

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2019

課題番号：26430030

研究課題名(和文)加齢脳における長期記憶学習依存的な神経細胞死発生機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of mechanism of LTM-induced cell death in aged brains

研究代表者

松野 元美 (MATSUNO, Motomi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・主席研究員

研究者番号：90392365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴う長期記憶障害(LTM-AMI)がどのような機構で起こるのかについては未解明である。私達は既に加齢体で長期記憶に必要な神経・グリア回路の活性低下を見出していた。今回私達は(1)その結果、固定中のグルタミン酸トランスポーターの増加が抑制され、グルタミン酸シグナルが増加すること、(2)グルタミン酸シグナルの増加は固定中のドーパミン作動性(DA)神経の活動増加とアポトーシス関連因子カスパーゼ3活性化を引き起こすことを見出した。一方(3)記憶痕跡形成は正常であることを明らかにした。以上の結果よりLTM-AMIは記憶の形成障害ではなく、DA神経細胞の過剰興奮による固定障害であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

若齢脳における長期記憶形成では記憶形成時に上昇したグルタミン酸シグナルを、記憶形成後には一転して抑制する機構があることを示した。一方、加齢個体ではこの抑制機構が機能せず、その結果神経細胞の過剰興奮とアポトーシス関連因子カスパーゼ3活性化が引き起こされ、これがAMIの原因となることを明らかにした。長期記憶がリスクの上で形成されるという概念は新しい概念であり、若い脳にはこのリスクを低下させるグリア細胞を介した仕組みが存在することを示した。本研究で得られた知見はAMI研究および記憶形成におけるグリアの機能について新たな見解を与えらると思われる。

研究成果の概要(英文)：The cellular and molecular mechanisms underlying age-related LTM impairment (LTM-AMI) has been unclear. We previously found that aging inhibits the activity of neuron-glia circuits, which is required for LTM.

Here we show that (1) a defect in the activity of neuron-glia circuits during memory-consolidation suppresses up-regulation of glial glutamate transporter upon LTM induction, causing disinhibition of glutamate signaling. (2) The increase in glutamate signaling results in both hyperactivity and increased caspase3 activation in dopaminergic neurons during consolidation, causing LTM defects. We further found that (3) memory encoding is normal in aged flies. These results suggest that LTM-AMI is not due to a defect of memory encoding, but due to defects in memory consolidation caused by over-excited dopaminergic neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：加齢性長期記憶障害 グリア グルタミン酸シグナル カスパーゼ3 記憶固定

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢性記憶障害(Age-related memory impairment)は脳老化の重要な指標となっているが、その発症機構については不明な点が多い。ショウジョウバエでは加齢に伴い中期記憶と長期記憶の2つの記憶成分が特異的に障害されるが、少なくとも中期記憶AMIは酸化ストレスに依存しない脳老化によること、グリアのピルビン酸カルボキシラーゼの活性上昇によることが示唆されている(Hirano et al., 2012, Yamazaki et al., 2014)。一方、長期記憶AMIがどのような機構により生じているのか依然として手掛かりがないというのが現状であった。

一般に加齢個体の脳では顕著な神経細胞の脱落が観察されるが、ショウジョウバエの加齢脳では記憶障害を示していても、細胞脱落はほとんど見られない。ところが私達は長期記憶障害を示すショウジョウバエ加齢脳では長期記憶学習後に細胞死マーカー、TUNEL 陽性シグナルが増加することを見出した。加えて(1)グリア細胞接着因子 Klg、グリア転写因子 Repo によるグリア遺伝子発現増加が長期記憶形成に必要であること、(2)加齢体では Klg、Repo の発現が共に低下していること、(3)若齢体で Klg/Repo の活性を低下させると、加齢体と同様、学習後に TUNEL 陽性シグナルが誘導されることを見出した。これらの結果は(1)長期記憶学習が細胞死を誘導すること、(2)Klg/Repo 経路によるグリア遺伝子発現増加がこの抑制に関わること、を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、「加齢によるKlg/Repo経路の活性低下が長期記憶学習による神経細胞死を誘導し、長期記憶AMIを引き起こす」との仮説を立て、これを立証するため、以下の項目を解明していくことを目的とした。

- (1) Klg/Repo経路の活性低下が長期記憶AMIを引き起こすのか？
- (2) Klg/Repo経路はどのような遺伝子発現を制御することで、グリアの神経細胞死抑制機構を活性化するのか？
- (3) 長期記憶学習後の細胞死は長期記憶AMIの原因か？

3. 研究の方法

「加齢によるKlg/Repo経路の活性低下と長期記憶学習による神経細胞死」について明らかにするため、行動解析、分子生物学、生化学解析および免疫組織化学的解析を行なった。

(1) 行動解析

行動解析ではショウジョウバエに匂いと電気ショックを用いた連合学習を行わせ、記憶を定量化した。ショウジョウバエの長期記憶はトレーニングを15分の間隔をあけて繰り返し行うことで(spaced training)作られることがわかっている。一方、間隔なしの繰り返し学習(massed traininig)では遺伝子発現やタンパク合成によらない麻酔耐性記憶が作られる。このように異なる記憶を生み出すトレーニング方法を使い分け、記憶を調べた。

(2) 分子生物学、生化学解析

長期記憶学習後の遺伝子発現やタンパク合成についてはQ-PCRおよびWestern blottingを用いて解析を行った。

(3) 免疫組織化学的解析

長期記憶学習後の個体脳を固定し、免疫組織染色を行ったのち、共焦点顕微鏡を用いて取得した蛍光画像について定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) Klg/Repo経路の活性低下が長期記憶AMIを引き起こすのか？

予備実験において加齢体ではKlg, Repoの発現が共に低下していることがわかっていた。

Klg/Repo経路の活性低下が長期記憶AMIを引き起こすのか？明らかにするため、レスキュー実験を行った。KlgまたはRepoをグリア細胞特異的に強制発現しておく、長期記憶AMIは抑制された。また、ショウジョウバエでは加齢に伴い中期記憶と長期記憶の2つの記憶成分が特異的に障害される(中期記憶AMI, 長期記憶AMI)。次にこれら2種類のAMIが同じ分子機構で生じているか確認し、中期記憶AMIを抑制している変異体(PKA触媒部位をコードするDC0の抑制変異体DC0/(Yamazaki et al., 2007))でも長期記憶AMIは観察されることがわかった。以上の結果より、1 長期記憶AMIと中期記憶AMIの発症分子機構は独立したものであること、2 長期記憶AMIはKlg/Repo経路の活性低下により引き起こされることが示唆された。

(2) Klg/Repo経路はどのような遺伝子発現を制御することで、グリアの神経細胞死抑制機構を活性化するのか？

Klg/Repo経路の活性低下が引き起こす現象について理解するため、長期記憶学習後、この経路の標的因子として働く遺伝子を既知のグリア発現遺伝子の中より探索し、グリアグルタミン酸トランスポーターEAAT1を同定した。私達は1 EAAT1が長期記憶学習後特異的に発現増加すること、2 この増加はklg, repo変異体では抑制されること、3 eaat1変異体は長期記憶を特異的に障害していること、4 klg, repo変異体が示す長期記憶障害はEAAT1の強制発現によりレスキューされることを見出し、「長期記憶形成にはKlg/Repo依存性にEAAT1が発現増加することが必要である」ことを明らかにした。加えて、5 学習後のEAAT1発現増加は加齢体で抑制されていること、6 EAAT1のグリアにおける強制発現はKlg, Repoと同様、長期記憶AMIをレスキューすること、7 長期記憶学習後、記憶固定時特異的に薬剤によりグルタミン酸受容体を阻害すると(memantine, riluzole, MK801, (s)-4C3HPG投与による)、長期記憶AMIがレスキューされることを明らかにした。以上の結果は「加齢体では記憶固定時にグルタミン酸トランスポーターEAAT1の発現増加が十分起らず、グルタミン酸活性を抑制できないために記憶障害を生じること」を示唆している。

(3)-1 長期記憶学習後の細胞死は長期記憶AMIの原因か？

グリアのグルタミン酸トランスポーターは細胞外のグルタミン酸を取り込み、神経の過興奮・細胞死(アポトーシス)を防いでいると考えられている。加齢個体ではEAAT1が十分増加しないため、長期記憶学習後に脳内のグルタミン酸活性が増加、神経の興奮性とその結果生じるアポトーシスが増加している可能性がある。そこで「細胞死(アポトーシス)は長期記憶AMIの原因か？」明らかにするため、長期記憶AMIをレスキューしている個体でアポトーシスがレスキューされているか？ TUNEL染色法による確認を行うことにした。しかし、当初の予想に反しTUNEL染色法が微細な反応条件の影響(パラフィン包埋など)を受けて容易に安定せず、定量解析に時間がかかるため、先に行動学を用いた別方法に切り替え確認を行った。具体的には細胞死(アポトーシス)を抑制すると長期記憶AMIがレスキューされるか2つの実験により示した。1 全脳でアポトーシス実行因子であるカスパーゼ3(cas3)の抑制因子p35を強制発現させると長期記憶AMIはレスキューされた。2 学習後、記憶固定時特異的にcas3インヒビター(Z-DEVD-FMK)を投与すると長期記憶AMIはレスキューされた。これらの結果は「長期記憶AMIの原因が記憶固定時のcas3活性上昇である」ことを示唆している。

(3)-2 長期記憶AMIはどのような種類の細胞がcas3活性化の影響を受けたためなのか？

初めに「記憶を担っている細胞がcas3活性上昇の影響を受けたためか？」記憶を担う記憶痕跡細胞数を可視化、計測を行った(長期記憶学習後にcAMP応答性因子CRTCが核移行している細胞を可視化する方法(Hirano et al., 2013)または最初期遺伝子c-fosプロモーターを用いて、学習後にレポーター遺伝子を誘導した細胞を可視化する方法(Miyashita et al., 2018)を使用した)。その結果、記憶痕跡細胞形成数は若齢体と加齢体で差がなく、「記憶形成そのものは正常であり、長期記憶AMIの原因がcas3活性上昇による記憶痕跡細胞の消失ではない」ことが示唆された。

次に「どの細胞がcas3活性化の影響を受け、長期記憶AMIを引き起こすのか？」を知るため、脳内の様々な細胞種特異的にcas3抑制因子p35を強制発現させ、どの細胞のcas3活性を抑えると長期記憶AMIがレスキューされるか？行動実験を用いたスクリーニングを行なった。その結果、ドーパミン作動性神経のサブセットMB060Bでcas3の活性を落とすと有意にAMIはレスキューされることがわかった。一方、他のドーパミン作動性神経サブセットやグルタミン酸作動性神経、グリア、記憶中枢のキノコ体神経細胞などでcas3活性を抑制してもAMIのレスキューは見られなかった。さらに(A)加齢個体脳では長期記憶学習後に実際にMB060Bドーパミン作動性神経の興奮性が増加し、cas3が活性化していること、(B)これらがEAAT1の強制発現または記憶固定時のグルタミン酸受容体阻害薬投与でグルタミン酸活性を抑えると抑制されることを免疫組織染色法により確認した(神経活動マーカー、リン酸化S6rp抗体、cas3活性レポーターまたは活性化cas3抗体を使用)。加えて、(C)MB060Bドーパミン作動性神経の活動を記憶固定時特異的に化学遺伝学的手法により抑制すること、または(D)MB060Bへのグルタミン酸入力をNMDA受容体のノックダウンにより抑制することでも長期記憶AMIがレスキューされることを明らかにした。以上の結果は「長期記憶AMIの原因が記憶固定時のMB060Bの過興奮とそれによるcas3活性化であること」を示唆している。

予想に反し、加齢個体では長期記憶学習後、MB060Bドーパミン作動性神経細胞でcas3が活性化するが、細胞数の有意な減少は検出できなかった。これを支持する結果としてアポトーシス初期マーカーAnnexinVもMB060Bドーパミン作動性神経において有意な増加は見られなかった。研究開始当初にはTUNELシグナルの増加から長期記憶関連細胞の学習後の細胞死を推定していたが、cas3を活性化するものの細胞死まではいかず、「cas3活性化による非細胞死機構を介したMB060Bドーパミン作動性神経の機能障害が長期記憶AMIを引き起こしている可能性」が示唆された。

以上より、

1. 加齢体ではKlg/Repo経路の活性が低下しているため、記憶の固定時にグリアのEAAT1の発現増加が十分起こらず、増加したグルタミン酸活性を抑制できないこと
2. グルタミン酸シグナルの増加は記憶固定中にMB060Bドーパミン作動性神経の過興奮とcas3活性化を引き起こすこと
3. 記憶痕跡形成は正常であり、細胞数の減少は見られないこと

より、「長期記憶AMIは記憶の形成障害ではなく、MB060Bドーパミン神経細胞の過剰興奮による固定障害であること」が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuno M, Horiuchi J, Ofusa K, Masuda T, Saitoe M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Inhibiting Glutamate Activity during Consolidation Suppresses Age-Related Long-Term Memory Impairment in Drosophila.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 55-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2019.04.014.	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 Matsuno M, Horiuchi J, Yuasa Y, Ofusa K, Miyashita T, Masuda T, and Saitoe M	4. 巻 35
2. 論文標題 Long-Term Memory Formation in Drosophila Requires Training-Dependent Glial Transcription	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 5557-5565
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.3865-14.2015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki D, Horiuchi J, Ueno K, Ueno T, Saeki S, Matsuno M, Naganos S, Miyashita T, Hirano Y, Nishikawa H, Taoka M, Yamauchi Y, Isobe T, Honda Y, Kodama T, Masuda T, and Saitoe M	4. 巻 84
2. 論文標題 Glial dysfunction causes age-related memory impairment in Drosophila.	5. 発行年 2014年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 753-763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松野元美, 上村望, 堀内純二郎, 大房京子, 齊藤実
2. 発表標題 加齢性長期記憶障害は学習後の固定ドーパミン作動性神経の過剰興奮により生じる
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松野元美、堀内純二郎、大房京子、齊藤実
2. 発表標題 記憶固定時のドーパミン作動性神経の過剰活性化が加齢性長期記憶障害を引き起こす
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松野元美、齊藤実
2. 発表標題 加齢性長期記憶障害は記憶固定時のドーパミン作動性神経の過剰興奮により生じる
3. 学会等名 「次世代脳」冬のシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松野元美、堀内純二郎、大房京子、齊藤実
2. 発表標題 Age-related impairments in long-term memory are caused by excess dopaminergic activity during memory consolidation.
3. 学会等名 第40回日本神経科学学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松野元美、堀内純二郎、齊藤実
2. 発表標題 Excess neural activity after spaced training disrupts long-term memory in aged Drosophila.
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Junjiro Horiuchi, Motomi Matsuno, Tomoko Masuda and Minoru Saitoe
2. 発表標題 Glial regulation of age-related memory impairment in Drosophila.
3. 学会等名 Janelia Conference, Learning and Memory: A Synthesis of Bees and Flies, (招待講演)
4. 発表年 2014年

1. 発表者名 松野元美、堀内純二郎、齊藤実
2. 発表標題 Aging reduces glial protection from memory-induced cell death
3. 学会等名 第37回 日本分子生物学会
4. 発表年 2014年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人 東京都医学総合研究所 学習記憶プロジェクト http://www.igakuken.or.jp/memory/

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