

長寿医療研究開発費 平成23年度 総括研究報告

脳神経系の老化制御に関する基礎研究：認知症との接点（23-1）

主任研究者 本山 昇

国立長寿医療研究センター研究所加齢健康脳科学研究部加齢病態研究室（室長）

研究要旨

アルツハイマー病をはじめとする認知症の罹患率は、加齢に伴い対数的に増加する。すなわち老化が認知症発症の重大なリスクファクターの一つであると考えられる。そこで、老化の観点から、即ち老化シグナルにおいて重要な機能を果たす IIS-FOXO、SIRT1 と DNA 損傷応答・細胞老化に着目して、その制御メカニズムと脳神経系の老化における機能を解析した。FOXO は、酸化ストレスによってプロテインホスファターゼにより選択的脱リン酸化を受け、核内に移行し活性化されることを明らかにした。また、SIRT1 が細胞老化の過程で、炎症性サイトカインの発現を制御していることを明らかにした。さらに、DNA 損傷応答が活性化した早期老化症モデルマウスにおいて、神経新生が早期に減少する可能性を明らかにした。また、成体神経幹細胞の老化機構を解明するための新たなモデル動物としてゼブラフィッシュ成魚モデルを構築し、正常時には哺乳類と同様に新生ニューロンが嗅球へ移動すること、及び脳に損傷を与えると傷害部位へ移動して失われたニューロンを再生させることを明らかにした。

主任研究者

本山 昇 国立長寿医療研究センター加齢健康脳科学研究部加齢病態研究室（室長）

分担研究者

澤本 和延 名古屋市立大学大学院医学研究科再生医学分野（教授）

A. 研究目的

アルツハイマー病をはじめとする認知症の罹患率は、加齢に伴い対数的に増加する。すなわち老化が認知症発症の重大なリスクファクターの一つであると考えられる。しかしながら脳神経系の老化のメカニズムや認知症発症との関連は不明である。

近年、成人の脳でも神経幹細胞が存在し、一生を通して神経新生が起こっており、学習・記憶などの脳高次機能に大きく関与していることが明らかになってきた。しかし、加齢に伴い神経新生が著しく減少することが示されており、加齢に伴う認知機能の低下の一因であると考えられ、そのメカニズムは不明である。また認知症においては、異常タンパク質の蓄積・凝集が生じ、神経変性を引き起こすことが示されており、加齢に伴うオートファジー、ユビキチン・プロテアソーム系などによる細胞の恒常性維持メカニズムの破綻が一因であると考えられる。

インスリン/IGFシグナルカスケード (IIS) が重要な老化シグナルであることが明らかになっている。このIISによって制御されるフォークヘッド型転写因子FOXOとその制御因子であるNAD依存性脱アセチル化酵素SIRTファミリーが老化制御において重要な機能を果たしている。IIS及び酸化ストレスシグナルによって制御される老化制御因子であるFOXOは、細胞内の活性酸素種レベルの調節などを介して造血幹細胞や神経幹細胞等の組織幹細胞維持に重要な機能を果たしているが明らかになってきた。また、ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解やオートファジーなど、様々なプロセスを介して細胞の恒常性維持に重要な機能を果たしている。IISとアルツハイマー病などの認知症発症との関連も示唆されている。一方、加齢に伴いDNA損傷及び老化細胞が蓄積することが示されDNA損傷応答と細胞老化も重要な老化シグナルと考えられている。さらに、加齢に伴い神経幹細胞等の組織幹細胞において、DNA損傷及び細胞老化誘導因子の一つである細胞周期制御因子p16INK4Aの蓄積が認められている。

そこで老化の観点から、即ち老化シグナルにおいて重要な機能を果たすIIS-FOXO、SIRT1とDNA損傷応答・細胞老化に着目して、その制御メカニズムを解明するとともに、神経幹細胞の老化と神経新生低下による脳神経系の老化のメカニズムを明らかにすることを目的として研究を進めた。また、成体神経幹細胞の老化機構を解明するための新たなモデル動物としてゼブラフィッシュ成魚モデルを構築することを目的として研究を進めた。

B. 研究方法

細胞は、10%FCS含有DMEMで培養した。タンパク質の発現量はSDS-PAGE、ウエスタンブロット法、mRNAの発現量は、RT-qPCR法により解析した。脳切片は、細胞サブタイプ特異的なマーカーに対する抗体を用いて解析した。プロニューラル遺伝子の一つである *neurogenin1* のプロモーター制御下でGFPを発現するトランスジェニックフィッシュ *Tg(ngn1:GFP)* 成魚脳のGFP陽性細胞を一定の時間毎に撮影した。ゼブラフィッシュ成魚

を麻酔下で 27-G 針を終脳右半球に 0.1 mm 挿入することにより作成し傷害脳を作成した。

(倫理面への配慮)

国立長寿医療研究センターにおける遺伝子組換えマウスを用いた動物実験は、国立長寿医療研究センター動物実験倫理委員会・遺伝子組換え実験安全委員会の承認を受け、動物実験指針・規則および遺伝子組換え実験安全規定に則り行った。また、名古屋市立大学で実施したゼブラフィッシュを用いた実験は、魚類に関しては特別な規制はないので動物実験において常識とされる配慮を行った。

C. 研究結果

(1) 老化制御因子 FOXO 転写因子の活性制御メカニズムの解明 (本山)

FOXO の活性は、IIS シグナルによって抑制され、酸化ストレスシグナルによって活性化される。すなわち IIS シグナルと酸化ストレスシグナルのバランスによって制御されている。しかしながら、酸化ストレスシグナルによる制御メカニズムの詳細は明らかにされていない。本研究では、酸化ストレスによって FOXO は、プロテインホスファターゼにより選択的脱リン酸化を受け、核内に移行し活性化されることを明らかにした。

(2) 老化制御因子 SIRT1 による細胞老化の制御メカニズムの解明 (本山)

老化細胞は細胞老化特異的分泌表現型 (SASP) を示し、炎症性サイトカインや増殖因子を分泌する。SASP によって自律的および非自立的に組織幹細胞や微小環境に影響を与えることが報告されている。本研究では、老化制御因子 SIRT1 による SASP の制御に着目して、SIRT1 が SASP 関連因子の発現を制御していることを明らかにした。

(3) 早期老化症モデルマウスを用いた神経幹細胞老化の制御メカニズムの解明 (本山、澤本)

老化シグナルと神経新生を検討するためのモデルとして、DNA 損傷応答が活性化した早期老化症モデルマウスにおいて DNA 損傷応答因子を欠損させると寿命が延長するマウスモデルを樹立した。また、この早期老化症モデルマウスにおいて、神経新生が早期に減少する可能性を明らかにした。

(4) 成体神経幹細胞老化の制御メカニズムの解明 (澤本)

成体神経幹細胞老化機構の新たな研究モデルとして、ゼブラフィッシュ成魚の脳室壁の細胞構築を解析し、正常時には哺乳類と同様に新生ニューロンが嗅球へ移動すること、及び脳に損傷を与えると傷害部位へ移動して失われたニューロンを再生させることを明らかにした。

D. 考察と結論

老化制御因子 **FOXO** は、ストレスに応答してプロテインフォスファターゼにより選択的脱リン酸化され核移行することを明らかにした。また、**SIRT1** は老化細胞の **SASP** を制御していることを明らかにした。さらに、早期老化症モデルマウスにおいて神経新生が早期に減少する可能性を見出した。今後は、これらの知見に基づき神経幹細胞の老化における **FOXO**、**SIRT1** および **DNA** 損傷応答の役割を解析する。

ゼブラフィッシュ成魚脳室壁付近 (脳室帯) において新生ニューロンが産生されることを明らかにした。成体マウス脳と同様に、脳室帯で産生された新生ニューロンは、正常脳では脳前方の嗅球へ移動する、脳損傷時には傷害部位へ移動することを明らかにした。本結果は、脊椎動物の成体脳におけるニューロン新生および移動メカニズムが進化上保存されていることを示唆している。また、ゼブラフィッシュ成魚は、成体神経幹細胞老化機構の解明のための新たなモデル動物となることがわかった。今後は、ゼブラフィッシュ老齢魚の脳室帯における細胞構造の解明および成魚脳との比較により、加齢に伴う成体神経幹細胞の変化を明らかにする。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shinohara K, Kawasumi A, Takamatsu A, Yoshida A, Botilde Y, **Motoyama N**, Reith W, Durand B, Shiratori H, Hamada H. Two rotating cilia in the node are sufficient to break left-right symmetry in the mouse embryo. **Nature Commun** 3: 622. doi: 10.1038/ncomms1624, 2011.
- 2) Xiang L, Nakamura Y, Lim YM, Yamasaki Y, Kurokawa-Nose Y, Maruyama W, Osawa T, Matsuura A, **Motoyama N**, Tsuda L. Tetrahydrocurcumin extends life span and inhibits the oxidative stress response by regulating the FOXO forkhead transcription factor. **Aging** 3: 1098-1109, 2011.
- 3) Nakaguchi K, Masuda H, Kaneko N, **Sawamoto K**. Strategies for regenerating striatal neurons in the adult brain by using endogenous neural stem cells. **Neurol Res Int** 898012, 2011.
- 4) Wang Y, Kaneko N, Asai N, Enomoto A, Isotani-Sakakibara M, Kato T, Asai M, Murakumo Y, Ota H, Hikita T, Namba T, Kuroda K, Kaibuchi K, Ming GL, Song H, **Sawamoto K**, Takahashi M/ Girdin is an intrinsic regulator of neuroblast chain

- migration in the rostral migratory stream of the postnatal brain. *J Neurosci* 31:8109-8122, 2011.
- 5) Kato S, Aoyama M, Kakita H, Hida H, Kato I, Ito T, Goto T, Hussein MH, **Sawamoto K**, Togari H, Asai K. Endogenous erythropoietin from astrocyte protects the oligodendrocyte precursor cell against hypoxic and reoxygenation injury. *J Neurosci Res* 89:1566-1574, 2011.
 - 6) Kishimoto N, Alfaro-Cervello C, Shimizu K, Asakawa K, Urasaki A, Nonaka S, Kawakami K, Garcia-Verdugo JM, **Sawamoto K**. Migration of neuronal precursors from the telencephalic ventricular zone into the olfactory bulb in adult zebrafish. *J Comp Neurol* 519:3549-3565, 2011.
 - 7) Sawada M, Kaneko N, Inada H, Wake H, Kato Y, Yanagawa Y, Kobayashi K, Nemoto T, Nabekura J, **Sawamoto K**. Sensory input regulates spatial and subtype-specific patterns of neuronal turnover in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 31:11587-11596, 2011.
 - 8) Yamane J, Ishibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, Kanemura Y, Nakamura M, Miyoshi H, **Sawamoto K**, Toyama Y, Mizusawa H, Okano H. Transplantation of human neural stem/progenitor cells overexpressing Galectin-1 improves functional recovery from focal brain ischemia in the Mongolian gerbil. *Mol Brain* 4:35, 2011.
 - 9) Kishimoto N and Sawamoto K. Planar polarity of ependymal cilia. *Differentiation* 83: S86-S90, 2012.
 - 1 0) Kishimoto N, Shimizu K, **Sawamoto K**. Neuronal regeneration in a zebrafish model of adult brain injury. *Dis Models Mech* 5: 200-209, 2012.
 - 1 1) Shinohara R, Thumkeo D, Kamijo H, Kaneko N, **Sawamoto K**, Watanabe K, Takebayashi H, Kiyonari H, Ishizaki T, Furuyashiki T, Narumia S. A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. *Nat Neurosci* 15: 373-380, 2012.
 - 1 2) 本山 昇. ステムセルエイジング仮説. *日本抗加齢医学会雑誌—アンチ・エイジング医学* 7 : 549-553, 2011.
 - 1 3) 早川智久, 本山 昇. SASP:細胞老化と個体老化の接点. *基礎老化研究* 35:29-31, 2011.
 - 1 4) 本山 昇. 細胞増殖シグナルと老化. *The Lipid* 22 : 364-368, 2011.

2. 学会発表

- 1) **本山 昇**. 個体老化における DNA 損傷応答と細胞老化. 第 100 回日本病理学会総会, ワークショップ 2「老化研究の最前線: 老化, 老化を基盤とする疾患を制御するシグナル」, 2011 年 4 月 28 日, 横浜.
- 2) **本山 昇**. 老化における DNA 損傷応答・細胞老化の役割. 第 11 回日本加齢医学会総会, シンポジウム 13「老化シグナルと加齢疾患」, 2011 年 5 月 28 日, 京都.
- 3) **本山 昇**. 個体老化を制御する DNA 損傷応答機構. 第 33 回日本基礎老化学会シンポジウム, 2011 年 10 月 9 日, 千葉.
- 4) **Motoyama N**. Impact of DNA damage response on aging and age-related diseases. 第 34 回日本分子生物学会年会, ワークショップ「The molecular biology of “Life-Aging-Disease-Death”」, 2011 年 12 月 15 日, 横浜.
- 5) Hayakawa T, Iwai M, Maruyama W, **Motoyama N**. SIRT1 suppresses senescence-associated secretory phenotype (SASP) during cellular senescence. Biology of Aging, Gordon Research Conferences, Feb 13, 2012, Venture, CA, USA.
- 6) 早川智久, 岩井美佳, 丸山和佳子, **本山 昇**. NAD 依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 による Senescence-associated secretory phenotype (SASP) の制御. 第 34 回日本基礎老化学会大会, 2011 年 6 月 16 日, 東京.
- 7) Hayakawa T, Iwai M, Maruyama W, **Motoyama N**. SIRT1 suppresses senescence-associated secretory phenotype (SASP) during cellular senescence. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 15 日, 横浜.
- 8) Yanagino T, Ito Y, Maruyama W, **Motoyama N**. MST1 is essential for transcriptional activity of FOXO in response to oxidative stress. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 15 日, 横浜.
- 9) 加古英介, 金子奈穂子, 増田浩, 青山峰芳, 戸苺創, 藤田義人, 祖父江和哉, **澤本和延**. 脳低酸素虚血における白質傷害と再生医療の可能性. 第 15 回日本神経麻酔・集中治療研究会, 2011 年 8 月 6 日, 名古屋.
- 1 0) **Kazunobu Sawamoto**. Mechanisms of positioning and orientation of cilia in the developing brain. 第 44 回日本発生生物学会, ワークショップ「Ciliary biology: essential role in development and diseases」, 2011 年 5 月 20 日, 沖縄.
- 1 1) **澤本和延**. 神経幹細胞と生後脳の発達・再生. 第 252 回日本小児科学会東海地方会, 特別講演, 2011 年 5 月 23 日, 名古屋.
- 1 2) **Kazunobu Sawamoto**. Neuronal migration in the adult brain.. Neurogenesis 2011, Jun 3, 2011, Kobe.
- 1 3) **澤本和延**. 脳に内在する神経再生メカニズムとその制御. 第 15 回日本神経麻酔・集中治療研究会, 特別講演, 2011 年 8 月 6 日, 名古屋.

- 1 4) **澤本和延**. 脳虚血と神経再生：基礎研究の最前線. 第 21 回脳血管シンポジウム「脳卒中のリハビリと神経再生—基礎と臨床—」, 2011 年 9 月 10 日, 大阪.
- 1 5) **Kazunobu Sawamoto**. Potential of endogenous neural stem cells in brain regeneration. Neuroscience 2011 Japan-Canada collaborative symposium. 第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 17 日, 横浜.
- 1 6) Kishimoto N, **Sawamoto K**. Olfactory Sensory Deafferentation Affects Neurogenesis in the Olfactory System of Adult Zebrafish. 第 17 回小型魚類研究会, 2011 年 9 月 8 日, TORAY 総合研究センター.
- 1 7) Nagai H, Kishimoto N, Shimizu K, Asawakawa K, Urasaki A, Holger Knaut, Nonaka S, Kawakami K, **Sawamoto K**. The Role of Sdf1/Cxcr4 Chemokine Signaling in Neurovascular Niche within the Adult Zebrafish Telencephalic Ventricular Zone. 第 17 回小型魚類研究会, 2011 年 9 月 8 日, TORAY 総合研究センター.
- 1 8) Masuda H, Kaneko N, Kako E, Hikita T, Tabata Y, **Sawamoto K**. Promotion of Neuronal migration towards the injured mouse cerebral cortex using sustained release of chemoattractant from gelatin hydrogel microspheres. 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 17 日, 横浜.
- 1 9) Kishimoto N, Shimizu K, Nagai H, Asawakawa K, Urasaki A, Knaut H, Nonaka S, Kawakami K, **Sawamoto K**. Neurovascular Niche in the Ventricular Zone of the Adult Zebrafish Telencephalon. 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 16 日, 横浜.
- 2 0) Sawada M, **Sawamoto K**. Sensory input regulates spatial and subtype-specific patterns of neuronal turnover in the adult olfactory bulb glomeruli. 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 16 日, 横浜.
- 2 1) Nakaguchi K, Kaneko N, Aoyama M, Okada Y, Asai K, Okano H, **Sawamoto K**. Directional migration of new neurons generated by transplanted human iPS cell-derived neural stem cells in the striatum of a mouse stroke model. 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 14-17 日, 横浜.
- 2 2) **澤本和延**. 脳に内在する神経再生機構とその操作技術：神経化学的アプローチ. 第 54 回日本神経化学学会大会, 神経化学の若手研究者育成セミナー, 2011 年 9 月 26 日, 山代温泉 瑠璃光.
- 2 3) **澤本和延**. 脳梗塞後の神経再生. 第 23 回日本脳循環代謝学会総会, シンポジウム「虚血性脳血管障害における神経再生と血管新生」, 2011 年 11 月 5 日, 都市センターホテル.
- 2 4) **澤本和延**. 脳室周囲に存在する幹細胞の神経再生能力. 第 3 回日本水頭症脳脊髄液学会, 特別講演, 2011 年 11 月 6 日, 東京.

- 2 5) Kaneko N, **Sawamoto K.** New Neurons use Slit 1 to maintain astrocytic tunnels for their rapid migration in the adult brain. Neuroscience2011, Nov 16, 2011, Washington DC, USA.
- 2 6) Kishimoto N, Shimizu K, Nagai H, Asawakawa K, Urasaki A, Nonaka S, Kawakami K, **Sawamoto K.** Zebrafish as a model for studying adult neurogenesis and neuronal regeneration. 第 34 回日本分子生物学会, 2011 年 12 月 13-16 日, 横浜.
- 2 7) **Kazunobu Sawamoto.** Mechanisms of neuronal migration in the normal and injured adult brain. International Society for Developmental Neuroscience, Symposium 9: adult neural stem cells, Jan 14, 2012, Mumbai, India.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし