

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16922

研究課題名(和文) 認知予備能メカニズムの解明に向けた、コリン作動性神経の新たな観点からの解析

研究課題名(英文) An analysis for the resolution of mechanism of cognitive reserve from the novel standpoint of cholinergic nervous system

研究代表者

水野 将行 (Mizuno, Masayuki)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：40748480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：内側中隔核から海馬に投射するコリン作動性神経は学習・記憶に重要である。海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチドHCNPは培養中隔核でアセチルコリンACh産生を促進する。最近、海馬神経活動を促進する活動がHCNPノックアウトマウスKOで低下していることを示し、HCNPが海馬で振動を発生させ、CA1上昇層でACh放出を促進すると考えられた。本研究で、KO中隔核ChAT陽性細胞数は著変ないが、KO海馬ACh濃度(マイクロダイアリシス法)・VAChT低下を示した。KOではシナプス小胞へのACh取込が低下していると考えられた。以上から、HCNPは中隔核-海馬のACh調節に重要な役割を担う可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HCNPによるAChを介したコリン作動性神経の賦活によって、海馬神経活動の維持に関与する可能性を示した。また、既存の治療薬であるコリンエステラーゼ阻害薬とは異なるメカニズムでAChを調整していることが考えられた。

我々はHCNPは加齢で減少していることを報告している。またHCNPを過剰発現するマウスでは、AD病理の一つであるアミロイドによる海馬神経活動の抑制を阻止できることも報告している。上記により、HCNP維持が海馬神経活動維持に関与する可能性が示され、またコリン作動性神経活動とアミロイド仮説を介して、CRメカニズムの一部が明らかになり、創薬の新たな分子標的になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The cholinergic efferent network from the medial septal nucleus (MSN) to the hippocampus (HIP) plays crucial role in learning and memory processes. Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) could induce acetylcholine (ACh) synthesis in the MSN of an explant culture system. We recently reported that theta activity in CA1, which could encode novel information, was reduced in HCNP KO mice, suggesting that HCNP is involved in generation of theta oscillations in the HIP and the enhanced release of ACh in the CA1 stratum oriens. Here, we confirmed the direct reduction of ACh concentration in the HIP of HCNP KO mice by using the microdialysis method. Whereas no significant difference in number of ChAT positive neurons in the MSN was shown, VAChT levels in the HIP were also lower than those in the control mice, suggesting decreased incorporation of ACh into synaptic vesicles. These results potentially indicate that HCNP may be a cholinergic regulator in the septo-hippocampal network.

研究分野：神経内科学

キーワード：認知予備能 アセチルコリン 海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド(HCNP)

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国にとって、認知症は解決せねばならない重要な疾患の一つである。認知症の最多の原因であるアルツハイマー病(AD)の根本治療は未だ無いが、ADの原因がアミロイド(A $\beta$ )蛋白の異常蓄積であるというアミロイドカスケード仮説が支持される。根本的治療に向けてA $\beta$ 蛋白を標的とした臨床試験がいくつも行われたが、残念ながら脳内のA $\beta$ 蛋白は減少するものの認知症の進行は止まらないことが分かった。孤発性ADにおいてはA $\beta$ 蛋白以外の因子も関与している可能性が否定できない。孤発性ADの発症には、ApoE蛋白 $\epsilon$ 4遺伝子・高血圧・糖尿病・頭部外傷などが関連し、また有酸素運動やダイエット、糖尿病や心疾患などの生活習慣病の治療が認知症の発症を減少させることが報告されている。これらからも孤発性ADの発症や予防には、多くの因子が関与することが考えられる。一方、A $\beta$ 蛋白蓄積や神経原線維変化などのAD病理変化を認めても認知症を発症しない症例が存在する(認知予備能:Cognitive reserve (CR)) (Stern Y, 2012 Lancet Neurol)。しかしながら、そのメカニズムは不明な点が多い。実臨床ではコリン作動性神経の賦活薬(ChoE 阻害薬)が認知機能を改善させる。この事実からコリン作動性神経の賦活を維持することが、CR機序と関連する可能性が考えられる。

申請者の研究室では、ラット海馬組織の可溶性成分より、アセチルコリン(ACh)の産生を促進するペプチド(海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド:HCNP)を発見した。さらに、このペプチドについて以下のことを明らかにしてきた(Ojika K, Matsukawa N, 2000, Prog Neurobiol)。

生体内の内側中核核のcholine-acetyltransferase(ChAT)量を増加させる、HCNP過剰発現は、アミロイドオリゴマーによる海馬の神経活動抑制を阻止できる、AD患者の海馬で極早期よりHCNP発現が低下する。

臨床的に、ChoE阻害薬は記憶を含めた認知機能を改善することから、海馬のグルタミン酸作動性神経に影響していると考えられるが、その効果は一時的である。

AD患者の脳では、コリン作動性神経の起始核である前脳基底野(内側中隔核)の神経細胞が脱落する。このことからChoE阻害剤の効果減弱は、疾患の進行に伴う前脳基底野のコリン作動性神経および海馬グルタミン酸神経の脱落・変性が一因と考えられる。しかし、その詳細は不明である。また、コリン作動性神経が脱落する機序も不明である。

CRメカニズム解明の観点から、コリン作動性神経調節の機序および神経保護メカニズム解明は重要な課題の一つである。

### 2. 研究の目的

海馬のグルタミン酸作動性神経の活動が抑制されることは記憶障害と密接に関連する。ADの主たる臨床症状は記憶障害であり、病態生理としては海馬を中心とした神経活動の障害と考えるのが妥当である。その障害の原因は、多くの研究からA $\beta$ 蛋白によるところが大きいと考えられる。しかしながら、実臨床ではA $\beta$ 蛋白量と認知機能が必ずしも相関しないという矛盾点がある。一方、臨床的にコリン作動性神経の賦活は一時的ではあるが記憶を含めた認知機能を改善することから、海馬のグルタミン酸作動性神経の活動に影響していると考えられる。

本申請では、アミロイドカスケード仮説の矛盾点を海馬での局所的な障害のみでなく、海馬へ投射する前脳基底野コリン作動性神経と海馬グルタミン酸作動性神経の相互作用によるネットワーク障害の観点から明らかにする。更には、HCNPがACh量の調整のみならず、コリン作動性神経の起始核の栄養因子として神経細胞の保護に関与していることも明らかにする創造性の高い試みである。CRの分子メカニズムが解明できれば、抗認知症薬の創薬の新たな標的となり、社会的に非常に重要な問題である認知症の診療に多大に貢献する可能性がある。そのため、期間内に以下の点を明らかにする。

HCNP発現抑制により、認知機能は障害されるか？

HCNP発現抑制により、海馬へ投射されるACh量は減少するか？

HCNP発現抑制により、中隔核のコリン作動性神経の細胞は減少するか？

### 3. 研究の方法

既に本教室で作成したHCNPコンディショナルノックアウトマウス(KO)と、同腹仔のcontrolを用いて、以下I~IIIの事項の解析と評価を行う。

#### I. 行動学的解析

記憶行動だけでなく、不安・うつ様行動など認知症に伴いやすいものも含めて解析する。

海馬ACh量をmicrodialysis法で検討する

エゼリン(フィゾスチグミン)負荷の環境下のmicrodialysis法により、海馬内のACh量を評価する。

### III. 中隔核コリン作動性神経の組織学的検討

蛍光免疫染色法により、連続切片にて内側中隔核における ChAT 陽性の神経細胞の数や大きさなどを数値化する。

#### 4. 研究成果

行動学的解析では、56 週齢で認知・不安・うつ様行動で両群間に有意差を認めなかった。

海馬 ACh 量的解析では 60 週齢で control 群と比べて KO 群で低下しており、さらにウェスタンプロット法で量的解析を進め、vesicular acetylcholine transporter: VAChT も KO 群で低下していることを示した。MS の ChAT の免疫組織学的解析では両群間に差を認めなかった。また KO 群では海馬コリン作動性神経の活動性が減少していること、海馬 CA1 での ChAT 陽性神経終末も減少していることを本教室より 2019 年に報告した。

上記の結果から、HCNP によって、ACh を介して海馬神経活動が制御される可能性を示したが、MS の ChAT 陽性細胞の保護作用を有するかは明確ではなかった。

予定した実験は計画通り遂行した。今回の結果より、CR メカニズムの一端を、HCNP によるコリン作動性神経活動の制御が関与する可能性を示せたものと考えられた。今後、CR のさらなるメカニズム解明が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Adachi K, Kato D, Kahyo T, Konishi T, Sato T, Madokoro Y, Mizuno M, Akatsu H, Setou M, Matsukawa N.	4. 巻 542
2. 論文標題 Possible correlated variation of GABA A receptor 3 expression with hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein in the hippocampus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 80-86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.01.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kondo-Takuma Y, Mizuno M, Tsuda Y, Madokoro Y, Suzuki K, Sato T, Takase H, Uchida Y, Adachi KI, Hida H, Borlongan CV, Matsukawa N.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Reduction of acetylcholine in the hippocampus of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein knockout mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 E22072
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01667-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤裕子
2. 発表標題 Acetylcholine is decreased in a hippocampus of HCNP-pp knockout mice
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤裕子
2. 発表標題 HCNP前駆体蛋白ノックアウトマウス海馬ではアセチルコリン量が低下している。
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------