

マイクロ RNA が培養神経回路の履歴依存的応答に及ぼす影響

櫻山 和浩, 窪田 智之, 林 賢, 白松(磯口) 知世, 高橋 宏知

キーワード : 刺激選択的適応, ミスマッチネガティビティ, 神経細胞の分散培養系, let-7b マイクロ RNA, 認知症

1. 研究背景・目的

脳は外界から刺激を受け、過去の刺激入力履歴に依存した活動を示す。例えば、マウスの聴覚野などではミスマッチネガティビティ(MMN)と呼ばれる現象が報告されている[1]。MMNは、連続的に同一の刺激(標準刺激)を提示しているときに、異なる刺激(逸脱刺激)を与えると発生する電位である。このような現象は、脳が過去の入力履歴を基に将来入力されるであろう刺激を予測しており、その予測が一致しなかったために生じる応答と考えられている。この逸脱刺激に対して特異的な応答は逸脱検出(deviance detection)な応答と呼ばれる。また、神経細胞の分散培養系では、2電極にそれぞれ高頻度と低頻度の電気刺激を提示すると、高頻度の刺激に対しては徐々に発火率が減少する一方で、低頻度の刺激に対しては増加する現象が報告されている[2]。これは選択的適応(selective adaptation)と呼ばれ、MMNとの関係性が指摘されている。先行研究によって、このような生体(in vivo)と培養(in vitro)間の履歴依存的応答の関係性が示唆されているが、分散培養系が逸脱検出な応答を示すかは明らかにされていない。

また、MMNは、アルツハイマー病やパーキンソン病のような認知症などで生じる神経障害による記憶減衰の指標として提案されている[3]。例えば、アルツハイマー病では、症状が進行するにつれて刺激によって生じた記憶痕跡がより早く減衰することが認められている。この評価では、MMNの逸脱検出が利用されており、過去の入力履歴を用いて将来の入力を予測する特性によって記憶減衰が評価される。

本研究の目的は2つある。1つ目は、分散培養系が逸脱検出な応答を示すかどうかを調べることである。MMNはin vivoにおける逸脱検出であり、その過去の入力履歴を用いて将来の入力を予測するという特性から、認知症の指標として提案されている。そこで、神経細胞の分散培養系で同様の現象が発生するかを調べ

ることで、分散培養系が逸脱検出特性を測る試料になりうるかを明らかにする。

2つ目は、認知症のバイオマーカーであるlet-7b[4]が分散培養系の逸脱検出を阻害するかを調べることである。let-7bはマイクロRNAの一種であり、認知症の進行とともに髄液内で濃度が増加していくことが知られている。神経細胞単体に細胞死を誘導するなどの特性が認められる一方、逸脱検出な応答に対してどのような影響を与えるかは調べられていない。そこで、本研究では、let-7bを試料に導入することで、逸脱検出特性の変化を調べる。

2. 手法

2.1 神経細胞の分散培養系の電気生理実験系

妊娠18日目のウイスターラットの胎児の脳皮質領域から摘出した神経細胞を高密度CMOS多点電極アレイ上(3.9×2.1 mm²; Fig. 1AB)に初代培養し、2試料を用意した。実験前に自発活動を計20分間計測し、スパイクの平均振幅の大きい順に電極を最大1024点まで選び、計測電極とした。その中から20 μm以上離れた電極32点を発火の振幅が大きい順に選択し、刺激電極とした。さらに、この刺激電極から、距離が近い刺激点5,6点を重複ありで選び、10個の刺激パターンA, B, ..., Jを作成した(Fig. 1C)。

2.2 オッドボール課題と多統制群課題

神経細胞の分散培養系の逸脱検出特性を調べるために、in vivoで用いられている刺激パラダイムで実験を構成した。1回の実験は2つのセッションから成り、1つのセッションは2つのオッドボールブロックと1つ多統制群ブロックから成る(Fig. 2)。オッドボール課題の標準：逸脱刺激の比は9:1とした。2つ目のオッドボールブロックでは標準・逸脱刺激の刺激パターンを入れ替えた。各ブロックのトライアル数は600回で、トライアル間は0.5 sとした。以上の実験をlet-7b暴露前後にそれぞれ計8回と計6回実施した。

2.3 計測データ

試料の細胞外電位(LFP; local field potential)は、多点電極アレイによって20 kHzでサンプリングされた。

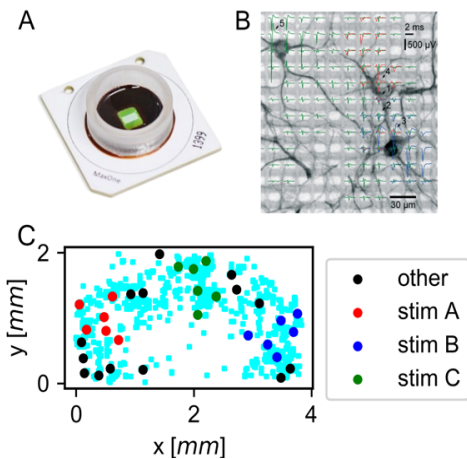


Fig. 1. The multielectrode array. (source: A, mxwbio.com; B, Müller2017)

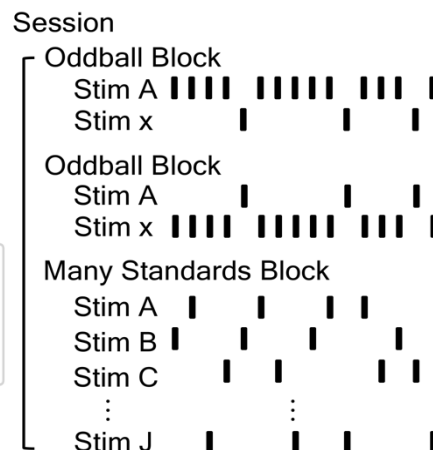


Fig. 2. The session configuration.

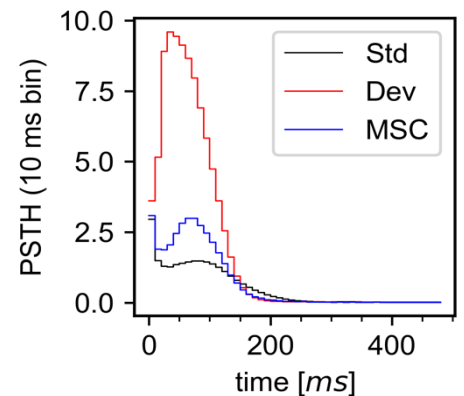


Fig. 3. PSTH.

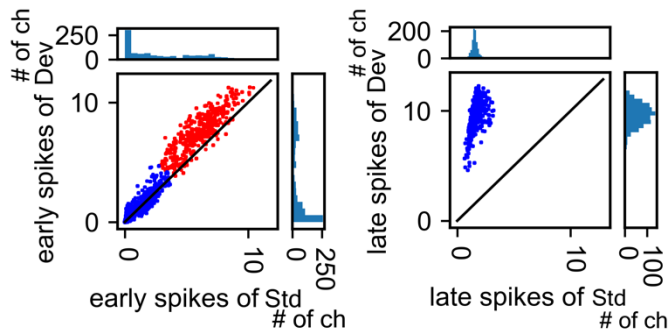


Fig. 4. The distribution of electrodes by early (left) or late (right) responses.

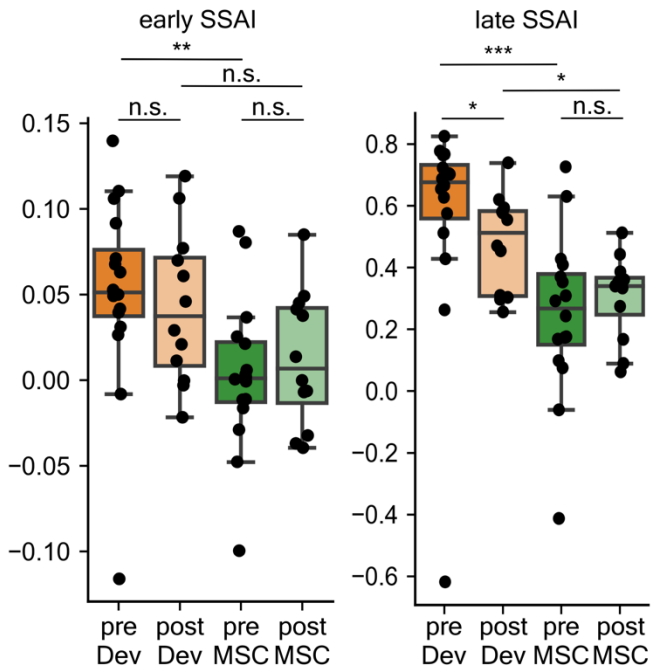


Fig. 5. The SSAI on the early (left) or late (right) phase. U-test were performed. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; uncorrected)

計測した LFP から 4 次のバターワースフィルターで 300–3000 Hz の成分を抽出した. さらに, 振幅が(負の値の標準偏差) $\times 6$ を超えたとき, スパイクが発生したとみなした. 刺激後 1.5–491.5 ms のスパイクをビン幅 10 ms で区切り, 電極ごとに加算した. これを全電極間で平均したものを刺激後タイムヒストグラム (PSTH; peristimulus time histogram) とした.

2.3 SSA インデックス

本研究では, 誘発応答を一次応答 (刺激後 0–10 ms) と二次応答 (刺激後 30 ms 以降) に分けた. さらに, それぞれの PSTH の最大値から, 一次応答と二次応答の逸脱/多統制群刺激の SSA インデックスを以下の式から求めた.

$$SSAI_{dev/msc} = \frac{P_{dev/msc} - P_{std}}{P_{dev/msc} + P_{std}}$$

ここで, $P_{std/dev/msc}$ は標準/逸脱/多標準刺激の誘発応答の振幅である.

$SSAI_{dev/msc}$ が 0 より大きい場合, 標準刺激よりも逸脱/多統制群刺激の誘発応答が大きく, 神経回路は刺激選択的適応を示すと考えられる. また, $SSAI_{dev}$ が $SSAI_{msc}$ よりも大きい場合, 刺激選択的適応以上に逸脱検出的な応答の影響が強いと言える.

3. 結果

3.1 一次応答と二次応答

1 つのセッションから, ある刺激パターンを標準刺

激, 逸脱刺激, 多統制群刺激として入力した場合の誘発応答が得られる. 各誘発応答の PSTH は潜時 0–10 ms の一次応答と, 潜時 30 ms 以降の二次応答の 2 つに分かれた (Fig. 3).

一次応答の大きさによる電極群の分布は二峰性であった (Fig. 4 左図). これは, 刺激パターンが同じであればオッドボールで対になる刺激に依存しなかった. 一方, 二次応答の大きさによる電極群の分布は一峰性であった (Fig. 4 右図). これは対になる刺激に依存した.

3.2 SSA インデックス

全セッションで得られた SSA インデックスを示す (Fig. 5, $N = 16$). 一次応答と二次応答どちらも $SSAI_{dev}$ が $SSAI_{msc}$ より有意に大きかった (Fig. 5, pre Dev vs. pre MSC). なお本稿ではすべての検定において, 補正なしの Mann-Whitney の U 検定を用いた. 暴露後では一次応答で $SSAI_{dev}$ と $SSAI_{msc}$ に有意な差は見られなかった (Fig. 5 左図, post Dev vs. post MSC). 二次応答では $SSAI_{dev}$ と $SSAI_{msc}$ に有意な差が見られた (Fig. 5 右図, post Dev vs. post MSC) が, $SSAI_{dev}$ は暴露によって有意に減少した (Fig. 5 右図, pre Dev vs. post Dev).

4. 考察

4.1 培養神経回路の逸脱検出特性

$SSAI_{dev}$ が $SSAI_{msc}$ より大きいことから培養神経回路は逸脱検出特性があることが認められた. この結果は in vivo で用いられている刺激パラダイムを用いることで初めて明らかにされた.

4.2 let-7b による逸脱検出特性への影響

let-7b の暴露により, 一次応答の $SSAI_{dev/msc}$ 間に有意差が無くなり, 二次応答の $SSAI_{dev}$ が減少した. このことから, 認知症での逸脱検出能力の低下は let-7b に起因していることが示唆される.

5. 結論

本研究では培養神経回路の履歴依存的な応答を調べるために, in vivo の刺激パラダイムを in vitro の系に適用し, 逸脱検出能力を評価した. 次にマイクロ RNA let-7b がこの応答に及ぼす影響を調べた. その結果,

- 培養神経回路は逸脱検出的な応答を示した.
 - let-7b によりこの逸脱検出的な応答は抑制された.
- 以上から, 分散培養系が逸脱検出能力を発生する神経基盤として十分であることが示唆された. また, 認知症患者は逸脱検出能力が低下することから, let-7b は逸脱検出能力を抑制することで認知症に寄与することが示唆された.

参考文献

- [1] Chen, I-Wen, Fritjof Helmchen, and Henry Lütke. "Specific early and late oddball-evoked responses in excitatory and inhibitory neurons of mouse auditory cortex." *Journal of Neuroscience* 35.36 (2015): 12560-12573.
- [2] Eytan, Danny, Naama Brenner, and Shimon Marom. "Selective adaptation in networks of cortical neurons." *Journal of Neuroscience* 23.28 (2003): 9349-9356.
- [3] Pekkonen, Eero. "Mismatch negativity in aging and in Alzheimer's and Parkinson's diseases." *Audiology and Neurotology* 5.3-4 (2000): 216-224.
- [4] Sharma, Neeti, and Anshika Nikita Singh. "Exploring biomarkers for Alzheimer's disease." *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* 10.7 (2016): KE01.