

氏 名 中田 開人

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2511 号

学位授与の日付 2024 年 3 月 22 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Quantitative spatiotemporal analysis of amyloid β -induced
calcium elevations in primary culture of astrocytes

論文審査委員 主 査 村越 秀治
生理科学コース 准教授
根本 知己
生理科学コース 教授
曾我部 隆彰
生理科学コース 准教授
山澤 徳志子
東京慈恵会医科大学 医学部 教授

博士論文の要旨

氏 名：中田 開人

論文題目：

Quantitative spatiotemporal analysis of amyloid β -induced calcium elevations in primary culture of astrocytes

Alzheimer's disease (AD) is known as a progressive neurodegenerative disorder that causes cognitive decline. Uncovering the mechanisms of neurodegeneration in the early-stage is important for establishing treatment for AD. The most pathological features of AD are known as accumulation of amyloid- β ($A\beta$) protein, a 40–43 amino acids peptide, in brain (Chen *et al.* 2017). $A\beta$ aggregates into various types of assemblies, including oligomers, fibrils and senile plaque. Among these, $A\beta$ oligomers have been known to induce neurotoxicity and hyperactivation of astrocytes. Also, $A\beta$ oligomers have reported to induce abnormal intracellular free Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) elevations in astrocytes (Talantova *et al.* 2013). The $[Ca^{2+}]_i$ elevations trigger excessive glutamate release from the astrocytes to the surrounding synapses. Excessive glutamate levels may induce dendritic spine loss and finally neurodegeneration. However, the signaling mechanisms of glutamate release underlying $A\beta$ oligomers are poorly understood.

Spatial and temporal patterns vary from microdomains to astrocytes network and from sub-second to sub-minute scales in the physiological conditions (Semyanov *et al.*, 2020). These patterns of $[Ca^{2+}]_i$ elevation are thought to correlate with astrocytic functions such as glutamate release (Bazargani and Attwell 2016, Santello *et al.*, 2011). However, the temporal resolutions (~ 1 Hz) of previous Ca^{2+} imaging under $A\beta$ oligomers in astrocyte (Pham *et al.* 2021, Shah *et al.* 2022) were not sufficient to evaluate spatial and temporal patterns of $[Ca^{2+}]_i$ elevation. Thus, it was necessary to quantitatively evaluate the patterns of $[Ca^{2+}]_i$ elevation under $A\beta$ oligomers utilizing high-speed imaging techniques.

In this study, to clarify the effects of $A\beta$ oligomers on diverse $[Ca^{2+}]_i$ elevations such as fast-microdomain $[Ca^{2+}]_i$ elevations in astrocytes, I examined $A\beta$ dimers-induced changes in the spatiotemporal patterns of $[Ca^{2+}]_i$ elevations in cultured astrocytes utilizing fast-imaging technique; two-photon excitation spinning-disk confocal microscopy.

Firstly, I observed spatial and temporal $[Ca^{2+}]_i$ patterns in primary cultured astrocytes expressing a genetically encoded Ca^{2+} probe, GCaMP6f, in the cytosol at 10 Hz. I found that $[Ca^{2+}]_i$ elevations were composed of distinct spatial and temporal patterns. To quantitatively analyze the spatial and temporal $[Ca^{2+}]_i$ elevations, I utilized an event-based machine-learning model, the Astrocyte Quantification Analysis (AQuA) algorithm. This analysis for spontaneous astrocytic $[Ca^{2+}]_i$ elevations showed that 50% of astrocytic $[Ca^{2+}]_i$ elevations had duration time 0.5 seconds or less,

and that 50 % of $[Ca^{2+}]_i$ elevations had the size of $[Ca^{2+}]_i$ elevation area below $35 \mu m^2$ or less. Based on the results, I classified the patterns of $[Ca^{2+}]_i$ elevations into four categories as fast-microdomain (≤ 0.5 seconds, $\leq 35 \mu m^2$), slow-microdomain (> 0.5 seconds, $\leq 35 \mu m^2$), fast-region (≤ 0.5 seconds, $> 35 \mu m^2$) and slow-region (> 0.5 seconds, $> 35 \mu m^2$).

Next, I investigated quantitative relationships between A β dimers exposure and spatial and temporal $[Ca^{2+}]_i$ responses. The $[Ca^{2+}]_i$ elevations were examined at concentrations of 50 nM, 200 nM, 500 nM, 2 μM , and 5 μM respectively, as referenced to previous studies (Pham *et al.* 2021, Shah *et al.* 2022). Lower doses of A β dimers (50, 200 nM) had no significant effect on any spatial and temporal patterns of $[Ca^{2+}]_i$ elevations. On the other hand, higher concentrations (above 500 nM) of A β dimers significantly increased the frequency of fast, slow-microdomain, and slow-region $[Ca^{2+}]_i$ elevations. I found that $[Ca^{2+}]_i$ elevations could be detected in response to over 500 nM A β dimers and the frequency and amplitude of $[Ca^{2+}]_i$ elevations were increased with greater in amount. The increase in amplitude under high concentrations of A β dimers may be a result of the superposition of fast, slow-microdomain, and slow-region $[Ca^{2+}]_i$ elevations.

Finally, I explored the signaling pathways of A β dimers-induced fast-microdomain $[Ca^{2+}]_i$ elevations. Under physiological conditions, fast-microdomain $[Ca^{2+}]_i$ elevations in astrocytes are mediated through purinergic G-protein coupled receptors (P2Y1 receptors) (Santello *et al.*, 2011). To investigate whether A β dimers-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevations are mediated through P2Y1 receptors, I analyzed $[Ca^{2+}]_i$ elevations in the presence of a P2Y1 receptor antagonist (MRS2179). The frequency and amplitude of the $[Ca^{2+}]_i$ elevations were not changed before and after treatment. Given that the activation of P2Y1 receptors leads to $[Ca^{2+}]_i$ release from the endoplasmic reticulum (ER) via inositol trisphosphate (IP₃) receptors, it is likely that the fast, slow-microdomain and slow-region $[Ca^{2+}]_i$ elevations are due to Ca^{2+} release from the ER.

In conclusion, I revealed that the frequency of fast, slow-microdomain, and slow-region $[Ca^{2+}]_i$ elevations was increased by over 500 nM A β dimers exposure. A β dimers-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevations might be mediated through P2Y1 receptors. These results suggest the existence of an unrecognized signaling mechanism of A β oligomers. A β dimers-induced fast-microdomain $[Ca^{2+}]_i$ elevations may modulate glutamate release. Fast-microdomain $[Ca^{2+}]_i$ elevations in astrocytes are a key signaling mechanism of glutamate release in the early stages of AD.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 中田 開人

論文題目 Quantitative spatiotemporal analysis of amyloid β -induced calcium elevations in primary culture of astrocytes

アルツハイマー病 (AD) は、認知機能の低下を引き起こす進行性の神経変性疾患として知られている。AD の早期における神経変性のメカニズムを解明することは、その治療法を確立する上で重要である。既存の研究から AD の最も顕著な病理学的な特徴のひとつは、40-43 アミノ酸のペプチドであるアミロイド β ($A\beta$) タンパク質が脳内に蓄積することであることが知られている。 $A\beta$ 分子自体は、オリゴマー、フィブリル、老人斑など、多様な重合状態で凝集する。このうち $A\beta$ オリゴマーは、神経毒性やアストロサイトの過活性化を誘導することが知られている。特に、 $A\beta$ オリゴマーはアストロサイトの細胞内遊離 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) の異常な上昇を誘導することが報告されている。アストロサイトにおける異常な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、アストロサイトからトリパタイトシナプスへの過剰なグルタミン酸の放出の引き金となりうると考えられている。加えて、この過剰なグルタミン酸濃度が樹状突起スパインの損失を引き起こし、最終的には神経変性を惹起する可能性があると考えられている。しかし、現時点では、 $A\beta$ オリゴマーからグルタミン酸の放出へ至る分子シグナル機構は十分に解明されていない。また、生理的条件下でのアストロサイトにおける $[Ca^{2+}]_i$ 上昇については、その空間的・時間的パターンは、空間的にはマイクロドメインからアストロサイトの細胞ネットワークのレベルまで、時間的にはサブ秒から分のスケールまで広く分布していることが報告されている。これら $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の時空間パターンの多様性は、グルタミン酸放出を含むアストロサイトの多様な細胞生理機能と関連している可能性が指摘されてきた。しかし、これまでの、 $A\beta$ オリゴマー曝露時のアストロサイトにおける蛍光 Ca^{2+} イメージングの報告では、その時間分解能はたかだか 1Hz であり、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の空間的・時間的パターンの定量的な解析や検討には不十分であった。従って、高速蛍光イメージング技術による可視化を実現し、 $A\beta$ オリゴマー投与下での $[Ca^{2+}]_i$ 上昇パターンを定量的に評価することが求められていた。

出願者は、アストロサイトにおいて、今までは可視化が困難で高速かつマイクロドメイン領域での $[Ca^{2+}]_i$ 上昇などを含む、多様な時間的・空間的パターンを有する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を定量的に可視解析し、さらに $A\beta$ オリゴマーの影響を検討することを目標とした。特に、高速蛍光イメージング技術である 2 光子励起スピニングディスク共焦点顕微鏡を用いて、アストロサイト初代培養標本における $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の時空間パターンの可視解析を実施した。まず、遺伝子コード型蛍光 Ca^{2+} プローブである GCaMP6f を細胞質に発現させた初代分散培養のアストロサイトを用いて、 $[Ca^{2+}]_i$ の空間的・時間的パターンを 10Hz で観察した。その結果、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は多様な空間的・時間的パターンで構成されていることがわかった。そこで、この複雑な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を時間的・空間的、かつ定量的に解析するために、

イベントベースの機械学習モデル、アストロサイト定量化解析 (AQuA) アルゴリズムを導入した。まず、アストロサイトの自発的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を解析した結果、有意に同定された総 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のイベントのうち 50%は持続時間が 0.5 秒以下のイベントであった。同様に同定された総 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇で、その 50%は有意な上昇領域の面積が $35\mu m^2$ 以下であった。この結果から、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の時間的・空間的なパターンを、ファースト-マイクロドメイン (0.5 秒以下、 $35\mu m^2$ 以下)、スロー-マイクロドメイン (0.5 秒以上、 $35\mu m^2$ 以下)、ファースト-リージョン (0.5 秒以下、 $35\mu m^2$ 以上)、スロー-リージョン (0.5 秒以上、 $35\mu m^2$ 以上) の 4 つに分類した。

次に、出願者は、 $A\beta$ 二量体の曝露と $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の空間的・時間的特性との間の定量的な関係を検討した。ここで、 $A\beta$ 二量体の投与濃度は、先行研究を参考に、それぞれ 50 nM, 200 nM, 500 nM, 2 μM , 5 μM とした。まず、低濃度の $A\beta$ 二量体 (50, 200 nM) は、全ての空時間カテゴリーの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に有意な変化を及ぼさなかった。一方、高濃度 (500 nM 以上) の $A\beta$ 二量体は、ファーストおよびスロー-マイクロドメインとスロー-リージョンのカテゴリーにおいて $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の頻度を有意に増加させた。さらに、高濃度の $A\beta$ 二量体が賦活化する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇では、 $A\beta$ 二量体濃度が高い程、頻度と振幅は増加することがわかった。よって高濃度の $A\beta$ 二量体が惹起する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇振幅の増大は、ファーストおよびスロー-マイクロドメインとスロー-リージョンの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のイベントが重畳した結果生じた可能性があった。

最後に、出願者は、上述の $A\beta$ 二量体の曝露が賦活化する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を介在する細胞内シグナル伝達経路について検討した。生理的条件下では、アストロサイトにおける自発的なファースト-マイクロドメインの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には、プリン作動性 G タンパク質共役型受容体 (P2Y1 受容体) を介した経路が内在することが知られていた。そこで、上述の $A\beta$ 二量体が賦活化する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に P2Y1 受容体が介しているかどうかを調べるために、P2Y1 受容体の拮抗薬 (MRS2179) 存在下での $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の可視化解析を実施した。その結果、拮抗薬は、 $A\beta$ 二量体曝露後で生じていた頻度と振幅の有意な増加を抑制した。従って、細胞膜上の P2Y1 受容体の活性化は細胞内イノシトール三リン酸 (IP_3) 濃度を増加させ小胞体 (ER) 膜上の IP_3 受容体を介した ER 内腔から細胞質への Ca^{2+} 放出を誘導する (IP_3 -induced Ca^{2+} release; IICR) こと考えると、 $A\beta$ 二量体曝露による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には P2Y1 受容体の活性化による IICR 経路が介在する可能性があることが推定された。

結論として、高濃度の $A\beta$ 二量体の曝露はファーストおよびスロー-マイクロドメインとスロー-リージョンのカテゴリーにおいて $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の頻度を増加させることが明らかになった。また、 $A\beta$ 二量体曝露が賦活化する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、P2Y1 受容体が関与している可能性があった。これらの結果は、 $A\beta$ オリゴマーの曝露から P2Y1 受容体の活性化へとつながる新奇的なシグナル伝達機構が存在する可能性が示唆される。また、ファースト-マイクロドメインの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はグルタミン酸放出を調節する可能性があることを考えると、本結果から、アストロサイトにおけるファースト-マイクロドメイン $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、AD の初期段階におけるグルタミン酸放出の重要なシグナル伝達機構である可能性が示唆された。

出願者は、アストロサイト初代分散培養標本における高速 Ca^{2+} イメージングとその定量的な解析のために必要な枠組みを自ら提案し構築するに留まらず、さらに、アストロサイトの Ca^{2+} シグナルについて新奇的な知見を得ることに成功した。本論文は、精神疾患の

発症の過程における細胞シグナルの分子的な基盤に関する重要な知見を含んでおり、将来的な波及効果も期待できるため、審査委員全員一致で博士学位論文に相応しいと結論した。