



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	乙第1926号
学位記番号	論第1682号
氏名	近藤 裕子
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	<p>Reduction of acetylcholine in the hippocampus of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein knockout mice (海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチドノックアウトマウス海馬ではアセチルコリンが低下している)</p> <p>Scientific Reports, 11: 22072, 2021</p>
論文審査担当者	主査： 齊藤 貴志 副査： 道川 誠, 澤本 和延

論文内容の要旨

【研究背景と目的】中隔核から海馬へ投射するコリン作動性神経は、海馬グルタミン酸作動性神経機能を介して記憶・学習において重要な働きをしている。我々の研究室では、コリン作動性神経調節を行う因子として、ラット海馬可溶性成分から海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド (hippocampal cholinergic neurostimulating peptide : HCNP) を発見した。生化学実験において、HCNP は中隔核コリン作動性神経のコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 量を増加させ、アセチルコリン (Ach) の産生を促進すると考えられている。また HCNP は、186 アミノ酸からなる HCNP 前駆体タンパク (HCNP precursor protein : HCNP-pp) の N 末端に存在する 11 アミノ酸残基が切り出されて生成される。これまで、海馬特異的 HCNP-pp 過剰発現マウスにおいて、生体内でも ChAT の発現量が増加することを明らかにしたが、生体内における Ach 産生への機能を直接的に確かめられていない。

本研究では、CreERT-loxP システムを用いて生後 12-14 週から HCNP-pp の発現抑制を行ったノックアウト (KO) マウス海馬内の Ach 量をマイクロダイアリシスにより経時的に測定した。また、メカニズム検索のために、中隔核の ChAT 陽性細胞数、海馬の ChAT、小胞アセチルコリン輸送体 (Vesicular Ach transporter : VAChT)、シナプトフィジン量および海馬のシナプス数を Control 群と比較した。

【方法と結果】マウスの左海馬 (Bregma より後方 3.1mm, 正中より左方 2.5mm, 脳表より深さ 1.0mm) にガイドカニューレを植え込み 2 週間安静にさせた。透析膜長 1mm の微小透析プローベを刺入後に、コリンエステラーゼ阻害薬を含んだ人工髄液を 1 μ L/min の速度で還流し、自由行動下でマイクロダイアリシスを行った。20 分間隔毎にサンプルを回収し、HPLC 法にて分析し、ECD 検出装置にて Ach 量を計 4 時間に渡り測定した。結果、Ach 量は、HCNP-pp KO マウスで有意に低下していた。

次に、メカニズムを検討するために、冠状断切片で中隔核を抗 ChAT 抗体で免疫染色し、ChAT 陽性細胞数をカウントしたが、KO と Control 間に陽性細胞数の有意な差はなかった。

Western Blot 法により海馬の ChAT、シナプトフィジンおよび VAChT 量を検討した。KO マウス海馬では ChAT、シナプトフィジン量に有意差はなかったが、VAChT 量が有意に低下していた。これは、免疫組織学的検討でも、海馬 CA1 錐体細胞層周辺および stratum oriens の VAChT 陽性終末の減少で確認された。神経終末の減少について電子顕微鏡を用いて検討したが、stratum oriens および stratum radiatum における神経終末数に両群において有意差はなかった。

【結果の考察】HCNP-pp KO マウス海馬では VAChT を介して、Ach 量が低下していることが確認された。今回の検討からは、中隔核の ChAT 陽性細胞数に両群間に有意差はなく、HCNP が神経栄養因子であることを示唆する結果は得られなかった。これまでの我々のデータでは、HCNP は ChAT 産生量に影響することを示してきたが、VAChT 量により影響する可能性が示唆された。

コリン作動性神経終末では、アセチル CoA とコリンから ChAT の触媒により Ach が合成され、VAChT によって Ach はシナプス小胞に充填される。膜重合によりシナプス間隙に放出された Ach は膜上に存在する受容体に結合した後、シナプス間隙に局在するアセチルコリンエステラーゼの働きで速やかにコリンと酢酸に分解される。既報告において、VAChT の完全なノックアウトマウスは致死性となるため、コンディショナルノックダウンマウスを用いて生理的機能が解析されている。ヘテロ型では神経筋能力は野生型と同程度に保たれているものの、物体認識記憶や社会性行動の障害などの認知機能低下がみられる。このように VAChT は、神経筋活動のみならず、記憶・学習行動において非常に重要であることが知られるようになった。

本研究では、①HCNP が生体内海馬において、Ach 量の制御因子であること、②これまでのChAT 量のみではなく、VAchT 量に影響することが明らかにできた。今回の結果により、中隔核-海馬コリン作動性神経障害モデルとして HCNP-pp KO マウスが非常に有望である可能性が直接的に支持された。

(注) 和文で2, 000字以内でまとめる

論文審査結果

【研究背景と目的】 アルツハイマー病 (Alzheimer's disease ; AD) 治療薬として、抗アミロイド抗体の臨床応用が現実味を帯びてきたが、残念ながら記憶改善の観点からは十分な効果を示さない。病理への介入と共に、神経活動改善が必要かもしれない。記憶には中隔核から海馬へ投射するコリン作動性神経機能も重要な働きをしている。我々の研究室ではコリン作動性神経調節因子として、ラット海馬可溶性成分から海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド (hippocampal cholinergic neurostimulating peptide : HCNP) を発見した。培養系では中隔核コリン作動性神経のコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 量増加により、アセチルコリン (Ach) の産生を促進する。また HCNP には 186 アミノ酸からなる前駆体蛋白(HCNP-pp)が存在する。CreERT-loxP システムを用いた生後 12-14 週から発現抑制したコンディショナルノックアウトマウス(HCNP-pp cKO)ではコリン神経活動低下を示確認したが、直接 Ach 量低下は確認できていない。本研究では、マイクロダイアリスにより同マウス海馬内の Ach 量、および神経終末コリン代謝の観点から HCNP が中隔核—海馬コリン作動性神経の調節因子であることを検証した。

【方法と結果】 マイクロダイアリスのために、マウスの左海馬 (Bregma より後方 3.1mm, 正中より左方 2.5mm, 脳表より深さ 1.0mm) にガイドカニューレを植え込み 2 週間安静にさせた。透析膜長 1mm の微小透析プローベを刺入後に、自由行動下でコリンエステラーゼ阻害薬を含んだ人工髄液を 1 μ L/min の速度で還流し、20 分間隔毎にサンプルを回収し、HPLC 法にて分離後に ECD 検出装置にて Ach 量を計 4 時間に渡り測定した。結果、Ach 量は HCNP-pp cKO マウスで有意に低下していた。中隔核 ChAT 陽性細胞数は cKO と Control 間に有意差はなかった。Western Blot 法および免疫組織学的検討では、HCNP-pp cKO マウス海馬では VAChT 量が有意に低下していたが、ChAT、シナプトフィジン量に有意差はなかった。電子顕微鏡による検討では、CA1 stratum oriens および stratum radiatum において神経終末数に両群に有意差はなかった。

【考察】 HCNP-pp cKO マウス海馬では VAChT を介して Ach 量の低下が確認され、HCNP が中隔核海馬コリン作動性神経の調節因子の一つであることが確認された。培養系の結果では、ChAT 産生への影響が主たる機能と考えられたが、今回の結果から VAChT 量への影響が新たに示唆された。一方、HCNP は中隔核 ChAT 陽性細胞の保護作用は確認できなかった。これまでに VAChT は、神経筋活動のみならず、記憶・学習行動において非常に重要であることが知られる。

本研究では、①HCNP が生体内海馬において、Ach 量の制御因子であること、②これまでの ChAT 量のみではなく、VAChT 量に影響することが明らかにできた。今回の結果により、中隔核-海馬コリン作動性神経障害モデルとして HCNP-pp cKO マウスが非常に有望である可能性が直接的に支持された。今後薬理的手法を用いた放出実験により、ChAT 産生および VAChT を介したシナプス小胞 Ach 取り込み機能への影響メカニズムなど更なる検討が必要である。

【学位審査】

申請者による約 20 分のプレゼンテーション後に、主査齊藤から HCNP-pp cKO マウスのモデルの妥当性、HCNP-pp の細胞外への放出の可能性、他のモノアミンへの影響など計 7 つの質問、第一副査道川教授からは、アルツハイマー病病態仮説の考え方、Ac-CoA および Choline 量など Ach が低下している理由、VAChT 量が低下するメカニズムなど計 9 つの質問、第二副査澤本教授からは、アルツハイマー病治療介入における神経栄養因子の可能性、栄養因子機能評価法としての ChAT 陽性細胞数評価の妥当性、マイクロダイアリスを腹側海馬で行った理由など計 8 つの質問がなされた。

これらの質問に対して申請者は、概ね適切に回答し、研究内容ならびにその背景等を十分に理解していると判断した。

本研究は、申請者の教室で発見した神経ペプチドが記憶機能に関わるコリン作動性神経活動の調節因子の一つであることを、生体海馬内 Ach 測定から直接的に検証した重要な研究である。今後、神経活動調節・症状改善の視点から新たな治療標的の創出が期待される。よって、申請者は、博士 (医学) を授与されるにふさわしい知識と研究能力を有すると審査委員会は結論した。

論文審査担当者 主査 齊藤 貴志 副査 道川 誠 澤本 和延