

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500316

研究課題名（和文） アルツハイマー病における神経再生機構の解明とその治療への応用

研究課題名（英文） Molecular mechanism of neurogenesis in Alzheimer' s disease.

研究代表者

内田 洋子 (UCHIDA YOKO)

財団法人東京都高齢者研究福祉振興財団・東京都老人総合研究所・主任研究員

60133633

研究成果の概要：

アルツハイマー病における neurogenesis の分子メカニズムを明らかにするため、培養系で、 $\beta$ -アミロイドによって発現変化する神経発生に關与する遺伝子群の網羅的解析を行った。その結果、 $\beta$ -アミロイドによって、神経発生に關与する転写因子、Mash1 の発現は誘導され、Olig2 発現は抑制されることが明らかになった。これは、Mash1 陽性/Olig2 陰性の神経幹細胞の割合が増加していたためであった。次に、AD マウスモデル (APPsw Tg、Tg2576) での Mash1、Olig2 の発現変化を調べたところ、15-21 カ月齢マウスでは、Mash1 (+) 細胞はほとんど認められなかったが、Olig2 (+) 細胞の数は、APPsw Tg マウスで有意に減少していた。さらに、Mash1 遺伝子と Olig2 RNAi の共発現実験によって、2 つの転写因子の発現変化が、細胞の運命をどのように変化させるのかを調べた。その結果、Olig2 を発現している神経幹細胞での Mash1 の過剰発現は、神経細胞への分化を誘導するのに対し、Olig2 発現を抑制された神経幹細胞での Mash1 の過剰発現は、神経分化よりもむしろ神経幹細胞の死を誘導することがわかった。これらの結果から、神経幹細胞から神経細胞の分化には、Mash1 と Olig2 の協調作用が必要であり、 $\beta$ -アミロイドによって、Mash1 陽性細胞で Olig2 発現が抑制されると、分化から細胞死へとスイッチングされると結論づけた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：アルツハイマー病、 $\beta$ -アミロイド、遺伝子発現、神経幹細胞、神経再生、

## 科学研究費補助金研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

神経再生 (neurogenesis) は、神経幹細胞内で特定の転写因子群が働くことによって、神経幹細胞からニューロンへと分化することである。アルツハイマー病脳では、老人斑や神経原線維変化、ニューロンの変性脱落に加え、神経再生マーカー蛋白の再発現も認められる。しかし、アルツハイマー病脳でニューロンが新生され、それによって変性脱落したニューロンが補充されることはほとんどない。成体脳やアルツハイマー病脳での神経再生の研究は極めて少なく、発生時と同様の転写因子群が働くのかどうか、その分子基盤さえも不明である。

神経再生マーカーの再発現は、アルツハイマー病のマウスモデルである、変異型 APP Tg マウスにも認められる。このことから、 $\beta$ アミロイド (A $\beta$ ) が神経再生マーカーの再発現を誘導し、かつ、完全な形で神経再生を阻害している分子の有力候補と考えられる。

## 2. 研究の目的

アルツハイマー病脳でどのような転写因子群の発現が変化しているのかを解析し、なぜ、アルツハイマー病では神経再生マーカーが発現しているにもかかわらず、新生ニューロンによる補充が起こらないかを分子レベルで解明することが本研究の目的である。

具体的には、まず、A $\beta$  が神経発生に関与する転写因子群のうち、どの因子の発現を変化させるのかを、培養系を使った網羅的遺伝子発現解析によって明らかにする。次に、変異型 APP Tg マウスを使い、A $\beta$  沈着によって、それらの転写因子群の発現が変化しているのかを明らかにする。さらに、同定した転写因子群の発現変化が、ニューロンへの分化を誘導するのか、それとも神経幹細胞や新生ニューロンの死を誘導するのかを、培養神経幹細胞への遺伝子導入および遺伝子機能阻害 (RNAi) 実験で明らかにする。

## 3. 研究の方法

## (1) 培養

## ①初代培養大脳ニューロン

胎生 17 日令ラットより常法に従い、細胞を調製し、gelatin-polyornithine-coated dish にまいた。培地には、5 %FBS や 10  $\mu$ M 2-mercaptoethanol を含む MEM を使用した。

## ②神経幹細胞 (neurosphere cell)

胎生 14 日令ラットより常法に従い、細胞を調製し、poly-2-hydroxyethylmethacrylate-coated

dish にまいた。培地には、EGF, FGF2, B-27 を含む DMEM/F12 を使用した。培養 7 日目に、形成された neurosphere を dissociate し、gelatin-polyornithine-coated dish にまき、同様の培地にて培養した (neurosphere cell)。

## (2) マウス

15-21 カ月令の Tg2576 (PrP-APP<sup>sw</sup>)ヘテロマウスと WT マウスを麻酔薬で屠殺し、還流固定した。さらに、後固定、cryoprotection を行い、凍結切片を作製した。

## (3) cDNA macroarray

初代培養大脳細胞に A $\beta$ 1-42 (5  $\mu$ M) を添加し、15 時間後に total RNA を調製した。得られた total RNA から、逆転写酵素によって、<sup>32</sup>P-labeled probe を作製し、Atlas Rat 102 Array に hybridize させた。Array 上の放射性を BAS2500 で測定し、ArrayGauge で解析した。A $\beta$ 1-42 処理細胞と未処理細胞での発現量の差が 2.5 倍以上ある遺伝子を 1 次スクリーニングした。

## (4) 遺伝子発現変化の確認

cDNA macroarray によって 1 次スクリーニングされた遺伝子を PCR-cloning し、Northern blotting での probe や QRT-PCR の外部標準 cDNA を作製した。Northern blotting と QRT-PCR には、A $\beta$ 1-42 処理細胞と未処理細胞から調製した poly(A)<sup>+</sup>RNA を、使用した。Northern blotting は常法に従い、<sup>32</sup>P-labeled cDNA を probe として用いた。QRT-PCR には、SYBR Green I を検出試薬として用いた。

## (5) 遺伝子導入と遺伝子機能阻害

Neurosphere cell への cDNA construct や siRNA の導入には、Lipofectamine 2000 を使用した。siRNA は、3 種類の specific oligo siRNA と 1 種類の scramble control oligo をデザインし、neurosphere cell に導入して、蛋白発現阻害を Western blotting によって確認した。

## (6) 蛍光免疫組織化学

固定した培養細胞やマウス凍結切片は、0.3 % Triton-X100 処理後、blocking し、1 次抗体と反応させた。2 次抗体として、Texas Red-conjugated anti-mouse IgG, Alexa 488-conjugated anti-mouse IgG<sub>2a</sub>, anti-rabbit IgG, Alexa-594 conjugated anti-mouse IgG<sub>1</sub> を使用した。核染色には Hoechst 33342 を使用した。マウス凍結切片は、染色後、10 mM CuSO<sub>4</sub> 処理して、リポフスチン顆粒の自家蛍光を消去した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Aβ1-42 による遺伝子発現変化

我々が使用した初代培養大脳細胞の構成比は、ニューロンが 70%、25%が nestin 陽性の未分化細胞、5%がアストロサイトであった。転写因子が数多くスポットされている macroarray を使い、Aβ1-42 によってこれらの細胞内で発現誘導される遺伝子群をスクリーニングした。さらに、同一の macroarray を使い、胎児期の脳でのみ発現誘導される遺伝子群をスクリーニングし、Aβ1-42 によって誘導される胎児性遺伝子を 13 種類同定した。Northern blotting や QTR-PCR によって、同定した遺伝子の発現変化を調べたところ、Mash1 の誘導のみが確認できた。

Mash1 は、神経幹細胞からニューロンへの分化を決定する転写因子である。そこで、神経分化に関与する他の転写因子の発現変化の有無を調べた。Mash2, neuroD2, neurogenin 1 は Aβ1-42 によって発現変化せず、Olig2 の発現は抑制されていた。

Mash1 と Olig2 の発現は、蛋白レベルでも Aβ1-42 によって同様の変化を示した。

##### (2) Aβ1-42 による Mash1 と Olig2 の発現変化は、培養大脳細胞の譜系にどのような変化を引き起すのか

始めに、未処理の初代培養大脳細胞系での Mash1 陽性細胞の譜系を調べた。初代培養大脳細胞のうち、約 10%が Mash1 陽性細胞であった。Mash1 陽性細胞の大部分は、nestin 陽性であり、βIII-tubulin (ニューロンのマーカー) 陰性であった。また、Mash1 陽性細胞の 70-80%は、Olig2 (オリゴデンドロサイトやニューロンの前駆細胞のマーカー) 陽性であった。これらのことは、Mash1 が神経幹細胞と思われる前駆細胞に発現することを示した。

次に、Aβ1-42 によって、Mash1 陽性細胞が増加し、Olig2 陽性細胞が減少するのかわかを調べた。Aβ1-42 添加しても、Mash1 陽性細胞数は増加しなかったが、Olig2 陰性・Mash1 陽性細胞数が増加していた。細胞特異マーカーによって、この Olig2 陰性・Mash1 陽性細胞の譜系を調べたが、この細胞には、ニューロンやアストロサイト、オリゴデンドロサイトのマーカーは発現していなかった。このことから、Aβ1-42 は細胞特異的マーカーを持たない未分化な細胞 (神経幹細胞) で Mash1 発現を誘導し、Olig2 発現を抑制すると言える。

##### (3) AD マウスモデル (APPsw Tg, Tg2576) での Mash1, Olig2 の発現変化

AD マウスモデル、Tg2576 では、12 ヶ月令以上になると大脳皮質や海馬に Aβ plaque が認められるようになると言われている。そこ

で、まず、使用する 15-21 ヶ月令 Tg マウス脳切片での Aβ plaque の出現を蛍光免疫組織化学で確認した。次に、15-21 ヶ月令 Tg マウスでの Mash1, Olig2 の発現変化を蛍光免疫組織化学によって調べた。この月令の wild type および hetero マウス大脳皮質には、Mash1 陽性細胞は認められなかったが、Olig2 陽性細胞はどちらの type のマウスにも認められた。そして、Olig2 陽性細胞の数は、hetero マウス大脳皮質 (gray matter) で減少していた。このことは、Aβ が成熟マウスの大脳皮質でも Olig2 の発現を抑制していることを示した。

##### (4) Olig2 発現を抑制した神経幹細胞での Mash1 の発現誘導は、神経幹細胞の分化と死を加速させる。

###### ① 神経幹細胞への遺伝子導入・遺伝子阻害による神経分化への影響

神経幹細胞への Mash1 の過剰発現: 培養神経幹細胞に hrGFP または、Mash1-hrGFP を遺伝子導入し、βIII-tubulin 抗体を用いた免疫組織化学によって、遺伝子導入された細胞のニューロンへの分化を調べた。hrGFP を導入された細胞では、5%以下の細胞しかニューロンへ分化しなかったが、Mash1-hrGFP を導入された細胞では、約 55%の細胞がニューロンへ分化した。

神経幹細胞への Olig2 siRNA の導入: 培養神経幹細胞に Olig2 siRNA を単独で導入したところ、Mash1-hrGFP を導入した場合よりも程度は小さいものの、ニューロンへの分化が誘導された。

神経幹細胞への Mash1 と Olig2 siRNA の共導入: 培養神経幹細胞に Mash1-hrGFP と Olig2 siRNA を共に導入したが、相加的なニューロンへの分化促進は認められず、むしろ、分化抑制が見られた。これらのことは、神経分化には Mash1 と Olig2、両方の発現が必要であることを示した。

###### ② 神経幹細胞への遺伝子導入・遺伝子阻害による細胞死への影響

神経幹細胞への Mash1 の過剰発現: 培養神経幹細胞に hrGFP または、Mash1-hrGFP を遺伝子導入し、DNA の濃縮・断片化を指標に、遺伝子導入された細胞での apoptosis を調べた。hrGFP を導入された細胞では、約 7%の細胞が apoptosis を起こしており、Mash1-hrGFP を導入された細胞では、約 12%の細胞が apoptosis を起こしていた。

神経幹細胞への Olig2 siRNA の導入: 培養神経幹細胞に Olig2 siRNA を単独で導入したところ、apoptosis を起こした細胞が約 3 倍

増加した。

神経幹細胞への Mash1 と Olig2 siRNA の共導入：培養神経幹細胞に Mash1-hrGFP と Olig2 siRNA を共に導入したところ、さらに apoptosis が誘導され、Mash1-hrGFP 単独での導入に比べ、約 3 倍の細胞に apoptosis が見られた。これらのことから、Olig2 発現細胞での Mash1 の過剰発現は、神経幹細胞からニューロンへの分化を誘導するが、Olig2 発現を抑制した細胞での Mash1 の過剰発現は、神経幹細胞の死を誘導すると言える。

(5) Growth factors (EGF/FGF2) は Mash1 の過剰発現による神経幹細胞の死を抑制する。

EGF と FGF2 (EGF/FGF2) は神経幹細胞の増殖・生存に必須であることが知られている。そこで、EGF/FGF2 の除去によって発現変化する転写因子を調べたところ、一過性に、Mash1、Hes5、Pax6 の発現が増加し、Olig2 の発現が減少していた。次に、EGF/FGF2 が (Olig2 発現の誘導を介して) Mash1 過剰発現細胞の生存を維持するかどうかを調べた。その結果、EGF/FGF2 存在下では、神経幹細胞に Mash1 を過剰発現させても、apoptosis は抑えられることが明らかとなった。

以上の研究成果は、これまで明らかとなっていなかった、病的状況下での転写因子、Mash1 と Olig2 の役割を明らかにした。また、これまで、なぜ、アルツハイマー病では神経再生マーカーが再発現しているにもかかわらず、ニューロンの新生・補充が起こらないのか不明であったが、本研究はその分子メカニズムの一部を明らかにした。

## 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 3 件)

- Uchida Y, Nakano S, Gomi F and Hakahashi H: Differential regulation of bHLH factors, Mash1 and Olig2, by  $\beta$ -amyloid accelerates both differentiation and the death of cultured neural stem cells. *J Biol Chem*, 282, 19700-19709, 2007
- Uchida Y and Takahashi H: Rapid detection of A $\beta$  deposits in APP transgenic mice by Hoechst 33342. *Neurosci Lett*, 448, 279-281, 2008
- Uchida Y: Molecular mechanisms of

regeneration in Alzheimer's disease brain. *Geriatrics Gerontology International*, in press.

[学会発表] (計 2 件)

- 内田洋子、中野俊一郎、五味不二也. アルツハイマー病モデルマウスにおける bHLH 因子の発現変化とその意味. 日本基礎老化学会、2007.6.21 札幌市
- 内田洋子、五味不二也. AD マウスモデル脳における Olig2 遺伝子の発現変化とその意味. *Neuro* 2007、2007.9.10 横浜市

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 洋子

財団法人東京都高齢者研究福祉振興財団・東京都老人総合研究所・主任研究員  
60133633

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

五味 不二也

財団法人東京都高齢者研究福祉振興財団・東京都老人総合研究所・研究員  
40205620