

氏名	ごとう やす あき 後 藤 康 彰
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 656 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 医 療 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	アルツハイマー病モデルマウスにおける興奮性シナプス伝達の制御機構 に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 赤池昭紀 教授 金子周司 教授 佐治英郎

論 文 内 容 の 要 旨

アルツハイマー病は、記憶力の低下や認知障害を主な臨床症状とする進行性の神経変性疾患であり、病理学的所見として脳内における神経細胞の脱落・老人斑の沈着・神経原線維変化が観察される疾患である。アルツハイマー病では脳の情報処理を担う最小単位であるシナプスを構成する蛋白質が減少していることは知られているが、シナプス機能に関する報告はほとんどない。本研究において著者は、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として同定されたアミロイド前駆体蛋白質のスウェーデン型変異およびプレセニン1のエクソン変異を持つダブルトランスジェニックマウスである APP^{swe}/PS1^{dE9}マウスをアルツハイマー病モデルマウスとして用い興奮性シナプス伝達の変化およびその制御機構について検討を行った。さらに、マウス海馬由来初代培養神経細胞を用いて老人斑の主な構成成分であるアミロイドβ蛋白質 (Aβ) の生理機能についても検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章 APP^{swe}/PS1^{dE9}マウスのシナプス伝達におけるグルタミン酸受容体の関与

3, 5, 9 ヶ月齢の APP^{swe}/PS1^{dE9}マウス (Tgマウス) についてELISA法による脳内Aβ蓄積量の測定および免疫組織化学法によるAβ沈着斑の観察を行った。3 ヶ月齢Tgマウスでは脳内Aβ蓄積量はほとんどなくAβ沈着斑も観察されなかった。5 ヶ月齢Tgマウスでは脳内Aβ蓄積量は低くAβ沈着斑も少なかった。9 ヶ月齢Tgマウスでは脳内Aβ蓄積量は高くAβ沈着斑も多かった。次に、Tgマウスより海馬スライスを調製し、64点細胞電位記録システムを用いてシナプス伝達の指標であり神経前シナプスの機能を示していると考えられている paired-pulse facilitation (PPF), 神経後シナプスの機能を示していると考えられている basal synaptic transmission (BST), 長期的可塑性の指標とされている long-term potentiation (LTP) を測定した。PPF, BST, LTP は3 ヶ月齢Tgマウスでは同月齢ワイルドタイプマウス (Wtマウス) と比較して差は認められなかったが、9 ヶ月齢Tgマウスでは有意に低下した。PPFとLTPは5 ヶ月齢TgマウスではWtマウスと比較して差は認められなかったが、BSTは有意に低下した。以上の結果より、アルツハイマー病ではシナプス機能が障害されていることやシナプス伝達の指標であるPPF/LTPとBSTでAβによる障害の機序が異なることが示唆された。次に、シナプス伝達の障害の機序を調べるために、ウエスタンブロット法により興奮性シナプス伝達に重要な役割を果たしているNMDA型グルタミン酸受容体サブユニットNR1およびAMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluR1, GluR2, GluR3の発現量について検討した。NR1, GluR1, GluR2, GluR3の発現量は3 ヶ月齢TgマウスではWtマウスと比較して差は認められなかったが、NR1とGluR2の発現量は9 ヶ月齢Tgマウスでは有意に低下した。また、GluR1の発現量は9 ヶ月齢Tgマウスでも差は認められなかったがリン酸化GluR1 (セリン845番目) の発現量は有意に低下した。NR1, GluR1, GluR2, GluR3の発現量は5 ヶ月齢TgマウスではWtマウスと比較して差は認められなかったが、細胞膜に局在しているGluR3の発現量は有意に低下した。以上の結果より、5 ヶ月齢Tgマウスで観察されたBSTの障害は細胞膜に局在しているGluR3の発現量低下により、9 ヶ月齢Tgマウスで観察されたPPFとLTPの障害は、NR1, GluR2, リン酸化GluR1の発現量低下により引き起こされたことが示唆された。

第二章 APP^{swe}/PS1dE9マウスのシナプス伝達におけるアセチルコリン受容体の関与

コリン作動性神経は学習記憶を含む認知機能に深く関与しており、その障害がアルツハイマー病の重要な要因であると考えられている。近年、凝集して蓄積したA β が引き金となって神経細胞が障害されアルツハイマー病に至るというアミロイド仮説も提唱されているが、コリン作動性神経との関連は不明である。そこで、アミロイド仮説に基づいて作製されたAPP^{swe}/PS1dE9マウスのシナプス伝達におけるコリン作動性神経の関与について検討した。Tgマウスより海馬スライスを調製し、64点細胞電位記録システムを用いてシナプス伝達の指標である興奮性シナプス後電位を測定し、コリンエステラーゼ阻害剤であるフィゾスチグミンの影響を調べた。フィゾスチグミンは興奮性シナプス後電位を減少させるがA β 沈着斑が観察されない3ヵ月齢TgマウスとWtマウスで差は認められなかった。一方、A β 沈着斑が観察された5.9ヵ月齢Tgマウスでは興奮性シナプス後電位を有意に減少させた。ニコチン性アセチルコリン受容体アンタゴニストであるメカミラミンはフィゾスチグミンによる興奮性シナプス後電位の減少に影響を与えなかったが、ムスカリン性アセチルコリン受容体アンタゴニストであるアトロピンはフィゾスチグミンによる興奮性シナプス後電位の減少をTgおよびWtマウスともに元のレベルに回復させた。以上の結果より、APP^{swe}/PS1dE9マウスではA β 沈着斑の出現に伴いムスカリン性アセチルコリン受容体の機能が障害されていることが示唆された。

第三章 グルタミン酸神経毒性に対する非線維状A β の神経保護作用

健常人脳内には凝集体を形成していない非線維状A β が存在することが知られているが、その生理的機能については不明である。そこで、マウス海馬由来初代培養神経細胞を用いてグルタミン酸神経毒性に対する非線維状A β の影響について検討した。使用したA β が凝集体を形成していない非線維状であることはチオフラビンTアッセイおよび原子間力顕微鏡で確認した。非線維状A β はグルタミン酸神経毒性に対して保護効果を示し、その機序としてNMDA型グルタミン酸受容体サブユニットNR1のエンドサイトーシスを促進し細胞膜に局在するNR1数を減少させ、NMDA型グルタミン酸受容体を介した細胞内へのカルシウムイオン流入量を減少させることにより神経保護作用を示すことが推定された。以上の結果より、凝集体を形成した線維状A β は神経細胞を障害するのに対して、凝集体を形成していない非線維状A β は神経細胞を興奮毒性から保護していることが示唆された。

以上、著者は、新しいアルツハイマー病動物モデルと考えられているAPP^{swe}/PS1dE9マウスでは興奮性シナプス伝達が障害されており、早期に障害されるシナプス伝達の指標であるBSTの機序として細胞膜に局在するAMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluR3の発現量が減少していることを明らかにした。さらに、凝集体を形成していない非線維状A β の神経保護作用に関する新たな知見を見出した。本研究の成果は、アルツハイマー病の発症機構および病態解析の解明に寄与するものであり、新たな治療法の開発など臨床応用に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

アルツハイマー病は、記憶力の低下や認知障害を主な臨床症状とする進行性の神経変性疾患であり、病理学的所見として脳内における神経細胞の脱落・老人斑の沈着・神経原線維変化が観察される。申請者は、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として同定されたアミロイド前駆体蛋白質のスウェーデン型変異およびプレセニリン1のエクソン変異を持つダブルトランスジェニックマウスであるAPP^{swe}/PS1dE9マウスをアルツハイマー病モデルマウスとして用い、興奮性シナプス伝達の変化およびその制御機構に関する神経薬理学的研究を行った。さらに、マウス海馬由来初代培養神経細胞を用い、老人斑の主な構成成分であるアミロイド β 蛋白質(A β)の神経生存における役割について検討した。

第一章 APP^{swe}/PS1dE9マウスのシナプス伝達におけるグルタミン酸受容体の関与

APP^{swe}/PS1dE9マウス(Tgマウス)における脳内A β 蓄積、沈着斑の解析を行ったところ、5ヵ月齢では脳内A β 蓄積量は低くA β 沈着斑も少ないが、9ヵ月齢で脳内A β 蓄積量は高くなりA β 沈着斑も多くなることが明らかになった。ついで、Tgマウスより海馬スライスを調製し、64点細胞電位記録システムを用い、シナプス伝達とくに神経前シナプス機能の指標であるpaired-pulse facilitation (PPF)、神経後シナプスの機能の指標であるbasal synaptic transmission (BST)、およびシナプス可塑性の指標とされるlong-term potentiation (LTP)の変化について、Tgマウスと同月例ワイルドタイプマウス(Wtマウス)と比較することにより、解析を行った。その結果、3ヵ月齢ではいずれの指標も変化がなく、5ヵ月齢

でBSTがTgマウスで低下し、9ヶ月齢で全ての指標がTgマウスで低下することを見出した。興奮性シナプス伝達に重要な役割を果たしているNMDA受容体サブユニットNR1およびAMPA受容体サブユニットGluR1, GluR2, GluR3の発現量について検討したところ、5ヶ月齢Tgマウスで細胞膜に局在するGluR3発現量が低下し、9ヶ月齢TgマウスでNR1とGluR2の発現量が低下し、リン酸化GluR1（セリン845番目）の発現量が低下した。以上の結果より、5ヶ月齢Tgマウスでは細胞膜に局在しているGluR3の発現量低下によりBSTの障害が生じ、9ヶ月齢TgマウスではNR1, GluR2, リン酸化GluR1の発現量低下によりPPFとLTPの障害が生じることが示唆された。

第二章 APP^{swe}/PS1^{dE}マウスのシナプス伝達におけるアセチルコリン受容体の関与

Tgマウスより海馬スライスを調製し、64点細胞電位記録システムを用いてシナプス伝達の指標である興奮性シナプス後電位を測定し、コリンエステラーゼ阻害薬フィゾスチグミンの作用を検討した。フィゾスチグミンは、3ヶ月齢Tgマウスでは著明な作用を示さなかったが、5および9ヶ月齢Tgマウスでは興奮性シナプス後電位を減少させた。その作用は、アトロピンにより拮抗されたが、メカミラミンによる影響は受けなかった。以上の結果より、APP^{swe}/PS1^{dE9}マウスではAb沈着斑の出現に伴い脳内ムスカリン性アセチルコリン受容体機能が障害されていることが示唆された。

第三章 グルタミン酸神経毒性に対する非線維状Aβの神経保護作用

マウス海馬由来初代培養神経細胞を用い、グルタミン酸神経毒性に対する非線維状Abの影響について検討したところ、非線維状Aβがグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を示した。その機序を検討した結果、NMDA受容体サブユニットNR1のエンドサイトーシスを促進して細胞膜に局在するNR1数を減少させ、NMDA受容体を介した細胞内への細胞内Ca²⁺流入量を減少させることにより神経保護作用を示すことが示唆された。以上の結果より、凝集体を形成した線維状Aβは神経細胞を障害するのに対して、凝集体を形成していない非線維状AβはNMDA受容体機能低下により神経細胞を興奮毒性から保護することが示唆された。

以上、申請者は、アルツハイマー病動物モデルと考えられているAPP^{swe}/PS1^{dE9}マウスを用いた解析を行い、興奮性シナプス伝達が障害されており、比較的早期のシナプス障害には細胞膜に局在するAMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluR3の減少が関与することを明らかにした。さらに、培養神経細胞系を用いた研究により、凝集体を形成していない非線維状Aβの神経保護作用に関する新たな知見を見出した。本研究の成果は、アルツハイマー病の発症機構および病態解析の解明に寄与するものであり、新たな治療法の開発など臨床応用に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成20年2月25日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。