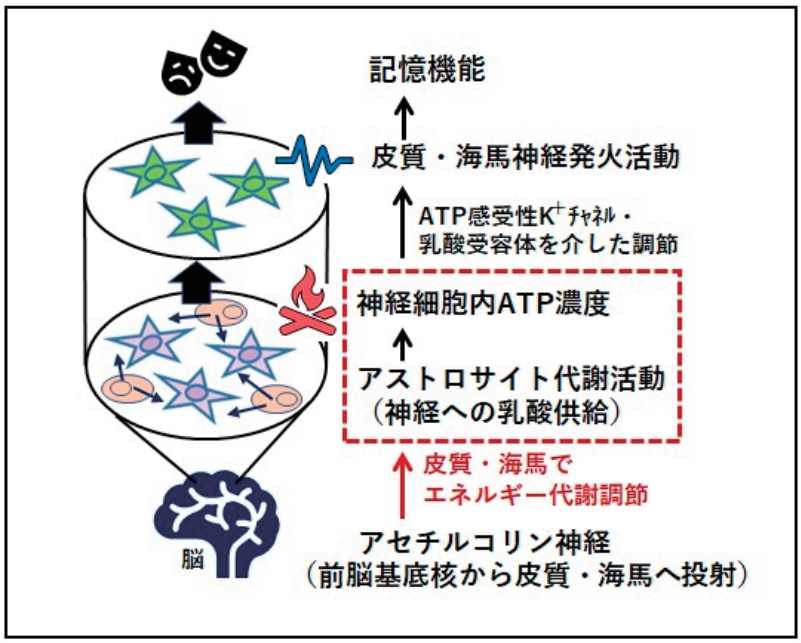
134　アセチルコリン神経の脳代謝調節機能と病態関与の解明	夏堀　晃世

【目的】アセチルコリン神経変性による脳内アセチルコリン減少は、アルツハイマー型認知症における記憶障害の中核病態として知られる。本研究の目的は、神経伝達物質の一つであるアセチルコリンが新たに脳のエネルギー代謝調節機能を持つことを示し、アルツハイマー型認知症においてアセチルコリン欠乏による脳代謝異常が記憶障害を引き起こしているという病態仮説を検証することである。

【方法】前脳基底核アセチルコリン神経に興奮性光感受性チャネルを発現させた遺伝子改変マウスに、皮質・海馬のアストロサイト（脳代謝調節に関わるグリア細胞の一種）の細胞内カルシウムと興奮性神経の細胞内 ATP（エネルギー分子）の濃度変化をそれぞれ感知する蛍光センサー（GFAP-GCamp と Thy1-ATeam）を発現させ、アセチルコリン神経の光活性化に伴う皮質・海馬のアストロサイトと興奮性神経の活動応答・代謝変動を、ファイバフォトメトリーを用いて計測した。また、化学遺伝学手法（DREADD システム）により前脳基底核アセチルコリン神経活動を選択的に抑制したマウスに空間記憶試験を実施するとともに、記憶試験中の海馬アストロサイト細胞内カルシウム活動をファイバフォトメトリーにより計測した。

【結果】前脳基底核アセチルコリン神経の光活性化により皮質・海馬のアストロサイト活性化がみられたが、皮質神経の細胞内 ATP 濃度は明らかな変化を示さなかった。この結果は、アセチルコリン神経の持つ脳代謝調節機能は、我々が最近報告したセロトニン神経の脳代謝調節機能とは異なることを示す。現在、アセチルコリン神経の光活性化に伴うアストロサイトから神経への乳酸（エネルギー中間体）供給活動の評価計測を行うため準備中である。次に、アセチルコリン神経抑制マウスに空間記憶試験を行ったところ有意な記憶低下を示した。当マウスがアルツハイマー型認知症のモデル動物であることを証明するため、アルツハイマー型認知症の治療薬であるコリンエステラーゼ阻害薬による記憶回復を現在検証中である。またこのアセチルコリン神経抑制マウスは、記憶低下と同時に海馬のアストロサイト活動の低下傾向を示した。本研究はアセチルコリン神経の新たな機能解明と、アセチルコリン神経変性により生じる記憶障害の中間病態として、アストロサイト活動を含めた脳代謝活動に異常が生じているという新たな病態仮説の検証に向け、引き続き実験を進める予定である。

本研究の全体構想―アセチルコリン神経の脳代謝調節機能とアルツハイマー型認知症への病態関与の解明



134. アセチルコリン神経の脳代謝調節機能と病態関与の解明

夏堀　晃世

東京都医学総合研究所 精神行動医学研究分野 睡眠プロジェクト

Key words： アセチルコリン神経，アルツハイマー型認知症，脳代謝活動，アストロサイト，空間記憶

緒　言

記憶障害を主症状とするアルツハイマー型認知症は、アセチルコリン神経変性による脳内アセチルコリン欠乏が中核病態として同定され、アセチルコリンの不足を補うコリンエステラーゼ阻害薬が記憶障害の治療に用いられている。しかし、脳内アセチルコリン不足が記憶障害を引き起こすメカニズムはこれまで未解明であった。研究代表者は最近、アセチルコリンと同じ neuromodulator（神経調節性因子）であるセロトニンが脳内におけるエネルギー代謝調節機能を持つことと、このセロトニンによる脳代謝調節機構にアセチルコリンも関与していることを発見した［1］。このことから、アセチルコリン神経が脳内のエネルギー代謝調節機能を持つ可能性が新たに示唆され、アセチルコリン神経変性を中核病態とするアルツハイマー型認知症に脳内エネルギー代謝異常が生じている可能性が初めて予想できた。

本研究の具体的な計画と目的は二段階から成る。第一の研究目的は、生体マウスにおける前脳基底核のアセチルコリン神経活動の光操作と、研究代表者が近年構築した脳代謝活動計測法［1，2］を組み合わせ、アセチルコリン神経が投射先である皮質・海馬において発揮するエネルギー代謝調節機能を解明することである。具体的には、アセチルコリン神経が投射先で、脳代謝活動調節に関わるグリア細胞の一種であるアストロサイトをまず活性化させ、アストロサイトの近傍神経への乳酸供給活動を促進させることで、神経の細胞内 ATP（エネルギー分子）の濃度が調節されるという仮説を立て、これを生体検証する。第二の研究目的は、アセチルコリン神経活動を人為的に抑制した認知症モデル動物を作製し、脳内エネルギー代謝活動の異常を検証することである。それにより本研究は、アセチルコリン神経の脳内エネルギー代謝調節機能の解明と、アルツハイマー型認知症の新たな病態仮説として、アセチルコリン欠乏による脳代謝異常が記憶障害を直接引き起こしている可能性の検証を目指した。

方　法

1. アセチルコリン神経による脳のエネルギー代謝調節機能の解明

前脳基底核アセチルコリン神経の脳内エネルギー代謝調節機能を明らかにするため、前脳基底核アセチルコリン神経選択的に興奮性光感受性チャネルを発現させた遺伝子改変マウス（ChAT-Cre::flex-ChR2（C128S）、以下 ChAT-ChR2 と記載）を作製して実験に用いた。マウスの前脳基底核へ留置した光ファイバを通じ、アセチルコリン神経を選択的に光活性化して投射先におけるアセチルコリンの放出を誘導した。このアセチルコリン神経の光活性化に伴う投射先のアストロサイトの活動変化を明らかにするため、アストロサイトの細胞内カルシウム活動を感知する蛍光センサー（GFAP-GCamp）をアデノ随伴ウイルスにより大脳皮質と海馬に発現させ、ファイバフォトメトリー（オリンパス社製）を用いた生体計測を行った［3］。さらに、アセチルコリン神経の光活性化に伴う投射先神経の細胞内 ATP 濃度変動を評価するため、皮質・海馬の興奮性神経の細胞質に ATP 蛍光センサーを発現させたマウス（Thy1-ATeam）と ChAT-ChR2 マウスを交配させた動物（ChAT-ChR2::Thy1-ATeam）を作製した。このマウスの前脳基底核と皮質あるいは海馬へ光ファイバを留置し、前脳基底核のアセチルコリン神

経の光活性化と同時に、皮質・海馬の興奮性神経の細胞内 ATP 濃度シグナルのファイバフォトメトリー計測を行った。これらの実験は全て馴化後、頭部固定下の生体マウスで行った。計測中、マウスの状態把握のために脳波と筋電図を常時モニタリングした。

2. アセチルコリン神経障害の認知症モデル動物における脳代謝異常の病態解明

化学遺伝学的手法（DREADD システム）により前脳基底核アセチルコリン神経の活動を選択的に抑制するため、ChAT-Cre マウスの前脳基底核に flex-hM4D（Gi）-mCherry を搭載したアデノ随伴ウイルスを局所投与した。このマウスに人工受容体作動薬（デスクロロクロザピン、以下 DCZ）を腹腔内投与することで、前脳基底核のアセチルコリン神経活動を選択的に抑制できる。このマウスの海馬依存性記憶を評価するため、空間記憶試験（Object locomotion test）を実施した。当試験は、マウスが試験 1 日目と 2 日目に置かれた位置が異なる物体を正しく認識し、これを 2 日目により長時間探索するかどうかで空間記憶を評価する。1 日目の記憶獲得時の直前に DCZ をマウスに投与し、アセチルコリン神経活動を抑制した。コントロールとしては、同一マウスに DCZ の代わりに生理食塩水を腹腔内投与して記憶試験をもう 1 クール行った。また、これらの空間記憶試験中のマウスの海馬アストロサイト活動を評価するため、アデノ随伴ウイルスを用いて GFAP-GCamp を海馬に発現させ、空間記憶試験中にファイバフォトメトリーを用いたアストロサイトのカルシウム活動計測を行った。

結果および考察

1. アセチルコリン神経による脳のエネルギー代謝調節機能の解明

前脳基底核アセチルコリン神経の選択的光活性化により、皮質あるいは海馬のアストロサイトの細胞内カルシウムシグナル（GFAP-GCamp シグナル）は、いずれも有意に増加した（図 1a）。一方、前脳基底核アセチルコリン神経の選択的光活性化により、皮質・海馬の興奮性神経の細胞内 ATP シグナル（Thy1-ATeam シグナル）は明らかな増加を認めなかった（図 1b）。一方で我々は最近、セロトニン神経が皮質アストロサイトの活性化と神経 ATP 濃度増加の両方を引き起こすことを報告している [1]。このことから、前脳基底核アセチルコリン神経が持つ脳代謝調節機能は、セロトニン神経のそれとは異なることが示唆された。一方、セロトニン神経の光活性化によるアストロサイトの活性化と神経 ATP 濃度増加は、ムスカリン性アセチルコリン受容体阻害薬であるスコポラミンあるいは化学遺伝学的手法（DREADD システム）によるアセチルコリン神経活動抑制により抑制された（図 1c）。このことから、セロトニンの脳代謝調節機能はアセチルコリンの同時存在下で発揮される可能性が示唆された。

アセチルコリン神経入力は投射先のアストロサイトを活性化させることから、次に活性化アストロサイトにより、エネルギー中間体である乳酸の神経への供給活動が促進される可能性の検証を目指した。アセチルコリン神経を光活性化したマウスの皮質細胞外乳酸濃度の変化を生体計測する計画を立て、2023 年 3 月末現在、酵素電極の輸入納品を待っている。アセチルコリン神経活性化による皮質アストロサイトから細胞外への乳酸放出が確認できた場合、セロトニン神経活性化下では乳酸の皮質神経への取り込み促進とエネルギー分子 ATP の合成が促進されたが、アセチルコリン神経活性化下では皮質神経の ATP 濃度増加がみられなかったことから、皮質神経の乳酸取込み促進が誘導されない可能性があり、これを検証する予定である。また、アストロサイトから神経への乳酸供給活動は動物の記憶機能に関連するとの報告があることから、2. において、アセチルコリン神経障害のモデル動物において乳酸供給活動に異常が生じている可能性の検証につなげる。

2. アセチルコリン神経障害の認知症モデル動物における脳代謝異常の病態解明

化学遺伝学手法（DREADD システム）により前脳基底核アセチルコリン神経の活動を選択的に抑制したマウス（ChAT-Cre::flex-hM4D（Gi）-mCherry）に対して空間記憶試験を施行したところ、記憶低下を認めた（図 2）。当マウスがアルツハイマー型認知症のモデル動物であることを主張するためには、アルツハイマー型認知症の治

療薬となっているコリンエステラーゼ阻害薬の投与により、この動物の記憶障害が回復することを確認する必要があり、現在実験を行っている。次に、この前脳基底核アセチルコリン神経の活動が低下した記憶障害マウスにおいて記憶試験中の海馬アストロサイトの細胞内カルシウム活動がいかに変容するかを明らかにするため、アストロサイトの細胞内カルシウムセンサーGFAP-GCamp のファイバフォトメトリー計測を行った。現在も実験中であるが、アセチルコリン神経活動が低下した記憶障害マウスでは、記憶試験中の海馬アストロサイトの活動が小さくなる傾向がみられている。本実験の次のステップとしては、この海馬アストロサイトの活動異常が引き起こす脳代謝活動異常（神経への乳酸供給活動異常、脳血流調節異常等）を同定し、記憶障害に対する因果関係を検証することを検討している。今後、1 と 2 を合わせ、アセチルコリン神経障害によるアルツハイマー型認知症のモデル動物における脳代謝異常の解明を、引き続き進めていく。

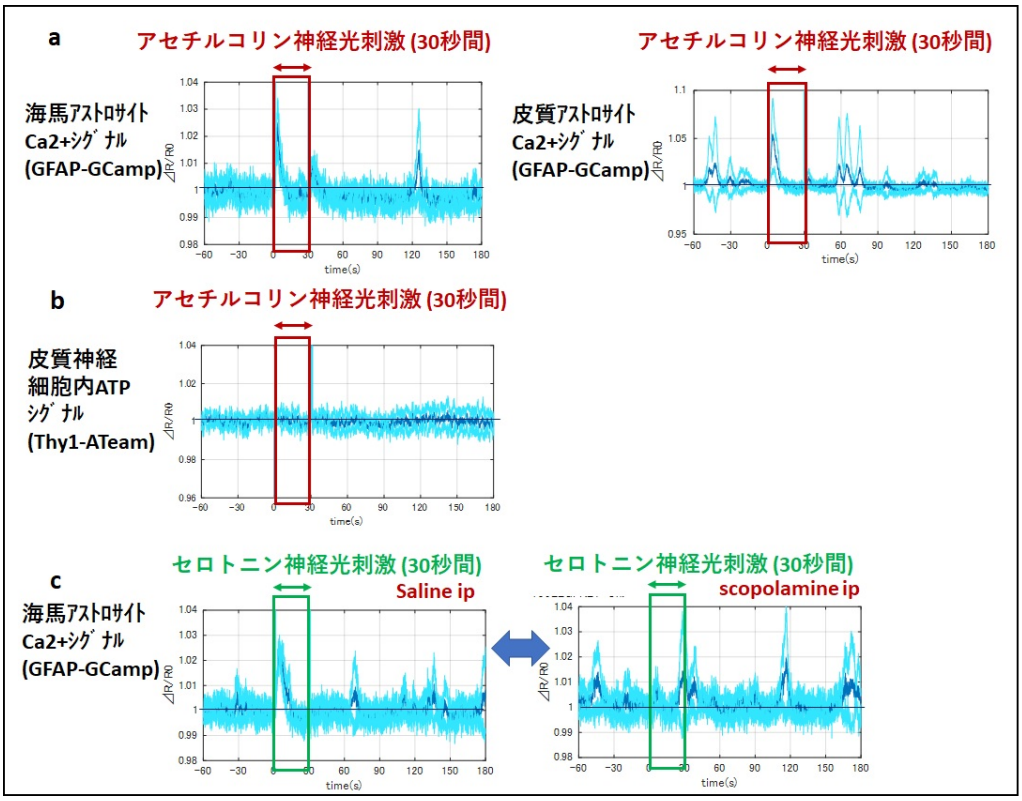


図 1. アセチルコリン神経光活性化による皮質・海馬アストロサイトのカルシウム活動と皮質・海馬神経の細胞内 ATP 濃度の応答

a）アセチルコリン神経光活性化に対する海馬（左）と皮質（右）のアストロサイトのカルシウムシグナル（GFAP-GCamp）応答。赤枠は 30 秒間のアセチルコリン神経光刺激期間を表す。シグナルトレースは、代表例 1 匹のマウスにおける 4〜6 回のアセチルコリン神経光刺激トライアルの応答を、刺激直前の値を 1 とする正規化の後に加算平均し、平均±SD で表した。

b）アセチルコリン神経光活性化に対する皮質興奮性神経の細胞内 ATP 濃度シグナル（Thy1-ATeam）の応答。アセチルコリン神経の光刺激下で、明らかなシグナル変動は生じなかった。データは a）と同じ解析方法で、平均±SD で表した。

c）セロトニン神経光活性化に対する海馬のアストロサイトのカルシウムシグナル（GFAP-GCamp）応答。同一マウスに、あらかじめ saline（生理食塩水：左）あるいはムスカリン性アセチルコリン受容体阻害薬である scopolamine（スコポラミン：右）を投与した場合のシグナル応答を比較したところ、scopolamine 投与下で有意な低下を認めた。データは a）、b）と同じ解析方法で、平均±SD で表した。

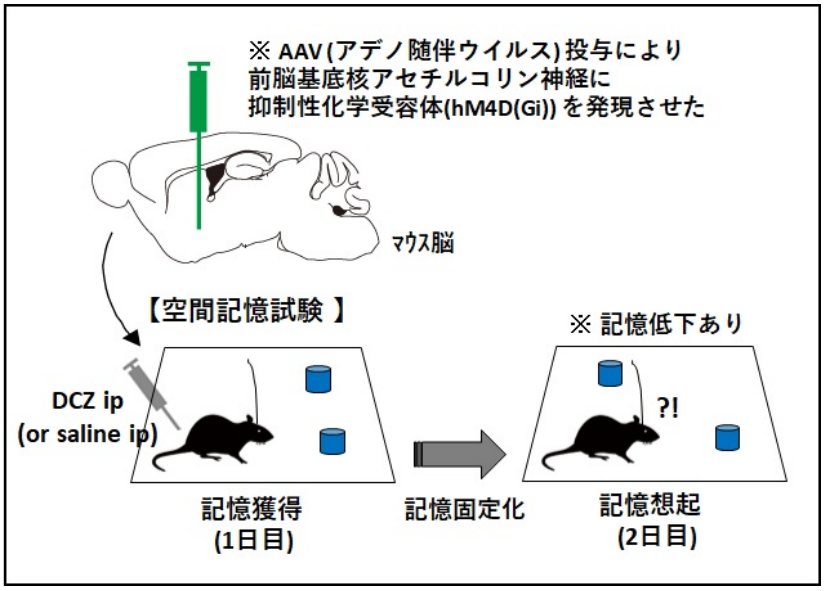


図 2. アセチルコリン神経活動抑制による記憶障害と背後の脳代謝異常の解明
化学遺伝学手法により前脳基底核アセチルコリン神経選択的に活動抑制したマウスに空間記憶試験を実施したところ、記憶機能低下を認めた。このマウスにおける海馬アストロサイト活動異常と脳代謝異常について現在解明中である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、公益財団法人東京都医学総合研究所睡眠プロジェクトの權秀珍、本多芳子、小島崇、本多真、生理学研究所ウイルスベクター開発室の小林憲太である。本研究は、公益財団法人上原記念生命科学財団 2021 年度研究奨励金の支援を受けて実施された。

文　献

1） Natsubori, A., Hirai, S., Kwon, S., Ono, D., Deng, F., Wan, J., Miyazawa, M., Kojima, T., Okado, H., Karashima, A., Li, Y., Tanaka, K.F., Honda, M. Serotonergic neurons control cortical neuronal intracellular energy dynamics by modulating astrocyte-neuron lactate shuttle. iScience, 2023, Jan 5;26(1):105830. doi: 10.1016/j.isci.2022.105830. eCollection 2023 Jan 20.

2） Natsubori A, Tsunematsu T, Karashima A, Imamura H, Kabe N, Trevisiol A, Hirrlinger J, Kodama T, Sanagi T, Masamoto K, Takata N, Nave KA, Matsui K, Tanaka KF, Honda M. Intracellular ATP levels in mouse cortical excitatory neurons varies with sleep-wake states. Commun Biol., 2020 Sep 7;3(1):491, doi: 10.1038/s42003-020-01215-6.

3） Natsubori, A., Tsustui-Kimura, I., Nishida, H., Bouchekioua, Y., Sekiya, H., Uchigashima, M., Watanabe, M., de Kerchove d'Exaerde, A., Mimura, M., Takata, N. & Tanaka, K.F. Ventrolateral striatal medium spiny neurons positively regulate food incentive, goal-directed behavior independently of D1 and D2 selectivity. J Neurosci. 2017 Mar 8;37(10):2723-2733. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3377-16.2017. Epub 2017 Feb 6.