

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08425

研究課題名(和文)ニューロンの細胞老化は加齢性神経変性疾患発症の要因となりうるか？

研究課題名(英文) Could neuronal cell senescence be a pathogenetic factor for age-associated neurodegenerative diseases?

研究代表者

千葉 陽一 (Chiba, Yoichi)

香川大学・医学部・講師

研究者番号：30372113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「神経細胞の細胞老化が加齢性神経変性疾患の発症に関与する」という仮説を検証するため、SAMP8マウス由来初代大脳皮質神経細胞を長期培養し、細胞老化マーカーの発現を検討した。SAMP8由来神経細胞では培養28日目以降で老化関連 ガラクトシダーゼ陽性細胞がコントロールのSAMR1由来神経細胞に比べて有意に増加していた。H2AXやマクロH2A、HNEの免疫細胞化学ではSAMP8神経細胞とコントロールとの間で有意な差は見出されなかった。

研究成果の概要(英文)：To investigate whether neuronal cell senescence contributes to the pathogenesis of age-associated neurodegenerative diseases, we analyzed the expression of cell senescence markers in cultured primary cortical neurons from E17 embryos of SAMP8 mice, a model for age-associated neurodegeneration. Primary neurons from mouse embryos were successfully maintained in serum-free media for up to 8 weeks. The ratio of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase-positive neurons from SAMP8 mice was significantly increased after 28 days in vitro (DIV) when compared to those from control SAMR1 mice. The expression of  $\gamma$ -H2AX, a marker for DNA damage foci, was increased in nuclei of cultured neurons after 28 DIV, although no significant difference between neurons from SAMP8 and SAMR1 mice. Other cell senescence markers, such as heterochromatin-associated mH2A and lipid peroxidation product 4-HNE, did not show significant difference between neurons from SAMP8 and SAMR1 mice.

研究分野：実験病理学

キーワード：細胞老化 神経変性疾患 神経細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病やパーキンソン病において、加齢が最大の危険因子であることはよく知られている。しかし、加齢に伴ってこれらの疾患の発症が促進されるメカニズムは十分明らかになっていない。

(2) 細胞老化の概念は、これまで専ら細胞の分裂停止による腫瘍形成抑制という観点で議論されてきたため、出生時にはすでに分裂停止した細胞である神経細胞に細胞老化の概念を適用することが可能かどうかについても十分確立していない状態であった。

(3) 近年、細胞老化は DNA 損傷反応に引き続いて起こるいくつかの形質の組み合わせとして理解されるようになり、DNA 二本鎖切断の際に形成される  $\gamma$ H2AX、老化関連ヘテロクロマチン斑 (SAHF)、細胞老化関連分泌形質 (SASP) などが細胞老化マーカーとして広く知られるようになった。これらを指標として、老齢マウスの脳組織やヒトアルツハイマー病脳組織における中枢神経系細胞の細胞老化を評価しようとする試みもなされ始め、神経系細胞の細胞老化と加齢性神経変性疾患との関係についての研究がなされ始めている。

## 2. 研究の目的

本研究では、「神経細胞の細胞老化が加齢性神経変性疾患の発症に関与する」という仮説を検証するため、初代神経細胞を長期培養した *in vitro* モデルと、加齢性神経変性を自然発症するモデルマウスを用いた *in vivo* 解析により、以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1) マウス由来初代大脳皮質ニューロンの長期培養による細胞老化形質の発現とアミロイド 蛋白の産生：加齢性神経変性を自然発症する SAMP8 マウスと、遺伝的に近縁ながら正常老化を示す SAMR1 マウスより採取した初代培養神経細胞の長期培養を行い、両者間の細胞老化マーカー発現の違いやアミロイド 蛋白の発現の違いについて明らかにする。

(2) SAMP8 マウスと SAMR1 マウスの加齢に伴う神経細胞における細胞老化マーカー発現を組織学的に解析し、*in vivo* での神経細胞老化と加齢性神経変性との間の関連性を明らかにする。

(3) 細胞老化関連シグナル分子 (p21, p38MAPK, NF- $\kappa$ B) を制御することにより、細胞老化マーカーの発現やアミロイド 蛋白の産生がどのように変化するかを調べ、神

経細胞老化と神経変性病態との間の因果関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) マウス大脳皮質初代神経細胞の長期培養による細胞老化形質の発現

SAMP8 マウスおよび SAMR1 マウスの胎生 17 日齢胎仔大脳皮質より神経細胞を単離し、Neurobasal™ medium に B-27<sup>®</sup> supplement (いずれも Thermo Fisher) を加えた無血清培地中で培養を行った。培養開始翌日に培地を全量交換後、28 日目に 1/10 量の培地を補充する、という方法により、8 週間までの長期培養が可能であることを予備実験で確認した。この培養条件下で 14 日目、28 日目、42 日目、56 日目にサンプルを回収し、各種細胞老化マーカーの発現につき解析を行った。なお、免疫染色等には Poly-D-lysine でコートしたセルデスク LF (住友ベークライト) 上に播種し培養した細胞を用いた。

(1) - 1 : Senescence Detection Kit (BioVision) を用いて老化関連 ガラクトシダーゼ染色を行い、陽性細胞率を経時的に測定した。

(1) - 2 : 長期培養した神経細胞における各種細胞老化マーカー (H2AX, mH2A, p-p38MAPK, p-p65RelA, HNE, p21, p16) の発現を免疫細胞化学的に解析した。

(2) 加齢性神経変性モデル動物による神経細胞老化形質の発現

4 週齢の雄性 SAMP8 マウスおよび SAMR1 マウスを購入し、コンベンショナル環境下で SAMP8 マウスは 52 週まで、SAMR1 マウスは 104 週まで飼育した。8 週、30 週、52 週、104 週齢において、全身麻酔下に 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定後脳を取り出し、半脳をパラフィン包埋、残りの半脳を凍結包埋し、免疫組織化学的検索に供した。

一部のマウスについては PBS にて灌流後、脳を摘出、部位別に分割後、生化学的検索用に -80 で凍結保存した。

## 4. 研究成果

(1) 長期培養マウス大脳皮質初代神経細胞における細胞老化形質の発現

(1) - 1 : 長期培養により試験管内で老化させた SAMP8 マウスと SAMR1 マウス由来培養神経細胞における老化関連 ガラクトシダーゼ (SA- $\beta$ -Gal) の陽性率を経時的に調べたところ、培養 14 日目までは両系統間に有意な陽性細胞率の差は認めなかったが、28 日目以降では SAMP8 マウス由来神経細胞で有意に陽性細胞率が高かった。代表的な位相差顕微鏡像を図 1 に、4 回の独立した実験の結果をまとめたグラフを図 2 に示す。

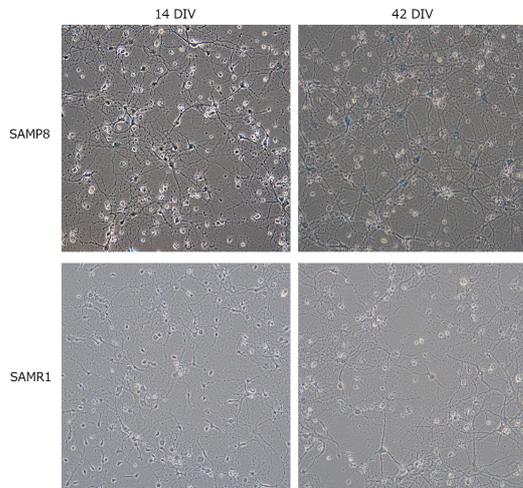


図1. 老化関連 ガラクトシダーゼ染色像 (位相差顕微鏡像)。

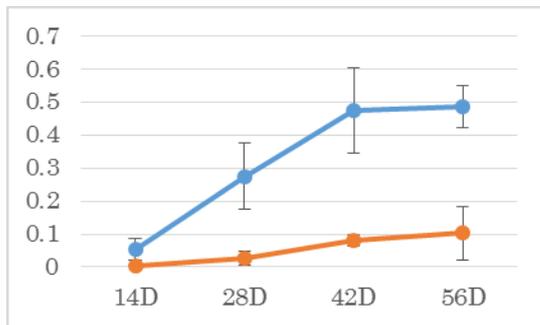


図2. 老化関連 ガラクトシダーゼ陽性細胞率の経時的変化。青：SAMP8 由来大脳皮質神経細胞、赤：SAMR1 由来大脳皮質神経細胞。

(1) - 2: 細胞老化マーカーの発現を長期培養した SAMP8 マウスと SAMR1 マウス由来培養神経細胞間で比較した。H2AX 免疫染色では、両系統由来細胞とも培養 14 日目までは少数の細胞が陽性となるだけであったが、28 日目以降は陽性細胞が増加した。増加の程度に系統差は明らかではなかった (図3)。Macro H2A 免疫染色による SAHF の評価においては、両系統由来細胞とも培養 14 日目より比較的多くの細胞の核が陽性所見を示し、加齢に伴う変化や系統差は見られなかった。HNE 免疫染色により過酸化脂質蓄積についても評価したが、明確な系統差は見られなかった。

(2) SAMP8 マウスの加齢による神経病理学的変化の解析を行った。3 種類の amyloid  $\beta$  抗体 (4G8, 12B2, BAM90.1) を用いた免疫染色で、4G8 は海馬に顆粒状の陽性所見、他の 2 つは樹状突起や脳梁の線維状の陽性所見を認めた。4G8 抗体で見られた顆粒状の陽性所見は、従来 PAS 陽性顆粒状構造物 (PGS) として報告されていた変化に相当するものと考えられ、既報告と合致する所見と考えられた。

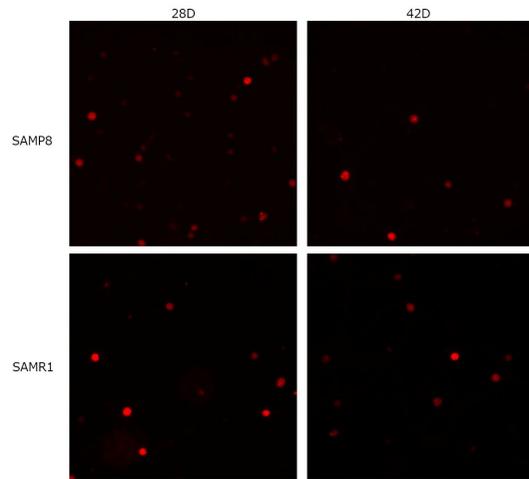


図3. H2AX 抗体による長期培養 SAM マウス由来神経細胞の免疫染色像

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Uemura N, Murakami R, Chiba Y, Ueno M. (他 6 名、3 番目) Immunoreactivity of urate transporters, GLUT9 and URAT1, is located in epithelial cells of the choroid plexus of human brains. *Neurosci Lett* 659:99-103, 2017. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.09.001. 査読有
2. Akiguchi I, Pallàs M, Budka H, Ueno M, Chiba Y, Hosokawa M. (他 8 名、9 番目) SAMP8 mice as a neuropathological model of accelerated brain aging and dementia: Toshio Takeda's legacy and future directions. *Neuropathology* 37: 293-305, 2017. DOI: 10.1111/neup.12373. 査読有
3. 上野正樹、千葉陽一、村上龍太、松本晃一、藤原龍史、植村直哉: Cerebral amyloid angiopathy - 血管周囲領域を介した脳組織間液ならびに脳脊髄液の排出との関連で. *病理と臨床* 35:724-728, 2017. 査読無
4. Kanaji N, Chiba Y, Sato A, Ueno M, Bandoh S. (他 5 名、2 番目) An autopsy case of bronchitis obliterans as a previously unrecognized adverse event of afatinib treatment. *Respir Invest* 55:58-62, 2017. DOI: 10.1016/j.resinv.2016.09.002 査読有
5. Kubo H, Shimono R, Chiba Y, Miki T, Kusaka T, Ueno M. (他 9 名、12 番目) Hypoxic-ischemic encephalopathy-associated liver fatty degeneration and the effects of therapeutic hypothermia in newborn piglets. *Neonatology* 111:203-210, 2017. DOI: 10.1159/000450721 査読有
6. Mashima M, Chiba Y, Murakami R, Ueno M.

- (他5名、2番目) Glucose transporter 8 immunoreactivity in astrocytic and microglial cells in subependymal areas of human brains. *Neurosci Lett* 636:90-94, 2017. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.11.005 査読有
7. Shimono A, Imoto Y, Sakamoto H, Chiba Y, Ueno M. (他6名、4番目) An immunohistochemical study of placental syncytiotrophoblasts in neonatal hemochromatosis. *Placenta* 48:49-55, 2016. DOI: 10.1016/j.placenta.2016.10.005 査読有
8. Itoh K, Ishihara Y, Chiba Y, Ueno M. (他6名、6番目) Levetiracetam treatment influences blood-brain barrier failure associated with angiogenesis and inflammatory responses in the acute phase of epileptogenesis in post-status epilepticus mice. *Brain Res* 1652:1-13, 2016. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.09.038 査読有
9. Imanishi M, Chiba Y, Ueno M, Tomita S. (他5名、2番目) Hypoxia-inducible factor-1 in smooth muscle cells protects against aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36:2158-2162, 2016. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.307784 査読有
10. Fujihara R, Chiba Y, Yamamoto T, Ueno M. (他5名、2番目) Albumin microvascular leakage in brains with diabetes mellitus. *Microsc Res Tech* 79:833-837, 2016. DOI: 10.1002/jemt.22708 査読有
11. Murakami R, Chiba Y, Tsuboi K, Ueno M. (他6名、2番目) Immunoreactivity of glucose transporter 8 is localized in the epithelial cells of the choroid plexus and in ependymal cells. *Histochem Cell Biol* 146:231-236, 2016. DOI: 10.1007/s00418-016-1444-5 査読有
12. Ueno M, Chiba Y, Murakami R, Matsumoto K, Kawauchi M, Fujihara R. Blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier in normal and pathological conditions. *Brain Tumor Pathol* 33:89-96, 2016. DOI: 10.1007/s10014-016-0255-7 査読有
13. Ueno M, Chiba Y, Matsumoto K, Murakami R. (他3名、2番目) Blood-brain barrier damage in vascular dementia. *Neuropathology* 36:115-124, 2016. DOI: 10.1111/neup.12262 査読有
14. Matsumoto K, Chiba Y, Fujihara R, Kubo H, Sakamoto H, Ueno M. Immunohistochemical analysis of transporters related to clearance of

- amyloid- peptides through blood-cerebrospinal fluid barrier in human brain. *Histochem Cell Biol* 144:597-611, 2015. DOI: 10.1007/s00418-015-1366-7 査読有
15. Itoh K, Inamine M, Oshima W, Kotani M, Chiba Y, Ueno M, Ishihara Y. Prevention of status epilepticus-induced brain edema and neuronal cell loss by repeated treatment with high-dose levetiracetam. *Brain Res* 1608:225-234, 2015. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.03.005 査読有

〔学会発表〕(計6件)

1. 千葉陽二、吉井りつ、佐藤明、上野正樹：Lewy 小体病理を伴った進行性核上性麻痺の一部検例。第8回日本神経病理学会中国四国地方会(2017)
2. 千葉陽二：SAMP8 マウスの神経病理。第32回老化促進モデルマウス(SAM)学会ワークショップ(2017)
3. 千葉陽二、佐藤明、金地伸拓、村上龍太、松本晃一、上野正樹：肺腺癌に対するEGFR-TKI治療中に閉塞性細気管支炎を発症した一部検例。第106回日本病理学会総会(2017)
4. 千葉陽二、佐藤明、金地伸拓、田所明、室田真希子、村上龍太、上野正樹：肺腺癌に対するEGFR-TKI治療中に進行性閉塞性換気障害を来した一部検例。第49回呼吸器病理研究会(2016)
5. 細川昌則、佐倉正明、千葉陽二、河村則子、古川絢子、榎戸靖、竹内実：SAMP1系統マウス皮膚の光老化モデルとしての意義。第30回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会(2015)
6. 千葉陽二、小森拓、吉田太、足立香織、難波英二、武井史郎、石井さなえ、上野正樹、細川昌則、島田厚良：前頭側頭葉優位の脳萎縮と広範なLewy小体の出現をみたNiemann-Pick病C型の一部検例。第104回日本病理学会総会(2015)

〔図書〕(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

千葉 陽一 (CHIBA, Yoichi)  
香川大学・医学部・講師  
研究者番号：30372113

### (2) 研究分担者

上野 正樹 (UENO, Masaki)  
香川大学・医学部・教授  
研究者番号：30322267