

機関番号：32692

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21800016

研究課題名（和文） アミロイドβが及ぼす神経細胞機能への構成的理解

研究課題名（英文） Constructive research for understanding the effects of amyloid β to neuronal function.

研究代表者

鈴木 郁郎 (SUZUKI IKURO)

東京工科大学・応用生物学部・助教

研究者番号：90516311

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病の原因因子の一つとして、凝集したアミロイドβペプチドが脳内に沈着することが考えられている。本研究では、毒性が高いとされているアミロイドβ1-42を用いて、長期間の神経回路活動に及ぼす影響および保護作用を示す物質の探索を目指した。1細胞レベルで神経活動を長期間計測できる系を確立し、アミロイドβ投与による活動頻度低下の経時変化の特性およびチモキノンによる保護作用の可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Alzheimer's disease (AD) is characterized by the aggregation of amyloid β peptide (Aβ). The aim of this study is to investigate the effect of Amyloid Beta toxicity in embryonic rat hippocampus through chronic monitoring of neuronal cell electrical activity using multielectrode array (MEA) recordings, and the molecules protecting neurons from Aβ toxicity. Applying Aβ to cultured embryonic rat hippocampal neurons has an inhibitory effect on spontaneous activity started 24h after applying and the firing disappeared at 72h. When thymoquinone (TQ) active constituent of Nigella Sativa Oil and Aβ were simultaneously applied, thymoquinone reduces the deleterious effect of Aβ at 34h after applying. This results indicated that TQ have the potential protecting hippocampus cells from Aβ toxicity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：神経細胞、アミロイドβ、多電極アレイ、時系列解析、チモキノン、長期計測、DFA、アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の病理学的変化の一つに老人斑があり、その主要な構成成分はアミロイドβペプチドからなっている。このアミ

ロイドβペプチドの凝集が神経細胞への毒性を持ち、アルツハイマー病の発症において重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、アミロイドβペプチドの凝集状態

(モノマー、オリゴマー、フィブリル) が及ぼす神経活動への影響、特に長期的な活動に及ぼす影響は十分調べられていない。その原因の一つは、組織や従来の分散培養下での電気生理学実験では、侵襲的計測手法のため長期間に及ぶ神経活動への影響を調べるのが難しいこと、また多シナプス経路で電流が入ってしまうため、厳密な神経活動の評価が難しいという技術的な問題点があったことによる。そこで、本研究では非侵襲計測である平面多電極アレイを用いて1細胞単独での神経活動計測系を構築して、アミロイドβペプチドが及ぼす長期的神経活動の評価することとした。

2. 研究の目的

本研究では、アミロイドβ1-42が長期的神経活動に及ぼす影響およびアミロイドβ1-42神経毒性の保護作用を示す物質の探索を目指して研究を行うこととした。具体的には、以下の3点を研究目的とした。

(1) アミロイドβ1-42が長期的神経活動に及ぼす影響を厳密に計測できる1細胞レベルの長期自発活動計測系の確立および発火データの時系列解析法の検討を行う。

(2) 神経細胞の長期自発活動に及ぼすアミロイドβ1-42の影響および凝集状態に依存した毒性を評価する。

(3) アミロイドβ1-42が及ぼす神経細胞機能への毒性を保護する物質を探索し、神経細胞の自発活動およびシナプス機能への保護作用を評価する。

3. 研究の方法

(1) アミロイドβ1-42が及ぼす神経細胞機能の評価するために、アルツハイマー病患者の脳組織で老人班が観察されている海馬組織に着目した。本研究では、ラット海馬初代培養細胞を用いた。

(2) 神経細胞の長期的な自発活動を評価するために、細胞外電位記録法である平面多電極アレイを用いた。また、分散培養の神経ネットワークはシナプス結合が複雑であり、得られた波形データがどの細胞由来であるかを解析することも困難である。そこで、他のニューロンからの入力がない1細胞培養系を用いて計測することとした。具体的には、平面多電極アレイ基板に細胞非接着素材であるアガロースゲルをコートし、電極上のアガロースゲルのみレーザで融解する方法を用いて電極上に1細胞培養する系を構築することとした。

(3) 神経活動の記録は、サンプリングレート20kHzで数日間の連続計測を行い、発火時刻を抽出した。発火の時系列データからスパイク間隔 (ISI: Inter Spike Interval) を抽出した。ISIの時系列データから定量的に活

動状態を評価するために、種々の非定常時系列データ解析法を検討した。

(4) アミロイドβ1-42の細胞毒性に対する保護作用を示す物質として、抗酸化作用で知られているチモキノン (ニゲラサチバの種子油の成分) を用いた。チモキノン投与による自発活動への影響を平面多電極アレイ基板を用いて評価し、シナプス機能への影響をFM dyeを用いて評価することとした。また、アポトーシスへの影響をCellTiter-Gloを用いて評価することとした。

4. 研究成果

(1) 1細胞レベル長期活動計測系の確立および発火時系列解析法の検討

① 1細胞レベル長期自発活動計測系の確立

1神経細胞の発火活動を長期間計測するために、非侵襲に計測できる平面多電極アレイ細胞外記録法を用いた。また、細胞移動を防ぐために、1細胞単位で細胞の空間配置を制御できるアガロースゲルマイクロ加工技術と多電極アレイ基板を組み合わせ、電極上でラット海馬初代培養細胞 (E18) を長期培養し続けた。その結果、他の細胞からの入力がない単一神経細胞における自発活動を長期間計測すること (一か月以上) に成功した。この計測手法を用いて、1神経細胞の発火パターンを調べた結果、(i) 数秒から数十秒 (場合によって数分) 間隔で一過的に複数のスパイクを発するバースト発火細胞、(ii) 高頻度 (1 Hz 以上) でトーニック発火する細胞 (GABA neuron)、(iii) バースト発火とトーニック発火が混同した細胞が見られた。さらに、計測期間中その性質は変化しないことから培養した1神経細胞は固有の発火パターンを示すことが分かった (図1)。

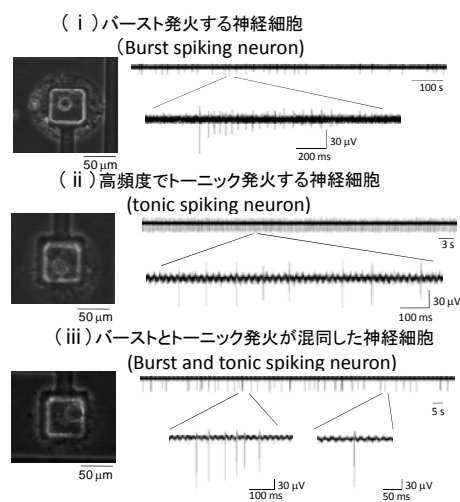


図1 1神経細胞の発火パターン
電極上に培養した1神経細胞の位相差像と細胞外記録による活動電位波形

② 発火時系列解析法の検討

1神経細胞計測によって得られた非定常

的な時系列データから長い時間スケールでの特徴を表す情報の抽出を検討した。ここでは、スパイク間隔のゆらぎが持つ長期相関性に着目して、近年、心拍変動や脳波などの生理機能評価に応用されてきている Detrended fluctuation analysis (DFA) を用いた。DFA は、Random walk モデルにおいて、トレンドを除去して、ゆらぎの長期相関関係を示すスケーリング指数 α を算出する方法であり、 $\alpha=0.5$ の場合、無相関 (ホワイトノイズ)、 $\alpha>0.5$ で相関関係を示し、 $\alpha=1$ の場合、 $1/f$ ゆらぎと対応する。得られた 1 神経細胞の長期時系列データを解析した結果、上記のいずれの発火パターンにおいても $10^2 < n < 10^{2.5}$ spikes (bursts) 付近を境に、短時間スケールと長時間スケールの指数が crossover する現象が見られ、長い時間スケールにおいて、べき的な相関が検出された。この結果により、長期神経活動の時系列データを定量的に評価することが可能となった (図 2)。

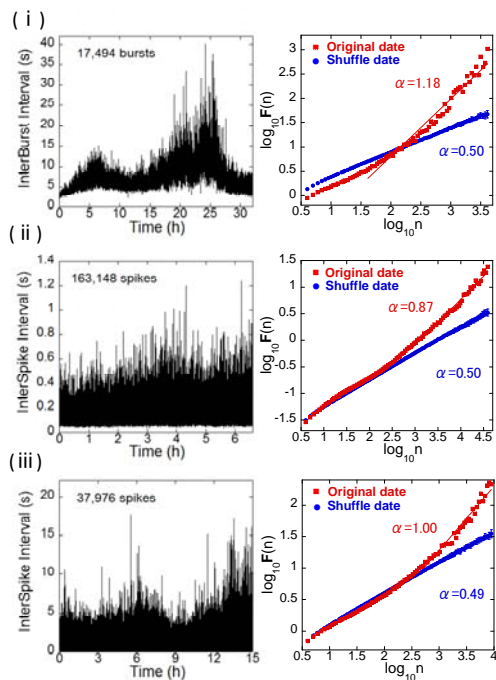


図2 発火タイミングにおける長時間相関

(i) バースト発火する細胞の inter burst interval (IBI) の経時変化と DFA。(ii) トーニック発火する細胞の inter spike interval (ISI) の経時変化と DFA。(iii) バーストとトーニック発火が混同した細胞の ISI 経時変化と DFA。■: オリジナルデータの DFA を示す。●: オリジナルの IBI, ISI 時系列データをランダムにシャッフルしたデータの DFA を示し、無相関を示す。

(2) 神経細胞の長期自発活動に及ぼすアミロイド β 1-42 の影響

培養 2 週間目の神経細胞にアミロイド β 1-42 をモノマーの状態に $10 \mu\text{M}$ 投与し、その後 4 日間連続して自発活動を計測した。得られたデータから発火周波数の時系列解析

を行った結果、培養 2 日目から徐々に活動頻度の低下が見られ、4 日後には自発活動が完全に消失する現象が見られた (図 3)。

この結果により、アミロイド β 1-42 の凝集状態がオリゴマーおよびフィブリルへ移行することが活動頻度の低下に関与していると考えられた。現在、アミロイド β 1-42 投与後 24 時間と 48 時間における凝集状態を調べている。

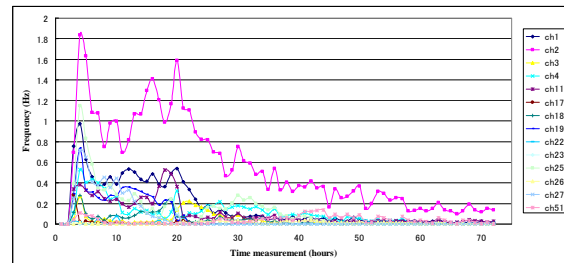


図3 アミロイド β 投与による自発活動変化

(3) チモキノンによる保護作用の検討

チモキノンによる神経活動の保護作用を検討するために、 $100 \mu\text{M}$ チモキノンと $10 \mu\text{M}$ アミロイド β 1-42 を同時投与して 3 日～4 日間の自発活動計測を行った。その結果、アミロイド β 1-42 のみの投与時に見られた自発活動の消失は見られなかった。また、 $100 \mu\text{M}$ チモキノンのみの投与においても、自発活動の消失は見られなかった。このことから、チモキノンには、アミロイド β 1-42 が及ぼす神経細胞機能への毒性を保護する性質も持っていると考えられた。

チモキノンによりアミロイド β 1-42 毒性が保護される作用機序の理解を進めるために、現在、チモキノンによるシナプス機能への保護作用の評価 (FM dye assay を用いた実験)、および細胞生存率の評価 (Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability assay を用いた実験) を進めている。また、チモキノンとアミロイド β 1-42 の結合評価とその効果も検討している。

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は下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① 鈴木郁郎、1 神経細胞の長期活動ダイナミクス、生物物理. 286 (49-6), 304-305, 2009 (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

① Alhebschi Amani Hassn, 鈴木郁郎, 後藤正男、アミロイド β ペプチドが及ぼすラット海馬神経細胞の発火頻度とチモキノンによる保護作用の検討、日本化学会第 91 春季年会、東京、2011-3-26

②坂本美緒、鈴木郁郎、後藤正男、ルテニウム錯体の細胞への取り込みと局在、日本化学会第91春季年会、東京、2011-3-26

③鈴木郁郎、構成的アプローチによる細胞ネットワークの制御と動態計測、細胞制御工学研究会、東京、2011-1-21

④鈴木郁郎、単一細胞における長期自発活動の DFA 解析、第33回日本神経科学会、第53回日本神経化学会大会、第20回日本神経回路学会大会、神戸、2010-9-2

⑤鈴木郁郎、1細胞からの構成的神経回路における長期活動ダイナミクス、「細胞を創る」研究会2.0、東京、2009-10-2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木郁郎 (SUZUKI IKURO)

東京工科大学・応用生物学部・助教

研究者番号：90516311