

突起である神経変性突起の共存が認められるアミロイドプラークは **neuritic** プラーク(コンゴレッド陽性プラーク)と呼ばれ、その出現頻度が AD 患者の臨床スコアと相関することが報告されている。

我々は進行抑制薬開発を目標として、ADの代表的な病理像であるアミロイドプラークと神経変性突起に着目し、これらの加齢に伴う量的及び質的变化、すなわちアミロイドプラークの数、体積、物理密度及び神経変性突起量を指標とした神経変性に対する影響に関する検討を行うこととした。実験には2種類のADモデルマウス(Tg2576マウス:変異APP [K670N, M671L] トランスジェニックマウス、PSAPPマウス:変異プレセニリン 1 [M146L] と変異APP [K670N, M671L])のダブルトランスジェニックマウスを用いた。

第1章 Tg2576マウスおよびPSAPPマウスにおける脳内アミロイド蓄積と神経変性突起の加齢依存的定量解析

Tg2576マウスの脳内神経変性突起はADの神経変性突起を染色することが報告されている抗リン酸化タウ抗体2種(抗Ser396抗体、AT8)、抗ユビキチン抗体、抗APP抗体で染色された。また、リン酸化タウ陽性神経変性突起はコンゴレッド陽性、A β 40陽性プラークとは共存していたが、A β 42陽性プラークとは共存していなかった。

次に画像処理ソフトを用い、コンゴレッド陽性プラーク及びリン酸化タウ陽性神経変性突起の定量解析系構築を行った。11-13、17-19、20.5ヶ月齢Tg2576マウスにおいて、神経変性突起総面積、コンゴレッド陽性プラーク総面積、コンゴレッド陽性プラーク数は加齢により顕著に増加した。一方で、平均プラーク面積、個々のプラークにおけるプラーク面積あたりの神経変性突起面積の割合も月齢によって変化せず、一定の値を示した。

更に病理変化が促進した状況下での神経変性突起とアミロイドプラークの形成様式を探るため、PSAPPマウスにおけるアミロイド蓄積の加齢変化を検討した。自社繁殖の5ヶ月齢PSAPPマウスの脳内A β 40量は、20ヶ月齢Tg2576マウスとほぼ同程度であり、12ヶ月齢PSAPPマウスでは20ヶ月齢Tg2576マウスで達するレベルの約10倍以上の値を示した。すなわち、PSAPPマウスではTg2576マウスと比べて、より早期から、より顕著なアミロイド蓄積が起こっていることを確認した。PSAPPマウス4、6、9、12ヶ月齢において任意に抽出したコンゴレッド陽性プラークに関し、プラーク面積に対する神経変性突起面積の割合を算出すると、やはり加齢によって割合は変化しなかった。

以上より、①Tg2576マウス脳内神経変性突起はAD神経変性突起を染色することが報告されている抗体で染色されることより、Tg2576マウスは神経変性突起解析モデルとして有用であ

る。②神経変性突起は、コンゴレッド陽性、A β 40 陽性プラークと高い共存性を示した。③神経変性突起面積の定量系を構築した。④コンゴレッド陽性プラーク総面積、神経変性突起総面積は加齢によって顕著に増加した。⑤コンゴレッド陽性プラーク面積あたりの神経変性突起量(割合)や平均プラーク面積は加齢によって変化しなかった。⑥PSAPP マウスでは、Tg2576 マウスと比べて、より早期から、より顕著な A β 40 量の増加が認められた。⑦PSAPP マウスにおいても、コンゴレッド陽性プラーク面積あたりの神経変性突起量は、加齢により変化せず、一定に保たれているということが明らかとなった。

第2章 位相差 X 線 computed tomography (CT) 法を用いた PSAPP マウス脳内アミロイド蓄積と物理密度の加齢依存的解析

位相差 X 線 CT 法は、生体を構成している水素、炭素、窒素、酸素などの軽元素中では吸収よりも位相差によるシグナルが約 1000 倍高くなるという性質を利用し、従来の X 線 CT 法よりも高感度に生体組織内の微細な密度分布を可視化する方法である。アミロイドプラークは凝集性の高い A β を主構成成分とし、電子顕微鏡下の観察において、 β シート構造を有する凝集体として観察される。そこで、我々は新たなアミロイドプラーク解析の指標として物理密度に着目し、位相差 X 線 CT 法を用いて、PSAPP マウスのアミロイドプラーク可視化を試みた。

12 ヶ月齢 PSAPP マウスの摘出脳を用いた位相差 X 線 CT において、大脳皮質、海馬領域を中心とする広範な領域で高密度斑点の存在が認められた。この高密度斑点は、12 ヶ月齢の野生型マウスでは全く認められなかった。同位置の免疫染色切片像との比較により、高密度斑点は、A β 40 陽性/A β 42 陽性プラーク、コンゴレッド陽性プラークと非常に良く一致し、A β 40 陰性/A β 42 陽性プラークとは一致しないということが明らかになった。

次に、位相差 X 線 CT により検出されるアミロイドプラークの加齢変化を検討した。アミロイドプラークは 4、6、9、12 ヶ月齢 PSAPP マウスにおいて、加齢依存的な増加を示した。アミロイドプラーク数と総体積を 3 次元的に定量解析すると、アミロイドプラーク数は 4 から 9 ヶ月齢までは増加するが、12 ヶ月齢では 9 ヶ月齢とほぼ同数であった。一方、アミロイドプラークの総体積は 4 から 12 ヶ月齢まで一貫して顕著な増加を示した。また、平均プラーク体積は、4 から 9 ヶ月齢まではほぼ一定の値を示し、12 ヶ月齢では 4 から 9 ヶ月齢と比べて顕著に増すということが明らかとなった。

位相差 X 線 CT 法を用いた解析により、アミロイドプラークの物理密度が定量可能となった。アミロイドプラークの平均物理密度は、加齢に伴い有意に増加した。アミロイドプラークの物理密度に対する度数分布を各月齢ごとにプロットすると、加齢により高密度側へのシフトが認めら

れ、高密度側へのシフトの度合いは、9 から 12 ヶ月齢の間で特に顕著であった。すなわち、12ヶ月齢においては9ヶ月齢以下では殆ど認められないような高密度なアミロイドプラークが形成されていることが明らかとなった。そこで、12 ヶ月齢で特異的に認められる高密度($\Delta\rho$ (= background との密度差) $\geq 3.5\text{mg}/\text{cm}^3$)なアミロイドプラークを高密度プラーク、それ以下($\Delta\rho \leq 3.4\text{mg}/\text{cm}^3$)のアミロイドプラークを低密度プラークと分類した。高密度プラークに共存するリン酸化タウ陽性神経変性突起量は、低密度プラークに共存する神経変性突起量と比して有意に増加していた。また、高密度プラークは低密度プラークに比べて有意に平均体積が大きいという性質を示すことが明らかとなった。

以上より、①位相差 X 線 CT 法を用いて、物理密度を測定することにより、PSAPP マウスのアミロイドプラークを 3 次元的に可視化することに成功した。②A β 40 陽性/A β 42 陽性プラークが脳内で高密度に存在することが明らかになった。③高密度アミロイドプラークの定量系(数と体積)を構築した。④アミロイドプラークの物理密度は加齢により増加していた。⑤12 ヶ月齢 PSAPP マウスで特異的に認められる高密度プラークでは、若齢で認められる低密度プラークと比べて、体積が大きく、共存する神経変性突起量が多いという性質を示すことが明らかになった。

総括

本研究により、アミロイドプラークの蓄積過程を明らかにした。すなわち、第一段階として、「個々のアミロイドプラークの性質(神経変性突起の共存割合、プラーク面積/体積)は一定に保たれたまま、アミロイドプラークの数が増加する」という数的増加を示す期間、第二段階として、「アミロイドプラークの数は増加せず、非常に高密度なアミロイドプラークが形成される」という質的変化が起こる期間が想定された。今後、AD サンプルを用いた検証により、AD 病態解明がより進むと期待される。また、その結果に応じて、最適な創薬戦略が策定可能であると考えられる。位相差 X 線 CT 法による物理密度変化を指標としたアミロイドプラークの新規イメージング法は、アルツハイマー病の病態解明、アルツハイマー病の診断および治療薬の薬効評価に有用であると考えられる。