

京都大学	博士（医学）	氏 名	北 口 浩 史
論文題目	Chronic cerebral hypoperfusion accelerates amyloid β deposition in APP ^{SwInd} transgenic mice (慢性脳低灌流状態は APP ^{SwInd} トランスジェニックマウスの アミロイド β タンパク質の沈着を促進する)		
(論文内容の要旨)			
アルツハイマー病は認知症の主たる原因であり、血管性認知症とは、その病態を異にすると考えられてきた。しかし最近の報告では、アルツハイマー病の発症前に、微小循環障害や脳血流の減少が起こることや、アルツハイマー病の剖検脳において、白質病変や大脳皮質の微小梗塞が観察されることが報告されている。また疫学研究では、中年期の高血圧や脂質異常症、糖尿病、アポ E4 の遺伝子型は、アルツハイマー病と血管性認知症の共通の危険因子と報告されている。こうした事実から、血管性危険因子や、慢性脳低灌流状態は、アミロイド β タンパク質(Aβ)の沈着を介してアルツハイマー病の病態を加速させるという仮説が提唱されている。しかし、この仮説を、<i>in vivo</i> で検証した研究はこれまで存在しない。 今回の研究では、アルツハイマー病のモデルマウスである、アミロイド前駆体タンパク質のスウェーデン変異（K670N/M671L）とインディアナ変異（V717F）を過剰発現するトランスジェニックマウス（APP^{SwInd}-Tg マウス）に、当研究室で独自に開発した両側総頸動脈狭窄術（BCAS）による慢性脳低灌流侵襲を加えて検証を行った。APP^{SwInd}-Tg マウスの同腹仔に、両側総頸動脈に内径 0.18mm の微小コイルを装着し BCAS 群を作成し、同時に作成された偽手術群を対照として組織学的・生化学的な比較を行った。5、8、11 ヲ月齢の APP^{SwInd}-Tg マウスに BCAS を行い、1 ヲ月後に評価する短期条件と、3 ヲ月齢に BCAS を行い 9 ヲ月後に比較する長期条件を用いた。マウス脳は半切し、一方を組織学的解析に、もう一方は生化学的解析に用いた。BCAS 群では、月齢や短期・長期条件にかかわらず、脳梁を含む白質は粗鬆化し、アストログリアの増生を認めた。抗 Aβ1-42 抗体での免疫染色では、6、9、12 ヲ月齢の BCAS 群で、核周囲が濃染する大脳皮質の神経細胞が、対照群に比べ有意に増加していた（p=0.027）。TUNEL 染色では、12 ヲ月齢マウスの海馬 CA1 と大脳皮質で、TUNEL 陽性細胞数が BCAS 群で有意に増加していた（p=0.0044, p=0.044）。以上のことから、細胞内に蓄積した Aβ1-42 が神経細胞死を誘導する機序が示唆された。次に 9 ヲ月齢の BCAS 群と対照群のマウスの半切脳から細胞外分画成分を抽出し、ウェスタンブロット法で解析を行った。BCAS 群では、対照群と比較して Aβ dimer が増加する傾向を認めた（p=0.071）。次にフィルターアッセイ法を用いて、Aβ 凝集体の半定量を試みた。この方法の有効性を確認するために、合成 Aβ を 37℃で 24 時間保温すると重合する特性を利用し、合成直後と保温後のサンプルを用いて SDS-PAGE 法とフィルターアッセイ法を行った。保温したサンプルのみで、SDS-PAGE 法で Aβ 凝集体と思われる高分子スメアを認め、同時にフィルターアッセイ法で Aβ 抗体に反応する直径 200nm 以上の凝集体を検出した。フィルターアッセイ法は Aβ 凝集体の検出に有効であった。次に、BCAS 群と対照群の細胞外分画成分に含まれる Aβ 凝集体を半定量的に検討したところ、BCAS 群で有意に増加していた（p=0.038）。以上の結果から、慢性脳低灌流状態は Aβ の代謝に影響を及ぼし、神経細胞内の Aβ1-42 の蓄積と神経細胞死の誘導および細胞外の Aβ dimer と Aβ 凝集体を増加させ、アルツハイマー病の病態を促進させる機序が示唆された。慢性脳低灌流による組織学的・生化学的変化が、マウスの認知機能に影響するか否かは、今後の検討が必要である。			

(論文審査の結果の要旨) アルツハイマー病と血管性認知症とは、その病態を異にすると考えられてきた。最近、共通の血管性危険因子や、アルツハイマー病での血管病理の報告がなされており、血管因子がアルツハイマー病の病態を修飾することが示唆されている。慢性脳低灌流状態が、アルツハイマー病の病態にどのように影響するのかについて検討を行った。アルツハイマー病のモデルマウスである APP^{SwInd}-Tg マウスの 5、8、11 ヲ月齢の同腹仔に両側総頸動脈に内径 0.18mm の微小コイルを装着し、偽手術群を対照として組織学的、生化学的に検討を行った。慢性脳低灌流群では月齢や条件に関わらず、白質の粗鬆化とアストログリアの増生を認めた。Aβ1-42 抗体での免疫染色では、大脳皮質で核周囲が濃染する神経細胞の増加を認めた。TUNEL 染色では、12 ヲ月齢の海馬 CA1 領域と大脳皮質で TUNEL 陽性細胞の有意な増加を認めた。生化学的には慢性脳低灌流群で、細胞外分画成分での Aβ dimer と Aβ 凝集体の増加を認めた。以上の結果から、慢性脳低灌流状態はアミロイド β タンパク質の代謝に影響を及ぼし、神経細胞内の Aβ1-42 の蓄積と神経細胞死の誘導、および細胞外の Aβ dimer や Aβ 凝集体を増加させ、アルツハイマー病の病態を促進する機序が示唆された。 以上の研究は、慢性脳低灌流状態によるアルツハイマー病の病態促進機序の解明に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 22 年 5 月 18 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			