

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640031

研究課題名(和文) 神経変性疾患における神経ネットワーク恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Homeostatic plasticity mechanisms against neurodegenerative disease

研究代表者

齋藤 直人 (Saitoh, Naoto)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：90334226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病を題材にして、予防戦略の新たなアイデアを提供することを目的とする。Abの急性の効果が現れないような実験条件で、培養神経細胞ネットワークにAbペプチドがどのように作用するのかを解析した。100NMのAbを投与1週間後では、37℃ではAbとコントロールとの間に発火頻度の差はないが、測定温度を下げると(28℃) Ab投与群のみ発火頻度が減少した。Ab毒性に対する恒常性維持機構には温度依存性があることが考えられた。ヒトにおいて加齢に伴ってAbが蓄積しつつも、認知症症状を呈さないための内因的防御メカニズムが存在するはずであり、以上の結果がその分子機序の解明に繋がると考えている。

研究成果の概要(英文)：I have focused on the mechanisms of the neurodegenerative disease. Especially, the relation between Ab toxicity and neuronal homeostatic plasticity is the most important issue in this work. Ab is the well-known molecule for the cause of Alzheimer's disease. After hippocampal primary culture got network activity, Ab was applied to the culture media. Ab has no acute effect on the cultured neuron activity. In several days, though, Ab diminished the presynaptic size both of excitatory and inhibitory synapse. Network activity is not changed at 37C, but changed at 28C. These results indicate temperature-sensitive homeostatic plasticity rescued from the toxicity of Ab in the experimental condition. In addition, BDNF might completely eliminate the toxicity of Ab, so there was no network activity change.

研究分野：神経科学

キーワード：神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

本研究においては、神経変性疾患の代表例として、アミロイドペプチド(A β)の神経細胞毒性を扱う。A β は家族性アルツハイマー病の原因遺伝子産物由来のペプチドであり、そのオリゴマー化、蓄積を介した神経細胞脱落モデルが発症機序として提唱されている(A β 仮説)。また、A β は後シナプスのグルタミン酸受容体の減少を促し、シナプス伝達を抑制することが報告されている(Hsiehら *Neuron* 2006)。また、P/Q型カルシウムチャンネルを抑制する可能性も示唆されている(Nimmrichら *J. Neurosci.* 2008)。このことから、A β の作用には神経細胞死をもたらす以前に、シナプス伝達に対して抑制作用があると考えられる。しかし、これらの実験はA β の急性作用を調べたものであって、A β の慢性的作用には別のメカニズムが働いている可能性がある。また、急性作用を見るときに用いられる μ MレベルのA β 濃度は、脳脊髄液中のnMレベルの内在性A β 濃度からはかけ離れた濃度である。

神経細胞を分散培養したときに出来る神経細胞ネットワークには、ネットワーク内の活動レベルを一定レベルに調節する恒常性維持機構が存在する。外因的に自発発火頻度を変動させられても、それに応じた分子機序によって自発発火頻度が元のレベルに再調整されよう動く。この発火頻度を指標とした神経細胞ネットワークの恒常性維持機構は、脳神経ネットワークにおける情報処理システムの堅牢性を保証する上で重要である(TurrigianoとNelson *Nat Rev Neurosci.* 2004)。

2. 研究の目的

アルツハイマー病を題材にして、神経変性疾患の予防戦略に新たなアイデアを提供する。A β 仮説に則り、人工神経細胞ネットワークにA β ペプチドがどのように作用するのかを解析する。ただし、神経細胞死やA β の急性の効果が現れないような実験条件に設定する。このような実験条件下では、A β の慢性効果のみを切り出すことが出来、そしてA β の慢性効果(毒性)を打ち消すように、神経細胞ネットワークの恒常性維持機構が働くと考えられる。ヒトにおいては加齢に伴ってA β が蓄積しつつも、認知症症状を呈さないための内因的防御メカニズムが存在するはずであり、このような実験条件がヒトの対神経変性疾患分子機序の実験的再現に繋がると考えている。このため、上記恒常性維持機構の細胞分子機序を解析し明らかにする。

3. 研究の方法

神経ネットワークのモデルとして、海馬初

代培養系を用いる。カバーグラス上に分散培養した神経細胞にFluo-4 AM等のカルシウム指示薬をロードし、自発発火に伴うカルシウム応答を測定する。カルシウム応答の大きさと頻度を自発発火頻度に相関した指標として扱い、A β 投与時の恒常性維持を評価する。

海馬初代培養

胎生16日から18日のマウス胎仔から海馬を取り出し、パパインで分散処理後、poly-D-lysineでコートしたカバーグラスに分散培養する。海馬初代培養系は恒常的可塑性メカニズムとしてsynaptic scalingが報告されている標本でもある(StellwagenとMalenka *Nature* 2006)。予備実験によって、div18以降に、自発発火頻度が安定することが分かっている。このため、培養3週目以降にA β の投与などは行う。海馬初代培養系で研究推進上問題が生じた場合には、大脳皮質初代培養系も検討する。

カルシウム応答イメージング

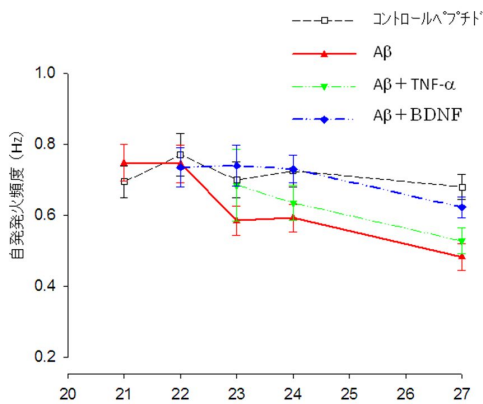
Fluo-4やFluo-8等のAM体をローディングすることによって、カルシウム応答のイメージングを行う。パッチクランプ法のon-cell記録で活動電位をモニターすることによって、発火頻度とカルシウム応答との相関を求めておく。カルシウム指示薬によるリアルタイムイメージングで十分な相関が得られないときは、カルシウム感受性蛍光タンパク質(GCaMP6など)や膜電位感受性蛍光タンパク質のトランスジェニックマウスを用いることも検討する。

A β の神経細胞毒性

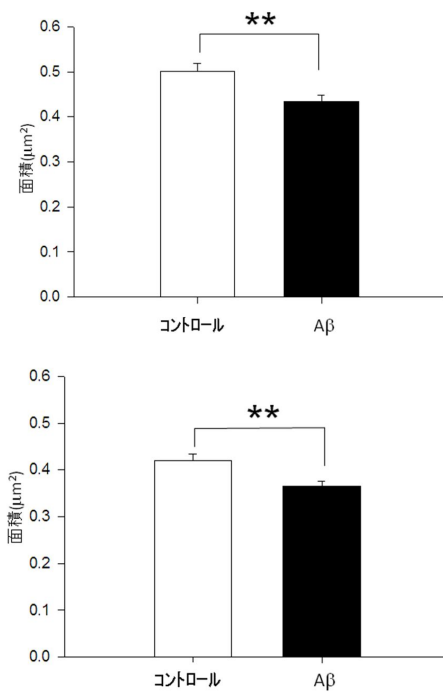
A β にも複数存在するが、神経細胞毒性を示す主要な分子として考えられているA β (1-42)のペプチドを用いて検討する。ネガティブコントロールペプチドとしてはA β (42-1)を用いる。1nM~100nMのレンジで実験条件を設定する。

4. 研究成果

1nM~1000nMまでの範囲でA β を慢性的に投与しても、神経細胞死など顕著な細胞毒性は示さなかった。100nMの条件下で急性の効果を検討したところ、自発発火頻度に対して影響は示さなかった。以上の結果から、100nM以下のA β は急性の神経細胞毒性は示さないと考えた。このような実験条件下では、A β の慢性効果(毒性)を打ち消すように、神経細胞ネットワークの恒常性維持機構が働くと仮説を立て、検討を行った。100nMのA β を投与後1週間たった時点では、培養温度と同じ37℃ではA β とコントロールペプチドとの間に発火頻度の差は生じないが、測定温度を下げると(28℃)A β 投与神経細胞ネットワークのみ発火頻度が減少した。このことからA β 毒性に対する恒常性維持機構には温度依

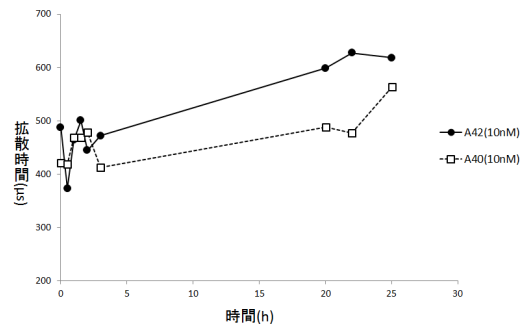


存性があることが考えられた。このときの、シナプスの形態的特徴を解析する目的で、VGluT1 (興奮性シナプス) と GAD65 (抑制性シナプス) の蛍光抗体染色を行った。この結果、A を慢性投与しても、興奮性/抑制性シナプス比は変化しなかった。一方、シナプスのサイズを染色像から検討すると、A 慢性投与によってシナプスサイズが減少することが示唆された。この結果は、A が LTD を引き起こすという先の報告に合致する。



シナプスの総数に関しても減少傾向はあったが、有意差はなかった。ヒトにおいて加齢に伴って A が蓄積しつつも、認知症症状を呈さないための内因的防御メカニズムが存在するはずであり、以上の結果がその分子機序の解明に繋がると考えている。ただし、これまで A の分子状態に関しては不問のまま、実験を行ってきた。しかし、オリゴマー化した A がこそが、細胞毒性を示す分子実体であるとする仮説および報告がなされている。そこで A のオリゴマー化を定量的に評価する必要があると考えた。そこで、溶液中の A オリゴマー化に関する評価系の立ち上

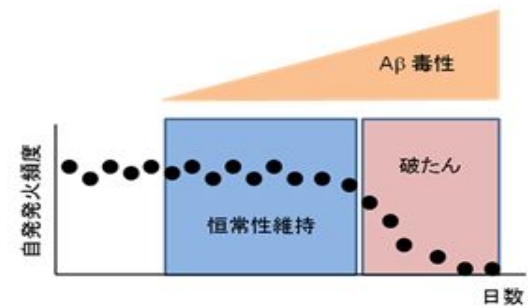
げを行った。実際には蛍光相関分光法 (FCF) により、蛍光ラベルされた A を用いて行った。条件検討の結果、およそ 1 日かけてオリゴマー化が進行すると考えられたが、今後さらなる検討も必要である。



本研究課題において A の神経細胞ネットワークに対する効果に関して、新たな側面を明らかにすることが出来た。興奮抑制バランスに関しては、予想に反して差が無いという結果になった。内在性の BDNF の効果の結果、バランスが崩れずに保っているのかも知らない。

人は自身の恒常性を維持している間は健康であるといえる。ただしその間も生体は、何も外的要因等に対処していないのではなく、積極的な対処の結果として恒常性を維持している。そして、その恒常性を維持できないほどバランスを崩したときに病気になるのだ。神経変性疾患の場合、発症したときにはすでに症状が進行している、という問題や、発症後の根本的な治療は非常に難しく、症状の軽減や進行を遅らせることが精一杯であるという現実がある。そこで、発症前の「予防」こそが重要であるといえる。アルツハイマー病においても、早期の診断方法や診断マーカーの探索が行われている。一方、予防方法に関しては、危険因子の探索 (A の蓄積を促進する) か、発症メカニズムに基づく戦略 (A の蓄積を阻害する) があげられるが、この発症で予防効果を期待できるような積極的な方法論は確立できていない。

成人してから以降、A は漸増的に蓄積し、ある一定レベルに達するとシナプス伝達などの神経機能障害が現れ、その後神経細胞死を引き起こし、認知症が進行するという仮説 (A 仮説) が広く受け入れられている。本研



Aβ 毒性と神経ネットワーク恒常性の経時変化

究課題では A が蓄積しつつも神経機能障害が現れる前の段階のメカニズムに焦点を当てる。この発症前段階においては、A の毒性に抗って神経ネットワークの恒常性が維持されているメカニズムがあると仮説を立てた。神経ネットワークの恒常性として、実験的に測定可能な指標である自発発火頻度が一定の頻度に調節されるメカニズムを扱う。A の毒性によって、シナプス伝達が軽微に阻害されたとしても、または少数の神経細胞が脱落したとしても、神経ネットワーク全体として自発発火頻度が一定値をとるように、全体のシナプス伝達効率を上昇させたり、興奮・抑制シナプスバランスを調節する恒常性維持機構が働いているだろう。

そして、脳神経ネットワークの恒常性が維持されている限りにおいては、認知症は発症しないと考えている。このため、A 毒性に対する神経ネットワーク恒常性維持機構を解析することで、新規の予防戦略を提供できるものと考えている。たとえば、神経ネットワーク恒常性維持機構をサポートするような薬剤を投与する、または恒常性維持機構そのものを活性化させる、などである。BDNF などは前者の効果が期待できる候補分子と考えられる。A 毒性に対する恒常性維持機構の分子メカニズムを解析することは、予防戦略の足がかりを作る上で重要であると考えている。さらに、ここで得られた知見は、他の神経変性疾患（パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症など）の予防戦略にも応用可能であり、その意味で多方面に貢献できる波及効果が期待出来るものと確信している。

日本での認知症高齢者は 200 万人を超え、30 年後にはほぼ倍増すると予想されている。確かな予防戦略を打ち出すことは急務である。医科学分野において基礎研究だけで行えることは限られているだろう（ヒトにおいて数十年かけて進行する病気を、たかだか数年の基礎研究の中で完全に再現することはほぼ不可能だろう）が、本研究課題の知見を着実にステップアップし、次に繋げていくことこそが重要であるとも考えている。

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）

〔学会発表〕(計 1 件)

2015.12.02 BMB2015. (Kobe) Dual-color imaging of cyclic nucleotides and calcium. Naoto Saitoh, Seiko Kawata, Shinya Masuoka, Ryo Watanabe, Tetsuya Hori

6 . 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 直人 (Saitoh, Naoto)
同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：90334226

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：