

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592114

研究課題名(和文)アルツハイマー病モデルにおける前頭葉基底核慢性刺激による学習記憶能力改善の試み

研究課題名(英文)Development of the animal model of Alzheimer disease and chronic stimulation of frontal basal nucleus to improve the cognitive function

研究代表者

辛 正廣 (SHIN, Masahiro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70302726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：高齢ラットを用い、アミロイド $A\beta_{42}$ oligomerを大脳皮質とマイネルト基底核内に注入し、Control群(手術無注入無)、Sham群(手術有注入無)、A群(手術有注入有)に分けて、手術前・後に継続してWater Mazeを行い、学習記憶機能の評価を行った。また夫々群の脳の免疫染色を行い、コリン作動性神経細胞の脱落について検討した。

結果、アミロイド $A\beta_{42}$ oligomerの注入を行った群では、注入を行わない群に比べ、有意に学習機能の低下がみられた。しかし、組織学的にもマイネルト基底核内でのコリン作動性ニューロンの脱落について、注入群で脱落傾向を認められたものの有意差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Amyloid $A\beta_{42}$ oligomer was stereotactically injected into cerebral cortex and basal nucleus of Meynert (BNM) in the elderly rats. Subjects were divided into 3 groups, the Control group (surgery-, injection-), the Sham group (surgery+, injection-), and A group (surgery+, injection-), and their cognitive functions were evaluated before and after surgery with Morris' s Water Maze. The brains in each group were extracted and degeneration of the cholinergic neurons were evaluated with immunostaining method.

As results, in the rats in the injection + groups, cognitive function was significantly more deteriorated than those in the injection -group. However, histological investigation of the cholinergic neurons in BNM revealed that the neuronal degeneration of the cholinergic neurons tended to be more severe in BNM of the rats in the injection + group than observed in the nucleus of the rats in the injection -group, which was not statistically significant.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳・神経 脳神経疾患 神経科学 痴呆 臨床

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病に代表される認知障害は、日本国内でも60万人以上が罹患し、社会的にも大きな問題となっている。これらの疾患については、進行が比較的緩徐なものが多くにもかかわらず、症状を改善させる治療法が発見されていない。一方、アルツハイマー病と並ぶ変性疾患のひとつであるパーキンソン病については、ペースメーカー型の脳深部電気刺激装置による neuromodulation 技術の進歩により、運動症状の改善が認められるようになっており、これは大脳基底核内に刺激電極の先端を正確に挿入し、一定の周波数で刺激することで、神経伝達物質の欠乏により異常活動を示す神経核やその周辺の神経線維の働きを正常に近い状態へと修飾し、歩行障害や不随意運動などの症状を改善させるものである。一般にパーキンソン病などの疾患では、過活動を示している視床、淡蒼球、視床下核を150Hz前後の高周波数で刺激することにより、これらの神経核の活動を適度に抑制することで治療効果が得られると考えられており、現在、うつ病や強迫観念神経症などの精神疾患にも多く応用され始めている。又、最近では同治療システムを用いたコリン作動性神経の賦活化の試みも実際に行なわれている。これは中脳の脚橋被蓋核など活動が低下しているコリン作動性神経核を20Hz前後の低周波数で刺激を行うもので、神経核の活動を促進又は神経細胞を保護する効果が得られることが知られており、多くの患者が恩恵に服している。

高齢者の認知機能障害における大脳基底核のアセチルコリン系神経の働きの低下が注目されるようになり、中でも細胞が密集し、神経線維の上行性投射を持つマイネルト基底核の機能が重要視されている。認知症を伴うパーキンソン症候群の患者でマイネルト基底核の低周波数刺激が認知機能改善に有効であったとする症例報告は存在するが、アルツハイマー病に対する有効性については、基礎データがなく、適応が躊躇されている。過去のラットを用いた実験では、前頭葉基底核を低周波数で電気刺激することで、神経成長因子の分泌が促進されたとした報告や、記憶行動の誘発が見られたとした報告を認めている。しかしながら、ラットなどの小型齧歯動物で、前頭葉基底核の慢性刺激を行なうことが困難であるため、こうした認知機能障害に対する脳深部刺激療法の臨床応用について行き詰まりが

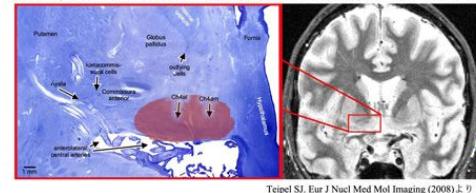
あった。

2. 研究の目的

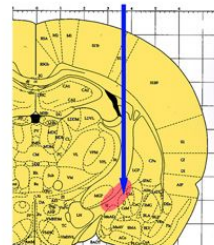
本研究は、こうした背景を踏まえ、認知機能障害患者での機能改善と神経保護を目的とした、新たな治療法の開発のため基礎実験を行なうものである。

人間に使用する小型の神経核刺激装置を元に、我々の開発した小型動物用の脳内神経核刺激装置を用いて、認知機能障害モデルラットの前頭葉基底核の慢性的刺激を試み、その学習記憶能力の改善効果を確認することにある。高齢化社会において最も問題となっていながら、未だ決定的な治療法が開発されていない認知機能障害に対し、実用化されている最新の neuromodulation 技術を応用することで、新たな治療を開発する第一歩になるものと思われる。

アルツハイマー病を含む認知障害では、basal forebrainの萎縮と同部位のコリン作動性神経の顕著な脱落が症状に関与している



Teipel SJ. Eur J Nucl Med Mol Imaging (2008) 33



ラットのbasal forebrainを50Hz, 200 μ Aで100分間刺激すると、神経成長因子の分泌促進と記憶行動の誘発が確認された
Hotta H. Neuroscience Research (2009) 57

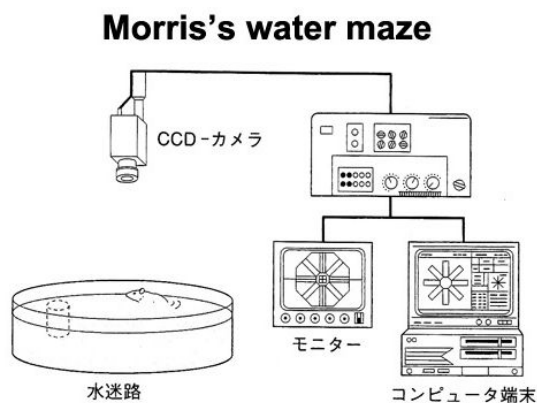


3. 研究の方法

高齢ラットを用い、アミロイド 42 をラットの脳内に直接注入することでアルツハイマー病モデルを作成、アルツハイマー病に特有のコリン作動性神経細胞や神経線維の脱落について見当を行なう。学習認知機能の評価には、以下の通り、Morris water maze を用いて行う。

【Morris water maze】直径 1.5m、高さ 60cm の円形のプールとプール内に直径 10cm の透明アクリル製のプラットホームを用意する。プールにラットを入れるとランダムに泳ぐうちにプラットホームの位置を空間認識する。通常、一日2回程度のトレーニング

グで5~10日の間に入水から直線的にプラットフォームに向かうようになる。120秒をcut-off timeとし、そこに至る遊泳距離、時間を測定する。認知機能に異常のある場合、トレーニングを繰り返してもプラットフォームの位置を記憶できず、遊泳距離・時間が有意に延長する。



【アミロイド -42 の脳内注入と組織学的評価】アミロイド -42 oligomer を $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度とし、 $0.1\mu\text{l}/\text{分}$ の速度で各々、大脳皮質とマイネルト基底核内の2箇所ずつ(マイネルト基底核: bregma から 1.0mm 後、 2.5mm 外側と 1.6mm 後、 3.4mm 外側、深さ 6.9mm 。大脳皮質は、前後外側は同じで深さ 1.3mm)に $0.5\mu\text{l}$ ずつ、計4箇所注入する。注入より、2週間後と3週間後に、夫々、Control 群(手術なし、注入なし、4匹)、Sham 群(手術あり、生理食塩水の注入、4匹)、A 群(手術あり、A の注入、8匹)ずつを sacrifice し脳を還流固定する。

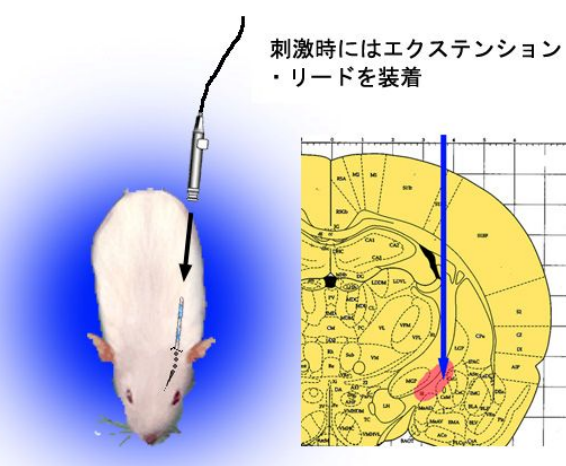
ラットから摘出した脳は、10%ホルマリン液、30%ショ糖液に十分浸した後、マイクロトームにて $20\mu\text{m}$ に切り出して保存する。これらを神経細胞のマーカーや、コリン作動性神経細胞を示す choline acetyltransferase (ChAT) や microglia の活性を示す integrin CD11b に対する抗体を用いた免疫染色を行い、それぞれのラットにおける大脳皮質及びマイネルト基底核において、神経細胞(特にコリン作動性神経)と細胞数の stereological analysis を行なうことで比較する。

【最終的な結果の統計学的検討】マイネルト基底核へのアミロイド -42 注入により、学習記憶行動の悪化が認められるかどうか

と、これらが組織学的所見と相関するかについて見当する

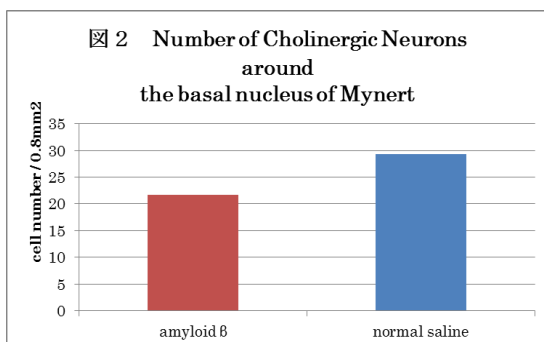
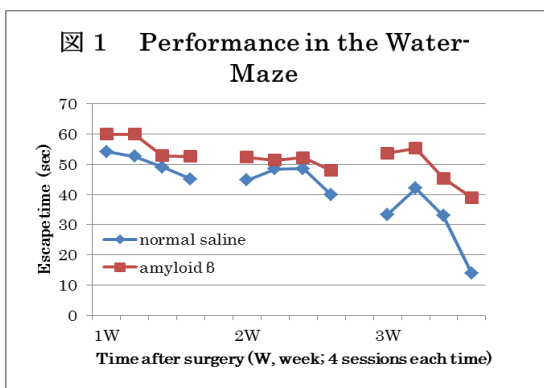
【ラット前頭葉基底核、慢性低周波刺激の条件設定と学習記憶機能評価】さらに、ラットの前頭葉基底核に慢性固定電極を挿入し、いつでも刺激できるような、安定したモデルの作成を行なう。

Ketamine hydrochloride (ケタラール®) $100\text{mg}/\text{kg}$ i.p.にて麻酔下にラットを脳定位固定装置にセットし、皮膚切開にて頭蓋骨を露出、Paxinos G and Watson C の“The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates”に従い、ラットのマイネルト基底核へタングステン製直径 0.2mm 、先端部 0.2mm を露出した電極を挿入し、頭部へ固定する(bregma から 2.3mm 後、 3.7mm 外側で深さ 7.6mm)。電極の distal end は、直径 1.3mm 、長さ 3mm の円柱状の電極になり、皮膚から 2cm 程度飛び出して、いつでもエクステンション・リードがつけられるような状態とする。こうして、Stim 群の8匹は手術の影響が無くなった1週間後から、エクステンション・リードと刺激装置に接続されて刺激を受ける。第三段階では、アルツハイマー病ラットでのマイネルト基底核の低周波慢性刺激が、学習記憶能力の改善とコリン作動性神経細胞と神経線維の脱落をどの程度、阻止できたのかを評価する。



4. 研究成果

アミロイド -42 oligomer の注入を行った群では、注入を行わない2群に比べ、Water Maze を用いた、認知機能評価では、図1に示す通り、有意に学習機能の低下がみられる傾向にあった。



しかしながら、組織学的にも、マイネルト基底核内でのコリン作動性ニューロンの脱落については、図2のごとく、アミロイド-42 oligomer 注入群で、脱落傾向を認められたものの、統計学的な有意差は認められなかった。

慢性刺激電極については、デンタルセメントによる、電極の固定を行った。当初、使用した電極では、電極が比較的細く、麻酔から覚醒後に、ラットが自らの電極を抜去したり、いじることで破損したりしてしまい、刺激に至らなかった。このため、新たに、金属製の外筒を作成し、中心部に刺激の時だけ、麻酔下に刺激電極を挿入して刺激が可能となるような電極を開発し、デンタルセメントにて固定して使用した。しかしながら、刺激に伴い、電流の広範囲への波及など、予期せぬ反応が見られ、狙った部位が限局性に刺激されているかどうかについて、甚だ疑問が生じた。その後、様々な試行錯誤を行ったが、マイネルト基底核内に限局して、安定した刺激を行うことが困難であり、さらなる検討を要した。

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)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辛 正廣 (SHIN Masahiro)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70302726

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者