

アストロサイトの異常によるシナプス伝達の変化に関する研究

大藪 康平

福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

Changes in synaptic transmission due to astrocyte abnormalities

Kohei Oyabu

Dept. Neuropharmacology Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan**Abstract**

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disease that presents with cognitive and behavioral disorders. Because $A\beta_{25-35}$ cause synaptic dysfunction and synapses loss, $A\beta_{25-35}$ are regarded as an initiator of the pathogenesis of AD. Giving that astrocytes play important roles, such as modulation of neurotransmission, synaptogenesis, in information processing of the central nervous system, the close relationship between astrocytes and synapses suggests that astrocyte dysfunction by $A\beta_{25-35}$ affects synaptic abnormalities in AD. However, their relationship is not well understood so far. In this study, the synaptic transmission and synaptic number were assessed in single neuron cultures, where the neuron was co-cultured with astrocytes exposed $A\beta_{25-35}$, namely, the neuron had not undergone the exposure of $A\beta_{25-35}$. Neurons in direct contact with astrocytes showed a significant decrease in excitatory postsynaptic current. This study further implies that not only the direct neuronal effect of $A\beta_{25-35}$ but also the astrocyte-mediated effect is severe in the pathogenesis of AD.

keywords : Alzheimer's disease, $A\beta_{25-35}$, Astrocyte, synapse

【緒言/目的】

アルツハイマー病 (AD) は高齢化の進む現代において患者本人の QOL のみならず周囲による介護問題など、様々な社会問題を抱えている。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、根本的な治療法は未だに確立されていない。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新た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あり記憶障害や行動障害などの症状が現れる。 β -amyloid ($A\beta$) 原線維の沈着は早期から見られ[1-3]、 $A\beta$ は神経細胞の機能不全、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[4-7]。したがって、 $A\beta$ はADに深く関与している因子であると考えられている[8]。

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、神経細胞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、近年になり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。このように、アストロサ

イトと神経細胞は密接関係にあることから、神経機能を理解するには、神経細胞だけでなく、神経細胞とアストロサイトの相互作用を考える必要がある。

ADにおいてもA β 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[9]、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などがある[10]。しかしながら、A β が作用したアストロサイトによる神経細胞の機能障害への関与は明らかではない。

AD病態の理解には神経細胞のみに焦点を当てる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 β 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。

【実験方法】

A β ₂₅₋₃₅の調整及び処置

A β ₂₅₋₃₅のストック溶液は、A β ₂₅₋₃₅を2 μ 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。神経細胞を播種する前にA β ₂₅₋₃₅をアストロサイトに72時間処置した。

オータプス培養標本

生後0～1日齢ICRマウス大脳皮質より単離したアストロサイトをドット状に区画培養した後、ICRマウスの海馬神経細胞と共培養を行うことでオータプス培養標本作製した。神経細胞を播種して13～18日目にホールセルパッチクランプ法を用いて機能解析を行った。

ホールセルパッチクランプ法によるシナプス解析

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。

【結果】

1. A β 処置アストロサイトの神経細胞への接触によるシナプス伝達変化の解析

A β ₂₅₋₃₅を前処置したアストロサイトとA β ₂₅₋₃₅を処置していない神経細胞を共培養することで、A β ₂₅₋₃₅が作用したアストロサイトによる神経細胞への影響を検討した。A β 処置アストロサイトと共培養した神経細胞では、興奮性シナプス伝達の減少 (Fig 1 B) および自発的な開口放出頻度の減少を示した (Fig 1 D)。

2. A β 処置アストロサイトの神経細胞への非接触によるシナプス伝達変化の解析

シナプス伝達はアストロサイトが神経細胞へ直接接触することで促進される。そこで、A β ₂₅₋₃₅処置アストロサイトが神経細胞へ接触したことでシナプス伝達障害が生じたかを検討するためにA β 処置アストロサイトと神経細胞が直接接触しない条件下で共培養を行ったところ、興奮性シナプス伝達に変化はなかった (Fig 2 B)。

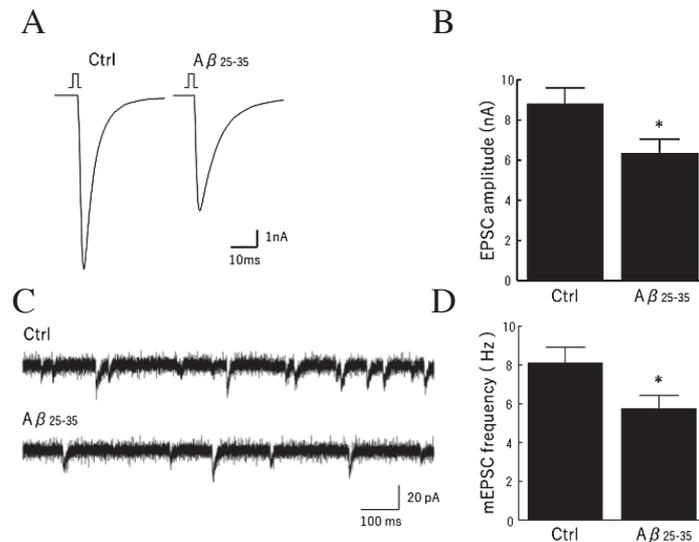


Fig.1 Effect of Aβ₂₅₋₃₅ exposed astrocytes on excitatory synaptic transmission
 (A) Representative traces of EPSCs recorded from autaptic neurons by electrophysiological recordings. (B) Average amplitude of evoked EPSCs in autaptic neurons. (C) Representative traces of miniature EPSCs in neurons. (D) Frequency of mEPSCs in autaptic neurons.

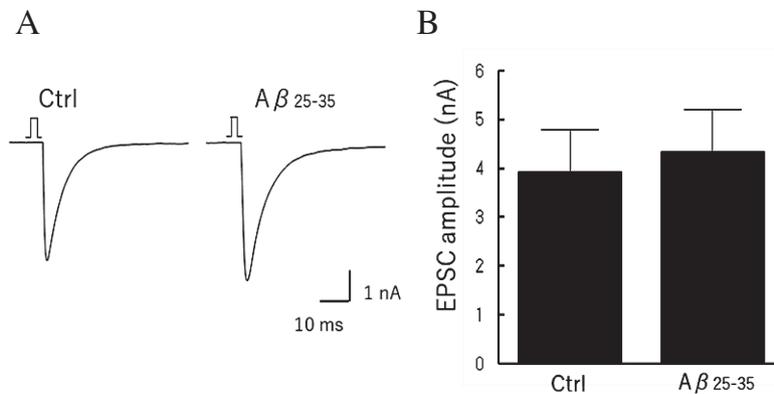


Fig.2 Effect of Aβ₂₅₋₃₅ exposed astrocytes on excitatory synaptic transmission
 (A) Representative traces of EPSCs recorded from autaptic neurons.
 (B) Average amplitude of evoked EPSCs in autaptic neurons.

3. アストロサイトの密度変化によるシナプス伝達変化の解析解析

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おり, 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。したがって, 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補充することで, 病態アストロサイトの機能不全を補い, 神経細胞の機能不全を補える可能性がある。

そこで, 神経細胞に対するアストロサイト数の増加 (密度増加) によるシナプス伝達への影響を検討した。神経細胞1つに対して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) として分類した。結果、アストロサイトの密度が高い群において、興奮性シナプス伝達および自発的な開口放出頻度が増加することが明らかとなった。

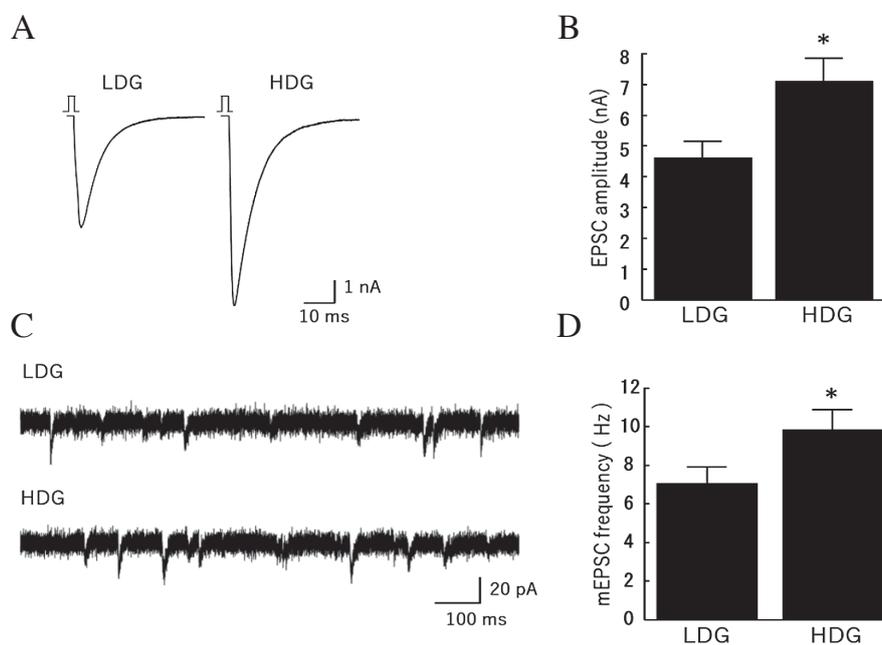


Fig.3 Effect of increased astrocyte density on synaptic transmission
 (A) Representative traces of EPSCs recorded electrophysiologically from autaptic neurons.
 (B) Average amplitudes of evoked EPSCs in autaptic neurons. (C) Representative traces of miniature EPSCs. (D) The frequency of mEPSCs in autaptic neurons.

【考察】

A β を処置したアストロサイトはA β が作用していない神経細胞のシナプス伝達低下を引き起こすことが明らかとなった。ADにおけるシナプス伝達障害はA β の神経細胞への直接作用だけでなく、アストロサイトを介して生じていることが示唆される。次にアストロサイトと神経細胞間の接触によるシナプス伝達への影響を検討するために、A β 処置アストロサイトと神経細胞が直接接触しない条件下で共培養を行ったところ、シナプス伝達は変化しなかった。つまり、A β 処置アストロサイトが神経細胞に直接接着することが、シナプス伝達障害を引き起こす必要条件である事が明らかとなった。これらのことはA β をアストロサイトへ作用させないことがADの新たな治療法となることを示唆している。

アストロサイトの密度増加は神経伝達を増加させたことをふまえると、正常アストロサイトを補充することでADにおけるシナプス伝達障害の回復を期待できると考えられる。このことは近年再生医療分野で研究が進められているiPS細胞を用いた“細胞医薬品”の開発に貢献できる可能性を含んでいる。したがって、アストロサイトの補充療法はアルツハイマー病における新たな治療戦略となるかもしれない。

【参考文献】

1. 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.
2. 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.
3. Rama Rao KV, Kielian T (2015) Neuron-astrocyte interactions in neurodegenerative diseases: role of neuroinflammation. *Clin Exp Neuroimmunol*. 6:245-263.
4. Viola KL, Klein WL (2015) Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol*. 129: 183-206.
5. Tu S, Okamoto S, Lipton SA, Xu H (2014) Oligomeric A β -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 9:48.
6. 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.
7. Koffie RM, Hyman BT, Spire-Jones TL (2011) Alzheimer's disease: synapses gone cold. *Mol Neurodegener*. 6:63.
8. Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 297:353-356.
9. Rodríguez JJ, Yeh CY, Terzieva S, Olabarria M, Kulijewicz-Nawrot M, Verkhatsky A (2014) Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. *Neurobiol Aging*. 35 (1) :15-23.
10. 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.