

令和元年6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08070

研究課題名(和文) 海馬神経伝達および神経ネットワークにおける細胞内Ca²⁺ホメオスタシスの役割研究課題名(英文) The role of Ca²⁺ homeostasis in hippocampal synaptic transmission and plasticity

研究代表者

伊藤 公一 (Ito, Koichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任准教授

研究者番号：50330874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：海馬神経伝達および神経ネットワークにおけるCa²⁺シグナルは細胞内Ca²⁺ホメオスタシスの基に一定に成り立っており、これが崩壊するとシナプス機能にも大きく影響があると考えられる。本研究により記憶・学習の素過程とされるシナプス可塑性へのCa²⁺ホメオスタシス関連分子群の関与、および加齢性認知機能低下のメカニズムとしてCa²⁺ホメオスタシスの加齢性変化が関与していることが定量的に明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海馬神経伝達およびシナプス可塑性を代表とする神経ネットワークに關与するCa²⁺シグナルに關する研究は多くあるが、Ca²⁺ホメオスタシスという観点から行われた研究は比較的少なく、本研究によって加齢・疾患における脳機能障害の新たな創薬のターゲットとなること、あるいは神経疾患の早期診断への寄与といった予防医学的な応用が期待され、これはヒトのアルツハイマー病などの神経変性疾患と細胞内Ca²⁺ホメオスタシスとの關連といった医学領域に限らず、近年伴侶動物の高齡化による認知機能障害が叫ばれる獣医学領域においても意義深い研究となる。

研究成果の概要(英文)：Intracellular Ca²⁺ concentration is maintained at a constant level so as to enable fine switchings on synaptic transmission and plasticity. This system is called Ca²⁺ homeostasis and it is regulated by a lot of related molecules. In this study, I demonstrated that Ca²⁺ homeostasis-related molecules are involved in the hippocampal synaptic plasticity such as long-term potentiation which is thought to be an elementary process of learning and memory, and age-dependent alteration of Ca²⁺ homeostasis-related molecules induces the cognitive impairment in age.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス可塑性 加齢 Ca²⁺ホメオスタシス 記憶・学習

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内外の Ca^{2+} 濃度差は約 1 万倍に達し、この濃度勾配によって Ca^{2+} による細胞内の繊細なシグナルのスイッチングが可能となっている。直接的なスイッチングの引き金として細胞膜上の Ca^{2+} チャネルや細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出が挙げられ、上昇した Ca^{2+} は細胞内 Ca^{2+} 結合タンパクにトラップされ Ca^{2+} -ATPase (Ca^{2+} ポンプ) や Na^{+} - Ca^{2+} exchanger (NCX) といった Ca^{2+} 排出系分子によって除去され、定常状態に戻る (Ca^{2+} ホメオスタシス)。神経細胞において Ca^{2+} によるスイッチングは主にシナプス伝達やシナプスの可塑的变化の際に用いられるが、この Ca^{2+} ホメオスタシスが正常に保たれていない場合はスイッチングが十分に機能せず重大な障害を引き起こすと考えられる。しかし、神経伝達や神経ネットワークレベルにおいて細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスがどのように維持されているのか、実際にどのような役割を担っているのか、障害を受けた場合にどのようなプロセスで機能不全に至るのか、などの詳細については不明な点が多い。

海馬神経細胞のシナプス可塑性は記憶・学習の素過程であると考えられている。加齢が進行すると記憶・学習をはじめとする認知機能が低下するが、これまで申請者らはこの過程においてシナプス伝達やシナプス可塑性も減弱することを定量的に明らかにしてきた【引用文献 1、2】。さらに詳しくシナプス電位を解析した結果、老齢個体の海馬からの記録では興奮性シナプス後電位 (EPSP) が若齢に比べて小さいだけでなく、EPSP 自体が延長することが明らかとなった。この延長の原因としてシナプス前細胞における神経伝達物質放出のダイナミクスの変化やシナプス後細胞における Na^{+} - Ca^{2+} ATPase 活性の低下などが考えられるが、 Ca^{2+} ポンプや NCX の加齢による発現変化や機能低下を検討した知見は非常に乏しい。

2. 研究の目的

上記のことを踏まえ、本研究では電気生理学的測定をメインに Ca^{2+} 画像解析や生化学的方法論を用いて神経伝達や神経ネットワークレベルでの細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシス関連分子の解明とその役割について解析することを目的としている。特に加齢に伴ってシナプス可塑性が低下することから Ca^{2+} ホメオスタシスの加齢性変化について焦点をあてていき、加齢モデル動物を用いて関連分子群の解析を行う。海馬神経伝達およびシナプス可塑性を代表とする神経ネットワークに参与する Ca^{2+} シグナルに関する研究は多くあるが、 Ca^{2+} ホメオスタシスという観点から行われた研究は比較的少なく、本研究によって加齢・疾患における脳機能障害の新たな創薬のターゲットとなること、あるいは神経疾患の早期診断への寄与といった予防医学的な応用が期待され、これはヒトのアルツハイマー病などの神経変性疾患と細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスとの関連といった医学領域に限らず、近年伴侶動物の高齢化による認知機能障害が叫ばれる獣医学領域においても意義深い研究となる。

具体的には以下のことを明らかにすることを目的とする。

- (1) 海馬神経細胞を用いて電気生理学的測定や Ca^{2+} 画像解析を行うことによるシナプス伝達時の EPSP 波形の詳細な解析
- (2) シナプス伝達に参与する Ca^{2+} 結合タンパク質の同定
- (3) 海馬スライス標本を用いたシナプス可塑性の評価と Ca^{2+} 結合タンパク質の関与
- (4) 病態モデル・遺伝子欠損モデル動物への応用

3. 研究の方法

本研究は神経伝達や神経ネットワークレベルにおける細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスの役割について電気生理学的的方法論と光学的測定法などを用いて定量的に理解し、その後に個体レベルに応用することを目的としている。そのために以下の方法を用いた。

- (1) 海馬神経細胞を用いて電気生理学的測定や Ca^{2+} 画像解析を行うことによるシナプス伝達時の EPSP 波形の詳細な解析

培養海馬神経細胞や老齢個体もしくは Senescence-Accelerated Mouse Prone 8 (SAMP8) といった老化促進モデル動物の海馬神経細胞よりフィールド記録やパッチクランプ法のホールセル記録、細胞内 Ca^{2+} イメージングを同時に行う系を立ち上げ、これによって EPSP/EPSC (興奮性シナプス後電流) 波形と細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化との対応を検討する。

- (2) シナプス伝達に参与する Ca^{2+} 結合タンパク質の同定

老齢個体と若齢個体では海馬神経細胞の EPSP の波形が異なることから、週齢により発現の異なるシナプス伝達関連 Ca^{2+} 結合タンパク質の存在が考えられる。この分子実体をウエスタンブロット法や RT-PCR 法などの生化学・分子生物学的手法により同定する。

- (3) 海馬スライス標本を用いたシナプス可塑性の評価と Ca^{2+} 結合タンパク質の関与

上記によって挙げられるだろう細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスに関連する分子の候補がもたらす Ca^{2+} ホメオスタシスの神経ネットワークレベルにおける関与を検討する。具体的には、海馬スライス切片を作製し候補分子の薬理的遮断の下でシナプス可塑性を検討する。

- (4) 病態モデル・遺伝子欠損モデル動物への応用

ターゲットとなる分子の機能低下または欠損モデル動物を用いた検討を行う。さらに高血圧

に代表される Ca^{2+} ホメオスタシスが関連して脳機能低下につながる病態モデルに対しても電気生理学・光学的方法論を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) 老化促進モデルマウスである SAMP8 を用いて Schaffer 側枝-海馬 CA1 錐体細胞間のシナプスおよび苔状線維-CA3 錐体細胞間のシナプスにおけるシナプス伝達・シナプス可塑性の詳細な解析を行った結果、加齢に伴い 2 発刺激に代表される短期シナプス可塑性や長期増強 (Long-term potentiation; LTP) に代表される長期シナプス可塑性が減弱していくことが明らかになった (図 1)。

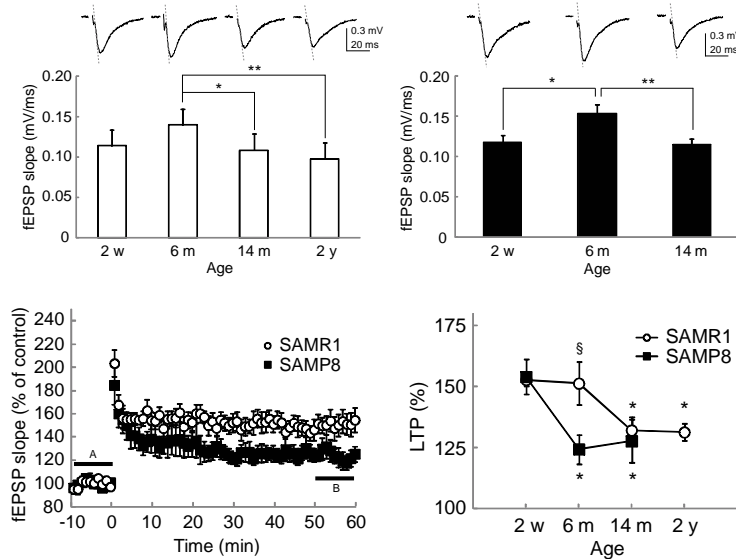


図1 海馬 Schaffer 側枝-CA1 錐体細胞間のシナプスにおける解析例 (左上) 対象群 (SAMR1; 2 週齢、6 か月齢、14 か月齢、2 年齢) における fEPSP の傾きの加齢性変化 (右上) SAMP8 (2 週齢、6 か月齢、14 か月齢) における fEPSP の傾きの加齢性変化 (左下) 6 か月齢における SAMR1 と SAMP8 の fEPSP の経時的変化。0 min の時点で高頻度刺激を行い LTP を誘導した (右下) 2 週齢から 2 年齢までの LTP の加齢性変化

LTP が加齢性に減弱する理由を探るため、以下の実験を行った。加齢に伴って酸化ストレスが上昇することが知られているが【引用文献 3、4】、SAMP8 を用いて新たな酸化ストレス評価法によって検討したところ、1 年齢の時点で両系統間で血中・脳内酸化ストレスに差が観察された。これはシナプス可塑性に差が見られた時期 (6 か月齢) より遅かった。これらのことから、LTP 減弱における酸化ストレスの関与は小さいと考えられた (図 2 左、中)。また、LTP に最も重要である NMDA 受容体の発現量を測定したところ、加齢性に発現量は変化しなかった (図 2 右)。

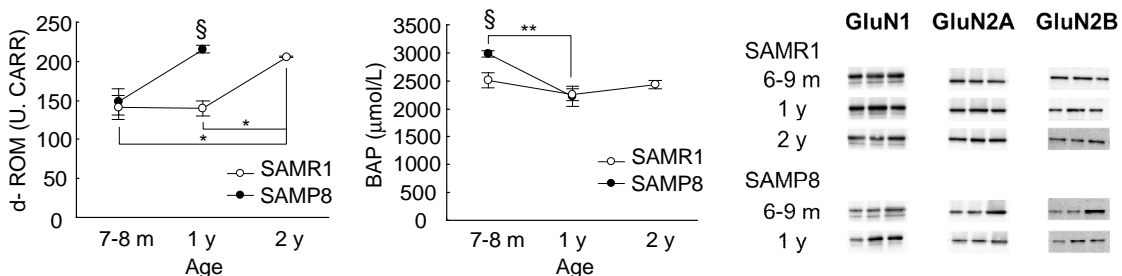
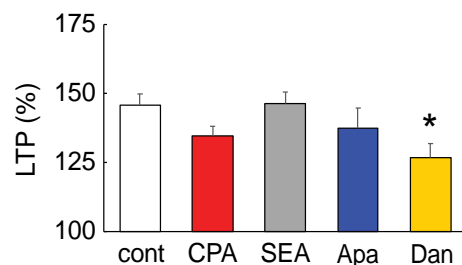


図2 血中酸化ストレスおよび抗酸化力の加齢性変化 (左) d-ROM 値 (ヒドロペルオキシド (ROOH) 濃度) (中) BAP 値 (Fe^{3+} を Fe^{2+} への還元力) (右) NMDA 受容体を構成するサブユニット発現量の加齢性変化

(2) 老齢個体と若齢個体では細胞内 Ca^{2+} 動態が異なることが明らかにされていることから、 Ca^{2+} ホメオスタシスを構成する Ca^{2+} 流入・放出系分子の役割について検討を行った。加齢とともに発現量・活性が増加するリアノジン受容体【引用文献 5】、同じく加齢性に発現量・活性が増大して NMDA 受容体を抑制する SK チャネル【引用文献 6】について、各々の阻害薬である Dantrolene および Apamin 存在下でシナプス伝達の変化を観察した。その結果、老齢・若齢ともにその波形には影響を与えなかったものの、LTP については若齢動物においてのみ Dantrolene 存在下で有意に減弱した (図 3)。これらの結果から、若齢個体においては Ca^{2+} ストア内に十分量の Ca^{2+} が蓄積されている一方で老齢個体においてはその蓄積量が減少している可能性が考えられた。

(3) Ca^{2+} ホメオスタシスを構成する Ca^{2+} 排出系分子の役割について検討を行った。海馬に豊富に発現し細胞膜上で Na^{+} と Ca^{2+} を交換輸送する NCX【引用文献 7】、 Ca^{2+} ストアへの再取り込みを担う SERCA【引用文献 8】について、各々の阻害薬である SEA 0400 と CPA 存在下でシナプス伝達の変化を観察した。その結果、いずれもシナプス伝達や LTP に影響を与えなかった (図 3)。(2) の結果と併せて考えると、今後は細胞内

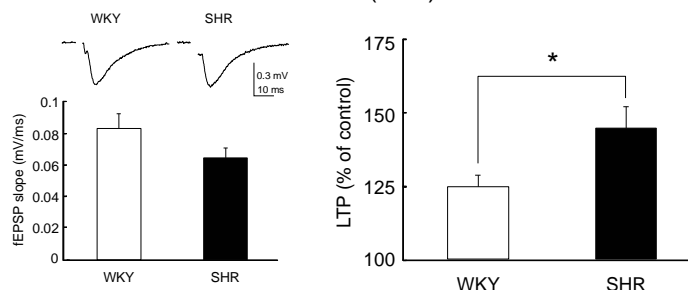


他の Ca²⁺結合タンパク質や SNARE 複合体などのシナプス小胞放出関連因子が関与を検討が必要であると考えられた。

図3 2週齢 C57BL/6J の海馬 CA1 シナプスの可塑性に対する各種阻害剤の効果

(4)近年高血圧の発症において Na⁺代謝に伴う細胞内 Ca²⁺動態の関与が指摘されている。自然発症高血圧モデル動物である Spontaneously hypertensive rat (SHR)を用いて認知機能との関連を検討した。その結果、対照群と比べて海馬における fEPSP の大きさや波形については差は観察されなかった一方で、LTP については SHR で有意に増強していた(図4)。高血圧動物においては Ca²⁺ホメオスタシスが破綻している可能性もあり、関連分子群による Ca²⁺ホメオスタシス制御の検討が必要だと考えられた。

図4 対照群(Wistar Kyoto; WKY)および SHR のシナプス伝達、可塑性の比較



本研究の成果により、加齢による脳機能低下について、シナプスレベルにおける機序および Ca²⁺ホメオスタシス関連分子群の役割の一端が明らかになり、加齢・疾患による認知機能低下の新たな創薬や予防への足がかりとなったと考えられた。

<引用文献>

1. Taniguchi S, Mizuno H, Kuwahara M, Ito K. Early attenuation of long-term potentiation in senescence-accelerated mouse prone 8. *Exp Brain Res* (2015) 233: 3145-3152.
2. Taniguchi S, Kuwahara M, Ito K. Chronic administration of N-acetyl-D-mannosamine improves age-associated impairment of long-term potentiation in the senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett* (2015) 598:41-46.
3. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* (1956) 11: 298-300.
4. Serrano F, Klann E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev.* (2004) 3: 431-443.
5. Arias-Cavieres A, Adasme T, Sánchez G, Muñoz P, Hidalgo C. Aging Impairs Hippocampal-Dependent Recognition Memory and LTP and Prevents the Associated RyR Up-regulation. *Front Aging Neurosci.* (2017) 9: 111.
6. Hammond RS, Bond CT, Strassmaier T, Ngo-Anh TJ, Adelman JP, Maylie J, Stackman RW. Small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel type 2 (SK2) modulates hippocampal learning, memory, and synaptic plasticity. *J Neurosci.* (2006) 26: 1844-1853.
7. Minelli A, Castaldo P, Gobbi P, Salucci S, Magi S, Amoroso S. Cellular and subcellular localization of Na⁺-Ca²⁺ exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat. *Cell Calcium.* (2007) 41: 221-234.
8. Earls LR, Bayazitov IT, Fricke RG, Berry RB, Illingworth E, Mittleman G, Zakharenko SS. Dysregulation of presynaptic calcium and synaptic plasticity in a mouse model of 22q11 deletion syndrome. *J Neurosci.* (2010) 30: 15843-15855.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)(総件数 4 件)

Son BK, Eto M, Oura M, Ishida Y, Taniguchi S, Ito K, Umeda-Kameyama Y, Kojina T, Akishita M. Low-intensity exercise suppresses C/EBP β /myostatin pathway through androgen receptor in muscle cells. *Gerontology*, 査読有, Epub ahead of print, 2019. DOI: 10.1159/000499826

Hashizume T, Son BK, Taniguchi S, Ito K, Noda Y, Endo T, Nanao-Hamai M, Ogawa S, Akishita M. Establishment of Novel Murine Model showing Vascular Inflammation-derived Cognitive Dysfunction. *Scientific Reports*, 査読有, vol. 9, 4023, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-40726-z

Taniguchi, S., Hanafusa, M., Tsubone, H., Takimoto, H., Yamanaka, D., Kuwahara, M., Ito, K. Age-dependency of the serum oxidative level in the senescence-accelerated mouse prone 8. *Journal of Veterinary Medical Science*. 査読有, vol. 78, 1369-1371, 2016. DOI: 10.1292/jvms.16-0204

〔学会発表〕(計 9 件)(総件数 12 件)

小倉 基嗣、谷口 紗貴子、安田 光祐、中島 綾香、鈴木 健吾、山中 大介、伊藤 公一、加齢性認知機能低下におけるユーグレナ含有物質の効果について、日本獣医学会学術集会、2018

Taniguchi S, Ogura M, Tanabe K, Yamanaka D, Ito K. Spontaneously Hypertensive Rat exhibits increased synaptic plasticity. Society for Neuroscience, 2018

Yasuda K, Ogura M, Taniguchi S, Nakashima A, Suzuki K, Ito K. Paramylon improves age-dependent impairment of spatial memory of the senescence-accelerated mouse prone 8. Society for Neuroscience, 2018

Taniguchi S, Hanafusa M, Tsubone H, Yamanaka D, Ito K. Age-dependent alteration of oxidative stress and expression level of glutamate receptors in senescence-accelerated mouse prone 8. Society for Neuroscience, 2017

谷口 紗貴子、田邊 築、小倉 基嗣、山中 大介、伊藤 公一、高血圧自然発症ラットにおける海馬 CA1 シナプス機能の電気生理学的解析、日本獣医学会学術集会、2017

田邊 築、谷口 紗貴子、小倉 基嗣、山中 大介、伊藤 公一、アダルトラットの記憶学習能におけるフェルラ酸長期投与の効果について、日本獣医学会学術集会、2017

Ito K, Taniguchi S, Hanafusa M, Tsubone H, Yamanaka D, Kuwahara M. Vanilline protects the hippocampal neuronal function from age-related deterioration. Society for Neuroscience, 2016

Taniguchi S, Takimoto H, Hanafusa M, Tsubone H, Yamanaka D, Kuwahara M, Ito K. Acetyl-L-carnitine improves age-dependent impairment of LTP of the senescence-accelerated mouse prone 8. Society for Neuroscience, 2016

谷口 紗貴子、山中 大介、伊藤 公一、桑原 正貴、海馬 CA1 シナプス活動に与えるバニリンの効果に関する検討、日本獣医学会学術集会、2016

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
食と生体機能モデル学研究室ホームページ
<http://webpark1838.sakura.ne.jp>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：谷口 紗貴子

ローマ字氏名：TANIGUCHI Sakiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。