

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08010

研究課題名(和文)アルツハイマー病態モデル神経細胞解析：初期シナプス機能不全に着目した研究

研究課題名(英文)Analysis of Alzheimer's disease model neurons focusing on synaptic dysfunction

研究代表者

小金澤 紀子 (Koganezawa, Noriko)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90643114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病は記憶障害に端を発しその後様々な認知機能障害が進行するが、その認知機能障害の程度とシナプス機能不全がよく相関することが報告されている。従って興奮性シナプスを構成する樹状突起スパインに着目したアルツハイマー病におけるシナプス機能不全の実態解明が重要である。本研究ではアルツハイマー病のスパインレベルでの詳細な解析を行うために新規モデルマウスを作成し、in vitroでの解析系を開発した。スパインに局在するタンパク質であるドレブリンに着目した解析を行い、スパインからドレブリンが消失することがシナプス機能不全につながる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病脳のシナプス機能不全の実態はその検証があまり進んでいない。本研究ではモデル神経細胞を用いてin vitro解析系を開発し、スパインレベルでの解析を可能とした。今後、さらに検証を進めることでアルツハイマー病におけるシナプス機能不全の実態を明らかにすることができると期待される。さらに本研究では、ドレブリンをシナプス機能マーカーとし、医薬品のシナプス機能安全性評価などへ応用可能なシナプス機能評価のハイスループット化を実現させた。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease causes cognitive dysfunction such as dementia, and it is reported that the degree of cognitive dysfunction correlates with synaptic dysfunction. It is important to reveal the synaptic dysfunction in Alzheimer's disease focusing on dendritic spines, because they are the main structures of excitatory synapses. To study Alzheimer's disease focusing on dendritic spines, a new animal model of Alzheimer's disease was made in this study. In addition, as an in vitro analysis system is necessary to study the dendritic spine level of the disease, in vitro high-content imaging analysis system was established. Drebrin, an actin-binding protein that accumulates at dendritic spines, is a good marker for synaptic states. The dendritic spines of cultured neurons from a new animal model of Alzheimer's disease were analyzed focusing on drebrin. It is suggested that the exodus of drebrin from dendritic spines causes synaptic dysfunction.

研究分野：神経科学

キーワード：樹状突起スパイン ドレブリン ハイスループット解析

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は記憶障害に端を発し、その後様々な認知機能障害が進行する。病理変化はアミロイドβ (Aβ) の蓄積 (老人斑)、タウタンパク質の異常リン酸化による神経原線維変化、そして細胞死が主に挙げられる。しかしながら死後脳解析によると、Aβ量や老人斑の増加、細胞死よりもシナプス機能不全の方が認知機能障害の程度と相関することが報告されている (Terru et al., 1991)。このシナプス機能不全は細胞死よりも早い段階で起きていると考えられるがその実態は不明な点が多い。従って、興奮性シナプスを構成する微小構造物である樹状突起スパインに着目したシナプス機能不全の実態解明が重要である。

樹状突起スパインの形態変化は認知機能に大きな影響を及ぼすが、その形態変化を担っているのがアクチン線維であり、アクチン重合が阻害されるとその形態変化は阻害される (Fischer et al., 1998)。アクチン線維はアクチン結合タンパク質の一種であるドレブリン (Shirao and Obata, 1985) と結合することで安定化し、スパインはその形態を長期間維持することができるようになる (Koganezawa et al., 2017)。一方ドレブリンが少なくなるとアクチン線維の重合・脱重合が促進し、形態が変化しやすいスパインとなり記憶形成・保持に障害を来すと考えられる。ドレブリンは加齢とともにゆるやかにその発現量が減少するが (Hatanapää et al., 1999)、アルツハイマー病患者の死後脳解析では海馬や大脳皮質を中心に著しい発現低下が認められている (Harigaya et al., 1996)。加えて軽度認知機能障害の患者においても、ドレブリン発現量の低下が認められている (Counts et al., 2006)。つまり、ヒト脳においてドレブリンの発現量減少の異常亢進は認知機能障害と関係することが示唆されている。アルツハイマー病脳においてはドレブリン異常減少により安定なアクチン線維が減り、安定なスパインと不安定なスパインのバランスが崩れシナプス機能不全を引き起こし、すなわちアルツハイマー病の初期症状である記憶障害の発症につながるのではないかと考えられる。

### 2. 研究の目的

アルツハイマー病早期におけるドレブリンの異常減少が安定なスパイン数を減らし、認知機能障害を引き起こすと考えられることから、本研究では安定なスパインを構成するドレブリンに着目し、アルツハイマー病のスパインレベルでの病態を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

スパインレベルでの詳細な解析を行うためには *in vitro* での解析系を開発することが必至である。アルツハイマー病の病態解明のため、これまでに多くのモデル動物が作成されており (Sasaguri et al., 2017)、こうした動物の脳でもヒトアルツハイマー病脳と同様にドレブリン発現量の減少は報告されている (Calon et al., 2004)。しかしながら、モデル動物でのドレブリン発現量減少はヒトにおけるそれに比べて弱く、ヒトで見られるドレブリン減少の異常亢進とまでは言えないのが実情である。そこで本研究では、従来開発されてきたモデルマウスとドレブリンノックアウトマウスを掛け合わせ脳内のドレブリン発現を消失させ、ヒトにおける病態に近づけた。既存のアルツハイマー病モデルマウスとドレブリンノックアウトマウスを掛け合わせた新規モデルマウスから培養神経細胞を作成し、アルツハイマー病態モデル神経細胞とした。これまでのモデル動物では Aβ の蓄積などに時間がかかり *in vitro* 系への応用が難しかった。しかし、ドレブリン発現を消失させることで少なくともドレブリン発現量の減少という点においては時間をかけずに *in vitro* 系での再現ができるようになった。この新規アルツハイマー病モデル神経細胞を用いて、シナプス機能不全に着目してスパイン内に局在するドレブリンの解析を進めた。また、アルツハイマー病では Aβ の凝集が病理的知見であることから、Aβ オリゴマーを投与することで病態モデル神経細胞を作成できる可能性が示唆されている (Ishizuka et al., 2014)。そこで本研究においてもアルツハイマー病態モデル神経細胞の2つ目の作成法として薬理的な手法による作成法を試みた。具体的には、げっ歯類胎仔海馬由来培養神経細胞に Aβ オリゴマーを投与することで病態モデル神経細胞とし、ドレブリン局在等の解析を行った。

### 4. 研究成果

本研究ではまず、既存のアルツハイマー病モデルマウスとドレブリンノックアウトマウスを掛け合わせた新規モデルマウスを作成した。この新規モデルマウスから培養神経細胞を作成し、その機能解析を行った。培養 21 日目で培養神経細胞を固定し、免疫細胞染色法によりドレブリンクラスター密度の比較を行った。その結果、新規モデルマウス由来培養神経細胞 (以下、モデル培養細胞) はドレブリンクラスター密度がコントロールマウス由来培養神経細胞 (以下、コントロール培養細胞) のほぼ半分であった (図 1)。ドレブリンは NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) の活性によりその局在を変化させることが知られている (Sekino et al., 2006)。これは、シナプスが正常に機能しているかどうかの判断基準となる。培養神経細胞を短時間グルタミン酸で処理してから免疫細胞染色法でドレブリンの局在を解析すると、クラスター状の局在が見られなくなり、その結果、ドレブリンクラスター密度が低下する。この反応性を検証するため、コントロール培養細胞とモデル培養細胞を 100 μM のグルタミン酸で処理した時のドレブ

リンクラスタ密度を比較した。その結果、モデル培養細胞でも有意にドレブリンクラスタ密度が低下したことから、シナプス機能は正常であることが示唆された。しかし、コントロール培養細胞ではドレブリンクラスタ密度が32%低下したのに対し、モデル培養細胞では20%程度の低下となった(図1)。

次に、薬理的に作成したアルツハイマー病態モデル神経細胞の解析を試みた。コントロール神経細胞にABオリゴマーを投与することでモデル神経細胞とした。モデル培養細胞の実験と同様に、ドレブリンクラスタ密度を定量したところ、コントロール細胞に比べて有意にドレブリンクラスタ密度が低下していることが明らかになった(図2)。

以上のことから、アルツハイマー病の記憶障害の背景には、シナプスにおけるドレブリンの集積低下が起きていることが明らかになった。また、ドレブリンのクラスタ密度を計測することで正常時のシナプス密度が予測でき、グルタミン酸への反応性を検証することでシナプス機能を予測できることが示唆された。そこで本研究の成果を発展させ、ドレブリンクラスタ密度を指標としてシナプス機能を評価する方法を確立させた(Hanamura and Koganezawa et al., 2019)。この方法では医薬品のシナプス機能安全性評価などへの応用を目指すためにハイスループット化を実現させた。

アルツハイマー病などによくみられる認知機能障害の改善を目指した創薬は盛んにおこなわれているが、近年、生薬やその有効成分にも注目が集まっている。本研究で開発したドレブリンをシナプス機能マーカーとして用いた *in vitro* ハイコンテンツイメージング解析法を用いることで認知機能を *in vitro* で検討することが可能となった。そこでこれまでにヒトの認知機能への効果が知られている生薬を中心にシナプス機能への影響をこの手法を用いて検証した(Koganezawa et al., 2021)。げっ歯類海馬由来神経細胞を培養し、培養21日目に3つの有効成分(ノビレチン、ジオスゲニン、テヌイフォリン)と5つの生薬(チョウトウコウ、ゴオウ、オウレン、オウバク、オンジ)を投与した。その後、免疫細胞染色法による *in vitro* ハイコンテンツイメージング解析を行った。細胞数、樹状突起長、ドレブリンクラスタ密度を自動解析した。投与した有効成分や生薬のうち、オウバク(PB)とオンジ(PR)はドレブリンクラスタ密度の低下を引き起こすことが明らかになった(図3)。また、このドレブリンクラスタ密度の低下はNMDAR阻害剤(APV)によりブロックされたことから、NMDAR依存的事であることが示された。つまり、これらの生薬はシナプス可塑性への影響があることが示唆された。さらに本研究ではこの *in vitro* ハイコンテンツイメージング解析法を凍結神経細胞を用いた方法に適用させ、その成果も発表した(Koganezawa et al., 2023)。

図1 新規モデル動物由来神経細胞の機能解析

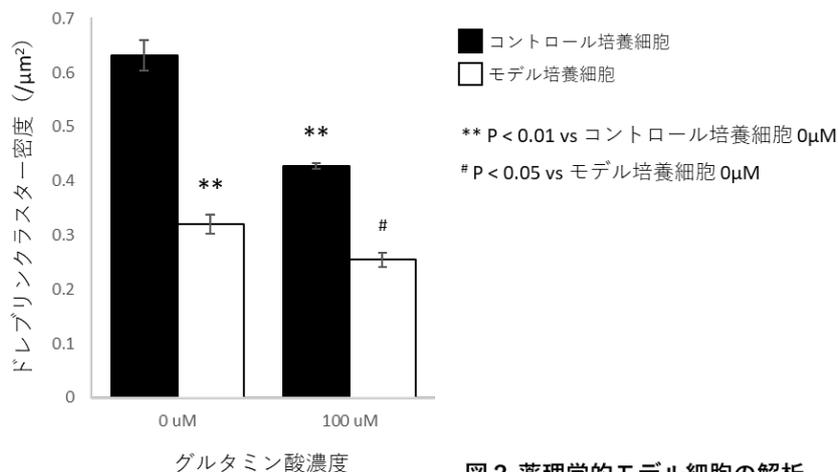


図2 薬理的モデル細胞の解析

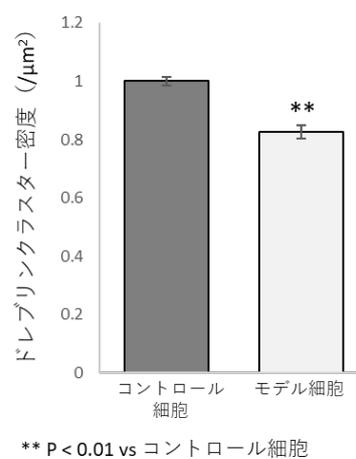
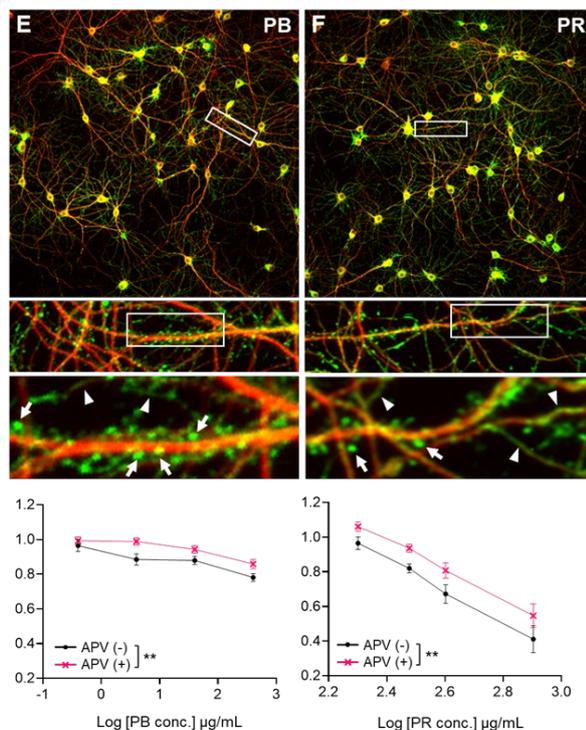


図3 生薬を用いた *in vitro* ハイコンテンツイメージング解析



オウバク(PB)とオンジ(PR)を投与したときのドレブリンクラスタイメージング(上段)とその定量結果(下段)。上段の矢印はクラスタ状のシナプスに局在するドレブリンを示しており、矢頭は局在を変えたドレブリンを示している。オウバクもオンジも濃度依存的にドレブリンクラスタ密度を減らしている(下段)。この効果の一部はAPVでNMDARの機能を阻害すると見られなくなることが示された。(Koganezawa et al., 2023より)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kobayashi Yuki, Tomoshige Sakura, Imakado Kosuke, Sekino Yuko, Koganezawa Noriko, Shirao Tomoaki, Diniz Giovanne, Miyamoto Tatsuo, Saito Yumiko	4. 巻 3
2. 論文標題 Ciliary GPCR-based transcriptome as a key regulator of cilia length control	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB BioAdvances	6. 最初と最後の頁 744-767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fba.2021-00029	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 該当する
1. 著者名 Kobayashi Yuki, Kohbuchi Shogo, Koganezawa Noriko, Sekino Yuko, Shirao Tomoaki, Saido Takaomi C., Saito Takashi, Saito Yumiko	4. 巻 610
2. 論文標題 Impairment of ciliary dynamics in an APP knock-in mouse model of Alzheimer's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 85 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.04.050	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 Koganezawa Noriko, Roppongi Reiko T., Sekino Yuko, Tsutsui Izuo, Higa Ayaka, Shirao Tomoaki	4. 巻 191
2. 論文標題 Easy and Reproducible Low-Density Primary Culture using Frozen Stock of Embryonic Hippocampal Neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/64872	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 Koganezawa Noriko, Sekino Yuko, Kawakami Hitomi, Fuchino Hiroyuki, Kawahara Nobuo, Shirao Tomoaki	4. 巻 0
2. 論文標題 NMDA receptor dependent and independent effects of natural compounds and crude drugs on synaptic states as revealed by drebrin imaging analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.15231	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 Kobayashi Yuki, Okada Tomoya, Miki Daisuke, Sekino Yuko, Koganezawa Noriko, Shirao Tomoaki, Diniz Giovanne B., Saito Yumiko	4. 巻 142
2. 論文標題 Properties of primary cilia in melanin-concentrating hormone receptor 1-bearing hippocampal neurons in vivo and in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104902 ~ 104902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2020.104902	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 該当する

1. 著者名 Hanamura Kenji, Koganezawa Noriko, Kamiyama Kazumi, Tanaka Natsume, Oka Takero, Yamamura Mai, Sekino Yuko, Shirao Tomoaki	4. 巻 99
2. 論文標題 High-content imaging analysis for detecting the loss of drebrin clusters along dendrites in cultured hippocampal neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological and Toxicological Methods	6. 最初と最後の頁 106607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vascn.2019.106607	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 Mitsuoka Toshinari, Hanamura Kenji, Koganezawa Noriko, Kikura-Hanajiri Ruri, Sekino Yuko, Shirao Tomoaki	4. 巻 99
2. 論文標題 Assessment of NMDA receptor inhibition of phencyclidine analogues using a high-throughput drebrin immunocytochemical assay	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological and Toxicological Methods	6. 最初と最後の頁 106583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vascn.2019.106583	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18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 小金澤紀子、関野祐子、白尾智明
2. 発表標題 認知症に効く漢方薬スクリーニング：オウバクとオンジの有効可能性
3. 学会等名 第28回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 間瀬省吾, 筒井泉雄, 光岡俊成, 小金澤紀子, 山崎博幸, 加藤祐一, 川辺浩志, 白尾智明, 關野祐子
2. 発表標題 Developmental neurotoxicity assessment of glutamate receptor binding agonists that cause learning and memory impairment : analysis of drebrin immunoreactivity in rat hippocampal cultured neuron
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saito Y, Miyamoto T, Sekino Y, Shirao T, Koganezawa N, Kobayashi Y
2. 発表標題 Transcriptome analysis of ciliary-dependent GPCR signaling - Identification a novel regulatory step underlying cilia length control
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 間瀬省吾, 光岡俊成, 小金澤紀子, 山崎博幸, 加藤祐一, 筒井泉雄, 川辺浩志, 關野祐子
2. 発表標題 Effects of a synthetic cannabinoid, CP55940, on synaptogenesis of cultured hippocampal neurons: imaging analysis of drebrin immunocytochemistry
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koganezawa N, Sekino Y, Shirao T
2. 発表標題 Effects of natural compounds and crude drugs on synaptic states revealed by drebrin imaging analysis
3. 学会等名 第11回国際放射線神経生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koganezawa N, Hanamura K, Schwark M, Krueger-Burg D, Kawabe H
2. 発表標題 Super-resolved 3D-STED microscopy reveals a layer-specific increase in excitatory synapses in the hippocampal CA1 region of a model mouse of autism spectrum disorder, Neuroligin-3 KO mice
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koganezawa Noriko, Sekino Yuko, Kawakami Hitomi, Fuchino Hiroyuki, Kawahara Nobuo, Shirao Tomoaki
2. 発表標題 High-content imaging evaluation of crude drugs effects on synaptic function
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koganezawa Noriko, Sekino Yuko, Shirao Tomoaki
2. 発表標題 NMDA receptor dependent and independent loss of drebrin from dendritic spines induced by crude drugs in Japanese Kampo
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mitsuoka Toshinari, Mase Syogo, Koganezawa Noriko, Katou Yuuichi, Tsutsui Izuo, Shirao Tomoaki, Sekino Yuko
2. 発表標題 Assessment of CB agonist CP55940 in maturity for rat hippocampal neurons using a high-throughput immunocytochemical assay and image digital analysis
3. 学会等名 第94回日本薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koganezawa N., Yamazaki H. and Shirao T.
2. 発表標題 Drebrin depletion affects stability of microtubules in dendrites
3. 学会等名 FAOPS2019 ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koganezawa N., Yamazaki H. and Shirao T.
2. 発表標題 Drebrin depletion alters NMDAR function and affects stability of microtubule in dendrites
3. 学会等名 NEURO2019 ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriko Koganezawa, Yuki Kajita, Hiroyuki Yamazakaki, Takashi Saito, Yuko Sekino, Takaomi C Saido and Tomoaki Shirao
2. 発表標題 Alzheimer ' s disease model mouse analysis focusing on drebrin
3. 学会等名 SfN2019 ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriko Koganezawa, Yuki Kajita, Hiroyuki Yamazakaki, Takashi Saito, Yuko Sekino, Takaomi C Saido and Tomoaki Shirao
2. 発表標題 Loss of drebrin from dendritic spines in hippocampal neurons from Alzheimer ' s disease model mouse
3. 学会等名 第93回日本薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	Noriko Koganezawa, Yuki Kajita, Hiroyuki Yamazakaki, Takashi Saito, Yuko Sekino, Takaomi C Saido and Tomoaki Shirao
2. 発表標題	Decreased immunoreactivity of drebrin around amyloid plaques in Alzheimer 's diseases model mouse
3. 学会等名	第10回国際放射線神経生物学会（国際学会）
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	間瀬省吾, 光岡俊成, 小金澤紀子, 山崎博幸, 加藤祐一, 筒井泉雄, 川辺浩志, 白尾智明, 関野祐子
2. 発表標題	ラット海馬培養ニューロンのドレブリン染色画像を用いた発達神経毒性の定量解析
3. 学会等名	第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	間瀬省吾, 光岡俊成, 小金澤紀子, 山崎博幸, 加藤祐一, 筒井泉雄, 川辺浩志, 白尾智明, 関野祐子
2. 発表標題	ラット海馬培養細胞のドレブリン染色画像を使ったハイコンテンツ分析法
3. 学会等名	第96回日本薬理学会年会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Shogo Mase, Toshinari Mitsuoka, Noriko Koganezawa, Tomoaki Shirao, Yuko Sekino
2. 発表標題	Quantitative analysis for drebrin clusters along dendrites using immunocytochemical images of cultured rat hippocampal neurons.
3. 学会等名	第12回国際放射線神経生物学会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名 Reiko T. Roppongi, Noriko Koganezawa, Yuko Sekino, Ayaka Higa, Tomoaki Shirao
2. 発表標題 凍結神経細胞を用いたハイスループットスクリーニング法
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023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
---------	---------