

培養神経回路内の記憶に対するmiRNAの影響

学生氏名：藤田 裕介，指導教員名：高橋宏知

miRNA , Alzheimer's Disease, short-term memory , apoptosis , over-excitability

1. 概要

アルツハイマー病型認知症(AD)の早期発見を目的としたバイオマーカーの確立が期待されている。その候補の一つとして、miRNA let-7bが挙げられる。let-7bは、アルツハイマー病患者の脳脊髄液中で有意に増加することや[1]、血中でも増加する可能性が報告されている。let-7bは、神経細胞に過興奮や[2]、アポトーシスを誘導するが[3]、これらが、どのように神経回路の情報処理に影響するかは解明されていない。

本研究では、let-7bが神経回路の短期記憶に影響する可能性を検証する。具体的には、神経細胞の分散培養系を実験試料として、試料中の特定部位に刺激を与え、その誘発応答から機械学習により元の刺激箇所を識別する課題により、神経回路の短期記憶を定量化する。この短期記憶に対して、let-7bが及ぼす影響を考察する。

2. 手法

ー培養

ウイスターラット(E18)から胎児ラットの大脳皮質を摘出し、トリプシン処理をしてCMOS MEA上に播種(30,000 cells / chip)して培養した。

ー神経回路の記憶能力の定量化

Fig. 1 に示すように培養細胞に6種類の場所をランダムに各150回電気刺激して、計測された発火数に基づく誘発モデルから元の刺激の種類をサポートベクターマシン(libsvm)により推定する課題を行い、その分類精度により神経回路の短期記憶能力を定量化した。

ー単一神経細胞の解析指標

誘発応答の全体平均を $\mu(t)$ ，刺激パターン内の平均を $\mu_c(t)$ ，各刺激応答の発火数を $S_i(t)$ として、式(1)で定義されるフィッシャー線形分離指標(FDR)により、各チャンネルのもつ情報量を定量化した。

$$J_n(t) = \frac{\sum_c (\mu_c(t) - \mu(t))^2}{\sum_c \sum_{i \in c} (S_i^n(t) - \mu_c(t))^2} \quad (1)$$

ー遺伝子導入実験

培養細胞にヒトmiRNA let-7b(Thermo Scientific)を最終濃度 10^{-7} M で細胞に添加し、24時間インキュベ-

トすることで遺伝子導入した。導入前後で神経回路の記憶能力を比較解析した。さらにlet-7bが、神経細胞のアポトーシスを誘導することを、Hoechst33342(全細胞)とPI(死細胞のみ)の核染色により、検証した。

3. 結果

Cell Viability Assayでは、let-7bの導入(10 g / ml)が 17.3 ± 7.1 % (N = 3) にアポトーシスを誘導することを確認できた (Fig. 2)。

神経回路の短期記憶の指標として、誘発応答から、どれだけ刺激情報を推定できるかを検証した(Fig.3A)。その結果、刺激後4秒間の推定精度は80%以上と高く、その後、徐々に減少し、8秒後には偶然に一致する確率と等しくなった。このような短期記憶は、let-7bを導入すると、有意に低下したが(p = 0.02, N = 4)、統制群として、機能的配列を持たない遺伝子の導入(Fig.3B)では確認されなかった(p = 0.21, N = 4)。これらの結果から、let-7bは神経回路内の短期記憶を阻害することが示唆された。さらにFDRの昇順にチャンネルを学習データに加えながら分類精度の推移を調べた結果(Fig.4)、let-7b導入前で特定のチャンネル

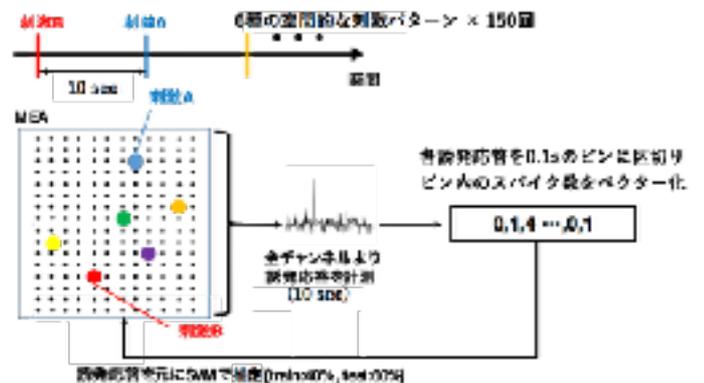


Fig.1 Experiment flow of memory test

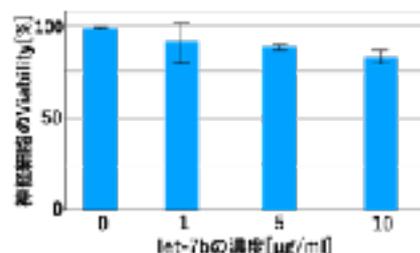


Fig.2 Result of cell viability assay

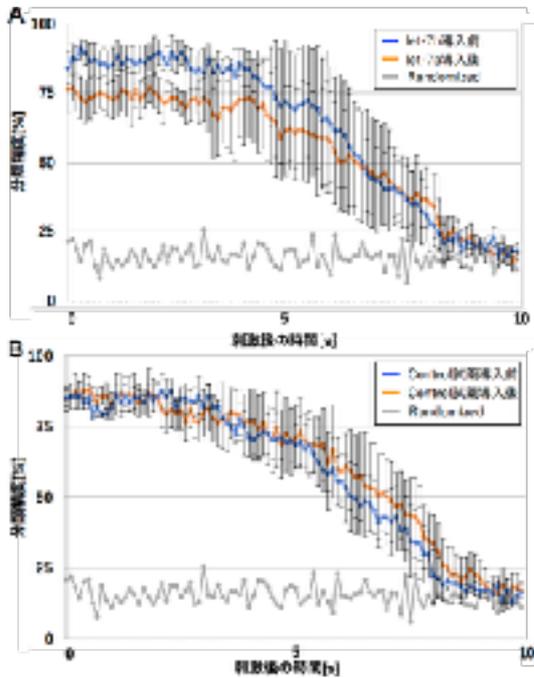


Fig.3 Short term memory depending on time

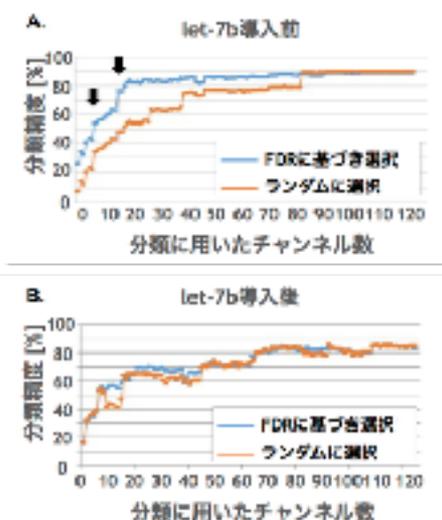


Fig.4 Score of memory test depending on channel

が分類精度を急激に上昇させることが確認され、局所的な情報表現がされていることが示唆された。

次に、個々の神経細胞の短期記憶をFDRで定量化した(N = 1)。その結果、let-7bの導入によってFDRが大幅に低下して、情報表現力を失う神経細胞が確認された(Fig.5A)。これらの神経細胞の発火頻度は、let-7b導入前に高かったが、導入後には大幅に低下した(Fig.5B)。

全サンプルの発火頻度の変化率は 2.58 ± 5.22 とlet-7bの投与により上昇傾向にあった。しかし、投与前に高い発火頻度を示していた神経細胞群(上位10%)では、let-7bにより、発火頻度の変化率は $0.32 \pm 0.81\%$ と低下した。またlet-7b導入により、元の発火頻度下位25%(Q4)は上昇傾向に比べて、上位25%(Q1)は減少傾向にあることがわかった(Fig.6)。

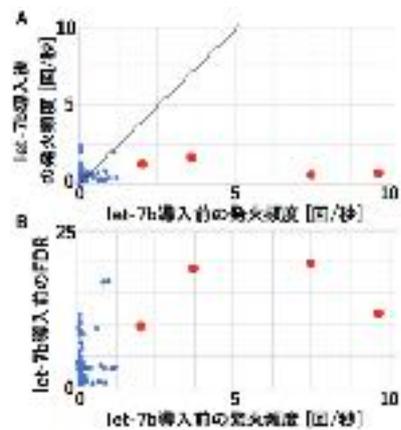


Fig.5 Effect of let-7b on firing rate and FDR

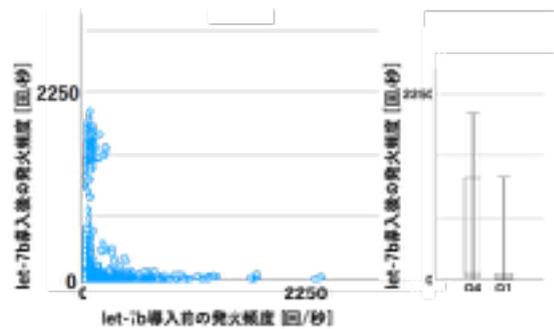


Fig.6 Variance of firing rate after transfection

4. 考察

神経回路は、局所的な情報表現によって記憶を維持している。すなわち、回路内の一部の神経細胞が、高い発火頻度を示し、大部分の情報量を担っている。しかし、let-7bが神経回路全体の発火頻度を上昇させると、もともと高い発火頻度を示していた神経細胞は過興奮により、細胞内のイオンバランスを崩して細胞死に至る。一方、もともと低い発火頻度で活動していた細胞群は、活動レベルを高める。その結果として、神経回路の記憶は、局所的な情報表現ではなく、分散的な情報表現によって維持されるようになる。

5. 結論

let-7bは神経細胞の興奮性をあげて細胞死を誘導することで、記憶能力を低下させる

参考文献

- [1] Park *et al.*, "Extracellular microRNAs activate nociceptor neurons to elicit pain via TLR7 and TRPA1", *Neuron*, (2014), pp.47-54
- [2] Lehmann *et al.*, "An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration", *Nature neuroscience*, (2012)
- [3] Du *et al.*, "Enterovirus 71 induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells through stimulation of endogenous microRNA let-7b expression", *Molecular medicine reports.*, (2015)