

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500308

研究課題名（和文） 中隔・海馬コリン神経系の投射様式と変性過程の解析

研究課題名（英文） Analyses on the projection pattern of the septohippocampal cholinergic pathway and its degenerating process.

研究代表者

安原 治（YASUHARA OSAMU）

滋賀県立大学・人間看護学部・教授

研究者番号：80239772

研究成果の概要（和文）：

学習・記憶に関わる中隔-海馬コリン神経の機能、投射様式、変性過程を解析した。①ニューロン核内のアセチルコリン ACh 合成酵素(ChAT)の機能を解析したところ、ChAT は ACh 神経関連遺伝子の転写調節に関わることが明らかとなった。②ウイルスベクターを用いて、ラットの内側中隔 ACh 神経の投射様式を解析した。③中枢性 ACh 神経の神経伝達に関係するカベオリン 1 の発現を海馬傷害ラットで検討したところ、活性化ミクログリアに発現誘導が認められた。ACh 神経伝達への関与は実証できなかった。

研究成果の概要（英文）：

Dysfunction of the basal forebrain cholinergic system has drawn attention as a cause of cognitive deficits in human neurodegenerative diseases. In the present study, we tried to analyze functions, modes of projection, and degenerative processes of this cholinergic system. 1) To elucidate functions of nuclear choline acetyltransferase (ChAT; a synthesizing enzyme of acetylcholine), we investigated the alteration of candidate gene transcription by ChAT, and found that nuclear ChAT enhanced transcription of high affinity choline transporter gene. 2) The projection mode of septal cholinergic neurons was analyzed using sindvis virus vector. 3) Because caveolin 1 has been implicated in the central cholinergic transmission, its expression change was examined in kainic acid-induced hippocampal damage in rats. Expression of caveolin 1 was induced in activated microglia by kainic acid, while no evidence was found for any role of caveolin 1 in central cholinergic functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経回路網・コリン作動性神経

1. 研究開始当初の背景

前脳基底部のコリン作動性神経は認知・学習・記憶に深く関わっていることが知られており、その機能異常が認知・学習・記憶障害の神経基盤として注目を浴びてきた。とくにアルツハイマー病におけるコリン作動性神経の機能障害は、アルツハイマー病の「コリン神経仮説」として定着し (Spillane et al., 1977; Francis et al., 1999)、今日のアセチルコリン分解酵素阻害剤による治療に発展した。前脳基底部のうちでも内側中隔核のコリン作動性神経は、海馬歯状回の顆粒細胞やアンモン角 CA1-CA3 の錐体細胞に投射するため、とくに記憶への関与が深いと考えられている。

記憶の神経回路として、嗅内野浅層-海馬 (歯状回と CA1/3) -嗅内野深層の 3 シナプス興奮性回路、または 1 シナプス興奮性回路の重要性が指摘されている (Amaral and Witter, 1989; Jerrard, 1993; Shepherd, 2003; Squire et al., 2004)、したがって、海馬に投射する中隔-海馬コリン神経は、これらの記憶関連神経回路を調節することによって記憶の形成や固定に関わっているものと想像される。しかしながら、中隔-海馬コリン神経の機能や投射様式、およびその変性過程の詳細については、依然として不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、前脳基底部コリン作動性神経の機能、投射様式とその変性過程を解析する目的で、以下の実験を行った。

(1) アセチルコリンは中隔-海馬コリン作動性神経路で神経伝達物質として働く。しかし、アセチルコリン合成酵素 (コリンアセチル基転移酵素 choline acetyltransferase: 以下 ChAT) には核移行シグナルがあり、実際に ChAT の細胞核への局在が観察されている。この事実は、神経伝達における役割とは別に、アセチルコリンがニューロンの核内で何らかの機能を果たしていることを示唆しているが、その機能の詳細については不明である。そこで、前脳基底部コリン作動性神経の機能を解析する第 1 段階として、核内 ChAT の機能の解析を試みた。転写調節への関与を検証するために、ヒト ChAT 遺伝子を強制発現した SH-SY5Y 神経芽細胞腫培養細胞系を用いてアセチルコリン関連遺伝子の転写活性を検討した。

(2) 単一の内側中隔アセチルコリン神経の投射様式を解析する目的で、ウイルスベクター

による神経トレーシングを試みた。膜移行シグナルと蛍光タンパク質 GFP をコードする遺伝子組換え sindvis ウイルスベクターを内側中隔に微量注入して、単一ニューロンの描出を試みた。

(3) 前脳基底部コリン作動性神経の変性過程を解析するために、特異的なコリン神経毒である AF64A をラットの右側脳室に注入し、コリン系障害ラットを作成した。また、海馬ニューロンに細胞死をもたらす興奮性神経毒であるカイニン酸をラットに投与して、海馬傷害ラットを作成した。これらのラットに、アセチルコリン合成酵素を過剰発現させたヒト神経幹細胞を移植して、認知機能の改善を検討した。また、アセチルコリン神経伝達に関わる分子の変動を解析した。

3. 研究の方法

(1) ニューロンの核内における ChAT の機能を検討した。核内の ChAT は他の遺伝子の転写を調節している可能性がある。そこで、コリン神経の機能に不可欠である高親和性コリントランスポーター CHT と小胞性アセチルコリントランスポーター VChT を候補遺伝子として選び、ChAT による転写活性の変化を検討した。

① SH-SY5Y 神経芽細胞腫培養細胞にヒト ChAT-GFP 遺伝子を強制発現した。ウェスタンブロット法で ChAT 遺伝子の発現を確認し、ChAT アッセイで ChAT 酵素活性を確認した。さらに共焦点レーザー顕微鏡で ChAT の細胞内局在を検討した。この細胞系について CHT 遺伝子と VChT 遺伝子の発現をリアルタイム PCR で検討した。

② 対照として、GFP 遺伝子だけを発現させた細胞と何も発現させていない SH-SY5Y 細胞を用い、同様の検討を行った。さらに、ヒト ChAT 遺伝子に変異を導入した融合遺伝子を作成し発現させた。すなわち、酵素活性部位に変異を導入して、酵素活性を欠失させた ChAT 遺伝子、および ChAT の核移行シグナルに改変を加えた変異遺伝子を作成し、SH-SY5Y 細胞に発現させた。これらの細胞系を用いて同様の検討を行った。

③ 核内 ChAT の機能がニューロン特異的であるかを検討するために、非ニューロン性の HEK293 細胞に、ヒト ChAT-GFP 遺伝子、または GFP 遺伝子のみを発現させ、同様の検討を行った。

(2) 中隔-海馬コリン作動性神経の投射様式を解析するために、膜移行シグナル GAP43 と蛍光タンパク質 GFP をコードする遺伝子

組換え sindvis ウイルスベクターを成熟雄性ラットの内側中隔核に微量注入した。2日後に灌流固定して脳を取り出し、後固定、クリオプロテクション（15%スクロース含有液に2日間浸漬）の後、クリオスタット切片を作成した。GFP 蛍光観察の後、抗 ChAT 抗体（AB144p）を用いて蛍光免疫染色を行い、2重蛍光を観察した。投射様式の解析が可能な個体を選び、抗 GFP 抗体による免疫染色を行い、光顕顕微鏡下で観察した。

(3) 前脳基底部分コリン作動性神経の変性過程を解析するために、特異的コリン神経傷害ラットと海馬傷害ラットを作成し、以下の実験に供した。

(4) 中枢性コリン作動性神経の神経伝達には、カベオラ関連タンパク質であるカベオリン1が関与することが示唆されている (Gioiosa et al., 2008)。そこで、海馬傷害ラットと対照ラットの脳を用いて、カベオリン1遺伝子の発現とカベオリン1タンパク質の局在の変化を検討した。カイニン酸を腹腔内に投与して、海馬傷害ラットとした。①カイニン酸モデルラットと対照ラットの大脳皮質と海馬から、total RNA を抽出し、RT-PCR 法によってカベオリン1遺伝子の発現を検討した。②カイニン酸モデルラットと対照ラットの大脳皮質と海馬から、タンパク質を抽出し、ウェスタン・ブロット法によってカベオリン1タンパク質の発現を検討した。③カベオリン1抗体を用いる免疫組織化学法を行った。カベオリン1を含有する細胞種を同定するために、NeuN（ニューロン）、GFAP（アストロサイト）、CD11b（ミクログリア）などの各種細胞マーカーを用いて免疫蛍光2重染色を行った。

(5) 分担研究者の松尾は、他の研究グループとの共同研究によって、特異的コリン神経傷害ラットと海馬傷害ラットに、ChAT を過剰発現させたヒト神経幹細胞を移植し、学習・記憶機能の改善を検討した。特異的コリン神経毒である AF64A を片側の側脳室に注入して、特異的コリン神経傷害ラットを作成した。また、カイニン酸を同側の海馬 CA3 に注入して、海馬傷害ラットを作成した。ヒト神経幹細胞 (Lee et al., 2007; Kim et al., 2008) に ChAT 遺伝子を過剰発現させ、移植に用いた。それぞれのモデル動物について、認知障害の存在を確認した後、ChAT 遺伝子(+)ヒト神経幹細胞を側脳室に注入し移植した。移植してから一定の期間後（2-9週）に、実験動物の認知機能を検討した。対照群として、①神経毒（AF64A またはカイニン酸）の注入も移植も行わない無処置の対照ラット群、②神経毒（AF64A またはカイニン酸）を注

入し、移植を行わないラット群、③神経毒（AF64A またはカイニン酸）の注入の後、ChAT 遺伝子(-)ヒト神経幹細胞（ChAT 遺伝子を発現させていないヒト神経幹細胞）を側脳室に移植したラット群を作製し、比較検討した。学習・認知機能の評価には、受動回避反応とモリスの水迷路試験を用いた。学習・認知機能の評価を終えたラットは、灌流固定し、脳を取り出して、形態学的に解析した。

4. 研究成果

(1) ニューロンの核内における ChAT の機能
ヒト ChAT 遺伝子を過剰発現させた SH-SY5Y 細胞では、CHT 遺伝子の転写が増強していたが、VACHT 遺伝子の転写には変化がなかった。CHT 遺伝子の転写増強は、酵素活性を欠失した変異遺伝子や核移行シグナルを改変した変異遺伝子を発現させた場合には、認められなかった。また非ニューロン性の HEK293 細胞にヒト ChAT 遺伝子を過剰発現させた場合にも、CHT 遺伝子の転写増強は認められなかった。以上の結果から、ChAT はニューロンの核内で CHT 遺伝子の転写調節に関わることが明らかとなった。今後、ChAT が他の遺伝子の転写を調節するメカニズムとともに、ChAT によって転写調節される遺伝子群の詳細が明らかになれば、コリン神経系における機能調節のメカニズムや、ニューロン以外の細胞におけるアセチルコリンの役割に関して理解が深まるであろう。

(2) 中隔-海馬コリン作動性神経の投射様式
内側中隔コリン作動性神経の軸索終末は、主に歯状回とアンモン角 CA1-CA3（主に上昇層、錐体細胞層・放射状層）に分布していた。内側中隔の吻側-尾側方向、および内側-外側方向に部位局在的な投射傾向が観察されたが、注入部位別に解析するには、解析可能な描出成功例が少なく、定量的な解析には至っていない。今後、さらに例数を増やして、定量的に解析する予定である。

(3) 海馬傷害ラットにおけるカベオリン1の発現

カベオリン1免疫活性はニューロンには認められなかった。対照ラットの脳では、血管内皮にカベオリン1の局在が認められた。一方、カイニン酸全身投与による海馬傷害ラットでは、海馬や大脳皮質の活性化ミクログリアにカベオリン1の発現が誘導された。カベオリン1の遺伝子とタンパク質の発現は、RT-PCR 法とウェスタン・ブロット法によって確認された。アセチルコリン神経伝達への関与は実証できなかったが、組織修復へのカベオリン1の関与を示唆する所見と考え、報

告した (Takeuchi et al., 2013)。

(4) ChAT を過剰発現したヒト神経幹細胞の認知障害モデルラットへの移植

AF64A 注入による特異的コリン神経傷害ラットでも、カイニン酸注入による海馬傷害ラットでも、受動回避反応とモリスの水迷路試験を行うと、学習・記憶の著明な障害が認められた。これらの認知障害ラットに ChAT 遺伝子(+)ヒト神経幹細胞を移植したところ、学習・記憶レベルは無処置の対照ラット群のレベルにまで完全に回復した。ChAT 遺伝子を発現させていない ChAT 遺伝子(-)ヒト神経幹細胞の移植では、学習・記憶障害は改善されなかった。移植後、ChAT 遺伝子(+)ヒト神経幹細胞は大部分がニューロンに、一部がアストログリアに分化していた。以上の結果から、ChAT を過剰発現させたヒト神経幹細胞の移植は、認知障害モデル動物の学習・記憶の改善に有効であることが示された。したがって、ヒト神経幹細胞の移植による ChAT 遺伝子の発現誘導は、アセチルコリンの補充を目的とするアルツハイマー病患者の治療法の一つとして利用できる可能性がある。

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 4 件)

- ① Takeuchi, S., Matsuda, W., Tooyama, I., Yasuhara, O., Kainic acid induces expression of caveolin-1 in activated microglia in rat brain. *Folia Histochem. Cytobiol.* 51, 25-30, 3013. 査読有り. DOI: 10.5603/FHC.2013.004
- ② Park, D., Lee, H. J., Joo, S. S., Bae, D-K., Yang, G., Yang, Y-H., Lim, I., Matsuo, A., Tooyama, I., Kim, Y-B., Kim, S.U., Human neural stem cells over-expressing choline acetyltransferase restore cognition in rat model of cognitive dysfunction. *Exp. Neurol.* 234, 521-526, 2012. 査読有り. DOI 10.1016/j.expneurol.1011.12.040
- ③ Park, D., Joo, S. S., Kim, T.K., Lee, S.H., Kang, H., Lee, H. J., Lim, I., Matsuo, A., Tooyama, I., Kim, Y-B., Kim, S.U., Human neural stem cells overexpressing choline acetyltransferase restore cognitive function of kainic acid-induced learning and memory deficit animals. *Cell Transplantation* 21, 365-371, 2012. 査読有り.

<http://dx.doi.org/10.3272/096368911X586765>

- ④ Matsuo, A., Bellier, J-P., Nishimura, M., Yasuhara, O., Saito, N., Kimura, H., Nuclear choline acetyltransferase activates transcription of a high-affinity choline transporter. *J. Biol. Chem.* 286, 5836-5845, 2011. 査読有り. DOI 10.1074/jbcM110.147611

[学会発表] (計 1 件)

- ① Matsuo, A., Bellier, J-P., Nishimura, M., Saito, N., Yasuhara, O., Kimura, H., Nuclear choline acetyltransferase activates transcription of a high-affinity choline transporter. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, 2011, July 14-18.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安原 治 (YASUHARA OSAMU)
滋賀県立大学・人間看護学部・教授
研究者番号：80239772

(2) 研究分担者

松尾 明典 (MATSUO AKINORI)
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助教
研究者番号：20324585
松田 和郎 (MATSUDA WAKOTO)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：80444446

(3) 連携研究者

古田 貴寛 (FRUTA TAKAHIRO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：60314184