

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01973

研究課題名(和文)アルツハイマー病モデル動物における発症早期の脳波異常解析

研究課題名(英文) Analysis of hippocampal theta oscillation in the early stage of learning deficits in 3xTg AD mice

研究代表者

川原 茂敬 (Kawahara, Shigenori)

富山大学・学術研究部工学系・教授

研究者番号：10204752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病モデル動物である3xTg-ADマウスにおいて、新たな学習課題である回転ホイール自由走行課題を用いて調べたところ、4ヶ月齢において顕著な学習障害が認められた。この学習障害は2ヶ月齢において既に有意であり、これまで報告されてきた学習障害の中では、最も早期の学習障害であると考えられた。そこで、この学習が障害を受け始める2および4ヶ月齢の海馬局所場電位を解析したところ、ウレタン麻酔後の海馬シータ波が対照群のマウスに比べて有意に増強していることを見出した。この早期の脳波異常が3xTgADマウスの学習障害の原因となっている可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病は進行性の神経変性疾患であるため、多数の神経細胞死が起きた後では効果的な治療をするのは困難になる。したがって、なるべく早期に異常を検出して治療を開始することが望ましい。本研究では、アルツハイマー病モデル動物を用いて、2ヶ月齢という早期において学習障害を検出する新たな学習課題を発見し、その障害の原因となる可能性がある海馬の脳波異常の特定に成功した。今後、この脳波異常の原因とメカニズムを明らかにすることができれば、ヒトにおけるアルツハイマー病の早期発見と早期治療開始に役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the learning ability of one of the Alzheimer's disease (AD) model mice, 3xTg AD mice, using a voluntary wheel running task. We found a prominent learning deficits in 2-month old 3xTg mice as well as in 4-month old 3xTg mice, compared to the control 129/Sv mice, suggesting that this task can be used for detecting an early onset of AD. We then examined the hippocampal local field potential and found that, both in 2- and 4-month old 3xTg mice, the hippocampal theta oscillation was abnormally enhanced after the urethane anesthesia. It is suggested that this abnormal hippocampal theta activity, detected already in 2 month old, might be related to the early deficits in learning task.

研究分野：行動神経科学

キーワード：アルツハイマー病 モデル動物 早期学習障害 自発走行学習 海馬シータ波

1. 研究開始当初の背景

海馬で観測される同期的リズム活動であるシータ波は、学習・記憶能力と高い相関がある。本研究では、アルツハイマー病発症の早期検出を目的として、病態モデルマウスの1つである3xTgAD mice における学習中および自発行動中の海馬シータ波を解析し、発症前から発症初期にかけて検出されるシータ波の異常と学習・記憶障害との相関を明らかにする。3xTgAD mice は6ヶ月齢から神経細胞外にアミロイド(A β)が蓄積してアミロイド斑を形成し、10-12ヶ月齢には神経細胞死と共に重篤な学習・記憶障害を示す。A β の細胞外蓄積が始まる6ヶ月齢前後における海馬依存的学習障害の進行状況と海馬シータ波の異常の関係を明らかにすることができれば、アルツハイマー病の早期検出・早期治療に役立つことが期待できる。

(1) アルツハイマー病の早期検出と病態モデルマウス

アルツハイマー病は進行性の神経変性疾患であるため、多数の神経細胞死が起きた後では効果的な治療をするのは困難になる。したがって、なるべく早期に異常を検出して治療を開始することが望ましい。これまで様々なアルツハイマー病モデルマウスを用いて、神経細胞死の主な原因の1つと考えられているアミロイド斑の形成と神経細胞死や学習・記憶障害との相関が報告され、治療方法の検討がなされてきた [1]。一方、早期発見の観点からアミロイド斑の形成に先立って生じる細胞内A β の増加と脳機能障害との関係が注目されている [2]。中でも3xTgAD mice は3種類の導入変異(APPSwe, PS1M146V, tauP301L)を持ち、6ヶ月齢において細胞外A β の蓄積が始まり、海馬依存的な学習である water maze learning の障害を示す [3]。また、すでに3-4ヶ月齢において細胞内A β の増加が認められるとともに、海馬のシナプス可塑性に障害があることから [4]、3xTgAD mice は早期の異常を研究するのに有望なモデルマウスであると考えられる。

(2) アルツハイマー病モデルマウスにおける海馬シータ波解析の現状

海馬で観測される同期的リズム活動であるシータ波は、学習・記憶と深い関係があることが報告されている。シータ波の異常を同定し、学習・記憶障害に関連づけることができれば、発症の早期検出法として利用することが可能となる。これまでアルツハイマー病モデルマウスの学習障害と神経回路レベルの機能障害とを関連付けるために、様々なモデルマウスにおいて海馬シータ波の測定が行われてきた (なお、3xTgAD mice での報告はまだない)。しかしながら、モデルマウスの種類によって海馬シータ波が減少すると言う報告がある一方で増強されていると言う報告もあり、総合的な結果は得られていない [5]。原因の1つとして、海馬シータ波の中でも学習・記憶と深い関わりを持つことが報告されている atropine 感受性の type 2 シータ波と、運動関連性が強い type 1 シータ波とを区別した研究がほとんどないことが挙げられる。種類によっては運動亢進を示すモデルマウスがいるため、type 1 と type 2 を区別して評価することはとても重要である。

(3) 瞬目反射条件付けと海馬シータ波

本研究で用いる瞬目反射条件付けは、音(CS)とまぶたへの刺激(US)の組み合わせにより、音を聞くだけでまぶたを閉じるようになる連合学習である。この単純な学習には小脳および脳幹が重要な役割を果たし、さらに、CSとUSの時間関係を変えるだけで海馬に対する依存性が増大する [6]。本申請者もラットやマウスを用いて瞬目反射条件付けの海馬依存性を調べてきた [7-9]。この学習は歩行運動を伴わないので type 1 シータ波の混入が少なく、type 2 シータ波と学習との関係を調べるのに適している。これまで、瞬目反射条件付けの複数の学習課題を用いて、海馬シータ波と学習・記憶の関係が調べられてきた。例えば、遅延課題および痕跡課題においては、海馬シータ波が良く出ている個体は学習速度が速いことがウサギで報告されている [10]。申請者もラットを用いて、文脈依存的弁別課題において学習中の海馬シータ波を解析し、海馬シータ波の相対強度と弁別応答との間に相関があることを見出した [8]。さらに、マウスへの薬物投与により type 2 シータ波に重要な役割を果たすムスカリン性アセチルコリン (mACh) 受容体を阻害すると、側頭葉が損傷している健忘患者の弁別課題学習障害と同様の障害が生じることを見出した [9]。これらの結果は、瞬目反射条件付けが海馬シータ波の異常と関連脳領域の学習・記憶障害との相関を調べるのに適していることを示している。

[1] Webster SJ et al. (2014) Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Frontier in Genetics*, vol. 5, article 88.

[2] Gimenez-Llort et al., (2007) Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: A role for intraneuronal amyloid. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31: 125-147.

[3] Billings LM et al. (2007) Learning decreases A β *56 and Tau pathology and ameliorates behavioral decline in 3xTg-AD mice. *J. Neurosci.*, 27:751-761.

[4] Oddo S et al. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39: 409-421

[5] Peña-Ortega F (2013) Amyloid beta-protein and neural network dysfunction. *J. Neurodegenerat. Dis.*, 2013, article ID 657470, 8 pages.

- [6] Christian and Thompson (2003) Neural substrates of eyeblink conditioning: Acquisition and retention. *Learn. Mem.*, 11: 427–455.
- [7] Takehara-Nishiuchi K, et al. (2006) Systems consolidation requires post-learning activation of NMDA receptors in the medial prefrontal cortex in trace eyeblink conditioning. *J Neurosci*, 26:5049-5058.
- [8] Tokuda K et al. (2014) Hippocampal state-dependent behavioral reflex to an identical sensory input in rats. *Plos One*, 9(11):e112927.
- [9] Rahman MA et al. (2016) Role of muscarinic acetylcholine receptors in serial feature-positive discrimination task during eyeblink conditioning in mice. *Plos One*, 11(1): e0147572.
- [10] Nokia MS and Wikgren J (2014) Effects of hippocampal state-contingent trial presentation on hippocampus-dependent nonspatial classical conditioning and extinction *J. Neurosci*. 34: 6003– 6010.

2. 研究の目的

本研究では、アルツハイマー病発症の早期検出を目的として、若齢 3xTgAD マウスにおいて生じる脳高次機能障害を検出可能な新たな学習課題の探索と、発症前から発症初期にかけて生じていると予想される海馬シータ波異常の発見と解析を目的とした。

(1) 3xTg AD mice の初期発症を検出可能な学習課題の探索

まずは、研究者が精通している瞬目反射条件付けを用いて、海馬や前頭前野などの上位中枢依存性の程度が異なる 3 種類の学習課題（遅延課題、痕跡課題、文脈依存性弁別課題）の中から、最も適した学習課題を選別することを目標とした。しかしながら、比較対象となるコントロールマウス、ミュータンマウス（3xTg AD mice）ともに上位中枢依存性が低い（小脳依存性が高い）遅延課題自体の学習自体が悪かったため、他の学習課題を検討した。その結果、新たに「回転ホイール自由走行課題」の有用性を見出すに至った。本報告では、この「回転ホイール自由走行課題」における障害について説明する。

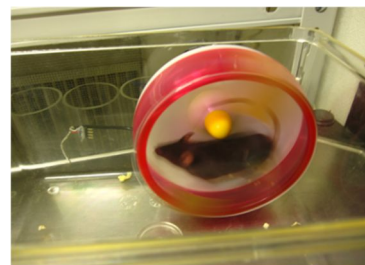
(2) 上記学習障害と対応する発症初期の脳波異常の探索

「回転ホイール自由走行課題」で学習障害が認められた若齢マウスにおいて、海馬内に埋め込んだ電極を用いて通常の局所場電位を測定するだけでなく、さらに一歩踏み込んで薬理的に海馬シータ波を type 1 と type 2 に分けて評価し、脳波異常の詳細を明らかにすることを目標とした。

3. 研究方法

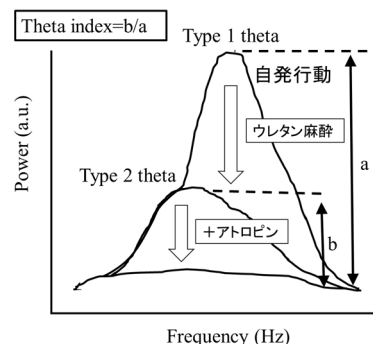
(1) 回転ホイール自由走行課題

平成 29 年度において、対照群の B6/129SV マウス、3xTgAD マウスの両方が瞬目反射条件付けにおいて学習を示さなかったことから、平成 30 年度に別の学習課題を検討することとした。これまで AD マウスで報告されている学習課題と同じ課題を用いた場合、これまでよりも早期に障害を発見することは難しいと思われたので、今までに報告のない回転ホイール自由走行課題を用いて検討した。この課題では、各マウスが毎日、走行用ホイール（回し車）の中に 5 分間入れられて、自由に走行する課題である。通常、マウスは日とともに、5 分間の走行距離および走行速度が徐々に増加し、数日で定常に達する（学習）。



(2) 海馬シータ波の type 別障害の解析

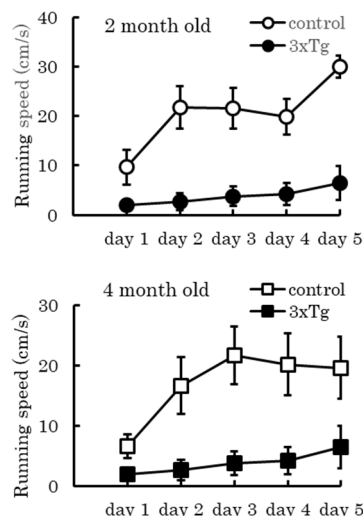
これまでアルツハイマー病モデルマウスにおいて学習障害と関連づけることを目的として海馬シータ波の測定が行われてきたが、統合的な結果は得られていない [5]。この原因の一つとして、運動関連性の type 1 シータ波と学習関連性の type 2 シータ波とを区別せずに解析・評価していることが挙げられる。そこで本実験では、発症前後の月齢の 3xTgAD mice の海馬シータ波を薬理的に type 1 と type 2 に分離して解析する。具体的には、海馬に慢性記録電極を設置し、比較的自由に行動しているマウスの海馬シータ波（主に type 1）を記録し、その後、ウレタン麻酔をして type 1 シータ波を抑制して type 2 シータ波を記録し、さらに mACh 受容体阻害薬であるアトロピンもしくはスコポラミンを投与して type 2 シータ波を抑制する（右図参照）。これらの記録から、同一マウスにおける type 1 シータ波と type 2 シータ波の相対的割合を定量的に評価することが可能になる。



4. 研究成果

(1) 回転ホイール自由走行課題

本課題を用いて、まずは、4ヶ月齢のコントロールマウスおよび3xTgADマウスの学習を調べたところ、3xTgADマウスにおいて顕著に障害されていることが明らかとなった。この障害は2ヶ月齢において既に有意であり、これまで当該マウスにおいて報告されている学習障害の中では、最も早期の学習障害であると考えられる。本学習課題は、ロータロッド課題の場合とは異なり、走行はマウスの自発性に委ねられているので、小脳などの下位中枢に障害がある場合のみならず、自発性に関わる上位中枢に障害がある場合も検出できると期待できる。3xTgAD miceはロータロッド課題では顕著な障害はないと報告されており、また、本課題でも十分学習させた後ではコントロールマウスにほぼ追いつくことから、今回2ヶ月齢で見つかった顕著な障害は運動学習そのものが障害されているというよりは自発性に関わる領域にその原因がある可能性がある。

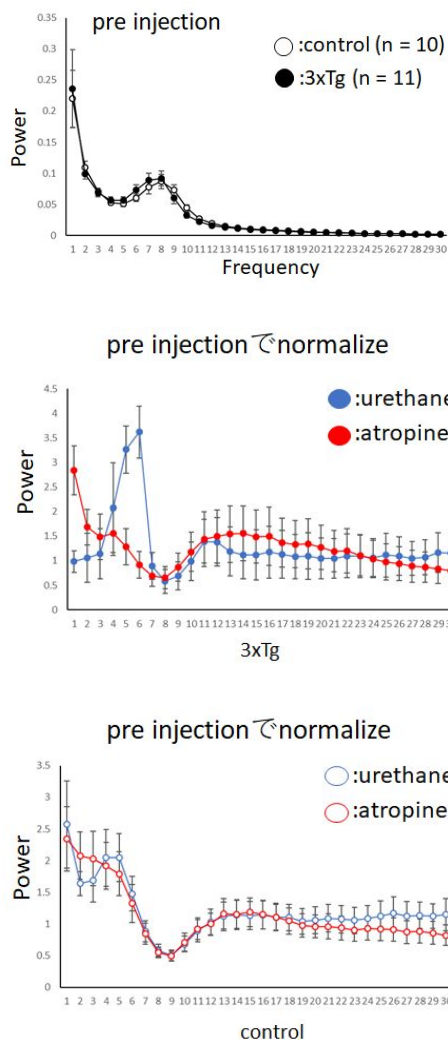


(2) 海馬シータ波の type 別障害の解析

2および4ヶ月齢の3xTg-AD miceの自由行動下における海馬局所場電位をFFT解析したところ、いずれの月齢においてもコントロールマウスとの間に顕著なパワースペクトルの差は認められなかった(右図 pre injection、2ヶ月齢)。

そこで、type 1 シータ波と type 2 シータ波を薬理学的に分離して解析することを試みた。自由行動下での測定後、マウスにウレタンを投与し type 1 を抑制した状態で海馬局所場電位を測定・解析したところ、予想に反して、3xTg マウスにおいてシータ波パワーの顕著な増加が観測された。この増加はコントロールマウスでは認められなかった。この3xTg マウスにおいて増加したシータ波は、その後のアトロピン投与により抑制されてコントロールマウスと同様のパワースペクトルとなったことから、type 2 シータ波であることが明らかとなった。つまり、3xTg マウスにおいては潜在的に type 2 シータ波が増強されているが、自由行動下ではそれが強く抑制されているために、コントロールマウスとは見た目に同様なパワースペクトラムとなっていたことが示唆される。ウレタンにより type 1 シータ波が抑制されるとともに、自由行動下では抑制されていた type 2 シータ波の抑制が外れて大きく観測されたと考えることができる。この海馬シータ波の内在的異常(外見的には正常)は脳内の海馬シータ波生成・制御メカニズムの異常を示唆しているが、その詳細については今後明らかにして行く必要がある。

本研究により、アルツハイマー病において、通常の記憶障害が顕著になる以前に自発性に関わるような神経症状や海馬シータ波の生成・制御メカニズムに異常が現れる可能性が明らかとなった。これらの知見はヒトにおける早期検出方法開発の手がかりとなることが期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 臼井弘児、小野宗範、加藤伸郎、川原茂敬
2. 発表標題 若齢アルツハイマー病モデルマウス(3xTg AD)における自発走行障害
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2019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
研究分担者	加藤 伸郎 (Kato Nobuo) (10152729)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	