

主論文

Long-Term Potentiation Enhances Neuronal Differentiation in the Chronic Hypoperfusion Model of Rats

(慢性低灌流ラットに長期増強を行うことで海馬における神経分化が促進される)

[緒言]

慢性脳低灌流や silent infarction はアルツハイマー病による認知症や非アルツハイマー病による認知症(血管性認知症)の一要因であると報告されている。軽度認知障害(mild cognitive impairment: MCI)はアルツハイマー病や非アルツハイマー病による認知症の preclinical な状態であることから、いかにして MCI の増悪を予防するかは重要な問題であるが、その方法に関してはまだ十分に解明されていない。

一方、成人期・老年期の海馬歯状回における神経新生の低下と中年期以降の海馬機能の低下の間に関連が報告されている。そのため MCI 患者において、成人期・老年期に神経新生を促進させることは、海馬機能を温存し、アルツハイマー病や非アルツハイマー病への進展を抑制する可能性が示唆される。

今回慢性低灌流モデルラットに対して、電気刺激によるアプローチ、特に記憶のメカニズムとされている長期増強(Long-term potentiation : LTP)を誘発させることで海馬の神経新生を促進させることができるかどうか実験を試みた。

LTP について以下に簡単な説明を加える。

海馬歯状回 (dentate gyrus) への入力線維(perforant pathway) を高頻度電気刺激するとシナプス伝達が増強する。この現象は高頻度電気刺激終了後も長期にわたり持続されるため、長期増強 (LTP) と呼ばれており、記憶のメカニズムに関与しているとされる。具体的には dentate gyrus に記録電極を、perforant pathway に刺激電極を留置し、刺激電極よりテスト刺激を加え、記録電極で baseline を記録したのち、刺激電極より高頻度刺激(high frequency stimulation: HFS)を加える。その後刺激電極よりテスト刺激を加え post-HFS baseline を記録する。テスト刺激により得られる 2 相性の波を高頻度刺激前後で比較すると、刺激前に比べて刺激後で波形が大きくなる。このことからシナプス伝達が増強したことが示される。LTP は 1973 年にその現象が確認されて以降、記憶の根幹をなす現象として様々な研究が行われており、近年はその分子レベルでの解析が盛んにおこなわれている。

健常ラットの海馬に LTP を起こすことにより海馬における神経新生がより促進されるという報告をもとに、これが慢性低灌流モデルにおいても応用できないかと考えた。

今回は慢性低灌流のモデルとして両側総頸動脈永久閉塞ラット(permanent 2-vessel occlusion: P2VO ラット)を作成し、これに LTP を誘発し神経新生を評価した。

[材料と方法]

実験動物

雄性 Wistar ラット(200-250g)

各処置の前に体重を測定し、全身状態の指標とした。

慢性低灌流モデル (permanent 2-vessel occlusion (P2VO)ラット)

ペントバルビタール(35 mg/kg, i.p.),を用いて全身麻酔下に両側総頸動脈を 5-0 絹糸で結紮、慢性低灌流モデルを作成した。後述の高頻度刺激直前に体重を測定し、200g 以下の個体については除外した。

電気生理学

P2VO ラット作成 1 週間後の亜急性期に LTP を起こすため片側の perforant pathway に電極を挿入し高頻度電気刺激を行った。

具体的には全身麻酔下にステレオ台を用い、微小電極(UJ-70-02-1.0, FHC Inc., USA)を以下の場所に挿入した。刺激電極 は Lamda 縫合より外側 4.5mm の perforant pathway に、記録電極 は Bregma より後方 3.7mm、外側 2.5mm の海馬歯状回に、いずれの電極についても、テスト刺激に対する波形を確認しながら深さを調整した。刺激電極・記録電極を最適な位置に留置したのち、高頻度刺激(0.5mA, 400Hz, 10 trains of 6 pulses 5 times)を行い、刺激前 30 分と刺激後 1 時間の、テスト刺激に対する反応の記録を比較、fEPSP が 120%以上、POP spike が 200%以上に増加した個体を有意に LTP が得られたと判断、LTP(+)群とした。

高頻度刺激をしたが上記の条件を満たさなかった群(LTP(-)群)、高頻度刺激をあたえなかった群(P2VO 群)、さらに高頻度刺激、P2VO を行わなかった群(Sham 群)の計 4 群で比較検討を行った。

またこれに加えて P2VO 作成後 12 週間経過したのち高頻度刺激を与えるモデル(chronic phase model)でも検討を行った。

免疫蛍光染色および統計処理

電気刺激を行った 1 週間後に屠殺、灌流固定を行い 40 μ m の凍結切片を作成、Bregma より後方 1.5mm-5.5mm の DG を 12 スライスごとに 1 枚、Ki-67、Doublecortin (DCX) で免疫染色を行い各群の刺激側、対側の陽性細胞数をカウントし、統計学的に検討した。

【結果】

体重変化

Sham 群と比較して P2VO を行なった 3 群では術 1 週間後には体重減少を、その 1 週間後には体重の増加を認めた。これら 3 群間で統計学的に有意な体重差は認めず、全身状態は同等であり、また脳の虚血性変化も同等であったと考えられる。また、電極の挿入や高頻度刺激といった電気生理学的な手技は体重に影響を与えなかった。

電気生理学

LTP が誘発された群では平均で fEPSP が 150% 以上、POPspike が 300% 以上を維持した。

神経新生評価

A) 亜急性期 LTP 誘発

Cell proliferation (Ki67 陽性細胞数)

Sham 群と比較し両側総頸動脈結紮を行った 3 群 (LTP(+), LTP(-), P2VO 群) では、両側とも Ki67 陽性細胞数の増加を認めた。高頻度刺激を与えた 2 群 (LTP(+), LTP(-) 群) では刺激側において非刺激側と比較して陽性細胞数の有意な増加を認めた。LTP(+)-群では LTP(-)-群と比較してさらに陽性細胞数の増加する傾向が認められた。

Neuronal differentiation (Ki67, DCX 重染色陽性細胞数)

Sham 群と比較し両側総頸動脈結紮を行った 3 群 (LTP(+),LTP(-),P2VO 群)では、両側とも Ki67/DCX 共陽性細胞数の増加を認めた。高頻度刺激を与えた 2 群 (LTP(+),LTP(-)群)では刺激側において非刺激側と比較して陽性細胞数の有意な増加を認め、加えて LTP(+群)では LTP(-)群と比較して陽性細胞数が有意に増加した。

B) 慢性期 LTP 誘発

chronic phase model ではいずれの群間でも Ki67 陽性細胞数に有意差がなく、また Ki67、DCX が重染色される神経細胞は確認し得なかった。

【考察】

これまで健常なラット、マウスに対して LTP を誘発させることで神経新生が促進されるという報告は存在した。本研究では慢性低灌流ラットに対して LTP を誘発し、これが治療への応用できないか検討したものである。

今回用いた P2VO ラットは慢性低灌流モデルとして老年、アルツハイマー病などの病態の基礎研究に広く使用されている方法である。長期的には海馬の細胞脱落を認めるモデルであるが、術後 1 週間、12 週間においては LTP を誘発することが可能であった。また術後の体重減少からは十分な虚血の存在と、虚血があっても長期生存できることが示されており、慢性低灌流モデルとして適切であったと考える。

また神経新生の評価のため Ki67 と DCX を用いて免疫染色を行なった。細胞の増殖のマーカーとして Bromodeoxyuridine (BrdU)がよく用いられ信頼性も高いが、細胞毒性を考慮し、また評価方法の信頼性として同等であるとの報告があることから Ki67 を採用した。

上述の結果のように、と高頻度刺激与えなかった群 (P2VO 群)と比較して高頻度刺激を与えた群では、LTP(-)群ではおよそ 30%、LTP(+群)においてはおよそ 40%、神経新生が増強されることが明らかとなった。

また chronic phase model では有意に神経新生が認められなかったことから、慢性低灌流モデルに対する高頻度刺激による神経新生の促進にはそれを可能とするタイムウインドウがあることが明らかとなった。

この結果より LTP を誘発する活動すなわち物事を学んだり、刺激的な環境に身を置

いたり、またランニングなど体を動かすことは脳血流の低下した海馬であっても、神経新生を促進させることができることを示唆している。また海馬が虚血によって破壊される前、できるだけ早い時期にそのような活動を開始することが望ましいことを示している。

こうした日常生活にある LTP を誘発する活動だけでなく、より積極的な医学的介入への応用も考えうるが、クリアすべき課題は多い。

今後 LTP による細胞増殖や分化の詳細なメカニズムを解明することが必要であり、このことはより効率的な神経新生につながり、脳低灌流による認知症等の加療・予防により効果的な治療法となりうるものと考ええる。

【結論】

高頻度電気刺激により LTP を誘発することで、慢性低灌流モデルラットの海馬における神経新生、特に神経系への分化が増強された。