

福岡大学博士論文
アストロサイトの異常による
シナプス伝達変化に関する研究
令和2年3月

PD161001

大藪康平

目次	1
緒言	4
第1章 $A\beta$ 25-35 暴露アストロサイトによるシナプス伝達への検討	
第1節 $A\beta$ 25-35 暴露アストロサイトによるシナプス伝達低下	
1 実験材料および実験方法	6
1-1 実験動物	
1-2 実験方法	
1-2-1 $A\beta$ 25-35 の調整	
1-2-2 Mass culture アストロサイトの作製手順	
1-2-3 マイクロアイランド状アストロサイト培養標本作製手順	
1-2-4 オータプス培養標本作成手順	
1-2-5 ホールセルパッチクランプ法によるシナプス伝達解析	
1-2-6 免疫染色法による興奮性シナプスの解析	
1-2-7 FM1-43 を用いたプレサイレントシナプスの同定	
1-2-8 サンドイッチカルチャー標本作製手順	
1-2-9 統計処理	
2 実験結果	16
2-1 アストロサイトに対する $A\beta$ 25-35 の濃度検討	
2-2 $A\beta$ 25-35 暴露アストロサイトのニューロンへの接触によるシナプス伝達評価	
2-3 $A\beta$ 25-35 暴露アストロサイトのニューロンへの接触によるシナプス形成及び樹状突起形態に対する検討	

2-4	A β 25-35 暴露アストロサイトのニューロンへの接触によるプレサイレントシナプスの検討	
2-5	A β 25-35 暴露アストロサイトのニューロンへの接触除外によるシナプス伝達評価	
2-6	A β 25-35 暴露アストロサイトのニューロンへの接触除外によるシナプス形成及び樹状突起形態に対する検討	
3	小括	27

第2章 アストロサイトの密度変化によるシナプス伝達変化の検討

第1節 アストロサイトの密度増加によるシナプス伝達の亢進

1	実験材料および実験方法	29
1-1	実験動物	
1-2	実験方法	
1-2-1	マイクロアイランド状アストロサイト培養標本作成手順	
1-2-2	オートプス培養標本作成手順	
1-2-3	ホールセルパッチクランプ法によるシナプス伝達解析	
1-2-4	免疫染色法による興奮性シナプスの解析	
1-2-5	FM1-43 を用いたプレサイレントシナプスの同定	
1-2-6	統計処理	
2	実験結果	30
2-1	アストロサイトの密度変化による興奮性シナプス伝達解析	
2-2	アストロサイトの密度変化による興奮性シナプス形成への検討	
2-3	アストロサイトの密度変化によるプレサイレントシナプス割合変化の検討	
3	考察と小括	37

考察と総括	39
参考文献	41
謝辞	45

緒言

アルツハイマー病(AD)は高齢化の進む現代において大きな社会問題となっている。Alois Alzheimerにより最初の症例が報告され1世紀が経過したにも関わらず、根本的な治療法は確立されていない。現在、ADの治療は神経伝達の調節に関わる薬物を使用するものであり、対症療法しか存在しておらず根本的な治療法を確立することが重要である。しかし、ADの病態は複雑であり詳細なメカニズムが解明されていないことが治療法確立を妨げる大きな要因となっている。

ADは進行性の神経変性疾患で、記憶障害や行動障害などの症状が現れる。ADにはアミロイド β ($A\beta$)の凝集に伴う老人斑の形成および過リン酸化タウから生じる神経原線維変化という特徴がみられる(Scheltens et al., 2016)。アルツハイマー病において $A\beta$ 原線維の沈着は早期から見られ(Roth et al., 1966; Pike et al., 1995; Rama Rao and Kielian., 2015)、 $A\beta$ はニューロンの機能不全、それに続いて神経細胞死をもたらすことで認知機能障害を引き起こすと考えられている。また、 $A\beta$ はシナプスの機能不全やシナプスの損失を引き起こす(Viola et al., 2015; Tu et al., 2014; Hefti et al., 2013; Koffie et al., 2011)。したがって、 $A\beta$ はADにおける中心的な役割を担うと考えられている(Hardy J and Selkoe DJ., 2002)。

中枢神経系に存在するグリア細胞の1種であるアストロサイトは、ニューロンに対して物理的支持や栄養供給を行うものとして認識されてきた。しかし、それらの役割に加えシナプス形成やシナプス機能の調節において重要な役割を担っていることが明らかとなってきた(Won-Suk Chung et al., 2015)。このように、アストロサイトとニューロンは密接関係にあることから、神経機能を理解するには、ニューロンだけでなく、ニューロンとアストロサイトの相互作用を考える必要がある。Autism Spectrum Disorder(ASD)、amyotrophic lateral sclerosis(ALS)、Rett syndromeのような神経変性疾患において、アストロサイトの異常な活性化、細胞体サイズおよび突起の分岐の減少など形態的变化が生じていることが報告されている(Sloan et al., 2014; Laurence et al., 2005; Fatemi et al., 2008)。

ADにおいても $A\beta$ によってアストロサイトに異常が生じていることが報告されている。例えば、アストロサイトの萎縮といった形態的变化(Rodríguez et al., 2014)、アストロサイトから分泌される神経新生やシナプス形成に関与する因子の減少、アストロサイトにおけるカルシウムシグナル伝達とグルタミン酸放出の異常(Talantova et al., 2013; Lee et al.,

2014) などがある。したがって、いくつかの神経変性疾患と同様に AD においてもアストロサイトの機能不全が神経異常を引き起こすことが十分に考えられる。

AD 病態の理解にはニューロンのみには焦点を当てただけでは不十分であり、アストロサイトとの関係も考える必要がある。また、既存薬は神経細胞を標的としたものしか存在していないため、新たな治療法確立のためには神経細胞以外の細胞も含め検討する必要があると考える。

本研究では、 $A\beta$ によるアストロサイトを介したシナプス伝達への影響および新たな治療方法を提案することを目的とした。第 1 章では $A\beta$ に暴露されたアストロサイトと $A\beta$ に暴露されていないニューロンを共培養し、シナプス伝達に対する影響を検討した。第 2 章ではアストロサイトが新たな治療標的になりうることをふまえて、アストロサイトの補充という観点から、アストロサイト密度変化がシナプス伝達へ与える影響を検討した。

第1章 $A\beta$ 25-35 暴露アストロサイトによるシナプス伝達への検討

第1節 $A\beta$ 25-35 暴露アストロサイトによるシナプス伝達低下

1 実験材料および実験方法

1-1 実験動物

動物に関する取扱いは福岡大学の実験動物管理福祉委員会の規則に厳密に従った。ICR マウス (Catalogue ID: Jcl:ICR, CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) は、妊娠 15 日目に九動 (Tosu, Japan) から購入した。初代培養には生後 0~2 日後のマウスを使用した。マウスは 12 時間の明暗サイクルで温度制御された部屋 ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) で個別にプラスチック製ケージに収容した。食料 (CLEA Rodent Diet, CE-2, CLEA Japan, Inc.) および水の摂取に対する制限は行わなかった。

1-2 実験方法

1-2-1 $A\beta$ 25-35 の調整及び処置

$A\beta$ 25-35 のストック溶液は、 $A\beta$ 25-35 (Sigma-Aldrich) を $2\mu\text{M}$ の濃度で滅菌水に溶解し、 37°C で 4 日間インキュベートすることにより調製した。アストロサイトはニューロンを播種する前に 72 時間 $A\beta$ 25-35 に曝露された。72 時間の $A\beta$ 25-35 処置後、10% FBS 溶液で 3 回すすぎ、溶液中から $A\beta$ 25-35 を除去した。 $A\beta$ 25-35 存在下におけるアストロサイトの生存率を調べるために、NucBlue™ Live Ready Probes™ 試薬 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で染色することにより、アストロサイトの数をカウントした。

1-2-2 Mass culture アストロサイトの作製手順

① 生後 0~2 日のマウスから全脳を取り出し、冷却した HBSS 溶液 (Hank's Balanced Salt

Solution, invitrogen) 中で大脳皮質を摘出した。

- ② 摘出した大脳皮質を Trypsin/EDTA 溶液が 1 mL 入った 1.5 mL チューブ (Eppendorf) に入れ、37°C, 700 rpm で 20 分振とうした。
- ③ 振とう後、チューブ中の Trypsin/EDTA 溶液を除去し、10% FBS 含有 D-MEM 溶液 (10% FBS) で洗浄した。10% FBS 溶液の組成は以下の通りである。

○ 10% FBS 含有 D-MEM 溶液の組成

0.5 ml	MITO ストック* (BD Bioscience)
1 ml	Penicillin-Streptomycin (invitrogen)
50 ml	FBS (invitrogen)
450 ml	D-MEM (GlutaMAX-I含有、invitrogen)

※ MITO+Serum Extender (BD Bioscience) 1 ボトルに超純水 5 mL 加えて溶解し分注して冷凍保存した。

- ④ 洗浄後に 10% FBS 中で大脳皮質を攪拌単離した。
- ⑤ 攪拌単離した液の上清を、10% FBS 10 mL の入った 250 cm² の培養フラスコ (Falcon) に入れ、Incubator 内で 24 時間程度培養した。
- ⑥ 24 時間後、培養フラスコ内の浮遊細胞を除去するため、新たな 10% FBS 溶液 10 mL と入れ替えインキュベーター内で 2 週間培養した。
- ⑦ アストロサイトがフラスコ底面に十分育っていることを確認し、フラスコ底面を平らな場所で打ちつけてアストロサイト以外の混在するグリア細胞等を機械的に除去した。
- ⑧ メディウムを吸引除去した後、37°C に温めておいた Trypsin/EDTA 溶液 10 mL をフラスコに加えて 5~7 分ほどインキュベートし、フラスコ底面からアストロサイト層を剥離した。
- ⑨ アストロサイト層の剥離後、10% FBS 溶液 15 mL を加え、Trypsin/EDTA の酵素活性を止めた。
- ⑩ アストロサイト剥離液を 50 mL チューブ (Falcon) に移し、37°C、1000 rpm で 3 分間遠心した。
- ⑪ 遠心後、上清を除去し、新たに 10% FBS 溶液 1 mL を加え、攪拌した。

- ⑫ 攪拌後、10% FBS 溶液の入った 6 well プレート (TPP) に 100000 cells/well となるように、コーティング混合液を施したカバーガラス (Matsunami 22 mm 丸型 No.1) にアストロサイトを播種した。
- ⑬ 溶媒の交換は行わずに 5~7 日かけてアストロサイト層を形成させ、 $A\beta$ 25-35 処置およびサンドイッチカルチャー標本に使用した。

○ カバーガラスのパターンコーティング手順

- 1: カバーガラスを遮光瓶に入れ硝酸 (質量分率 65%) に浸して 1 日間洗浄した (100 ~120 rpm)。
- 2: 蒸留水中で数時間洗浄し、さらに新たな蒸留水中で一晩洗浄した。
- 3: コーティング混合液 (1 mg/mL Collagen と 0.5 mg/mL Poly-D-Lysin を 1:1 で混合) を用いてカバーガラス全体にコーティングを施した。

1-2-3 マイクロアイランド状アストロサイト培養標本作成手順

アストロサイトの培養は第 1 章 1-2-2 と同様の手順で行った。アストロサイトを播種し 6~8 日後に、マイクロアイランド状アストロサイトが形成されているのを確認し、オートプス培養標本に使用した。その間、溶媒の交換は行わなかった。アストロサイトは 6 well プレート (TPP) に 25000 cells/well で播種した。また、カバーガラスのコーティング手順は以下のように異なる。

○ カバーガラスのコーティング手順

- 1: カバーガラスを遮光瓶に入れ硝酸 (質量分率 65%) に浸して 1 日間洗浄した (100 ~120 rpm)。
- 2: 蒸留水中で数時間洗浄し、さらに新たな蒸留水中で一晩洗浄した。
- 3: 0.5% Agarose でカバーガラス表面をコーティングした。その後 UV ランプを 30 分照射した。
- 4: コーティング混合液 (1 mg/mL Collagen と 0.5 mg/mL Poly-D-Lysin を 1:1 で混合) を作製し、35mm Culture dish に丸く切ったキムワイプを 3 枚敷き、150 μ L ほど入れた。
- 5: 3.で Agarose コーティングしたカバーガラスに、Poly Ethel Ethel Keton 製の表面

に多数の $300 \times 300 \mu\text{m}$ のドットが存在するスタンプにコーティング混合液を付着させ、ドットサイズが $300 \times 300 \mu\text{m}$ のスタンプを施した。

1-2-4 オータプス培養標本作成手順

① マイクロアイランド状アストロサイト培養標本のメディウムを NBA 溶液に置換した。

○ NBA 溶液の組成

0.5 ml	Penicillin-Streptomycin (invitrogen)
2.5 ml	Glutamax- I (invitrogen)
5 ml	B27-Supplement (invitrogen)
245 ml	Neurobasal A-Medium (invitrogen)

② 生後 0~2 日のマウスから全脳を取り出し、冷却した HBSS 溶液 (Hank's Balanced Salt Solution, invitrogen) 中で海馬を摘出した。その後、Enzyme 溶液が $800 \mu\text{L}$ 入った 1.5 mL チューブに入れ、 37°C 、 $650 \sim 700 \text{ rpm}$ で 50 分間酵素処理した。

○ Enzyme 溶液の組成

0.5 ml	100 mM CaCl_2 溶液 (Sigma)
0.05 ml	0.5 M EDTA 溶液 (Sigma)
10 mg	L-Cystein hydrochloride monohydrate (Sigma)
50 ml	D-MEM

上記 2.5 mL に対して、papain (Worthington) $50 \mu\text{L}$ を添加して用時調整した。

② Inactivation 溶液 $500 \mu\text{L}$ に置換し、 37°C 、 $650 \sim 700 \text{ rpm}$ で 15 分間振とうした。

○ Inactivation 溶液の組成

125 mg	Trypsin inhibitor from chicken egg white (Sigma)
125 mg	Albumin bovine serum initial fractionation by heat shock (Sigma)

50 ml 10% FBS 溶液

- ④ Inactivation 溶液を除去し、NBA 溶液で洗浄後、新たに NBA 溶液を 100 μ L 加え海馬を攪拌した。
- ⑤ 上清を NBA 溶液が 800 μ L 入った 1.5 mL チューブに移した。
- ⑥ 組織片が残っているチューブに新たに NBA 溶液を 100 μ L 加え、攪拌し、その後上清 100 μ L を、さらに 1.5 mL チューブに移した。
- ⑦ NBA 溶液の入った 6 well プレート (TPP) に 6000 cells/well でニューロンを播種した。
- ⑧ ニューロン播種後、13~18 日後の標本を用いてシナプス解析を行った。ニューロン培養期間中は溶媒の交換を行わなかった。

1-2-5 ホールセルパッチクランプ法によるシナプス伝達解析

シナプス応答はパッチクランプアンプ (MultiClamp 700B, Molecular Devices) を使用して、-70 mV の保持電位で記録した。シナプス応答は 20 kHz でサンプリングし、10 kHz でフィルタリングした。データは、AxoGraph X 1.2 ソフトウェア (AxoGraph Scientific, Berkeley, CA) を使用して分析した。

○ 細胞外液 (Base+ 溶液)

140 mM NaCl

2.4 mM KCl

10 mM HEPES

10 mM Glucose

4 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

2 mM CaCl_2

pH=7.4

○ 細胞内液

1.0 mL の ATP-GTP-stock 溶液 (10 \times)、0.1 mL の 100 mM K-EGTA 溶液、8.9 mL の K-Gluconate-HEPES 溶液を混合したものをを用いた。

① ATP-GTP-stock-stock 溶液 (10×)
120 mM Phosphocreatine (Sigma)
3 mM GTP-Na (Sigma)
40 mM ATP-Mg (Sigma)
500 units Creatine-phosphokinase (Sigma)
6 mM MgCl₂
PH=7.4-7.5

② 100 mM K-EGTA-stock 溶液
0.1 M EGTA 液 (Sigma) を 500 μL ずつ分注し冷凍保存した。pH は KOH を用いて
7.4 に調節した。

③ K-Gluconate-HEPES 溶液
164.4 mM K-Gluconate (Sigma)
20 mM HEPES
PH=7.4

1-2-6 免疫染色法による興奮性シナプスの解析

<試薬>

○ PBS 溶液

PBS 粉末 (富士フイルム和光純薬) を用いて作成した。

○ 10% Triton X-100 溶液

Triton X-100 を PBS 溶液と混合し作製した。

○ 4%-Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (4% PFA-PBS)

○Antibody 溶液

0.1M Tris-base
0.15M NaCl
0.1% TritonX-100
2% ヤギ血清 (NGS)
pH=7.4

<免疫染色法手順>

- ① PBS 溶液で 1 回洗浄。
- ② 4% PFA-PBS で 20 分間固定。
- ③ PBS 溶液で 3 回洗浄。
- ④ Antibody solution で 30 分ブロッキング。
- ⑤ Antibody solution に Anti-vGlut1 (1:2000) + Anti-MAP2 (1:1000) を溶解し、4°Cで一晩静置した。
- ⑥ PBS 溶液で 3 回洗浄。
- ⑦ Antibody solution に Alexa 594 (1:400) + Alexa 488 (1:400) を溶解し、30 分間静置。
- ⑧ PBS 溶液で 3 回洗浄。
- ⑨ ProLong[®] Gold Antifade Reagent with DAPI (life technologies) を用いてカバーガラスをスライドへ固定。
- ⑩ 共焦点顕微鏡 LSM 710 ZEN (Carl Zeiss) を用いて蛍光観察を行った。Alexa Fluor 488 は 488 nm、Alexa Fluor 594 は 594 nm の励起を照射し、それぞれの蛍光波長を観察した。

1 - 2 - 7 FM1-43 を用いたプレサイレントシナプスの同定

<試薬>

- 細胞外液 (Base+ 溶液)
 - 140 mM NaCl
 - 2.4 mM KCl
 - 10 mM HEPES
 - 10 mM Glucose

4 mM MgCl₂ × 6H₂O

2 mM CaCl₂

pH=7.4

○ リン酸緩衝液溶液 (PBS)

PBS 粉末 (富士フイルム和光純薬) を用いて作成した。

○ 10% Triton X-100 溶液

Triton X-100 を PBS 溶液と混合し作製した。

○ 4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (4% PFA-PBS)

○ Antibody 溶液

0.1M Tris-base

0.15M NaCl

0.1% TritonX-100

2% ヤギ血清 (NGS)

pH=7.4

○ FM1-43 溶液

10 μM FM1-43

10 μM CNQX

25 μM APV

2 mM CaCl₂

45 mM KCl Base+

<FM1-43 染色法手順>

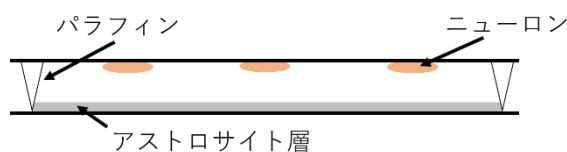
- ① 35-mm dish へカバーガラスを移動。
- ② Base+ 溶液で 1 回洗浄。
- ③ FM1-43 溶液を加え 2 分間静置。

- ④ Base+ (含 1 μ M TTX) で 3 分間 \times 3 回洗浄。
- ⑤ 4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (4%PFA-PBS) で 10 分固定。
- ⑥ PBS で 3 分間 \times 3 回洗浄。
- ⑦ カバーガラスを顕微鏡へ移動。
- ⑧ FM 画像取得 (exposure time 300 ms \times 10 slice)。
- ⑨ Antibody 溶液で 15 分間洗浄。
- ⑩ 全ての溶液を除去。
- ⑪ Antibody 溶液に Anti-vGlut1 (1:2000) + Anti-MAP2 (1:1000) を溶解し、3 時間静置。
- ⑫ PBS で 15 分洗浄。
- ⑬ Antibody 溶液に Alexa 594 (1:400) + Alexa 488 (1:400) を溶解し、30 分間静置。
- ⑭ PBS で 15 分洗浄。
- ⑮ VGLUT1 及び MAP2 画像取得 (exposure time 300 ms \times 10 slice)。

1-2-8 サンドイッチカルチャー標本作製手順

サンドイッチカルチャー標本は、まず、アストロサイトのみを培養し、別にパラフィンで固定したカバーガラスを作製して、パラフィンがある面にニューロンのみを培養する。その後、アストロサイト層の上にパラフィンとニューロンが存在する面を向き合わせた状態で重ね合わせる。パラフィンが存在していることにより、アストロサイトからの液性因子はニューロンへ供給されるが、アストロサイトとニューロン間の物理的接触は完全に除外することが可能となる (下図参照)。

第 1 章 1-2-2 と同様の手順で Mass culture アストロサイト層を作製し、アストロサイトを播種後 8~9 日後にニューロンとの共培養を行った。第 1 章 1-2-3 と同様にカバーガラスをコーティングし、パラフィンを 3 か所固定する。その後、第 1 章 1-2-4 と同様の手順で摘出したニューロンを 6 well プレート (TPP) に 6000 cells/well で播種する。1 日後にニューロンを播種したカバーガラスを Mass culture アストロサイト上にカバーガラスのニューロン面が下になるように置いた。ニューロン播種後、13~18 日後の標本を用いてシナプス解析を行った。ニューロン培養期間中は溶媒の交換を行わなかった。



サンドイッチカルチャー標本イメージ図

1 - 2 - 9 統計処理

2 群間の統計処理には、Student's t-test を使用した。

2 実験結果

2-1 アストロサイトに対する A β 25-35 の濃度検討

アストロサイトに対する A β 25-35 の適切な濃度を決定するために、異なる濃度 (1、3、および 10 μ M) の A β 25-35 を 72 時間処理し、アストロサイトの生存率を評価した。アストロサイトの数は、A β 25-35 で処理した 14 日後に NucBlue™ Live Ready Probes™ 試薬で染色することによりカウントした。アストロサイト数は 3 および 10 μ M でコントロールと比較して著しく減少した (Ctrl, 145 ± 13.3 ; 1 μ M, A β , 149 ± 9.58 ; 3 μ M, 113 ± 6.62 ; 10 μ M, 81.6 ± 9.32 ; 図 1A)。したがって、細胞死を伴わないシナプス伝達に対する A β 25-35 の効果の評価には A β 25-35 の 1 μ M が生理学的に適切であると考えた。よって、以下の実験では 1 μ M A β 25-35 を用いた。

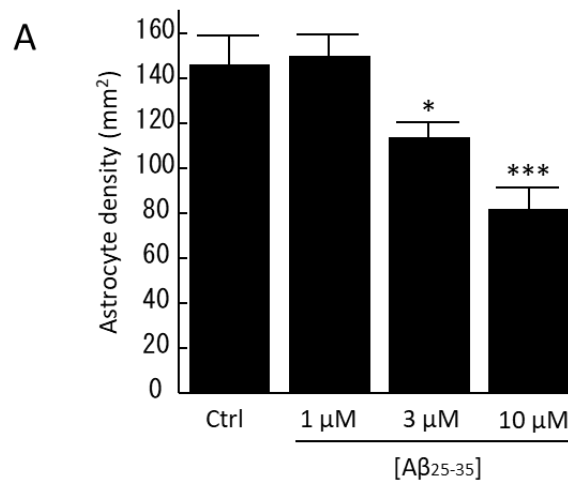


図 1 培養アストロサイトに対する A β 25-35 の濃度検討

2-2 A β 25-35 暴露アストロサイトのニューロンへの接触によるシナプス伝達評価

A β 25-35 に曝露されたアストロサイトによるシナプス伝達を評価するためにホールセルパッチクランプ法を用いた。まず、活動電位刺激による興奮性シナプス後電流 (Excitatory Postsynaptic Current, EPSC) を記録した (図 2A)。A β 25-35 に曝露されたアストロサイトと共培養された海馬ニューロンにおいて EPSC amplitude は有意に減少した (Ctrl, 8.82 ± 0.79 nA, $n = 49$ from 12 cultures; A β , 6.37 ± 0.65 nA, $n = 49$ from 12 cultures; 図 2B)。

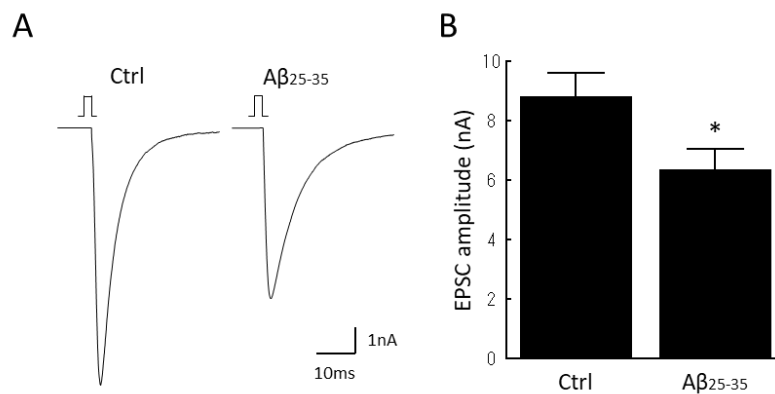


図 2 A β 25-35 暴露アストロサイトによりシナプス伝達は低下する

次に自発的なシナプス伝達を評価するために、Na⁺チャンネル阻害薬の 1μ M テトロドトキシンの存在下で miniature EPSC (mEPSC) を記録した (図 3A)。mEPSC amplitude は変化しなかったが (Ctrl, 26.00 ± 1.39 pA, $n = 49$ from 12 cultures; A β , 26.11 ± 1.43 pA, $n = 50$ from 12 cultures; 図 3B)、mEPSC frequency は A β 25-35 に曝露されたアストロサイトと共培養された海馬ニューロンにおいて有意に減少した (Ctrl, 8.07 ± 0.80 Hz; A β , 5.72 ± 0.69 Hz; 図 3C)。mEPSC は単一のシナプス小胞から放出される神経伝達物質によるシナプス後膜上の受容体を介した応答を示している (Bekkers et al., 1991; Katz et al., 1979)。シナプス後膜 (ポストシナプス) 側の変化は mEPSC amplitude に影響するのに対し、神経

終末部（プレシナプス）側の変化は mEPSC frequency に影響する。したがって、シナプス伝達の低下はプレシナプスの変化によるものであることを示唆している。

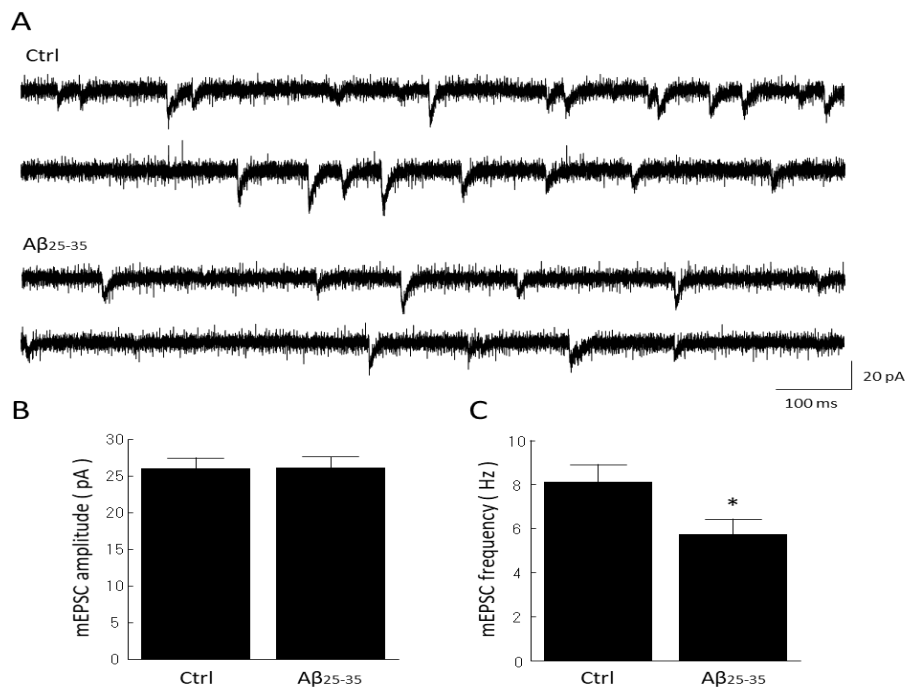


図3 $A\beta_{25-35}$ 暴露アストロサイトによりシナプス開口放出頻度は低下する

活動電位が神経終末部に到達すると電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介して細胞内へ Ca^{2+} が流入し、エキソサイトーシスによって神経伝達物質が放出される。シナプス小胞はドッキング、プライミングという過程を得てエキソサイトーシスされ、エンドサイトーシスにより再取り込みされることでシナプス内をリサイクリングしている。リサイクリング過程の中で、プライミング状態にある小胞群、つまり、いつでも開口放出可能な状態にある小胞群を Readily Releasable Pool (RRP) と呼び、RRPsize の変化はシナプス伝達へ影響する。

プレシナプス機能が変化する要因として、①RRPsize の減少②開口放出機能の低下③シナプス数の減少④サイレントシナプスの増加の4つを考えた。

まず、高浸透圧スクロース (0.5M) を用いて RRP に存在する小胞群を強制的に開口放出させることで RRPsize を測定した (図 4A)。A β 25-35 に曝露されたアストロサイトと共培養されたニューロンでは RRPsize の有意な減少を示した (Ctrl, 2.01 ± 0.27 nC, $n = 49$ from 12 cultures ; A β , 1.21 ± 0.15 nC, $n = 50$ from 12 cultures ; 図 4B)。RRPsize は開口放出可能な全てのシナプス小胞の応答を示しており、mEPSC は1つのシナプス小胞の応答を示していることから、RRP 電荷を平均 mEPSC 電荷で割ることにより、RRP のシナプス小胞数を求めることが可能である (Kawano et al., 2012)。シナプス小胞の数は、A β 25-35 に曝露されたアストロサイトと共培養されたニューロンで有意に減少した (Ctrl, 14934.93 ± 1854.36 , $n = 49$ from 12 cultures; A β , 9309.53 ± 1139.86 , $n = 50$ from 12 cultures; 図 4C)。

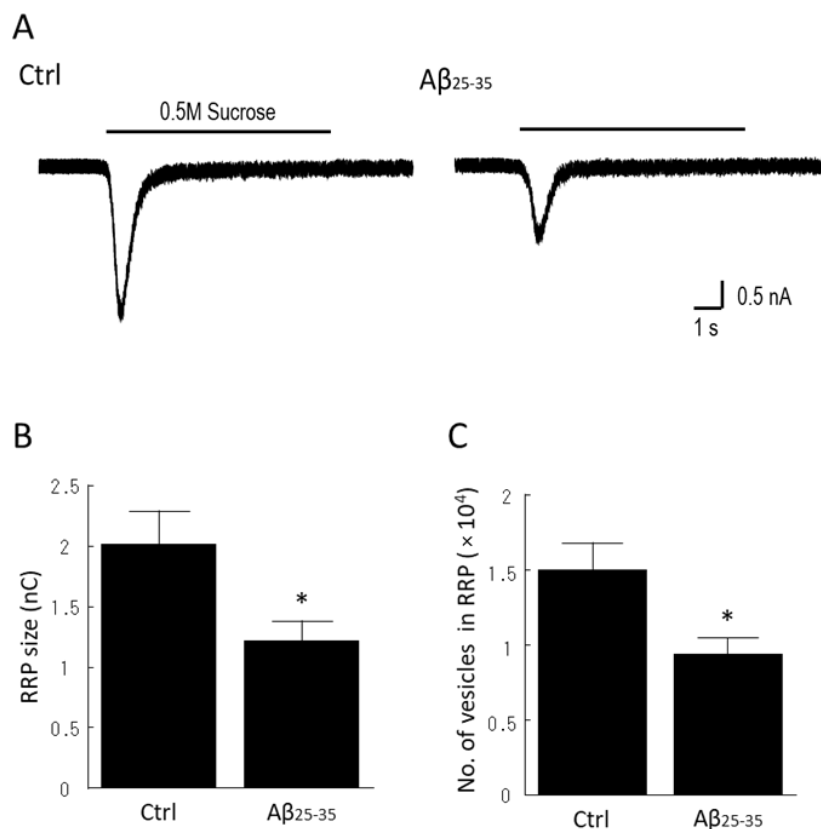


図4 Aβ₂₅₋₃₅ 暴露アストロサイトにより開口放出可能シナプス小胞数は減少する

次にシナプス放出機能を評価するために小胞放出確率 (Vesicular release probability, Pvr) と paired-pulse ratio (PPR) を求めた。Pvr は活動電位に応じた個々のシナプス小胞の放出確率として定義される。つまり、RRP に存在する小胞のうち、1回の活動電位刺激によって放出されるシナプス小胞の割合を示したものである。したがって、EPSC の電荷を RRP の電荷で除することで求めることができる。両グループにおいて Pvr に差は見られなかった (Ctrl, 7.05 ± 0.84 nA, $n = 49$ from 12 cultures; Aβ, 5.92 ± 0.73 nA, $n = 49$ from 12 cultures; 図 5A)。PPR は活動電位に続く Ca²⁺流入に対する Ca²⁺感受性の指標となる (Xu-Friedman and Regehr., 2004)。PPR は 50 ms 間隔の連続刺激によって誘発される EPSC の 2 回目の EPSC の振幅と 1 回目の EPSC の振幅の比として定義される。PPR も同様に両グループにおいて差は見られなかった (Ctrl, 1.03 ± 0.03 nA, $n = 49$ from 12 cultures; Aβ,

1.02 ± 0.03 nA, n = 50 from 12 cultures; 図 5B)。これらの結果は A β 25-35 に曝露されたアストロサイトによってシナプス放出機能が変化しなかったことを意味している。

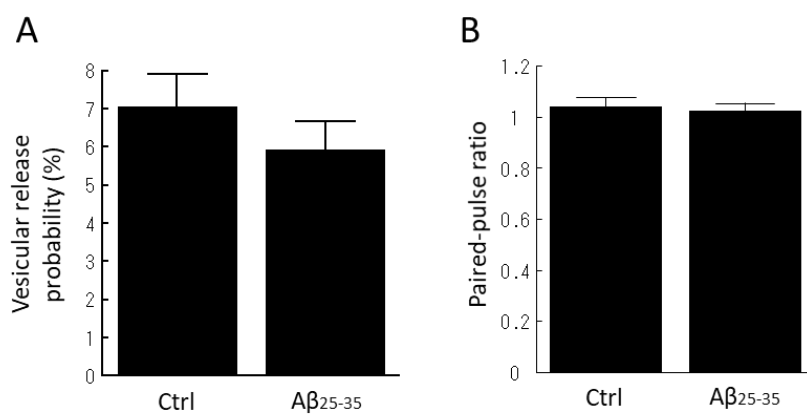


図 5 A β 25-35 曝露アストロサイトによりシナプス開口放出機能は変化しない

2-3 A β 25-35 暴露アストロサイトのニューロンへの接触によるシナプス形成及び樹状突起形態に対する検討

興奮性シナプスを VGLUT1 抗体、樹状突起を MAP2 抗体を用いて免疫染色法により評価した (図 6A, 上図 scale bars = 20 μ m, 下図 scale bars = 10 μ m)。A β 25-35 に曝露されたアストロサイトと共培養されたニューロンでは興奮性シナプス数が有意に減少した (Ctrl, 350.17 \pm 32.85, n = 39 from 4 cultures; A β , 203.91 \pm 18.56, n = 35 from 4 cultures; 図 6B)。次に、樹状突起形態を Sholl analysis 法により評価した (図 6C)。Sholl analysis 法は細胞体を中心に同心円を描くことで、その同心円と神経突起が交差した回数を評価することが可能である。A β 25-35 に曝露されたアストロサイトと共培養されたニューロンでは、樹状突起の交差回数が有意に減少した (Ctrl, 181.64 \pm 13.50, n = 23 from 5 cultures; A β , 134.82 \pm 7.64, n = 35 from 4 cultures; 図 6D)。

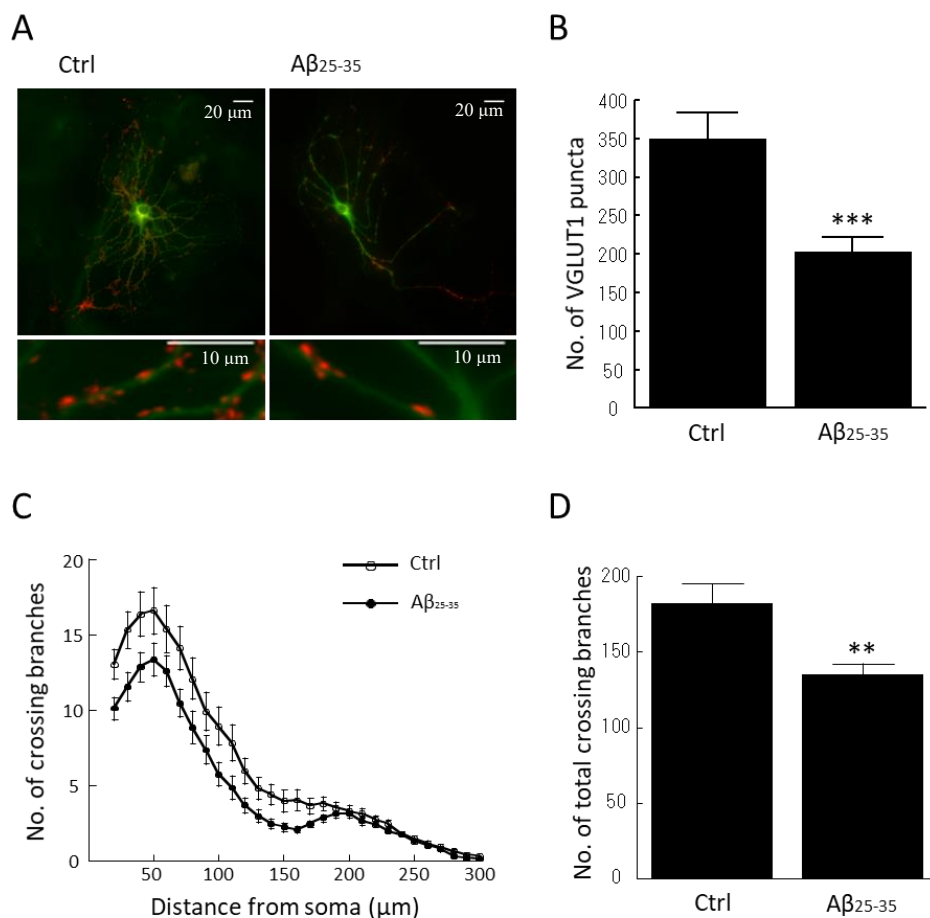


図 6 シナプス形成及び樹状突起変化

2-4 A β 25-35 暴露アストロサイトのニューロンへの接触によるプレサイレントシナプスの検討

プレシナプスにはシナプスが形成されているにも関わらず神経伝達物質を放出しないサイレントシナプスが存在する (Crawford and Steven., 2012)。開口放出機能に変化は見られなかったことから (図 5 A,B)、mEPSC frequency (図 3 C) と RRPsize (図 4 B) の減少はシナプス数の減少 (図 6 B) が1つの要因として考えられる。しかしながら、サイレントシナプスの増加が mEPSC frequency (図 3 C) と RRPsize (図 4 B) の減少に関与している可能性も考えられる。そこで、FM1-43 を使用してプレサイレントシナプス割合を評価した。FM1-43 はシナプス小胞のエンドサイトーシスによって取り込まれる蛍光色素である。つまりエンドサイトーシスが生じていないプレサイレントシナプスには取り込まれない。したがって、VGLUT1 抗体 (赤) で標識されるが FM1-43 (緑) で標識されないシナプスをプレサイレントシナプスとして同定した (図 7A)。A β 25-35 に曝露されたアストロサイトと共培養されたニューロンではサイレントシナプスの割合が有意に増加した (Ctrl, 20.82 \pm 3.13, n = 13 from 4 cultures; A β , 30.7 \pm 3.50, n = 13 from 4 cultures; 図 7B)。

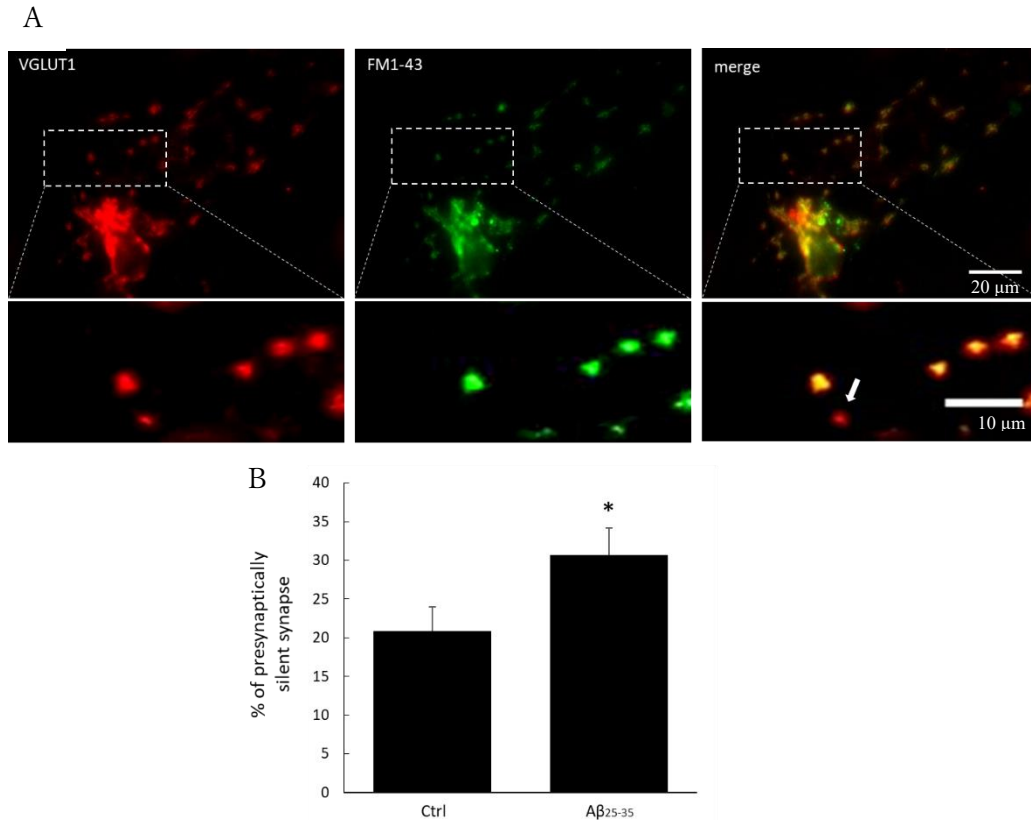


図 7 プレサイレントシナプスの割合は増加する

2-5 A β 25-35 暴露アストロサイトのニューロンへの接触除外によるシナプス伝達評価

A β 25-35 暴露アストロサイトのどのような要因がシナプス伝達異常に関与しているのか検討した。シナプス伝達やシナプス形成にはアストロサイトから放出される液性要因とアストロサイトがニューロンへ直接接触することによる接着要因の 2 つが関連している (Mauch et al., 2001; Christopherson et al., 2005; Kucukdereli et al., 2011)。A β とアストロサイトの液性因子の関係についての研究は多く存在する。例えば、A β は、シナプス形成やシナプス伝達に関与するアストロサイトから放出される glial cell line - derived neurotrophic factor (GDNF) や thrombospondins を減少させる (Tseng et al., 2012)。一方、アストロサイトのニューロンへの接着がシナプス伝達・形成に重要であるにも関わらず、A β に暴露されたアストロサイトの接着がシナプスへどのような影響を及ぼすかは明らかではない。そこで、A β に暴露されたアストロサイトとニューロンが直接接触していない条件下で、シナプス伝達を評価した。シナプス伝達の評価にはサンドイッチカルチャー 標本を用いた (Kaech and Banker., 2006)。まず、アストロサイトを Mass culture で作成し、A β 25-35 を 3 日間処置した A β 25-35 暴露アストロサイト層を作製する。その後、パラフィン固定したカバーガラス上に播種したニューロンとの共培養を行った (図 8A)。パラフィンが存在することで A β 25-35 暴露アストロサイトからのニューロンへの液性因子は供給されるが、物理的な接触は完全に除外することができる。

シナプス伝達を評価するために EPSC を記録した (図 8B)。EPSC amplitude は両グループで差はなかった (Ctrl, 3.91 ± 0.87 nA, $n = 23$ from 5 cultures; A β , 4.32 ± 0.88 nA, $n = 23$ from 5 cultures; 図 8C)。

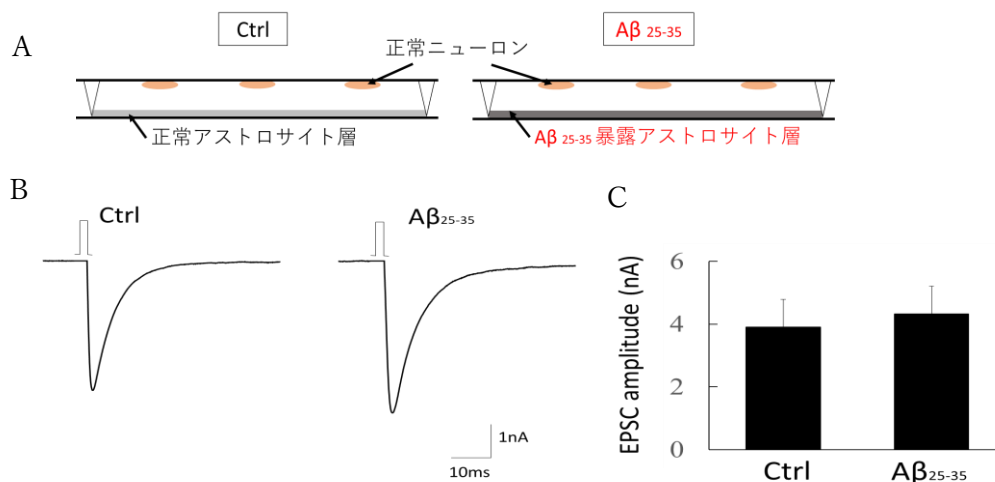


図 8 A β アストロサイトとの接触を除外すると興奮性シナプス伝達の抑制は消失する

次に $1 \mu\text{M}$ テトロドトキシンの存在下で miniature EPSC (mEPSC) を記録した (図 9A)。mEPSC amplitude (Ctrl, $21.54 \pm 0.96 \text{ pA}$, $n = 23$ from 5 cultures; $A\beta$, $20.42 \pm 1.01 \text{ pA}$, $n = 23$ from 5 cultures; 図 9B) および mEPSC frequency (Ctrl, $2.74 \pm 0.69 \text{ Hz}$, $n = 23$ from 5 cultures; $A\beta$, $2.70 \pm 0.75 \text{ Hz}$, $n = 23$ from 5 cultures; 図 9C) に変化はなかった。

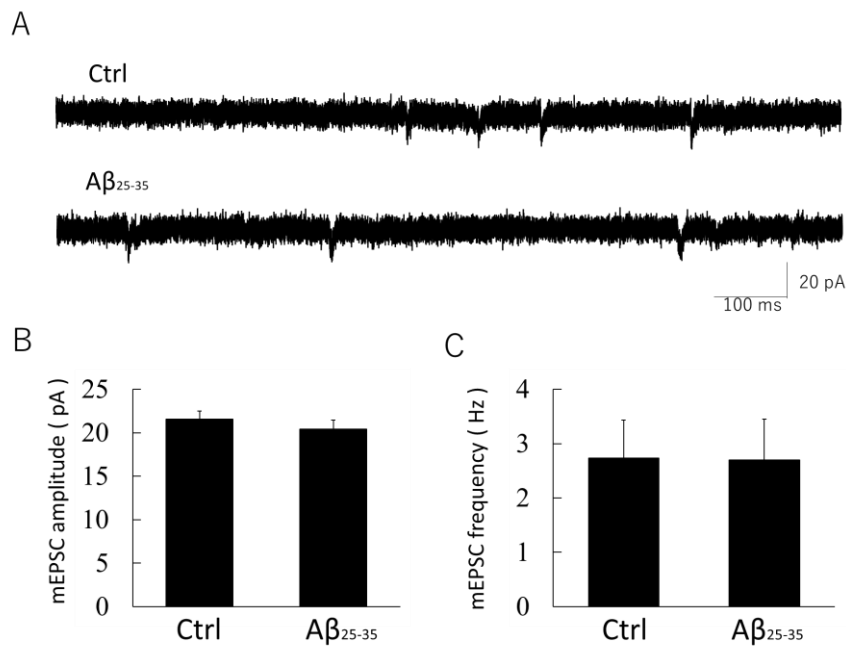


図 9 $A\beta$ アストロサイトとの接触を除外すると自発的な興奮性シナプス伝達の抑制は消失する

2-6 $A\beta_{25-35}$ 暴露アストロサイトのニューロンへの接触除外によるシナプス形成及び樹状突起形態に対する検討

興奮性シナプスを VGLUT1 抗体、樹状突起を MAP2 抗体を用いて免疫染色法により評価した (図 10A, 上図 scale bars = $20\ \mu\text{m}$, 下図 scale bars = $10\ \mu\text{m}$)。興奮性シナプス数に変化はなかった (Ctrl, 213.38 ± 24.49 , $n = 26$ from 4 cultures; $A\beta$, 221.00 ± 24.52 , $n = 31$ from 4 cultures; 図 10B)。

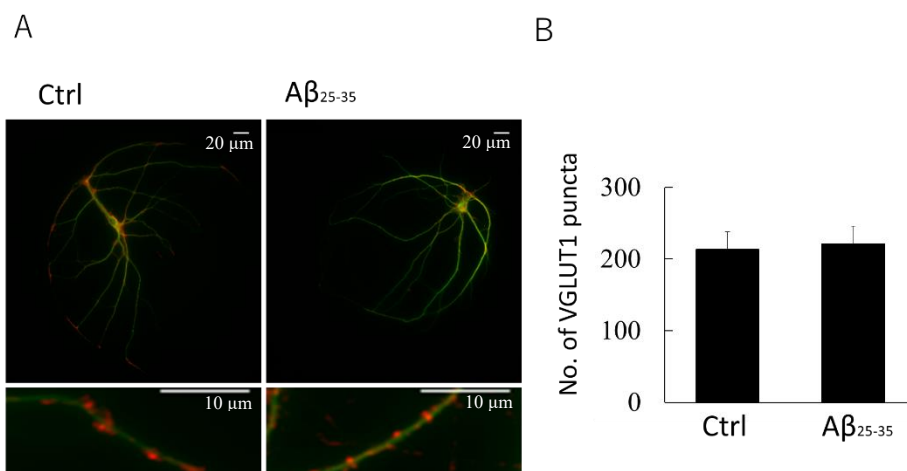


図 10 $A\beta$ アストロサイトとの接触を除外すると興奮性シナプス数の減少は消失する

3 小括

AD のシナプス伝達障害は $A\beta$ によって引き起こされることが明らかとなっている (Cullen et al., 1996; Small et al., 2001; Selkoe., 2002)。しかしながら、これらの研究では $A\beta$ によるアストロサイトの異常がシナプス伝達障害に関与しているかは明らかではない。In vivo 研究において $A\beta$ をアストロサイトだけに作用させることは難しく、アストロサイトおよびニューロンのどちらへも作用してしまうことから、アストロサイトの異常がシナプス伝達異常に関与しているかを評価することは困難である。そこで、本研究では $A\beta$ 25-35 に暴露されたアストロサイトと $A\beta$ 25-35 にさらされていないニューロンとの共培養を用いて in vitro 研究を行った。 $A\beta$ 25-35 に暴露されたアストロサイトと共培養したニューロンでは興奮性シナプス伝達の低下を示した (図 2)。シナプス放出機能は変化していなかったことから (図 5)、シナプス伝達の低下はシナプス数の減少 (図 6)、さらにプレサイレントシナプス割合の増加 (図 7) に起因することが明らかとなった。プレサイレントシナプスの生理学的な存在意義は明らかとなっていないが、本研究はプレサイレントシナプスがアルツハイマー病態に関与していることを示唆している。プレサイレントシナプスを神経伝達物質の放出可能なアクティブシナプスにすることができれば、シナプス伝達を回復できるかもしれない。 $A\beta$ は AMPA 受容体の異常を引き起こすことが報告されている (Hsieh et al., 2006) が、本章では mEPSC の振幅に変化は見られなかったことから (図 3 B)、AMPA 受容体の感受性や数に影響はないと考えられる。 $A\beta$ 1-40 露出アストロサイトと共培養された海馬ニューロン (Kawano et al., 2017) はこの研究と同様の結果を示していることから、 $A\beta$ 暴露アストロサイトはニューロンの AMPA 受容体の特性に影響を与えないと推測される。

次にアストロサイトのどのような要因がシナプス伝達へ関与しているかを検討した。アストロサイトは液性因子の放出とニューロンへ直接接触することでシナプス伝達やシナプス形成を調節する。 $A\beta$ によってアストロサイトの液性因子が影響を受けことは報告されているが (Tseng et al., 2012)、接着要因に関する検討は行われていない。そこで本研究ではアストロサイトとニューロンの接着に着目した。 $A\beta$ 暴露アストロサイトとの直接的な接触を除外して共培養したニューロンでは、シナプス伝達及びシナプス形成の異常を示さなかった (図 8、9、10)。つまり、 $A\beta$ によってアストロサイトの接着に関連する因子が原因となり、シナプス伝達の異常を生じた可能性がある。しかしながら、本章では因子の特定には至っていないため、さらなる検討が必要である。

本章ではニューロンが $A\beta$ に直接さらされていなくても、 $A\beta$ がアストロサイトに作用することによってシナプス伝達の障害を引き起こすことを示した。つまり、アルツハイマー病においてアストロサイトを $A\beta$ から防御する事が新たな治療法となりうることを示唆している。

第2章 アストロサイトの密度変化によるシナプス伝達変化の検討

第1節 アストロサイトの密度増加によるシナプス伝達の亢進

1 実験材料および実験方法

1-1 実験動物

第1章 1-1と同様である。

1-2 実験方法

1-2-1 マイクロアイランド状アストロサイト培養標本作成手順

第1章 1-2-3と同様である。

1-2-2 オータプス培養標本作成手順

第1章 1-2-4と同様である。

1-2-3 ホールセルパッチクランプ法によるシナプス伝達解析

第1章 1-2-5と同様である。

1-2-4 免疫染色法による興奮性シナプスの解析

第1章 1-2-6と同様である。

1-2-5 FM1-43を用いたプレサイレントシナプスの同定

第1章 1-2-7と同様である。

1-2-6 統計処理

2 群間の統計処理には、Student's t-test を使用した。

2 実験結果

2-1 アストロサイトの密度変化による興奮性シナプス伝達解析

第1章では $A\beta$ 暴露アストロサイトによってシナプス伝達が障害されたことから、アルツハイマー病態にアストロサイトが関与していることが示唆された。近年、ES 細胞や iPS 細胞を様々な細胞に分化させる研究が行われている。また、iPS 細胞からアストロサイトへの分化法も確立されている。つまり、このような技術を用いて正常なアストロサイトを作り出して補充し、アストロサイトの機能不全を補うことでニューロンの機能不全を補える可能性がある。

アストロサイトの存在が重要であることはアストロサイトが存在しなければシナプス伝達やシナプス形成が低下する報告から明らかである (Hama et al., 2004)。しかしながら、アストロサイトの存在の重要性に関する報告は、アストロサイトが存在する場合と存在しない場合について評価しており、ニューロンに対するアストロサイトの割合の増加による影響は検討されていない。そこで本章ではアストロサイト密度の違いがシナプス伝達へ与える影響を評価した。

アストロサイト層内のアストロサイト数が 1-10 個の群を Low density group (LDG)、20-30 個の群を High density group (HDG) として群分けし評価した。アストロサイト数は NucBlue™ Live Ready Probes™ を用いて核を染色することによりカウントした。

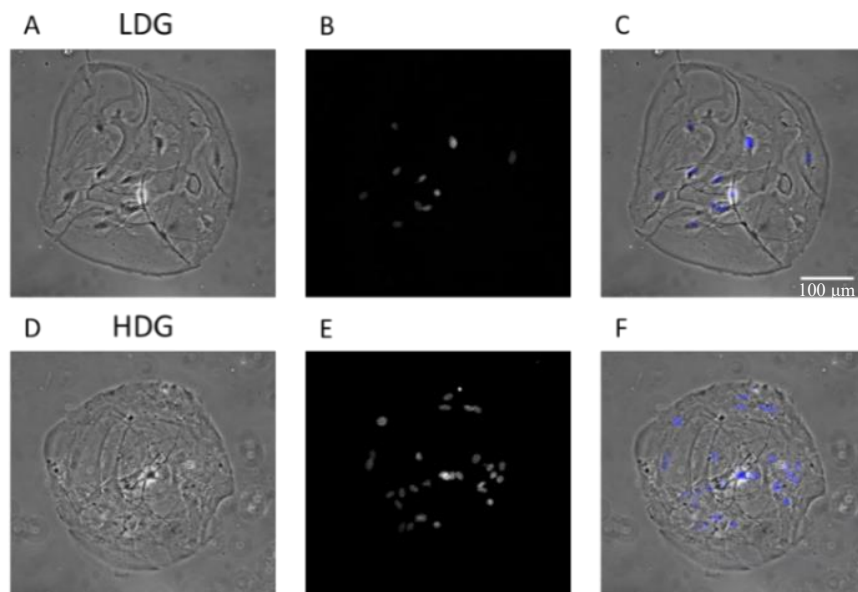


図 11 オータプス培養標本

アストロサイトの密度変化によるシナプス伝達への影響を評価するために、ホールセルパッチクランプ法を用いた。まず、活動電位刺激による興奮性シナプス後電流 (EPSC) を記録した (図 12A)。HDG では、EPSC amplitude は有意に増加した (LDG, 4.62 ± 0.53 nA, $n = 66$ from 10 cultures; HDG, 7.12 ± 0.71 nA, $n = 60$ from 10 cultures; 図 12B)。

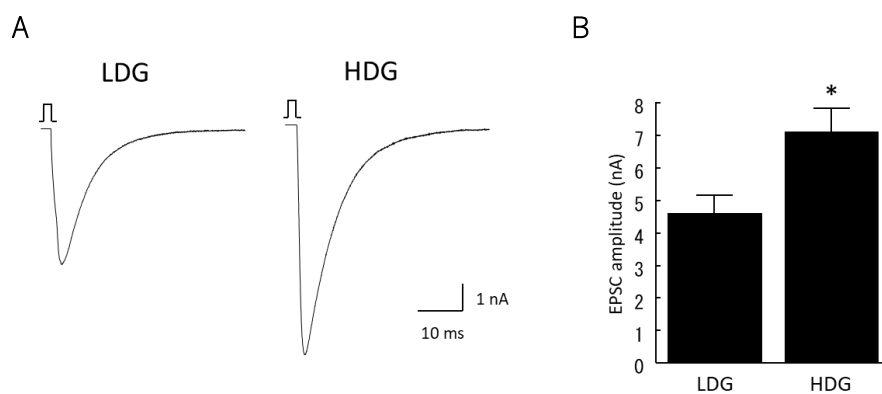


図 12 アストロサイトの密度増加により興奮性シナプス伝達は増加する

次に $1\mu\text{M}$ テトロドトキシン存在下で miniature EPSC (mEPSC) を記録した (図 13A)。 アストロサイトの密度変化によって、mEPSC amplitude は変化しなかったが (LDG, $29.1 \pm 1.01\text{ pA}$; HDG, $29.0 \pm 1.43\text{ pA}$, $n = 66$ from 10 cultures; 図 13B)、mEPSC frequency は HDG において有意に増加した (LDG, $7.07 \pm 0.84\text{ Hz}$; HDG, $9.88 \pm 1.01\text{ Hz}$, $n = 60$ from 10 cultures; 図 13C)。 これらの結果は、アストロサイトの密度が上昇することによってプレシナプス側に何らかの変化が生じ、結果的にシナプス伝達が増加したことを意味する。

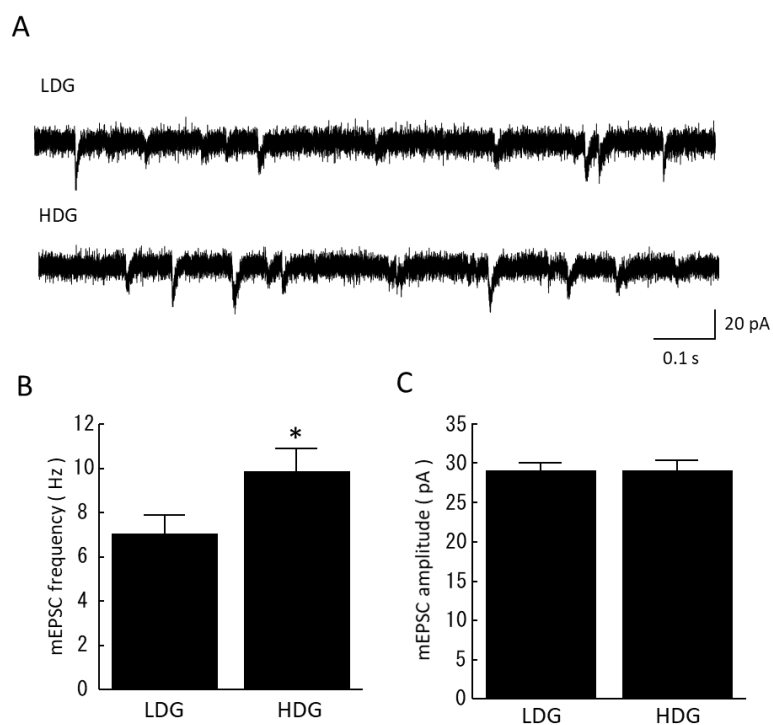


図 13 アストロサイト密度増加によりシナプス開口放出頻度は増加する

次にプレシナプスの変化について詳細に評価を行った。まず、0.5M スクロースに対する反応を測定することにより、シナプス小胞 (RRP) の容易に放出可能なプール (RRP) を測定した (図 14A)。HDG において RRP サイズは有意な増加を示した (LDG, 0.96 ± 0.15 nC, $n = 66$ from 10 cultures; HDG, 1.38 ± 0.15 nC, $n = 60$ from 10 cultures; 図 14B)。

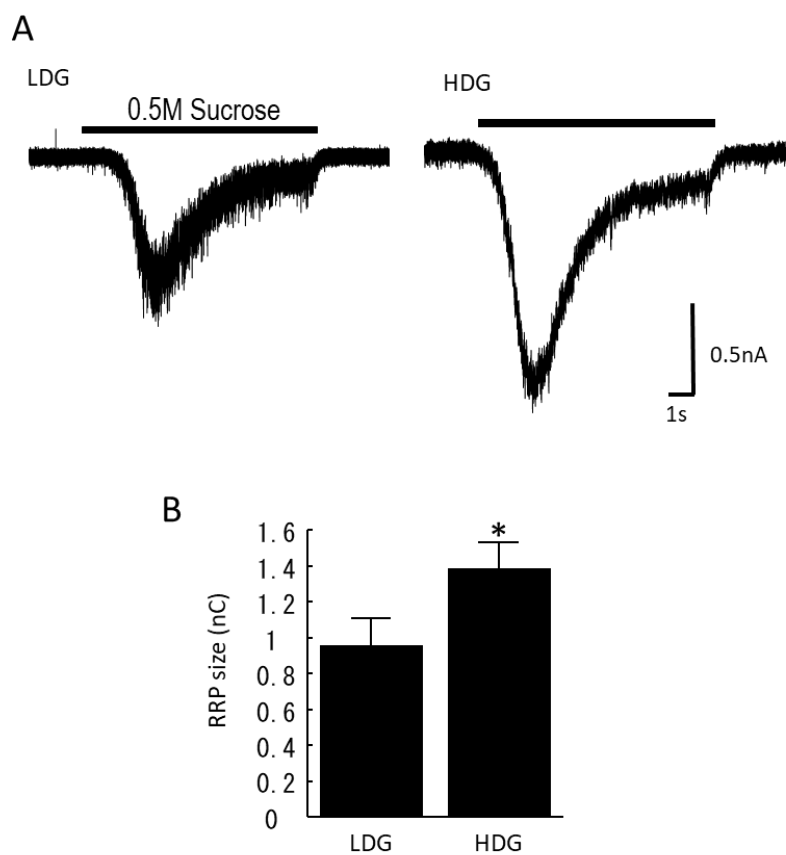


図 14 アストロサイト密度の増加により RRPsize は増加する

次にシナプス放出機能を評価した。アストロサイトの密度変化は Pvr に影響しなかった (LDG, $7.98 \pm 1.39\%$, n=66 from 10 cultures; HDG, $9.91 \pm 1.83\%$, n=60 from 10 cultures; 図 15A)。また、PPR も同様に両グループにおいて差は見られなかった (LDG, 1.00 ± 0.02 , n=46 from 7 cultures; HDG, 1.02 ± 0.03 , n=42 from 7 cultures; 図 15B)。これらの結果はアストロサイトの密度変化によってシナプス放出機能が変化しなかったことを意味している。

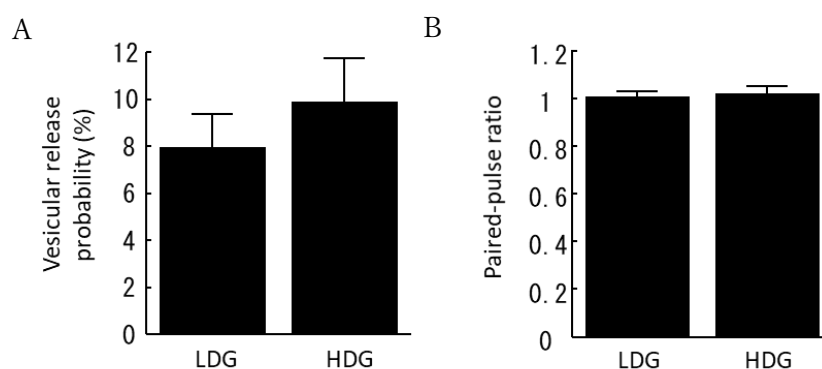


図 15 アストロサイト密度の増加により放出機能は変化しない

2-2 アストロサイトの密度変化による興奮性シナプス形成への検討

アストロサイト密度増加はシナプス放出機能に影響を与えなかった。したがって、HDGにおいてシナプス数が増加したことにより、RRPsizeが増加したのではないかと推測した。そこで興奮性シナプスを VGLUT1 抗体、樹状突起を MAP2 抗体を用いて免疫染色法を行った (図 16A)。興奮性シナプス数はアストロサイト密度増加により変化しなかった (LDG, 358.29 ± 32.32 , $n = 31$ from 4 cultures; HDG, 412.21 ± 43.29 , $n = 24$ from 4 cultures; 図 16B)。

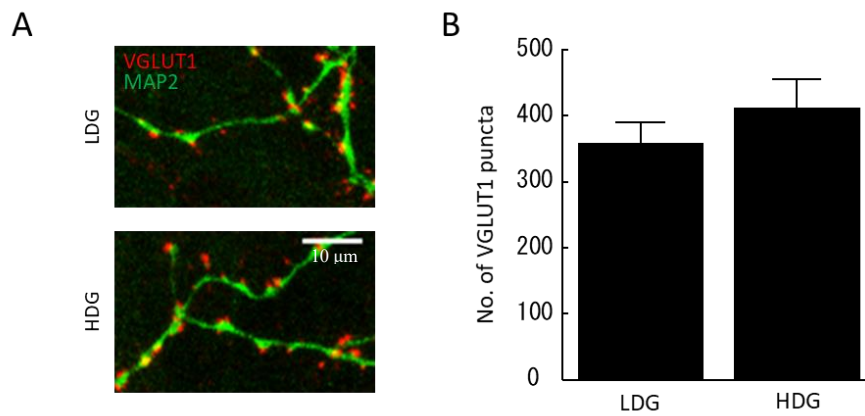


図 16 興奮性シナプス数は変化しない

2-3 アストロサイト密度変化によるプレサイレントシナプス割合変化の検討

アストロサイト密度の増加によりシナプス数は変化していないにもかかわらず、RRPsizeが増加したことをふまえると、形成されているシナプスの中のサイレントシナプスの割合が減少したことでシナプス伝達が増加したことが示唆される。そこで、FM1-43を使用してプレサイレントシナプス割合を評価した。VGLUT1抗体(赤)で標識されるがFM1-43(緑)で標識されないシナプスをプレサイレントシナプスとして同定した(図17A)。

プレサイレントシナプスの割合はHDGにおいて有意に減少した(LDG, 26.81 ± 3.68 , $n = 13$ from 11 cultures; HDG, 20.35 ± 1.86 , $n = 13$ from 11 cultures; 図17B)。

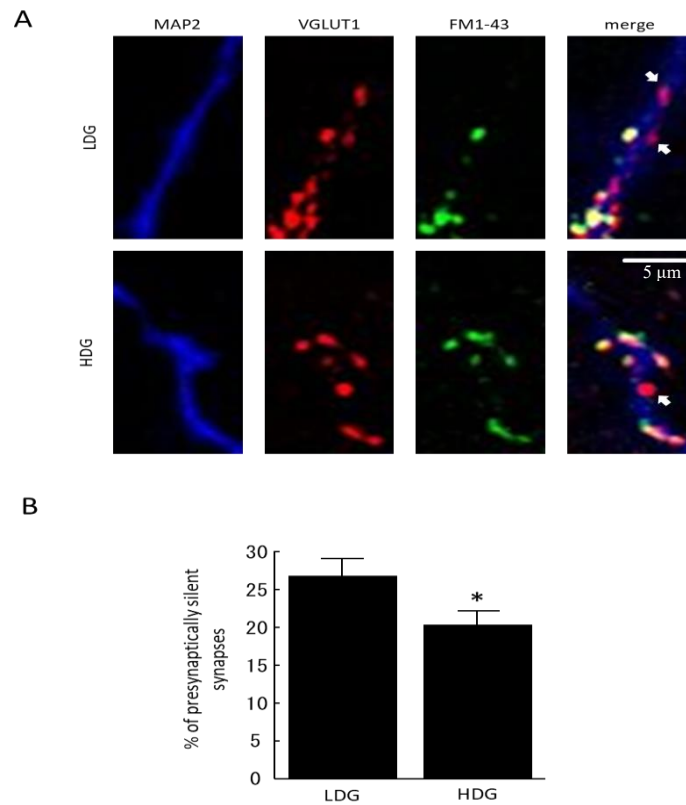


図17 サイレントシナプスの割合は減少する

3 考察と小括

本研究では異なるアストロサイト密度層と共培養された単一ニューロンにおけるシナプス伝達を評価した。アストロサイトの密度の違いは Pvr (図 15A)、paired-pulse ratio (図 15B)、およびシナプス数を変化させなかった (図 16A)。つまり、アストロサイトの密度変化はシナプス形成やシナプス開口放出機に影響しなかった。これらの結果については、1-10 個のアストロサイトであってもシナプス伝達やシナプス形成を維持するには十分であったと考えられる。EPSC amplitude (図 12)、mEPSC frequency (図 13B)、RRP size (図 14) は HDG で有意な増加を示した。一方、FM1-43 を用いたプレサイレントシナプスの同定では、HDG のニューロンにおいて、有意にサイレントシナプスの割合が減少した (図 17)。したがって、アストロサイト密度が高いことでシナプス終末部からのグルタミン酸放出部位が増加し、シナプス伝達が増加したと考えられる。

神経の活動レベルは神経終末のグルタミン酸放出部位の割合に影響することが報告されている。例えば、培養海馬ニューロンにおいて持続的強力な脱分極はプレサイレントシナプスを増加させる (Moulder et al., 2004)。一方、一次海馬培養におけるプレサイレントシナプス割合は、テトロドトキシン処置による活動電位のブロックにより減少する (Moulder et al., 2006)。しかしながら、神経活動レベルがどのようなメカニズムでプレサイレントシナプスを調節しているかは明らかとなっていない。一方、cAMP を利用したシグナルカスケードがシナプス前終末のサイレンシングとサイレンシング解除の両方に関与することが明らかとなっている。以前の研究では cAMP シグナル伝達の増加は、プレサイレントシナプスの数を低下させることが示されている (Moulder., 2008)。本研究では LDG と HDG の両方に対して上述したような神経活動レベルに影響する処置を行っていないため、サイレントシナプスの割合減少に対する神経活動レベルの関与は低いと考えられる。したがって、cAMP を介したシグナル経路が関与していることが示唆される。本研究のサイレントシナプス割合の減少には Pellerin and Magistretti によって提唱された the astrocyte–neuron lactate shuttle (ANLS) が関与している可能性がある (Pellerin L, Magistretti PJ., 1994)。アストロサイトの解糖系で生成した乳酸はニューロンへ供給され、そこでピルビン酸に変換され、その後、ミトコンドリアで酸化リン酸化を介して代謝されて、ATP を生成する。HDG では ANLS の活性化により、ニューロンへのエネルギー供給が増加したことで、cAMP シグナル経路が活性化し、サイレントシナプスの割合が減少した可能性がある。

ニューロンに対するアストロサイト密度増加によって、シナプス伝達は増加した。したがって、ADのようなシナプス伝達障害が生じているような疾患において、正常なアストロサイトを増やすことでシナプス伝達障害を回復できることを示唆している。

考察と総括

本研究では、 $A\beta$ によるアストロサイトを介したシナプス伝達への影響および新たな治療方法を提案することを目的とした。

第1章では $A\beta$ 25-35に暴露されたアストロサイトによる正常ニューロンに対する影響を検討した。

- ・ $A\beta$ 25-35 暴露アストロサイトと接触したニューロンのシナプス伝達は低下し、RRPsizeの減少を示した
- ・ $A\beta$ 25-35 暴露アストロサイトと接触したニューロンはシナプス数の減少、プレサイレントシナプス割合の増加を示した
- ・ $A\beta$ 25-35 暴露アストロサイトとニューロンが接触しなければシナプス伝達、シナプス数は維持された

以上の結果から、 $A\beta$ によるシナプス伝達障害は $A\beta$ が直接ニューロンへ作用しなくても、 $A\beta$ に暴露されアストロサイトによって引き起こされた。さらに、アストロサイトとニューロンの接着要因が関与していることが示唆された。したがって、アストロサイトはアルツハイマー病における治療標的になりうると考えられる。また、サイレントシナプス割合が増加していることから、サイレントシナプスを活性化することができればシナプス伝達を増加させることができると考えられる。

第2章ではアストロサイト密度変化によるシナプス伝達を評価した

- ・ アストロサイトの密度増加によってシナプス伝達は増加し、RRPsizeの増加を示した
- ・ アストロサイトの密度増加は放出機能およびシナプス数に影響しなかった

- ・ アストロサイトの密度増加はサイレントシナプスの割合を減少させた

以上の結果から、ニューロンに対する正常なアストロサイトの増加はサイレントシナプスの割合を減少させることでシナプス伝達を増加させることが明らかとなった。しかし、サイレントシナプスの調節に関するメカニズムは不明なため、さらなる検討が必要である。

神経変性疾患において神経異常にアストロサイトの機能異常が関与していることが明らかとなっている。本研究で示したようにニューロンに対する正常なアストロサイトの増加はシナプス伝達を亢進させたことをふまえると、アストロサイトの機能異常を補うために正常なアストロサイトを補充することで、神経機能を回復できることを示唆している。

参考文献

1. Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, Van der Flier WM (2016) Alzheimer's disease. *Lancet*. 388:505–517.
2. Roth M, Tomlinson BE, Blessed G (1966) Correlation between scores for dementia and counts of 'senile plaques' in cerebral grey matter of elderly subjects. *Nature*. 209:109–110.
3. Pike CJ, Cummings BJ, Monzavi R and Cotman CW (1994) Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 63:517–531.
4. Rama Rao KV, Kielian T (2015) Neuron-astrocyte interactions in neurodegenerative diseases: role of neuroinflammation. *Clin Exp Neuroimmunol*. 6:245–263.
5. Viola KL, Klein WL (2015) Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol*. 129:183–206.
6. Tu S, Okamoto S, Lipton SA, Xu H (2014) Oligomeric A β -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 9:48.
7. Hefti F, Goure WF, Jerecic J, Iverson KS, Walicke PA, Krafft GA (2013) The case for soluble A β oligomers as a drug target in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 34:261–266.
8. Koffie RM, Hyman BT, Spires-Jones TL (2011) Alzheimer's disease: synapses gone cold. *Mol Neurodegener*. 6:63.
9. Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 297:353–356.
10. Sloan SA, Barres BA (2014) Mechanisms of astrocyte development and their contributions to

neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Neurobiol.* 27:75–81.

11. Laurence JA, Fatemi SH (2005) Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects. *Cerebellum.* 4:206–210.
12. Fatemi SH, Folsom TD, Reutiman TJ, Lee S (2008) Expression of astrocytic markers aquaporin 4 and connexin 43 is altered in brains of subjects with autism. *Synapse.* 62:501–507.
13. Rodríguez JJ, Yeh CY, Terzieva S, Olabarria M, Kulijewicz-Nawrot M, Verkhratsky A (2014) Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. *Neurobiol Aging.* 35(1):15-23.
14. Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto S, Dziewczapolski G, Nakamura T et al (2013) A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(27):2518–2527.
15. Lee L, Kosuri P and Arancio O (2014) Picomolar Amyloid- β Peptides Enhance Spontaneous Astrocyte Calcium Transient. *J Alzheimers Dis.* 38(1):49–62.
16. Bekkers JM, Stevens CF (1991) Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(17):7834-7838.
17. Katz, B., and R. Miledi (1979) Estimates of quantal content during ‘chemical potentiation’ of transmitter release. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 205:369–378.
18. Devon C. Crawford and Steven Mennerick (2012) Presynaptically silent synapses: dormancy and awakening of presynaptic vesicle release. *Neuroscientist.* 18(3): 216–223.
19. Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A and Pfrieger FW (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science.* 294:1354–1357.

20. Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, MULLowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P and Barres BA (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*. 120:421–433.
21. Kucukdereli H, Allen NJ, Lee AT, Feng A, Ozlu MI, Conatser LM, Chakraborty C, Workman G et al (2011) Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:440–449.
22. Tseng PT, Lee Y and Lin PY (2012) Age-associated decrease in serum glial cell line-derived neurotrophic factor levels in patients with major depressive disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry*. 40:334–339.
23. Kaech S, Banker G (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc*. 1(5):2406–2415.
24. Cullen WK, Wu J, Anwyl R, Rowan MJ (1996) beta-Amyloid produces a delayed NMDA receptor-dependent reduction in synaptic transmission in rat hippocampus. *NeuroReport*. 8:87–92.
25. Small DH, Mok SS and Bornstein JC (2001) Alzheimer's disease and A β toxicity: from top to bottom. *Nat Rev Neurosci*. 2:595–598.
26. Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 298:789–791.
27. Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R (2006) AMPAR removal underlies A β -induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron*. 52: 831–843.
28. Kawano H, Oyabu K, Yamamoto H, Eto K, Adaniya Y, Kubota K, Watanabe T, Hirano-Iwata A et al (2017) Astrocytes with previous chronic exposure to amyloid β -peptide fragment 1-40 suppress excitatory synaptic transmission. *J Neurochem*. 143(6):624-634.
29. Devon C. Crawford and Steven Mennerick (2012) Presynaptically silent synapses: dormancy and

awakening of presynaptic vesicle release. *Neuroscientist*. 18(3): 216–223.

30. Hama H., Hara C., Yamaguchi K., Miyawaki A (2004) PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron*. 41:405–415.
31. Moulder KL, Meeks JP, Shute AA, Hamilton CK, de Erausquin G, Mennerick S (2004) Plastic elimination of functional glutamate release sites by depolarization. *Neuron*. 42:423–435.
32. Moulder KL, Jiang X, Taylor AA, Olney JW, Mennerick S (2006) Physiological activity depresses synaptic function through an effect on vesicle priming. *J Neurosci*. 26(24):6618–26
33. Moulder KL, Jiang X, Chang C, Taylor AA, Benz AM, Conti AC (2008) A specific role for Ca²⁺-dependent adenylyl cyclases in recovery from adaptive presynaptic silencing. *Journal of Neuroscience*. 28(20):5159–68.
34. Pellerin L and Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:10625–9.

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に終始御指導、御鞭撻を賜りました福岡大学薬学研究科臨床疾患薬理学教室の岩崎克典教授に深く感謝致します。本研究の遂行にあたり終始御指導と御助言を賜りました渡辺拓也助教、窪田香織助教に深く感謝致します。また、多大な御指導、御助言とともに、終始実験を援助して下さった桂林秀太郎准教授に心より御礼申し上げます。共に実験して下さいました武田琴水女史、内野鉦也氏、清田寛樹氏をはじめ臨床疾患薬理学教室の皆様にも深く感謝致します。そして、学生生活を通じて始終精神的、経済的支援を賜りました家族や私を支えて下さった友人に心より感謝致します。最後に、本研究に尊い生命を提供して頂きました実験動物緒霊に深く感謝致します。