合したA $\beta$ オリゴマーが蓄積するが、老人斑の形成は認められないAD患者(大阪変異)が発見されたことから、細胞外でのA $\beta$ の沈着より細胞内のA $\beta$ オリゴマーがより強い毒性を示すことが示唆されている。大阪変異のモデルマウスでは、A $\beta$ オリゴマーが細胞内に蓄積するにつれてシナプス機能や空間認知機能が低下するため、従来考えられていたオリゴマーの細胞外からのシナプス攻撃だけではなく、細胞内からの作用も重要である可能性が出て来た。一方、個体に対する運動は海馬歯状回の神経新生を促進し、これが認知機能の改善に繋がるといわれている。A $\beta$ オリゴマーは神経新生に対し促進作用を示すという報告と、逆に抑制作用を示すとする報告があり、この作用の違いはA $\beta$ の重合状態に依存する可能性が高いと考えられる。我々が開発した新規モデルマウスは、細胞内だけにA $\beta$ オリゴマーが発現し、シナプス機能を低下させ認知機能障害を呈する。このようなA $\beta$ 動態を示すモデル動物に対する習慣的な運動の効果は全くわかっていない。

### 2. 研究の目的

ADは老人斑の形成や神経細胞の脱落に先行して記憶障害が生じることから、AD発症の極初期に起こるシナプスの微細な変化を捉えることは、疾患の真の発症機序の解明に繋がる。ADにおいてシナプス機能の低下はアミロイドタンパク質(A $\beta$ )のオリゴマーによって引き起こされることが示唆されている。また、低下した認知機能は習慣的な運動等のリハビリテーションにより改善することが知られている。本研究は、細胞内に蓄積するA $\beta$ オリゴマーの動態と機能解析に最適なADモデルマウスを用いて、A $\beta$ オリゴマーの動態を生きたシナプスで観察し、シナプス内部でのA $\beta$ の重合と毒性の関連を解明するとともに、習慣的な運動による認知機能の改善にA $\beta$ オリゴマーがどのように影響するのかを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) A $\beta$ -GFP トランスジェニックマウス(A $\beta$ -GFP Tg)の開発

本研究で使用するADモデルマウスはchicken  $\beta$ -actin プロモーターを持つpEGFP-N1ベクターにヒトA $\beta$ <sub>1-42</sub>とGFPを導入したpAct-A $\beta$ <sub>1-42</sub>-GFPプラスミドを用いて作成した(Ochiishiet al., 2016)。A $\beta$ -GFP融合タンパク質はこれまでの解析により *in vivo*・*in vitro* 両方で数量体からなるA $\beta$ オリゴマーのみを形成し、また、細胞外に分泌するためのシグナル配列を持っていないことから、A $\beta$ -GFP Tgは生涯を通して、神経細胞内だけにA $\beta$ オリゴマーを発現する。

#### (2) 生化学的解析

A $\beta$ -GFP Tgの海馬よりシナプトソーム分画を作製し、シナプス前部および後部に発現する主要な蛋白質の発現量をウエスタンブロット法で検討した。

#### (3) 電気生理学的解析

細胞内のA $\beta$ オリゴマーがシナプス伝達機能にどのような影響を与えるかを検討するため、A $\beta$ -GFPマウスの海馬スライスを用いて、長期増強の解析を行った。

#### (4) 行動解析

A<sup>-</sup>GFP マウスは若い月齢で認知機能が低下することから生後約3ヶ月齢のマウスを用い、回転かごによる自発的な運動を約2ヶ月間負荷し、新奇物体認識テストを行い認知機能の変化を調べた。野生型にも同様の実験を行い、その結果から細胞内のA<sup>-</sup>オリゴマーによる認知機能障害に対する運動の影響を検討した。

#### 4. 研究成果

本研究で使用した新規ADモデルマウスはA $\beta$ -GFP融合タンパク質を発現している(A<sup>-</sup>GFPマウス)。この融合タンパク質は生きた細胞内で主に2-7分子が重合したオリゴマーのみを発現する。このマウスの脳のシナプトソーム分画をウエスタンプロットにより解析した結果、NMDA受容体やシナプスの接着因子関連のタンパク質が同腹のnon-Tgマウスと比較して有意に減少していることが明らかとなった。また電気生理学的解析では長期増強が顕著に減衰していた。更に、A<sup>-</sup>GFPマウスの新奇物体認識テストでは、同腹のnon-Tgに比べてA<sup>-</sup>GFPマウスの認知機能が若い個体で既に顕著に低下していた。そこで、回転かごによる自発的な運動を約2ヶ月間行い、新奇物体認識テストを行ったところ、運動を行ったA<sup>-</sup>GFPマウスは行わなかった群と比較して認知機能が有意に改善された。この結果をもとに、運動を負荷したA<sup>-</sup>GFPマウスの海馬についてDNAアレイを行い、運動負荷を行っていない群やnon-TgのDNAアレイの結果と比較検討を行い、A<sup>-</sup>オリゴマーによって引き起こされた認知機能障害に対して運動によってどのような遺伝子が活性化され、どのようなメカニズムで認知機能改善に効果を表すのかを解析している。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 8件)

Tomoyo Ochiishi, Development of new Alzheimer's disease model mouse that specialized for the analysis of amyloid oligomer. INDIA-JAPAN SYMPOSIUM "Recent Advances in Biomedical Research" DAICENTER PIKNIK SERIES XXXV March 28, 2019 (Guwahati, India) 招待講演

Tomoyo Ochiishi, Masami Kaku, Kazuyuki Kiyosue, Motomichi Doi, Tatsuhiko Ebihara, Behavioral and electrophysiological analyses of new Alzheimer's model mouse that express amyloid oligomer intraneuronally. Neuroscience 2018, November 4, 2018, (San Diego, USA)

Tomoyo Ochiishi, Development of new animal model of Alzheimer's disease. 1<sup>st</sup> RCB Bioimaging mini symposium. March 24, 2018 (Faridabad, India) 招待講演

Tomoyo Ochiishi, Development of new animal model of Alzheimer's disease that express amyloid protein. TISTR-AIST Mini Joint Synposium February 19, 2018 (Bangkok, Thailand) 招待講演

Tomoyo Ochiishi, Kazuyuki Kiyosue, Motomichi Doi, Tatsuhiko Ebihara, Masami Kaku, Behavioral and electrophysiological analysis of the Alzheimer's model mouse the express amyloid oligomer. 生命科学系学会合同年次大会 December 6, 2017 (神戸)

Tomoyo Ochiishi, Development of the new animal model of Alzheimer's disease that express the amyloid oligomer. 2<sup>nd</sup> International conference on Nutraceuticals and

Chronic Disease, September 2, 2017 (Goa, India)招待講演

落石知世、角正美、清末和之、志村秀樹、ト部貴夫、服部信孝、戸井基道、海老原達彦、  
アミロイドオリゴマーを発現する新規アルツハイマーモデルマウスの解析 第35回日  
本認知症学会学術集会 2016/12/2 (東京)

Tomoyo Ochiishi, Kazuyuki Kiyosue, Masami Kaku, Motomichi Doi, Tatsuhiko Ebihara,  
Behavioral and electrophysiological analysis of the Alzheimer's disease model mouse  
that express amyloid oligomer intraneuronally.第39回日本神経科学学会 July 21,  
2016 (横浜)

〔図書〕(計1件)

落石知世・戸井基道、株式会社エヌ・ティー・エス、「アルツハイマー病 発症メカニズム  
と新規診断法・創薬・治療開発」(2018)、460ページ(pp.214-223)

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称：神経変性疾患関連タンパク質を神経細胞内で可視化したモデル動物

発明者：落石知世、戸井基道、海老原達彦

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：6407507

取得年：2018

国内外の別：国内

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：角 正美

ローマ字氏名：Kaku Masami

職名：植草学園大学・保険医療学部・講師

研究者番号(8桁)：30646261

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：海老原 達彦

ローマ字氏名：Ebihara Tatsuhiko

研究協力者氏名：清末 和之

ローマ字氏名：Kiyosue Kazuyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。