

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590060

研究課題名（和文） 生体、組織内での認知症関連分子の作用

研究課題名（英文） Roles of molecules related to dementia was revealed in organotypic culture or in vivo

研究代表者

山田 麻紀 (YAMADA MAKI)

東京大学・大学院医学系研究科・客員研究員

研究者番号：00312281

研究成果の概要：

私たちは既に培養神経細胞を用い、BDNF やエストロジェンの抑制性神経細胞賦活作用を報告していた。これら分子の不足がともに認知症のリスクファクターだとする説があるため、生体内でも同様の作用を本研究課題にて確認した。また、BDNF を強発現する海馬錐体細胞がごく少数（5%まで）あるので、ある記憶の担当細胞は少数である可能性を考え、学習依存的变化やスパイン形態の解析などを通してそれを補強した。これらから認知症が抑制系の破れによる神経回路暴走にともなう病態である可能性を提示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：BDNF、抑制性神経伝達、女性ホルモン、神経活動、記憶

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、認知症をはじめとする多くの神経変性疾患の原因は、神経細胞が異常に死に至るという前提で研究されていた。しかし、近年の Transgenic Mice の結果では、（認知症をおこしやすくする）変異 APP の発現によって、細胞死に先んじて、神経細胞の機能低下が観察されている。ここで、私は、機能低下や細胞死を起こし

うる危険な分子 APP をなぜ生物が持っているのか、そもそも、疑問に思った。

私たちは既に、培養神経細胞を用いた研究では、BDNF や神経細胞が作るエストロジェン（女性ホルモン）が、抑制性神経細胞活性化の役割を担うことをつきとめて発表していた（J.Neurosci. 22:7580 (2002) Cereb.Cortex 15:291-8 (2005) J.Neurosci.Res. 84:1771-7. (2006) NeuroReport 17:1847-51.(2006). BDNF も

エストロジェンも、神経活動が高まると生成するといわれていたため、一見抑制が強まることは不可解な結果と見えた。

この現象の生理的メカニズムを考える上で、BDNF もエストロジェンも、その減少を認知症の原因とする説があることに注目し、以下のような作業仮説を立てた。

認知症でおきる細胞死や機能低下の仕組みは情報の上書きが起らないための神経回路システム防御反応ではないか？。

これは、Hasselmo という理論神経科学者の説をベースにしている (Neural Networks 1994;7;13 -) が、分子との関係で実験的に裏付ける研究はなく、オリジナリティーとしては BDNF やエストロジェンによる抑制強化現象が分子機構の一部である点である。この説は、つまり、以下のようなことである。普段、若年時は情報をかきこんだ興奮性神経細胞には抑制性神経伝達強化を使った仕組み (BDNF やエストロジェン等により) で同一細胞への情報上書きを防止しているが、加齢に伴う抑制性神経細胞死や、上記分子の不足によって、興奮性神経細胞の抑えが効かなくなった場合は、情報書き込み時の長期増強 (positive feedback) システムの結果、情報入力を受けた興奮性神経細胞が暴走をはじめることが濃厚である。こうした、暴走した神経細胞を抑える仕組みは、若年期には BDNF、estrogen による抑制系の制御であるが加齢による不全が起きると、APP が切断された Abeta がその役割を担うようになり、前記の APP 発現時に見られた興奮性神経伝達機能低下をまず起こす。そして、機能低下でも抑えきれない暴走細胞があれば排除 (認知症でみられる神経細胞死) もおこると考える。この説で、認知症に関連して 2009 年現在次々と報告されつつある不可思議な結果を矛盾なく説明できる。この仮説証明の第一段階として、減少が認知症の引き金となるとされる分子、BDNF (などの神経栄養因子) や神経細胞が作るエストロジェン (女性ホルモン) の中枢神経系での作用を解明し、抑制性神経細胞の機能を活性化している可能性を検証することが重要と考えた。

2 . 研究の目的

前述の説の前提となるのは、神経細胞に情報がコードされる仕組みとして全部の細胞に少しずつ、ではなく、一部の細胞群に集中的に、という形式であること、となるが、その証拠は研究開始時点ではほとんどなかった。(2009 年には Science323 ,1492 が出たが。)

そこで、この点について、生体脳内で、BDNF を強く発現する細胞が、入力依存的に変化するか、という手法で、解析した。まず、BDNF 強発現細胞が、情報をコードする細胞と関連があるのかどうかを支持する結果をもとめた。その上でさらに生体脳内でも BDNF が、抑制性神経伝達の活性化に働いているのか、あきらかにすることをめざした。

一方、エストロジェンについて、抑制性神経細胞活性化の効果が生体脳内でもあるのか、確認した。

3 . 研究の方法

(1) 海馬 CA1 錐体細胞など、一見、均一に見える細胞でも BDNF の発現をみると、強く発現する細胞がごく少数 (1 - 5 %) あることを既に見いだしていたので、学習により、その数が変化するか、増えた場合はその細胞に投射してくる抑制性入力が増強されるかどうか、生体脳内での状態を解析。

(2) また、上記研究に関連して、生体内で記憶をになう細胞が一部である可能性をより補強する方法として、活動依存的に遺伝子発現する分子 (BDNF、Arc など) を発現した細胞のスパインの形態が変化するか、計測。これは、近年シナプス可塑性と同時にスパインの大きさが変化するという invitro の結果に基づいて仮説立案した。

(3) 一方、エストロジェン (女性ホルモン) が実際に生きた脳の中で作られているのか、また、作られている分子種についても、エストロジオールなのか、なのか、諸説存在している。そこで、私たちはエストロジェン合成阻害薬物を直接脳に打ち込む方法を使って脳内のどの種のエストロジェンの量が減少するか、ガスクロマトグラフィーによる定量により、まず確認。そして、その減少が、抑制性神経細胞の状態に関わるか、また、個体の行動に影響を及ぼすのか、解明を試みた。

4 . 研究成果

(1) 海馬 CA1 錐体細胞中の BDNF 強発現細胞の数の変化を恐怖条件付け学習試行の後の脳切片免疫組織科学によって解析した。その結果、4 時間後には、BDNF 強発現細胞の数は約二倍に増えた。その増加は学習獲得を阻害する NMDA 阻害剤の

前投与によっておさえられた。また、同じ操作で電気ショックのタイミングを変えた場合（海馬依存性学習が起こらないとされる条件）でも増加しなかった。さらに、BDNF 強発現細胞の周囲の GAD65（GABA 合成酵素）の量が BDNF 発現強度と正の相関を持っていたことから、**BDNF の抑制性神経伝達賦活効果が生体内でもある**ことが推測できた。本成果は Neurobiol. Learn. Memory に発表した。BDNF 強発現細胞がごく少数（1 - 5%）であることから、**ある記憶を担当している細胞はごく少数である可能性が考えられた。**

（2）個体の探索活動により可塑的变化を起こしたと考えられるスパインの大きさの変化について解析。変化は Arc（活動した神経のマーカーとされる）発現細胞に選択的で、大きくなるものが数%ふえ、小さくなるか消えるかするものは元々小さいものに限って 10-30%程度見られた。一般にシナプス伝達の増強が起こる場合はスパインが大きくなると考えられているため、この結果は、**シナプスが学習で強化される場合は、主にごく少数（数%）でよい、**という可能性を提示した。この発見の論文は Cereb Cortex に発表し、Dr. Mayford の推薦により、Must read paper in Faculty of 1000 of Biology (BioMed) に選ばれた。

（3）雄ラットでも脳において、主要な女性ホルモンの異性体 **17 アルファ - エストラジオールが、エストロゲンとして作られること、** OpenField 滞在時間でみた **新規探索時の不安抑制**という中枢神経機能に効果があることも突き止めた。さらに、脳内での生理的エストロゲン合成阻害によって、主にシナプス領域の GAD65 の減量があり、**生体内でもエストロゲンが抑制性神経細胞の賦活化を**になっていると考えられた。これらの結果は投稿準備中である。女性ホルモンと認知症発症の関係には議論があり、本研究が一定の役割を果たすと考えられる。

他にも、以下のような業績を上げている。

1 海馬スライスカルチャーに BDNF を発現するレンチウイルスを局所適用した実験の結果より、BDNF は歯状回から海馬 CA3 に投射する苔状線維の走行に対し束状化を促し、BDNF 発現部位とは異なる部位に投射するよう作用していると考えられた。この結果は、海馬 CA3 - 苔状線維

の情報が BDNF の不足によって混乱する可能性を提示する。この領域の失調は、認知症にも、また、統合失調症にも関連するという可能性の報告がある。本発見は新しい見地から疾病理解を促進する可能性があり、急ぎ Mol Brain 誌に発表した。

2、一方、神経栄養因子の効果を強める可能性のある薬物の作用機序に関しての論文を J Pharmacol Sci に発表し、今後の創薬に新しい方向性を示せた。

5 . 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計7件)

1. Tamura M, Tamura N, Ikeda T, Koyama R, Ikegaya Y, Matsuki N, M.K. Yamada Influence of brain-derived neurotrophic factor on pathfinding of dentate granule cell axons, the hippocampal mossy fibers. **Mol Brain.** 2009 Jan 31;2(1):2. 査読有
2. Takuma Kitanishi, Yuji Ikegaya, Norio Matsuki, M.K. Yamada Experience Dependent, Rapid Structural Changes in Hippocampal Pyramidal Cell Spines **Cerebral Cortex**, in press 査読有
3. T. Kahyo, S. Ichikawa, T. Hatanaka, M.K. Yamada, M. Setou. A novel chalcone polyphenol inhibits the deacetylase activity of SIRT1 and cell growth in HEK293T cells. **J. Pharmacol. Sci.**, 2008 Nov;108(3):364-371 査読有
4. Y. Sugiura, S. Shimma, Y. Konishi, M.K. Yamada, M. Setou. Imaging Mass Spectrometry technology and the application on ganglioside study **Plos. Biol.**, 2008 Sep 18;3(9):e3232 査読有
5. M.K. Yamada, Y. Konishi, B. Kakinoki, K. Ikegami, M. Setou. Enhancement of Trk signaling pathways by a cholestane amide conjugate, MCC-257. **J. Pharmacol. Sci.**, 2008 Sep;108(1):131-4. 査読有

6. R. Koyama, R. Muramatsu, T. Sasaki, R. Kimura, C. Ueyama, M. Tamura, N. Tamura, J. Ichikawa, N. Takahashi, A. Usami, M.K. Yamada, N. Matsuki, Y. Ikegaya. A low-cost method for brain slice cultures. *J. Pharmacol. Sci.* 104:191. (2007). 査読有

7. J. Chen, T. Kitanishi, T. Ikeda, N. Matsuki, M.K. Yamada. Contextual Learning Induces an Increase in the Number of Hippocampal CA1 Neurons Expressing High Levels of BDNF. *Neurobiol. Learn. Memory* 88: 409-415 (2007) 査読有

〔学会発表〕(計 8件)

1. 北西 卓磨、山田 麻紀、池谷 裕二、松木 則夫 P20-A1-6 海馬シナプスにおける急速で一過性の経験依存的構造変化 日本薬理学会年会 2009年3月17日 神奈川県 パシフィコ横浜 Tamura,
2. 佐々木拓哉、小山隆太、村松里衣子、木村梨絵、上山千紘、田村誠、田村直寛、市川淳也、高橋直矢、宇佐美篤、山田麻紀、池谷裕二、松木則夫 経済的な脳スライス培養法, 第81回日本薬理学会年会(横浜)2008年3月19日、P31-08
3. 北西卓磨、池谷裕二、松木則夫、山田麻紀 海馬における経験依存的なスパイン構造の可塑性, 第81回日本薬理学会年会(横浜)2008年3月19日、P31-62
4. T. Kitanishi, Y. Ikegaya, N. Matsuki, M. K. Yamada Acute and coordinated spine reorganization in behaviorally activated neurons, Society for Neuroscience 2007年11月16日 Washington DC, USA
5. 北西卓磨、池谷裕二、松木則夫、山田麻紀 海馬における経験依存的な樹状突起スパインの可塑性, シナプス研究会「シナプスの形成と成熟の分子機序」(岡崎) 2007年12月6日、5日
6. M., Koyama, R., Ikegaya, Y., Matsuki, N. and Yamada, M.K. Brain-derived

neurotrophic factor (BDNF) expressed in granule cells regulates mossy fiber fasciculation: An analysis using lentivirus-mediated gene delivery. Society for Neuroscience 3rd Nov, 2007 San Diego

7. 田村誠、池谷裕二、松木則夫、小山隆太、山田麻紀、海馬苔状線維経路探索における脳由来神経栄養因子(BDNF)の役割 ~ レンチウイルスを用いた解析 ~ 第30回日本神経科学大会(横浜)2007年9月、P2-d15

8. 北西卓磨、野村洋、池谷裕二、松木則夫、山田麻紀、海馬における経験依存的なスパインの可塑性, 第30回日本神経科学大会(横浜)2007年9月、P3-b17

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 麻紀 (YAMADA MAKI)
東京大学・大学院医学系研究科・
客員研究員
研究者番号: 00312281

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし