

アルツハイマー病の睡眠バイオマーカー確立と治療開発

北海道大学大学院 理学研究院 生物科学部門 行動神経生物学分野
常松 友美

【本研究の目的】

アルツハイマー病といった神経変性疾患患者の脳では、正しい立体構造を形成できずに不良化したタンパク質の蓄積・凝集化が認められる。現在のところ神経変性疾患の治療は対症療法しかなく、根治は難しい。一方、アルツハイマー病ではその前駆症状として睡眠の質や量が変化することが報告されている。このことは、睡眠変化を指標とした新規バイオマーカーを確立することができれば、アルツハイマー病の早期発見の実現に近づけることを意味している。

これまで、アルツハイマー病モデルマウスを用いた研究により、睡眠覚醒変化が明らかにされてきた。しかしながら、アルツハイマー病モデルマウスの種類の多さ故、それぞれの種のモデルマウスが呈する睡眠障害が異なり統一見解を得ることが難しかった。また、モデルマウスでは蓄積するアミロイドベータ ($A\beta$) の脳領域を制御することが不可能であり、どの脳領域に沈着した $A\beta$ がどのような睡眠覚醒変化を引き起こすのかを解析することは難しい。そこで本研究では、野生型マウスの特定の脳領域に線維化 $A\beta$ を投与し、その後の睡眠覚醒ステージ、および脳波の変化を経時的に明らかにすることを目的とした。本研究により、特定の脳領域に蓄積した $A\beta$ が惹起しうる睡眠覚醒の変化を詳細に明らかにすることができると期待される。本研究では、アルツハイマー病で $A\beta$ の蓄積が起りやすい領域である海馬での影響を検討した。

【方法】

1, 使用した動物

本研究は、東北大学実験動物専門委員会の承認（承認番号：2021生動-001, 2023学動-002）および、北海道大学動物実験委員会の承認（承認番号：23-0117）を受け、米国国立衛生研究所のガイドラインに準拠して実施した。動物の苦痛を最小限に抑え、使用する動物の数を減らすため最大限の努力を行った。実験には3-4ヶ月齢の野生型マウス（C57BL/6J）を用いた。マウスは12時間周期の明暗サイクル（明期：8:00-20:00）で制御され、さらに餌と水を自由に摂取できる環境で飼育した。

2, 線維化 $A\beta$ の脳実質投与手術

オスの野生型マウスを使用した。手術はイソフルラン麻酔下（1-2%維持）で行った。脳定位固定装置にマウス頭部を固定し、調製した線維化 $A\beta$ 1-40 ($A\beta$ 40, 100 μ M)、あるいは線維化 $A\beta$ 1-42 ($A\beta$ 42, 100 μ M) を両側海馬（ブレグマから2.5 mm後部、2.0 mm外側、深さ2.0 mmの位置）に1.5 μ Lずつ投与した。投与速度は0.2 μ L/minで行い、ステレオタキシックインジェクタで制御した。皮質脳波（Electroencephalogram; EEG）用電極として頭蓋骨に3本のネジ電極を埋め込み、筋電位（Electromyogram; EMG）用電極として頸部筋肉に撚り線を縫い付けた。また、グラウンド用として小脳にネジ電極を埋め込んだ。自由行動下で脳波と筋電位を連続記録するために、マウスの動きを制限しな

いスリッピングを介した。脳波、および筋電位の電気信号は、増幅器で増幅し、サンプリングレート128 Hzでデジタル化した。その際、脳波は0.75-20 Hzで、筋電位は20-50 Hzでフィルタリングした。記録ソフトはSleepSignソフトウェアバージョン3を用いた。手術後3日から14日まで24時間連続で脳波・筋電位を測定した。

3, 免疫組織化学的解析

アミロイド線維の局在、また神経脱落を調べるため、免疫組織化学的解析を行った。線維化A β を投与したマウスをイソフルランで十分に麻酔し、20 mLの生理食塩水、続いて20 mLの4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定した。摘出した脳は4%パラホルムアルデヒド溶液に4°Cで一晩浸漬後、30%スクロース液にて2日以上浸漬した。脳は包埋液 (OCTコンパウンド) で急速凍結し、クライオスタットを用いて40 μ mの厚さで冠状断切片を作成した。蛍光免疫染色では、線維化A β を確認するために抗Amyloid Fibril抗体 (1:500) を4°Cで一晩インキュベートした。次に、CF488抗ラビットIgG抗体を室温で1-2時間インキュベートした。また、神経細胞の局在を蛍光で可視化するために、Nissl染色 (1:300) を行なった。その後DAPI (1:1000) を室温で1時間インキュベートした。染色された脳切片はAPSコートされたスライドグラスに載せ、50%グリセロールにて封入した。脳切片は蛍光顕微鏡で観察した。

4, 睡眠覚醒ステージ判定

記録した脳波・筋電位は基準に従い、SleepSignにより、4秒を1エポックとして覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠にオフラインで自動判定を行なった。自動判定後、全ての睡眠覚醒ステージを目視で確認し、適宜修正を行なった。脳波のスペクトル解析は高速フーリエ変換にて算出し、デルタ波 (1-5 Hz)、シータ波 (6-10 Hz)、アルファ波 (10-13 Hz)、ベータ波 (13-25 Hz) に分けた。

【結果】

1, 海馬実質に投与した線維化A β は海馬実質でアミロイド線維を形成する

海馬実質に投与した線維化A β が脳内でアミロイド線維を形成しているかどうかを蛍光免疫染色を用いて検討した。3-4ヶ月齢の若い成熟野生型マウスの両側海馬にA β 40あるいは、A β 42を投与し、その後脳を摘出した。コントロールにはBuffer (20 mM HEPES buffer (pH7.5), 100 mM NaCl) を投



図1 蛍光免疫染色で示したアミロイド線維の局在

与した群を用いた。緑で示されているように、コントロールを投与した海馬ではアミロイド線維免疫陽性はほとんど観察されなかったが、A β 40とA β 42を投与したマウスの海馬では免疫陽性が観察された (図1)。このことから、線維化A β を投与することでアミロイドプラークが形成されることを明らかにした。

2, 線維化A β 42を海馬実質投与するとレム睡眠合計時間が経時的に減少する

次に、海馬実質に線維化A β を投与した後に、マウスの睡眠覚醒ステージが変化するかどうかを検討した。マウスは自由行動下で脳波筋電位を24時間記録した。コントロール、A β 40投与群、A β 42投与群で比較した。記録は投与後3日目から14日目まで断続的に行なった。マウスの睡眠覚醒ステージは毎日同じではないため、3日ごとの平均を算出した。図2に示すように、24時間分のそれぞれの睡眠覚醒ステージの合計時間を見てみると、レム睡眠で顕著な変化が観察された。A β 40を投与したマウスではコントロールと比べてやや合計時間が減少したが、A β 42を投与したマウスでは投与後6日目以降にレム睡眠合計時間

が徐々に減少していった(図2)。本研究結果は未発表データであるため、図2は1例のみを示している。以上の結果から、A β 42の両側海馬実質投与はレム睡眠の合計時間を減少させることを見出した。

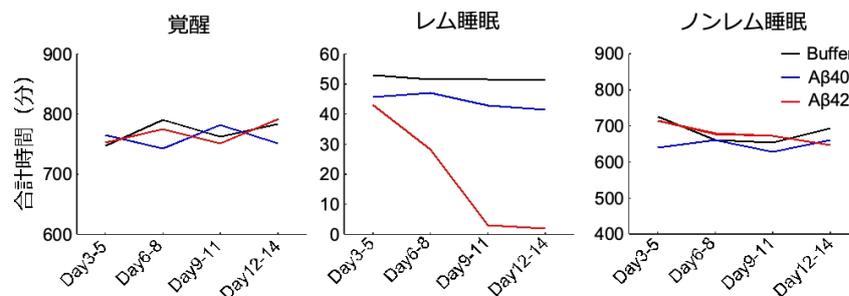


図2 各睡眠覚醒ステージの24時間合計時間の経時的変化

3, 線維化A β の海馬実質投与は覚醒時とレム睡眠時の脳波を変化させる

次に、睡眠覚醒ステージ変化だけでなく、脳波が変化するかどうかを解析した。睡眠覚醒ステージと同様に投与後3日目から14日目までの脳波に関して3日ごとの平均を解析し、比較した。その結果、覚醒時とレム睡眠時に、コントロールと比べて脳波の成分のうちシータ波(6-10 Hz)のパワー値が有意に減少することを明らかにした。一方で、ノンレム睡眠時の脳波には影響は見られなかった。

4, 線維化A β の海馬実質投与は海馬神経細胞を脱落させる

次に、線維化A β の投与により、海馬の神経細胞が脱落しているかどうかを検討するため、Nissl染色を行なった。その結果、コントロールであるBufferの投与では海馬神経細胞にほとんど影響は見られなかったが、A β 40投与では投与位置での神経脱落が観察され、A β 42投与ではさらに顕著な神経脱落が観察された。

【考察】

本研究結果より、海馬に線維化A β を投与するとマウスのレム睡眠が強く抑制されることが明らかになった。また、覚醒時およびレム睡眠時のシータ波の成分が減少することも見出した。免疫組織化学的手法により、線維化A β 投与による海馬神経細胞の脱落を示した。海馬神経細胞はシータ波を発生させることが報告されていることから、線維化A β 投与により神経脱落が生じ、その結果シータ波成分が減少したと考えられる。一方、海馬神経細胞がレム睡眠の制御に重要であるという知見はこれまで報告されておらず、なぜレム睡眠合計時間が減少しうるのか、その神経メカニズムは今後明らかにする必要がある。さらにレム睡眠合計時間やシータ波の減少は、A β 40投与よりもA β 42投与の方がさらに強く観察された。海馬神経脱落はA β 40投与よりもA β 42投与の方が顕著に生じていたことから、その影響が反映されていると考えている。

本研究では、海馬実質への線維化A β 投与による睡眠覚醒ステージや脳波への影響を検討した。今後、様々な他の脳領域での影響も検討を進め、どの脳領域に沈着したA β がどのような睡眠覚醒変化を引き起こすのかを詳細に解析していく。これにより、アルツハイマー病の早期発見のための睡眠変化指標、さらには睡眠変化を調べるだけで、蓄積を起こしている脳領域の簡易的な同定にも繋がっていくと期待している。また、新規治療法の開発にも貢献したいと考えている。これまで、分子シャペロンが不良タンパク質の阻害効果を有することが分子レベルで多数報告されており、脳内でアミロイド線維の凝集や蓄積を抑制する分子シャペロンの同定も進めていく。

本研究結果は、責任著者として論文投稿準備中である。

【謝辞】

本研究は、公益財団法人アステラス病態代謝研究会2021年度研究助成金の支援を受けて行いました。本研究の遂行にあたり、線維化アミロイドタンパク質の調製において東北大学学際科学フロンティア研

研究所奥村正樹准教授にご協力いただきました。実験データの取得、解析にあたっては、東北大学学際科学フロンティア研究所佐柳友規学術研究員、高原桂子技術補佐員に多大なサポートをいただきました。また、著者は研究課題採択時には東北大学大学院生命科学研究科所属でしたが、本研究プロジェクト期間中に現職である北海道大学大学院理学研究院に異動し、研究室を立ち上げました。研究設備の移設や、研究環境の構築においても多大な支援をいただき、スムーズな研究室の立ち上げが可能となりました。厚く御礼申し上げます。