



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1952号
学位記番号	第1382号
氏名	鈴木 健悟
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	<p>Reduction of glutamatergic activity through cholinergic dysfunction in the hippocampus of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein knockout mice (HCNP 前駆体蛋白ノックアウトマウスの海馬ではコリン作動性神経機能障害を介してグルタミン酸作動性神経活動が低下している)</p> <p>Scientific Reports, 2022 Nov 10;12(1):19161</p>
論文審査担当者	主査： 齊藤 貴志 副査： 飛田 秀樹, 道川 誠

論文内容の要旨

海馬グルタミン酸作動性神経活動は、内側中隔核 (MSN) から海馬へのコリン作動性神経ネットワークなどの様々な求心性線維によって修飾される。海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド (hippocampal cholinergic neurostimulating peptide: HCNP) は MSN においてコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の量を増加させることでアセチルコリン (Ach) 合成を誘導すると考えられている。我々は以前に、Cre-loxP システムを用いて HCNP 前駆体蛋白 (HCNP-pp) ノックアウト (KO) マウスを作成し、海馬の Ach 減少、小胞アセチルコリントランスポーター (VAChT) の減少、海馬 CA1 上昇層の ChAT 陽性軸索量減少、海馬 CA1 における local field potential の theta power 減少を報告した。また、海馬で HCNP-pp を過剰発現させると、ムスカリン性 M1 受容体 (M1R) を介してグルタミン酸作動性神経活動が亢進し、野生型と比べて長期増強効果 (Long-term potentiation: LTP) が増幅されやすいことを報告した。また、野生型マウスにおいて、LTP を誘導するテタヌス刺激 (TS, 100Hz, 1 秒) を 1 回 (S-TS)、2 回 (D-TS) と増加させることにより、D-TS では S-TS と比較し、M1R を介した LTP の増幅がみられることを報告した。本研究では、アルツハイマー病 (AD) の部分病態モデルとしての HCNP-pp KO マウスの妥当性を検証するために、HCNP-pp KO マウスの海馬における LTP 誘導機能を評価した。また LTP のコリン作動性神経機能障害の機序を確認するため、ウェスタンブロット (WB) 法により LTP 関連分子を対照マウスと比較した。

はじめに、若齢世代 (11-17 週齢) の HCNP-pp KO とその対照マウスにおいて、海馬 CA3 のシャーフター側枝 (SC) -CA1 の LTP 誘導作用を比較した。若齢世代において、HCNP-pp KO と対照マウスいずれも S-TS による LTP 誘導と D-TS による LTP のさらなる増幅効果を示し、M1R 選択的拮抗薬であるピレンゼピン (Prz, 0.1 μ M) 投与によってこの増幅効果は消失した。加齢変化を評価するために成体世代 (24-35 週齢) においても同様の実験を行ったところ、対照マウスでは S-TS から D-TS の増幅効果が見られた一方で、HCNP-pp KO マウスでは S-TS から D-TS の増幅効果に障害が見られた。成体世代の HCNP-pp KO マウスは D-TS にコリン作動薬であるカルバコール (CCh, 50nM) を加えることにより LTP の増幅が見られ、この増幅は Prz の共投与により消失した。一方、対照マウスでは D-TS に CCh を加えることによる LTP 増幅は見られず、Prz により D-TS の LTP 増幅効果は消失した。このことから、成体世代の HCNP-pp KO マウスにおける D-TS による LTP 増幅効果の障害には M1R を介したコリン作動性神経障害が関与していることが示唆された。一方、シナプス前機能の評価として SC-CA1 における paired-pulse facilitation (PPF) を評価したが、HCNP-pp KO マウスと対照マウスの間では、若齢世代、成体世代ともに PPF に差は認めなかった。

続いて、成体世代の HCNP-pp KO マウスにおけるコリン作動性神経障害について、その機序を明らかにするためコリン作動性およびグルタミン作動性神経末端に関連する複数の分子を WB 法でスクリーニングした。しかし、成体世代では評価した全ての分子について HCNP-pp KO マウスと対照マウスの間で有意な差は認めなかった。電気生理実験と同様に時間依存的な変化を期待し、老齢世代 (54-55 週齢) の HCNP-pp KO マウスにおいて同様の評価をしたところ、HCNP-pp KO マウスでは、VAChT の有意な低下と M1R の有意な増加が見られたが、ChAT、高親和性コリントランスポーター (CHT1)、シナプトフィジンは有意な変化を認めなかった。グルタミン酸作動性神経に関しては、NMDAR、AMPA もともに有意な変化は示さなかった。

以上の結果から、HCNP-pp KO マウスは年齢依存的にコリン作動性神経障害を介した海馬グルタミン酸作動性神経可塑性が低下することが明らかになった。また、さらなる加齢により

HCNP-pp KO マウスの海馬では VAchT の低下と、Ach 濃度低下の代償的な変化として M1R の増加が見られた。これらより、HCNP-pp KO マウスの海馬では年齢依存的にコリン作動性神経障害が進行することが示され、コリン作動性仮説の観点から、このモデルは AD の部分病態モデルとしての可能性を持っていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

【背景と研究目的】海馬グルタミン酸作動性神経活動は、記憶形成・固定や再生に重要な機能である。その活動は、海馬に投射されるコリン作動性神経、GABA 作動性神経、ノルアドレナリン作動性神経など多くの神経ネットワークにより調整される。申請者の研究室では、その調整系の一つである内側中隔核から投射されるコリン作動性神経作動性神経活動を調節するペプチド(海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド hippocampal cholinergic neurostimulating peptide: HCNP)を発見し、その機能について検討してきた。これまでに、①培養系では、中隔核コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 量増加を介しアセチルコリン (Ach) 合成を誘導すること、②HCNP には 186 アミノ酸からなる前駆体蛋白 (HCNP precursor protein; HCNP-pp) が存在すること、Cre-loxP システムを用いた HCNP-pp コンディショナルノックアウト (cKO) マウスの検討では③海馬の Ach が減少すること、④海馬 CA1 においてコリン神経活動を意味する局所集合電位 theta power が低下すること、⑤小胞アセチルコリントランスポーター (VAChT) が減少すること、⑥海馬 CA1 上昇層の ChAT 陽性軸索量が減少すること、更に⑦海馬における HCNP-pp 過剰発現により、ムスカリン性 M1 受容体 (M1R) を介してグルタミン酸作動性神経活動が亢進し、長期増強効果 (Long-term potentiation: LTP) が増幅されることを報告した。一方、中隔核-海馬コリン作動性神経活動の電気生理学的実験系として、LTP 誘導条件のテタヌス刺激 (TS, 100Hz, 1 秒) の比較が、コリン作動性神経機能検討に妥当な方向であることを報告した。即ち、1 回 (S-TS) 刺激により誘導される LTP は不完全であり、2 回 (D-TS) 刺激以上の誘導で LTP は完全に誘導される。また、S-TS から D-TS に誘導される増強は、ムスカリン受容体 (M1 R) を介したコリン作動性神経活動が機能している。本遺伝子改変モデルが、コリン仮説に基づくアルツハイマー病 (AD) の部分病態モデルとして考慮した場合には、海馬グルタミン酸神経活動への影響を確認する必要がある。本研究では、HCNP-pp cKO マウスのグルタミン酸作動性神経活動およびコリン作動性神経活動について評価した。また、その機序を両神経活動に関連する蛋白量をウェスタンブロット (WB) 法により評価した。

【実験の方法と結果】海馬 CA3 のシェーファー側枝をテタヌス刺激し CA1 にて LTP を比較した。若齢世代 (11-17 週齢) では、HCNP-pp cKO とその対照マウス、いずれもコリン作動性神経障害は認めなかった。成体世代 (24-35 週齢) HCNP-pp KO マウスでは、S-TS から D-TS への増幅効果が抑制された。抑制された D-TS は、コリン作動薬であるカルバコールにより LTP は増幅され、この増幅は M1R 拮抗薬であるピレンゼピンにより消失した。このことから、HCNP-pp cKO マウスの D-TS による LTP 増幅効果の障害には M1R を介したコリン作動性神経障害が関与していることが示唆された。

シナプス前機能の評価として SC-CA1 における paired-pulse facilitation を評価では、HCNP-pp cKO と対照マウスの間では、若齢、成体世代ともに差は認めなかった。

WB 法による LTP 関連分子の評価では、成体世代ではグルタミン酸作動性神経活動およびコリン作動性神経活動の各因子に HCNP-pp cKO マウスと対照マウスの間で有意な差は認めなかった。老齢世代 (54-55 週齢) HCNP-pp cKO マウスでは、VAChT の低下と M1R の増加が認められた。またグルタミン酸作動性神経活動関連因子には有意な変化を示さなかった。

以上の結果から、HCNP-pp cKO マウスは年齢依存的にコリン作動性神経障害を介した海馬グルタミン酸作動性神経可塑性が低下することが明らかになった。また、その機序には VAChT の低下と M1R の増加が関与していた。今回およびこれまでの結果を踏まえて、コリン仮説の観点からも本モデルマウスは AD の部分病態モデルとしての特性を有していると考えられた。

【審査の内容】約 20 分間のプレゼンテーションの後、主査の齊藤から実験に用いた電気生理学的実験条件について、コリン作動性神経とシェーファー側枝刺激の妥当性、免疫染色による部位特異性検討の必要性など計 7 つの質問、第一副査飛田教授から電気生理に用いるスライス切片的作成ポイント、実験条件における温度の意義、fEPSP 評価法など計 8 つの質問、第二副査道川教授からは HCNP-pp cKO マウスについて、加齢変化する理由、カルバコールや HCNP 投与によるレスキューの可能性など計 6 つの質問がなされた。申請者から概ね満足のいく回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。

本研究は、申請者の研究室で発見した神経ペプチドの遺伝子改変モデルマウスを用いた非常に独創性の高い研究である。今回の結果も、古くから提唱されたコリン仮説を検討する基盤モデルになりえることを検証した臨床的視点からも非常に意義の高い研究である。以上を持って、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 齊藤 貴志 副査 飛田 秀樹 道川 誠