



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1610号
学位記番号	第1145号
氏名	佐藤 豊大
授与年月日	平成 30年 3月 26日
学位論文の題名	<p>Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide as a Possible Modulating Factor against Glutamatergic Neuronal Disability by Amyloid Oligomers</p> <p>(海馬コリン作動性神経刺激ペプチド(HCNP)はアミロイドオリゴマーによるグルタミン酸作動性神経の機能障害に抗する修飾因子である)</p> <p>Cell Transplantation 2017; 26(9): 1542-1550</p>
論文審査担当者	主査： 飛田 秀樹 副査： 道川 誠, 松川 則之

## 論文内容の要旨

アルツハイマー病病理の特徴は、老人斑、神経原線維変化および神経細胞脱落である。多くの基礎研究から、その主因はアミロイド $\beta$  ( $A\beta$ ) の凝集であるとするアミロイド仮説が提唱され、多くの創薬が試みられてきた。しかしながら、現在までに $A\beta$ 減少効果は認められるものの、認知機能改善をする治療薬は開発されていない。一方で、重度のアルツハイマー病病理変化をもちながら認知能力を維持している症例が存在し、その現象は認知予備力として知られる。認知予備力に関する知見では、予備力を有する症例では神経ネットワークが活性化していること、また食事・運動療法、認知機能訓練や血管リスク管理介入が高齢者における認知機能低下を抑制することが報告された。しかし、その詳細な分子メカニズムは不明である。興味深いことに、豊かな環境で育てられたラット海馬では、 $\beta 2$  アドレナリン神経の活性化を介して、アミロイドによる海馬神経活動阻害の抑制効果が報告された。

我々の研究室では、記憶メカニズムの観点からアルツハイマー病研究を行ってきた。標的由来神経栄養因子の観点から、海馬可溶性成分から中隔核コリン作動性神経を活性化する hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) を発見した。最近、HCNP 過剰発現 (HCNP 前駆体トランスジェニック: Tg) マウスでは、不完全誘導条件下において長期増強効果 (Long-term potentiation: LTP) が、野生型マウスに比べて増幅されやすいことを報告した。これらの結果を踏まえ、本研究では、①グルタミン酸作動性神経の活動性依存的なコリン作動性神経による LTP 修飾、② $A\beta$  オリゴマーによるグルタミン酸作動性神経の活動抑制に対するコリン作動性刺激および HCNP の保護作用効果について検討した。

始めに、海馬 CA1 領域のグルタミン酸作動性神経における LTP 誘導条件と神経活動の関係を明らかにするため、LTP を誘導するテタヌス刺激 (tetanus stimulation: TS, 100Hz, 1 秒) の繰り返しを 1 回、2 回、3 回と増加させることで誘導される LTP を評価した。その結果、LTP は 2 回までは TS の回数依存的に増加するが 3 回目では 2 回目と変わらず頭打ちとなった。この結果から 2 回の TS で誘導される LTP を飽和した LTP、1 回のものを不飽和 LTP と呼称する。次に誘導される LTP に対するコリン作動性神経の関与を評価するためにコリン作動薬 (カルバコール; CCh, 50nM) 投与下で 1 回および 2 回の TS で LTP を誘導した。その結果 1 回の TS で誘導される LTP は、2 回の TS で誘導される LTP と同程度まで増強された。対照的に 2 回の TS で誘導される LTP はコリン作動性刺激による増強は見られず、逆にムスカリン (M1) 受容体選択的阻害薬であるピレンゼピンにより 1 回刺激と同程度まで抑制された。これらの結果から、今回用いた誘導条件では、コリン作動性刺激は不飽和 LTP を増強するが飽和 LTP は増強しない、飽和 LTP の誘導時はグルタミン酸作動性神経の活動だけでなくコリン作動性神経の活動も関与していることが推測された。中隔核のコリン作動性神経は、主に海馬 CA1 上昇層 (stratum oriens) に投射される。今回の実験では、CA3 シャーファー側枝を刺激している。上記の結果の妥当性を確認するために、中隔核にアデノ随伴ウイルスを用いて蛍光標識による順行性の neuro-tracing を行った。その結果、コリン作動性神経終末は CA1 の放線層 (stratum radiatum) にも分布しており、これが 2 回の TS による LTP 誘導時のコリン作動性刺激の要因となっていると考えられた。

次に、アルツハイマー病病態におけるコリン作動性神経活動の働きを明らかにするために、合成アミロイドオリゴマーを作成し、その妥当性を形態学的に確認した後に、以下の順に実験を行った。合成アミロイドオリゴマーは、野生型マウスにおいて 1 回 TS 刺激による LTP の神経活動を濃度依存的に減衰した。更に、コリン作動薬 (CCh, 50nM) によるコリン作動性刺激は、合成アミロイドオリゴマーによる LTP の減衰を抑制した。最後に、内因性のコリン作動性賦活作用をもつ HCNP Tg マウスにおいて、同様にアミロイドオリゴマーによる LTP の減衰は阻止できた。

以上の結果からコリン作動性刺激は海馬の生理的条件下ではグルタミン酸作動性神経の活動性依存的にシナプス可塑性を亢進させることが明らかになった。また、アミロイドオリゴマーにより海馬のグルタミン酸作動性神経の活動が抑制された条件でも、コリン刺激により正常時と同等のシナプス可塑性を維持する作用を持つと考えられた。更には、コリン作動性神経調節因子の一つである HCNP 過剰発現は、アミロイドオリゴマーによる神経抑制に抗する可能性がある。これらの結果から、コリン作動性神経活動の維持の程度の差異が、認知予備力を説明する分子メカニズムのひとつである可能性が考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

【背景・目的】アルツハイマー病病理の特徴は、老人斑、神経原線維変化および神経細胞脱落である。多くの基礎研究から、その主因はアミロイド $\beta$  ( $A\beta$ ) の凝集であるとするアミロイド仮説が提唱されている。一方、重度のアルツハイマー病病理変化をもちながら認知能力を維持している症例が存在し、その現象は認知予備力として知られる。しかし、その詳細な分子メカニズムは不明である。申請者の研究室では、コリン作動性神経制御因子の一つである海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド (hippocampal cholinergic neurostimulating peptide : HCNP) の観点から記憶メカニズムおよびアルツハイマー病態解明を行っている。これまでの結果を踏まえ、本研究では、①グルタミン酸作動性神経の活動性依存的なコリン作動性神経による LTP 修飾、② $A\beta$  オリゴマーによるグルタミン酸作動性神経の活動抑制に対するコリン作動性刺激および HCNP の保護作用効果について検討した。

【方法と結果】始めに、海馬グルタミン酸作動性神経における LTP 誘導条件と神経活動の関係を明らかにするため、テタヌス刺激 (TS, 100Hz, 1 秒) 1 回、2 回、3 回にて誘導される LTP を評価した。その結果、LTP は 2 回までは回数依存的に増加するが 3 回目では 2 回目と変化しなかった。次に LTP に対するコリン作動性神経の関与を評価するためにコリン作動薬 (カルバコール ; CCh, 50nM) により検討したところ、1 回刺激 LTP は、2 回刺激と同程度まで増強された。しかし、2 回刺激 LTP には影響を与えず、一方ムスカリン (M1) 受容体選択的阻害薬により 1 回刺激と同程度まで抑制された。この結果から、今回の実験条件では、1 回刺激 LTP と 2 回刺激 LTP の差異にコリン作動性神経が関与すると推測された。

次に、アルツハイマー病病態におけるコリン作動性神経活動の働きを明らかにするために、合成  $A\beta$  オリゴマーを作成した。合成  $A\beta$  オリゴマーは、野生型マウスにおいて濃度依存的に LTP を減衰した。更に、コリン作動薬 (CCh, 50nM) および HCNP 過剰発現は、それぞれ同程度に  $A\beta$  オリゴマーによる LTP の減衰を阻止した。

【考察】コリン作動性刺激は海馬の生理的条件下でグルタミン酸作動性神経の活動性依存的にシナプス可塑性を亢進させる。また、 $A\beta$  オリゴマーにより海馬のグルタミン酸作動性神経の活動が抑制された条件でも、コリン作動薬および HCNP により正常時と同等のシナプス可塑性を維持する可能性がある。これらの結果から、コリン作動性神経活動の維持の程度の差異が、認知予備力を説明しうる分子メカニズムの一である可能性が考えられた。

【審査の内容】約 20 分間のプレゼンテーションの後に、主査の飛田教授から、研究の目的、チオフラビンアッセイ、LTP 評価における slope と amplitude の差異、使用した試薬の薬理作用と臨床的意義など、研究の意義や方法論などに関しての 10 項目の質問がなされた。また第一副査の道川教授からは、飼育における豊かな環境とはなにか、合成オリゴマー作成法と毒性評価、生体内オリゴマーとの差異、HCNP の脳内分布、今後の治療戦略など 8 項目が質問された。第二副査の松川教授からは専門領域に関連して、認知症疾患の分類と治療戦略など臨床に関わる 3 項目が質問された。いずれの質問に対しても、十分に満足のいく回答が得られ、学位論文の実験手技・主旨を十分理解していると判断した。

本研究は、実臨床においてコリンエステラーゼ阻害剤が記憶を一時的に改善するメカニズムも説明しえる結果である。更にアルツハイマー病病態解明・創薬の観点から、現在大きな注目を浴びるようになっている認知予備力の分子メカニズムを解明する一助になる可能性を秘めたものであり、その意義は非常に高い。以上をもって本論文の著者には、博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 飛田 秀樹 教授 副査 道川 誠 教授・松川 則之 教授