

脳神経系の老化制御に関する基盤研究：認知症との接点（26-25）

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

神経幹細胞の恒常性維持に重要な機能を果たす老化制御転写因子の活性制御メカニズムについて検討した。IIS シグナルおよび酸化ストレスシグナルによる老化制御転写因子のターゲット遺伝子特異性を明らかにし、これに基づき酸化ストレス不応答ノックインマウスを樹立した。また、ゼブラフィッシュを成体神経新生のモデルとして用い、神経幹細胞・前駆細胞の恒常性維持の分子メカニズムおよび老化が与える影響を解析した。成魚脳で神経幹細胞に発現し、加齢に伴って減少する老化制御因子の機能を解析した結果、老化制御因子は神経幹細胞の維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、加齢に伴い蓄積する DNA マウス損傷と老化の関連を検討した。DNA 損傷応答因子ノックアウトマウスでは、早期に神経幹細胞数・新生ニューロン数が減少す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

学習・記憶等の認知機能は加齢とともに減少する。また、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。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る。老化制御シグナルであるインスリン/IGF シグナルカスケード（IIS）や DNA 損傷が神経幹細胞の老化に関与するが、そのメカニズムは不明な点が多く残されている。また、糖尿病・インスリン抵抗性とアルツハイマー病発症との関連も示唆されている。そこで 老化シグナル（インスリン/IGF シグナルカスケード（IIS）と DNA 損傷応答）に着目して、その制御メカニズムを解明するとともに、学習・認知機能において重要な機能を果たす神経幹細胞の老化および神経新生の減少のメカニズムを明らかにするとともに、アルツハイマー病発症における老化シグナルの機能を解明し、加齢に伴う認知機能低下および認知症発症の原因を追及することを目的とする。

B. 研究方法

細胞培養：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。

アンチセンス・モルフォリーノの脳室内注入法：麻酔下で、ゼブラフィッシュの間脳上部の頭骸骨に 27-G 針で微小な穴を開け、老化制御因子の発現を抑制するアンチセンス・モルフォリーノをガラス針および油圧マニピュレータを用いて間脳実質に注入した。対照群には、非特異的な配列を有するコントロール・モルフォリーノを用いた。

組織免疫染色法：ゼブラフィッシュ脳を 4%PFA 溶液で固定したのち切片を作成し、細胞サブタイプ特異的なマーカーに対する抗体および老化制御因子に対する抗体を用いて組織免疫染色をおこなった。染色された脳切片は共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮像し、解析した。

(倫理面への配慮)

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、動物実験取扱規定および遺伝子組換え実験安全規定に則り行った。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、名古屋市立大学医学研究科動物実験委員会・名古屋市立大学遺伝子組換え実験等安全委員会の承認を受け、動物実験取扱規定および遺伝子組換え実験安全規定に則り行った。

C. 研究結果

1) 老化制御転写因子の活性、ターゲット遺伝子発現制御メカニズムの解明

老化制御転写因子の活性は、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。老化制御転写因子を欠損すると神経幹細胞の早期老化が引き起こされることから、老化制御転写因子の活性制御メカニズムの減弱が神経幹細胞の老化と関連していると考えられる。IIS シグナルと酸化ストレスシグナルによる老化制御転写因子の転写活性について検討し、ターゲット遺伝子によって活性制御が異なることを示した。今後は、網羅的解析を通してプロファイル化していく予定である。

2) 老化制御因子による神経幹細胞・神経新生・神経再生メカニズムの制御

神経幹細胞における老化制御因子の機能を調べるために、老化制御因子の発現を抑制するアンチセンス・モルフォリーノをゼブラフィッシュ脳室内へ注入した。成魚脳 (5 ヶ月齢) にアンチセンス・モルフォリーノを注入すると、神経幹細胞における老化制御因子の発現量が劇的に減少することを確認した。また、モルフォリーノによる老化制御因子の発現抑制によって成魚脳における神経幹細胞の数が減少し、神経前駆細胞および新生ニューロンの数が増加することが明らかになった。

3) 老化制御転写因子による神経幹細胞・神経新生制御メカニズムの解明

これまでに、酸化ストレスに応答した老化制御転写因子の活性化にリン酸化が必須であることを示してきた。今年度は、これに基づきリン酸化部位を Ala に置換した酸化ストレス不応答性老化制御転写因子ノックインマウス (SA マウス) を樹立した。IIS シグナルと酸化ストレスシグナルの神経幹細胞維持・神経新生における生理機能を解析するためのマウスが樹立できた。SA マウスは、KO マウス同様見かけ上は野生型マウスと比べて異常なく成長している。現在、SA マウスにおける神経幹細胞・神経新生について解析を進めて行く予定である。

4) DNA 損傷による神経幹細胞・神経新生制御メカニズムの解明

神経幹細胞の老化・神経新生における DNA 損傷・DNA 損傷応答の関与を検討してきた。これまでに、DNA 損傷の蓄積・DNA 損傷応答の活性化が認められる早期老化症 Hutchison-Gilford Progeria Syndrome (HGSP) のモデルマウス (Zmpste24 KO マウス : HGPS モデルマウス) において、海馬歯状回における SOX2 陽性神経幹細胞数に変化はなかったが、神経新生が著しく減少することを見出した。また、この HGPS モデルマウスにおいて、DNA 損傷応答因子を欠損すると、神経幹細胞数・神経新生ともに著しく減少することを見出した。そこで今年度は、DNA 損傷応答因子 KO マウスにおける神経幹細胞数・神経新生を検討したところ 4.5 ヶ月齢において神経幹細胞数が減少することを見出した。すなわち DNA 損傷応答因子は神経幹細胞の維持に重要な機能を果たすことを明らかにした。neurosphere 培養において、DNA 損傷応答因子 KO マウス由来海馬神経幹細胞の増殖が低下することを見出した。今後、増殖能・分化能の解析、網羅的プロテオーム解析、トランスクリプトーム解析を行う。また、発現が変化する因子の機能解析を培養系および個体レベルで行うことにより、神経幹細胞の老化 (減少・機能不全) における DNA 損傷、DNA 損傷応答の解析していく予定である。

D. 考察と結論

神経幹細胞の恒常性維持に重要な老化制御転写因子は、IIS シグナルと酸化ストレスシグナルによって活性が制御されているが、ターゲット遺伝子によって活性制御が異なることを示した。この結果に基づいたノックインマウス (SA マウス) を樹立し、IIS シグナルと酸化ストレスシグナルの神経幹細胞維持における機能の解析が進むことが期待できる。また、加齢に伴い神経幹細胞に DNA 損傷が蓄積してくるが、DNA 損傷応答因子を欠損したマウスでは、早期に神経幹細胞数が減少し、その結果新生ニューロンの数が著しく減少することを見出した。今後、DNA 損傷応答の神経幹細胞の恒常性維持における機能の解析を行っていく予定である。アンチセンス・モルフォリーノを用いた老化制御因子の機能阻害実験により、神経幹細胞の数が減少し、代わりに神経前駆細胞および新生ニューロンの数が増加したことから、老化制御因子には神経幹細胞を維持し、ニューロンへの分化を抑制する役割があることが示唆された。これまでの研究で、加齢に伴って神経幹細胞の数および老化制御因子の発現が減

少することが分かっていたが、両者の関係については不明であった。本研究の結果から、加齢に伴う老化制御因子の発現減少が、神経幹細胞のニューロンへの分化を促進し、その数を減少させると考えられる。今後は、加齢に伴う神経幹細胞の変化をさらに詳細に検討する予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hayakawa T, Iwai M, Aoki S, Takimoto K, Maruyama M, Maruyama W, Motoyama N. SIRT1 suppresses the senescence-associated secretory phenotype through epigenetic gene regulation. *PLOS ONE*, *in press*.
 2. Johmura Y, Shimada M, Misaki T, Naiki-Ito A, Miyoshi H, Motoyama N, Ohtani N, Hara E, Nakamura M, Morita A, Takahashi S, Nakanishi M. Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction. *Mol Cell* 55: 73-84, 2014.
 3. 澤本和延、松本真実、澤田雅人. 成体ニューロン新生における血管の役割. 生体の科学 65(3): 215-219, 2014.
 4. Ota H, Hikita T, Sawada M, Nishioka T, Matsumoto M, Komura M, Ohno A, Kamiya Y, Miyamoto T, Asai N, Enomoto A, Takahashi M, Kaibuchi K, Sobue K, Sawamoto K. Speed control for neuronal migration in the postnatal brain by Gmp-mediated local inactivation of RhoA. *Nat Commun* 5: 4532, 2014.
 5. Zheng L, Hitoshi S, Kaneko N, Takao K, Miyakawa T, Tanaka Y, Xia H, Kalinke U, Kudo K, Kanba S, Ikenaka K, Sawamoto K. Mechanisms for interferon- α -induced depression and neural stem cell dysfunction. *Stem Cell Rep* 3(1): 73-84, 2014.
 6. Ajioka I*, Jinnou H*, Okada K, Sawada M, Saitoh S, Sawamoto K [*Co-first authors]. Enhancement of neuroblast migration into the injured cerebral cortex using laminin-containing porous sponge. *Tissue Eng Part A*, 21(1-2): 193-201, 2014.
 7. Zheng L, Kaneko N, Sawamoto K. Minocycline treatment ameliorates interferon-alpha-induced neurogenic defects and depression-like behaviors in mice. *Front Cell Neurosci* 9: 5, 2015.
 8. Yamagishi S, Yamada K, Sawada M, Nakano S, Mori N, Sawamoto K, Sato K. Netrin5 is highly expressed in neurogenic regions of the adult brain. *Front Cell Neurosci* 9: 146, 2015.
- ##### 2. 学会発表
1. Hayakawa T, Iwai M, Aoki S, Maruyama W, Motoyama N. SIRT1 epigenetically regulates

- senescence-associated secretory phenotype during cellular senescence. 第37回日本基礎老化学会大会、2014年6月26-27日、大府
2. Ibaraki, K, Sawada M, Sawamoto K, Minamiyama M, Maruyama W, **Motoyama N**. Chk2 deficiency accelerates neural stem cell aging in the adult mouse hippocampus. 第37回日本神経科学大会、2014年9月13日、横浜
 3. Minamiyama M, Nose-Kurokawa Y, Long N, **Motoyama N**, Nagai-Shamoto M, Ibaraki K, Hayakawa T, Yamada H, Kanamori K, Yamada A, Naoi M, Maruyama W. The downregulation of longevity-related gene, FOXO3 induces the neurodegeneration of the Lewy body disease model cells. 第37回日本神経科学大会、2014年9月13日、横浜
 4. 永井雅代、日坂真輔、大澤俊彦、直井信、南山誠、**本山昇**、丸山和佳子. α -synuclein 過剰発現細胞では脂質過酸化ストレス下でタンパク分解系が活性化する. 第57回神経化学大会、2014年9月29日、奈良
 5. **Motoyama N**, Hayakawa T, Iwai M, Aoki S, Maruyama W. SIRT1 epigenetically regulates DNA damage-initiated pro-inflammatory response. Molecular Biology of Aging, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, October 1, 2014, Cold Spring Harbor, NY, USA.
 6. 永井雅代、日坂真輔、大澤俊彦、直井信、南山誠、**本山昇**、丸山和佳子. 脂質過酸化傷害は α -synuclein の不溶化を亢進させタンパク分解系に影響を及ぼす. 第87回日本生化学会大会、2014年10月16日、京都
 7. Ibaraki K, Sawada M, Sawamoto K, Minamiyama M, Maruyama W, **Motoyama N**. Chk2 maintains neural stem cell pool in mouse adult hippocampus during aging. 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience2014), Nov 17, 2014, Washington DC, USA.
 8. Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Naoi M, Hisaka S, Osawa T, Minamiyama M, **Motoyama N**. Role of lipid peroxides derived from PUFA in the conformational change of α -synuclein and cell death in Parkinson disease. 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience2014), Nov 17, 2014, Washington DC, USA.
 9. Shamoto-Nagai M, Naoi M, Osawa T, **Motoyama N**, Minamiyama M, Maruyama W. DHA induced the dysfunction of cellular proteolysis system and the formation of α -synuclein aggregates in SH-SY5Y cells. 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience2014), Nov 17, 2014, Washington DC, USA.
 10. Long N, Nose K, Minamiyama M, **Motoyama N**, Shamoto-Nagai M, Ibaraki K, Hayakawa T, Yamada H, Kanamori K, Yamaoka A, Naoi M, Maruyama W. The downregulation of longevity-related gene, FOXO3 induces the neurodegeneration of the Lewy body disease model cells. 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience2014), Nov 19, 2014, Washington DC, USA.
 11. 龍 訥、南山誠、能勢弓、**本山昇**、永井雅代、茨木京子、早川智久、山田洋美、金森久美子、直井信、丸山和佳子. 長寿関連遺伝子 FOXO3 のレビー小体病発症における役割の解

- 析. 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月26日、横浜
12. **Sawamoto K**, Kishimoto N, Nagai H, Knaut H, Asakawa K, Urasaki A, Kawakami K. Roles for chemokine signaling in neuronal migration in the adult zebrafish brain. the 18th International Vascular Biology Meeting. 2014年4月15日、京都市
 13. 三宅美緒、伊藤由起、澤田雅人、酒井潔、鈴木日美子、坂本龍雄、**澤本和延**、上島通浩. マウスにおける2-エチル-1-ヘキサノール吸入曝露後の嗅球への影響. 第87回日本産業衛生学会、2014年5月22日、岡山県岡山市
 14. **澤本和延**. 感覚入力によって制御されるニューロン再生機構. 第51回日本リハビリテーション医学会学術集会 シンポジウム3、2014年6月5日、愛知県名古屋市
 15. **澤本和延**. 脳に内在する再生機構. 藤田保健衛生大学医学セミナー、2014年6月25日、愛知県豊明市
 16. **澤本和延**. 幹細胞・前駆細胞を支える足場. 第41回日本毒性学会学術年会 シンポジウム3、2014年7月2日、兵庫県神戸市
 17. 金子奈穂子、**澤本和延**. 活性化アストロサイトとの相互作用の操作による新生ニューロンの傷害部への供給促進. 第35回日本炎症・再生医学会、2014年7月2日、沖縄県名護市
 18. **澤本和延**. 脳に内在する再生機構. 第2回ニューロネットワーク講演会 Session1 基礎講演、2014年7月25日、大阪府大阪市
 19. **澤本和延**. 脳に内在する再生機構とその操作技術の開発. 第2回再生医療関連機器開発研究会、2014年9月4日、愛知県名古屋市
 20. Sawada M, Huang S, Hikita T, Uemura A, **Sawamoto K**. 新生ニューロンの移動形態制御による嗅球内停止位置の決定. 第37回日本神経科学大会、2014年9月11-13日、神奈川県横浜市
 21. **Sawamoto K**. 成体嗅球における新生ニューロンの移動・成熟. 第37回日本神経科学大会 シンポジウム2-G-1、2014年9月12日、神奈川県横浜市
 22. Kaneko N, **Sawamoto K**. 傷害脳内を移動する新生ニューロンと反応性アストロサイトの相互作用. 第37回日本神経科学大会、2014年9月11-13日、神奈川県横浜市
 23. 佐藤祐哉、浄住大慈、二木杉子、中野伊津子、金子奈穂子、**澤本和延**、関口清俊. 成体神経幹細胞ニッチとしての斑点状基底膜の機能. 第36回日本生物学的精神医学会大会・第57回日本神経化学学会大会合同年会、2014年9月29日-10月1日、奈良県奈良市
 24. 金子奈穂子、**澤本和延**. インターフェロン療法中のうつ病発症と海馬のニューロン新生の変化. 第36回日本生物学的精神医学会大会・第57回日本神経化学学会大会合同年会、2014年9月29日-10月1日、奈良県奈良市
 25. 松本真実、澤田雅人、**澤本和延**. 光血栓性大脳皮質虚血モデルにおける新生ニューロンの移動様式の解析. 第36回日本生物学的精神医学会大会・第57回日本神経化学学会大会合同年会、2014年9月29日-10月1日、奈良県奈良市

26. 金子奈穂子、澤本和延. ミクログリアの活性化を介する海馬のニューロン新生抑制とうつ病発症メカニズムの解析. 第23回「海馬と高次脳機能」学会、2014年10月11-12日、石川県金沢市
27. 澤田雅人、神谷幸余、稲田浩之、岡田淳志、田口和己、郡健二郎、柳川右千夫、高坂新一、鍋倉淳一、澤本和延. ミクログリアの食食による成体嗅球ニューロンのターンオーバーの制御. 第23回「海馬と高次脳機能」学会、2014年10月11-12日、石川県金沢市
28. 澤本和延. Adult neurogenesis研究のトピックス. 第23回「海馬と高次脳機能」学会 教育講演II、2014年10月11日、石川県金沢市
29. Aoyama M, Kato S, Kakita H, Hida H, Sawamoto K, Asai K. Astrocyte-derived erythropoietin protects the oligodendrocyte precursor cell against hypoxic and reoxygenation injury. 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience2014), 2014. 11. 15-19 Washington DC, USA
30. Kaneko N, Zheng L, Hitoshi S, Takao K, Miyakawa T, Tanaka Y, Kalinke U, Kudo K, Kanba S, Ikenaka K, Sawamoto K. Interferon- α inhibits neurogenesis and induces depression-like behavioral phenotype via interferon receptors expressed in the mouse brain. 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience2014), 2014. 11. 15-19 Washington DC, USA
31. 金子奈穂子、澤本和延. ニューロン新生・再生過程におけるアストロサイトとの相互作用. 第10回成体脳のニューロン新生懇談会、2014年12月6日、千葉県柏市
32. 澤田雅人、黄誌恵、匹田貴夫、桜井陽明、植村明嘉、澤本和延. Sema3E-PlexinD1シグナルによる新生ニューロンの移動維持・停止メカニズム. 第10回成体脳のニューロン新生懇談会、2014年12月6日、千葉県柏市
33. 松本真実、澤田雅人、澤本和延. 成体大脳皮質虚血傷害に対する応答と新生ニューロンの移動. 第10回成体脳のニューロン新生懇談会、2014年12月6日、千葉県柏市
34. 荻野崇、中居智恵美、高瀬弘嗣、岸本憲人、澤田雅人、澤本和延. 老齢ゼブラフィッシュにおける、ニューロン新生の低下と多繊毛の出現について. 第10回成体脳のニューロン新生懇談会、2014年12月6日、千葉県柏市
35. 宮本拓哉、澤田雅人、神農英雄、辻村幸平、川上巧、宮田卓樹、澤本和延. 抑制性・興奮性神経前駆細胞の生後脳傷害に対する挙動の解析. 第10回成体脳のニューロン新生懇談会、2014年12月6日、千葉県柏市
36. 金子奈穂子、鄭蓮順、等誠司、高雄啓三、宮川剛、田中靖人、夏洪晶、Kalinke U、工藤耕太郎、神庭重信、池前一裕、澤本和延. インターフェロン誘発性うつ病モデル動物におけるニューロン新生抑制機構の解析. 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク冬のシンポジウム、2014年12月11-13日、東京都
37. 太田晴子、匹田貴夫、澤田雅人、西岡朋生、松本真実、小村理行、大野彰久、神谷幸余、宮本拓哉、浅井直也、榎本篤、高橋雅英、貝淵弘三、祖父江和哉、澤本和延. Rho制御タ

- ンパク質Gmipによる生後マウス脳内を移動する新生ニューロンの速度調節. 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク冬のシンポジウム、2014年12月11-13日、東京都
38. 松本真実、澤田雅人、澤本和延. 成体大脳皮質の虚血モデルを用いた新生ニューロンの移動動態の観察. 第14回日本再生医療学会総会、2015年3月19日、神奈川県横浜市
 39. 金子奈穂子、澤本和延. アストロサイトとの相互作用の制御による梗塞部への新生ニューロンの供給促進. 第14回日本再生医療学会総会、2015年3月19日、神奈川県横浜市
 40. 神農英雄、澤田雅人、齋藤伸治、澤本和延. 新生仔脳傷害モデルマウスにおける脳室下帯由来ニューロン再生. 第14回日本再生医療学会総会、2015年3月19日、神奈川県横浜市
 41. 澤本和延. 内在性神経幹細胞による傷害脳組織の再生. 第14回日本再生医療学会総会シンポジウム3、2015年3月19日、神奈川県横浜市
 42. 中野秀、山岸覚、山田浩平、澤田雅人、森則夫、澤本和延、佐藤康二. Netrin-5の成体マウス神経新生関連領域における特異的発現. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会 合同大会、2015年3月21日、兵庫県神戸市
 43. 澤本和延. 成体脳の恒常性維持と再生における新生ニューロンの移動機構. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会 合同大会 シンポジウム47、2015年3月22日、兵庫県神戸市
 44. Miyamoto T, Kaneko N, Sawamoto K. Behavior of oligodendrocytes after brain injury. MD研究者育成プログラム 第5回全国合同リトリート、2015年3月21-22日、兵庫県神戸市
 45. Nakai C, Ogino T, Takase H, Kishimoto N, Sawada M, Sawamoto K. Emergence of multiple cilia in the Zebrafish periventricular zone with aging. MD 研究者育成プログラム 第5回全国合同リトリート、2015年3月21-22日、兵庫県神戸市

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