

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。酸化ストレスに応答した FOXO の活性化には、MST1 によりリン酸化が必須であることを明らかにした。また、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、新生神経の数が減少することを明らかにした。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、加齢に伴い神経幹細胞数および新生ニューロン数が顕著に減少し、再生能力が低下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。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るが、そのメカニズムは不明である。そこで 老化シグナル (IIS-FOXO-SIRT1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、ウェスタンブロット法、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。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、名古屋市立大学におけるゼブラフィッシュを用いた実験は、名古屋市立大学動物実験委員会・遺伝子組換え実験等安全委員会の承認を受け、名古屋市立大学動物実験規定および遺伝子組換え実験等安全管理規程・要項に従って行なった。

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。FOXO 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、FOXO 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。そこで FOXO の制御メカニズムについて検討を行った。酸化ストレスに応答した FOXO の転写活性化には、MST1 キナーゼによるリン酸化が必須であることを明らかにした。今後、MST1 による FOXO 活性制御メカニズムの破綻が、神経幹細胞の早期老化を引き起こすか検討する予定である。

- (2) 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の海馬歯状回における神経幹細胞について検討した結果、新生ニューロンの数が減少することを明らかにした。

- (3) 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付近の細胞構築を解析した。加齢に伴い神経幹細胞数および新生ニューロン数が顕著に減少すること明らかにした。中年期および老齢期のゼブラフィッシュ脳では、脳傷害後の新生ニューロンの増加および傷害部位への移動が認められず、ニューロンの再生が見られなかった。

D. 考察と結論

老化制御因子 **FOXO** は、酸化ストレスに応答して **MST1** キナーゼによりリン酸化され転写活性化されることを明らかにした。また、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ことを見出した。また、ゼブラフィッシュ成魚脳室壁付近 (脳室帯) において加齢に伴い神経幹細胞数および新生ニューロン数が顕著に減少すること明らかにした。また、それに伴い、再生能が低下することを見出した。

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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lee IH, Kawai Y, Fergusson MM, Rovira II, Bishop AJ, **Motoyama N**, Cao L, Finkel T. Atg7 modulates p53 activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress. *Science* 336: 225-228, 2012.
- 2) Demidov ON, Zhu Y, Kek C, Goloudina AR, **Motoyama N**, Bulavin DV. Role of Gadd45a in Wip1-dependent regulation of intestinal tumorigenesis. *Cell Death Diff* 19: 1761-1768, 2012.

- 3) 神農英雄・齋藤伸治・澤本和延. 新生児脳傷害に対する再生医療の可能性. *日本産婦人科・新生児血液学会誌* (ISSN: 0916-8796) (2013) 22: 37-44.
- 4) Masato Sawada and **Kazunobu Sawamoto**. Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain. *The Keio Journal of Medicine* (ISSN: 0022-9717) (2013) 62:13-28.
- 5) Mari Yamagata M, Akihito Yamamoto, Eisuke Kako, Naoko Kaneko, Kohki Matsubara, Kiyoshi Sakai, **Kazunobu Sawamoto**, and Minoru Ueda. Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. *Stroke* (ISSN: 0039-2499) (2013) 44: 551-554.
- 6) **澤本和延**. 成体脳に内在する神経前駆細胞を用いた神経再生. *臨床神経学* (ISSN: 0009-918X) (2012) 52: 539-541.
- 7) **澤本和延**. 脳に内在する神経再生機構とその制御. *脳循環代謝* (ISSN: 0915-9401) (2012) 23: 95-99.
- 8) 岸本憲人、**澤本和延**. 成体神経幹細胞老化のゼブラフィッシュモデル. *基礎老化研究* (ISSN: 0912-8921) (2012) 36: 43-45
- 9) **澤本和延**、神農英雄、澤田雅人、齋藤伸治. 新生児神経疾患の再生医療の可能性. *Fetal & Neonatal Medicine* (ISSN: 1884-555X) (2012) 4: 30-33.
- 1 0) **澤本和延**. 血管に沿って動く新生ニューロン. *細胞工学* (ISSN: 0287-3796) (2012) 31: 639.
- 1 1) Eisuke Kako, Naoko Kaneko, Mineyoshi Aoyama, Hideki Hida, Hirohide Takebayashi, Kazuhiro Ikenaka, Kiyofumi Asai, Hajime Togari, Kazuya Sobue, and **Kazunobu Sawamoto**. Subventricular-zone derived oligodendrogenesis in injured neonatal white-matter in mice enhanced by a nonerythropoietic EPO derivative. *Stem Cells* (ISSN: 1549-4918) (2012) 30: 2234-2247.
- 1 2) Yuki Hirota, Masato Sawada, Yasuyuki S Kida, Shih-hui Huang, Osamu Yamada, Masanori Sakaguchi, Toshihiko Ogura, Hideuki Okano, and **Kazunobu Sawamoto**. Roles of planar cell polarity signaling in maturation of neuronal precursor cells in the postnatal mouse olfactory bulb. *Stem Cells* (ISSN: 1549-4918) (2012) 30: 1726-1733.
- 1 3) Norihito Kishimoto, Kohei Shimizu, and **Kazunobu Sawamoto**. Neuronal regeneration in a zebrafish model of adult brain injury. *Disease Models and Mechanisms* (ISSN: 1754-8411) (2012) 5: 200-209.
- 1 4) Yasuko Kato, Naoko Kaneko, Masato Sawada, Keishi Ito, Sousuke Arakawa, Shingo Murakami, and **Kazunobu Sawamoto**. A subtype-specific critical period for neurogenesis in the postnatal development of mouse olfactory glomeruli. *PLoS ONE* (ISSN: 1932-6203) (2012) 7 (11): e48431.

doi:10.1371/journal.pone.0048431.

- 1 5) Kanako Nakaguchi, Hideo Jinnou, Naoko Kaneko, Masato Sawada, Takao Hikita, Shinji Saitoh, Yasuhiko Tabata, and **Kazunobu Sawamoto**. Growth factors released from gelatin hydrogel microspheres increase new neurons in the adult mouse brain. *Stem Cells International* (ISSN: 1687-9678) (2012) 2012, Article ID 915160, 7 pages, doi: 10.1155/2012/915160
- 1 6) Satoshi Suyama, Takehiko Sunabori, Hiroaki Kanki, **Kazunobu Sawamoto**, Christian Gachet, Schuichi Koizumi, and Hideyuki Okano. Purinergic signaling promotes proliferation of adult mouse subventricular zone cells. *The Journal of Neuroscience* (ISSN: 0270-6474) (2012) 32: 9238-9247.

2. 学会発表

- 1) **本山 昇**. DNA 損傷応答機構 (DDR) による老化・がん化の制御. 第 34 回日本分子生物学会、ワークショップ「ゲノム安定性と発がん・老化の制御」、2012 年 12 月 11 日、福岡.
- 2) Yanagino T, Itoh Y, Furukawa-Hibi Y, Glantschnig H, Maruyama W, **Motoyama N**. MST1-mediated phosphorylation of FOXO enhances its transcriptional activity by recruiting SIRT1 in response to oxidative stress. Aging and Diseases of Aging, Keystone Symposia, Oct 24, 2012, Tokyo, Japan.
- 3) 柳野卓也、日比陽子、伊藤裕貴、丸山和佳子、**本山 昇**. MST1 による酸化ストレス誘導性 FOXO 転写活性化メカニズムの解析. 第 35 回日本基礎老化学会大会、2012 年 7 月 26-27 日、習志野
- 4) 新飯田俊平、山本 誠士、村松 昌、東 英梨月、**本山 昇**、滝川 修. 血中 miRNA と Endothelial Microparticles. 第 4 回日本 RNAi 研究会、2012 年 8 月 31 日、広島
- 5) 神農英雄、澤田雅人、中口加奈子、金子奈穂子、匹田貴夫、齋藤伸治、田畑泰彦、**澤本和延**. 増殖因子の徐放化による正常脳及び傷害脳における脳室下帯ニューロン新生の賦活化. 第 12 回日本再生医療学会総会. 口演. 2013.3.21. 神奈川県, パシフィコ横浜.
- 6) 大野彰久、匹田貴夫、澤田雅人、**澤本和延**. Functions of Rac1 in saltatory migration of new neurons in rostral migratory stream of postnatal brain. 第 6 回神経発生討論会. ポスター. 2013.3.14-15. 埼玉県, 理化学研究所・鈴木梅太郎ホール.
- 7) 村上志津子、金子奈穂子、**澤本和延**、内山安男. スリット 1,2 ダブルノックアウトマウスにおける GnRH ニューロンの移動と軸索投射. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 口演. 2013.3.28-30. 香川県, サンポートホール高松・かがわ国際会議場.

- 8) 金子奈穂子, 鄭蓮順, 澤本和延. インターフェロン α 投与による抑うつ症状と海馬におけるニューロン新生の抑制. 第2回日本マーマーモセット研究会. ポスター. 2013.2.27-28. 東京都, 慶應義塾大学.
- 9) Hikita, T., Ohno, A., Sawada, M., Sawamoto, K. Visualization of spatiotemporal activity of Rac1 GTPase using FRET biosensor in new neurons migrating from the subventricular zone toward olfactory bulb. (成体脳内を移動するニューロンの Rac1 活性: FRET バイオセンサーを用いた時空間的解析). 第35回日本分子生物学会年会. 口演及びポスター. 2012.12.11-14. 福岡県, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡.
- 10) Kishimoto, N., Sawamoto, K. Sirt1 is required for maintenance of neural stem cells in the ventricular-subventricular zone in the adult zebrafish brain. 第35回日本分子生物学会年会. 口演及びポスター. 2012.12.11-14. 福岡県, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡.
- 11) 太田晴子, 匹田貴夫, 西岡朋生, 大野彰久, 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 Gmp13 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. 第63回名古屋市立大学医学会総会. 口演. 2012.12.02. 愛知県, 名古屋市立大学.
- 12) Yamagata, M., Yamamoto, A., Kako, E., Kaneko, N., Matsubara, K., Sakai, K., Sawamoto, K., Ueda, M. Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. Global COE the 4th International Symposium "Global COE Symposium on Neuro-Tumor Biology and Medicine". ポスター. 2012.11.16. 愛知県, Westin Nagoya Castle Hotel.
- 13) 澤田 雅人, 黄 詩恵, 廣田ゆき, 澤本 和延. 発達期・老齢期のマウス側脳室外側壁における上皮細胞の極性. 第5回日本水頭症脳脊髄液学会. 口演. 2012.11.11. 東京都, 順天堂大学.
- 14) Yamagata, M., Yamamoto, A., Kako, E., Kaneko, N., Matsubara, K., Sakai, K., Sawamoto, K., Ueda, M. Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. MHS (Micro-Nano Mechatronics and Human Science) 2012 & Nagoya University Micro-Nano Global COE. International Symposium on Micro-Nano Systems for the Interaction of Young Researchers - MHS 2012 Satellite Session. ポスター. 2012.11.4-7. 愛知県, 名古屋大学野依記念講堂.
- 15) Sawada, M., Kaneko, N., Inada, H., Wake, H., Kato, Y., Yanagawa, Y., Kobayashi, K., Nemoto, T., Nabekura, J., Sawamoto, K. Sensory input-dependent spatiotemporal regulation of neuronal turnover in the adult olfactory bulb glomeruli. Neuroscience 2012. ポスター. 2012.10.13-17. LA アメリカ, New Orleans Ernest

N. Morial Convention Center.

- 1 6) 金子奈穂子, 鄭蓮順, 夏洪晶, **澤本和延**. げっ歯類・霊長類を用いたインターフェロン誘発性の抑うつ行動と海馬ニューロン新生抑制の解析. 第21回海馬と脳高次機能学会. 口演. 2012.10.7. 石川県, 金沢 湯涌創作の森「交流研修棟」.
- 1 7) 澤田雅人, 加藤康子, 金子奈穂子, 伊藤圭志, 荒川総介, 村上信五, **澤本和延**. 発達期における嗅覚入力ニューロン新生と嗅覚機能への影響. 第21回海馬と脳高次機能学会. 口演. 2012.10.7. 石川県, 金沢 湯涌創作の森「交流研修棟」.
- 1 8) Kaneko, N., Zheng, L., **Sawamoto, K.** Impaired hippocampal neurogenesis and depressive behaviors in interferon-alpha-treated mice and monkeys. 第55回日本神経化学会 (The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society of Neurochemistry と合同開催) . 口演. 2012.9.30-10.2. 兵庫県, 神戸国際会議場.
- 1 9) Sawada, M., Huang, S., **Sawamoto, K.** Mechanisms for layer-specific sorting of distinct interneuron subtypes migrating in the postnatal olfactory bulb. 第35回日本神経科学大会. 口演. 2012.9.21. 愛知県, 名古屋国際会議場.
- 2 0) Kishimoto, N., **Sawamoto, K.** Aging of the neurogenic niche in the zebrafish telencephalic ventricular zone. 第35回日本神経科学大会. 口演. 2012.9.18-21. 愛知県, 名古屋国際会議場.
- 2 1) Kaneko, N., **Sawamoto, K.** New neurons migrate through the activated astrocytes in the brain after stroke using Slit-Robo signaling. 第35回日本神経科学大会. 口演. 2012.9.18-21. 愛知県, 名古屋国際会議場.
- 2 2) Sawada, M., Huang, S., **Sawamoto, K.** Mechanisms for layer-specific sorting of distinct interneuron subtypes migrating in postnatal olfactory bulb. 第35回日本神経科学大会. 口演. 2012.9.18-21. 愛知県, 名古屋国際会議場.
- 2 3) Ota, H., Hikita, T., Asai, N., Enomoto, A., Kaibuchi, K., Takahashi, M., Sobue, K., **Sawamoto, K.** Gmp controls a speed of migrating new neurons in postnatal mouse brain. 第35回日本神経科学大会. 口演. 2012.9.18-21. 愛知県, 名古屋国際会議場.
- 2 4) Ishizaki, T., Kaneko, N., Tamura, A., Miyata, T., Tsukita, S., **Sawamoto, K.** Ezrin controls morphology and function of subventricular zone astrocytes in the postnatal mouse brain. 第35回日本神経科学大会. ポスター. 2012.9.18-21. 愛知県, 名古屋国際会議場.
- 2 5) Nakaguchi, K., Kaneko, N., Sekiguchi, K., **Sawamoto, K.** Expression of β 1-integrin in chain-forming new neurons migrating along blood vessels in the striatum after ischemic stroke. 第35回日本神経科学大会. ポスター. 2012.9.18-21. 愛知県, 名古屋国際会議場.

- 26) 岸本憲人, 澤本和延. ゼブラフィッシュ嗅覚系におけるニューロン新生のメカニズムと機能 嗅覚情報処理の神経基盤—匂い分子から嗅覚神経回路、行動・情動まで—. ポスター. 2012.9.15. 東京都, 東京大学医学部.
- 27) 加藤康子, 金子奈穂子, 澤田雅人, 澤本和延. 嗅球糸球体のニューロン新生に対する発達期嗅覚入力の影響—匂い分子から嗅覚神経回路、行動・情動まで—. ポスター. 2012.9.15. 東京都, 東京大学医学部.
- 28) 岸本憲人, 武田芳樹, 澤本和延. 成体神経幹細胞老化のゼブラフィッシュモデル. 第 35 回日本基礎老化学会大会. 口演. 2012.7.26-27. 千葉県, 東邦大学習志野キャンパス.
- 29) 山形まり, 山本朗仁, 加古英介, 酒井陽, 金子奈穂子, 澤本和延, 上田実. 低酸素虚血脳障害モデルマウスに対する歯髄幹細胞移植の治療効果. 第 33 回日本炎症・再生医学会. ポスター. 2012.7.5-6. 福岡県, ホテル日航福岡.
- 30) 山形まり, 山本朗仁, 加古英介, 酒井陽, 金子奈穂子, 澤本和延, 上田実. 低酸素虚血脳障害モデルマウスに対する歯髄幹細胞移植の治療効果. 第 11 回日本再生医療学会総会. ポスター. 2012.6.13. 神奈川県, パシフィコ横浜.
- 31) Kishimoto, N., Shimizu, K., Nagai, H., Asakawa, K., Urasaki, A., Nonaka, S., Kawakami, K., Sawamoto, K. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the zebrafish brain. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting. ポスター. 2012.6.13-16. 神奈川県, パシフィコ横浜.
- 32) Kako, E., Kaneko, N., Aoyama, M., Hida, H., Takebayashi, H., Ikenaka, K., Asai, K., Togari, H., Sobue, K., Sawamoto, K. Asialoerythropoietin enhances the maturation of oligodendrocyte progenitor cells derived from subventricular zone after neonatal white matter injury. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting. ポスター. 2012.6.13-16. 神奈川県, パシフィコ横浜.
- 33) Ito, A., Shinmyo, Y., Kaneko, N., Hirota, Y., Hatakeyama, J., Yamaguchi, M., Shimamura, K., Sawamoto, K., Tanaka, H., Ohta, K. TSUKUSHI maintains the growth and undifferentiated properties of neuronal stem/progenitor cells as a niche molecule. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting. 口演. 2012.6.13-16. 神奈川県, パシフィコ横浜.
- 34) 太田晴子, 匹田貴夫, 貝淵弘三, 高橋雅英, 祖父江和哉, 澤本和延. 生後マウス脳における新生ニューロンの移動に関する Rho 制御タンパク質の発現および機能の解析. 第 59 回日本麻酔科学会学術集会. 口演及びポスター. 2012.6.7-9. 兵庫県, 神戸ポートピアホテル・神戸国際展示場.
- 35) Ito, A., Shinmyo, Y., Kaneko, N., Hirota, Y., Hatakeyama, J., Yamaguchi, M., Shimamura, K., Sawamoto, K., Tanaka, H., Ohta, K. Tsukushi maintains the

growth and undifferentiated properties of stem/progenitor cells as a niche molecule.

第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会. ポスター.

2012.5.28-31. 兵庫県, 神戸国際会議場・神戸商工会議所.

- 3 6) Thumkeo, D., Shinohara, R., Watanabe, K., Takebayashi, H., Kaneko, N., **Sawamoto, K.**, Ishizaki, T., Furuyashiki, T., Narumiya, S. Roles of mDia, a Rho effector and action nucleator, in nenroepitheliu integrity and neuroblast migration.

第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会. ポスター.

2012.5.28-31. 神戸国際会議場・神戸商工会議所.

- 3 7) Hikita, T., Ohno, A., Sawada, M., Ohta, H., Matsuda, M., **Sawamoto, K.** Functions and spatiotemporal activation patterns of Rho family GTPases in living new neurons migrating in the postnatal mouse brain. 第 45 回発生生物学会・第 64 回細胞生物学会合同大会. 口演. 2012.5.28-31. 兵庫県, 神戸国際会議場・神戸商工会議所.

- 3 8) 太田晴子, 匹田貴夫, 貝淵弘三, 高橋雅英, 祖父江和哉, **澤本和延**. 脳損傷に対する新たな治療法開発への取り組み ~新生ニューロン移動に関する Rho 制御タンパク質の同定と機能解析~. 第 16 回日本神経麻酔・集中治療研究会. 口演. 2012.4.14. 岡山県, 岡山コンベンションセンター.

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