

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650200

研究課題名(和文)非分裂細胞の試験管内老化系の確立

研究課題名(英文)Establishment of an in vitro aging system of non-dividing cells

研究代表者

森 望(MORI, Nozomu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：00130394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラット脳の海馬からの初代培養神経細胞をシャーレ上にて長期培養し、インビトロでのニューロンの老化様態を観察した。また、神経老化の制御因子、細胞寿命の規定因子を把握することを目的として研究を進めた。これまでに確立した培養条件で、恒常的に5-6ヶ月の長期培養には成功している。以前の予備的研究の中では1年を越えての生存も十分にあったので、また不確定な「条件」があると想定された。その問題点はあるにせよ、培養1ヶ月齢(ほぼ4週齢)のニューロンと培養4-5ヶ月のニューロンとでは老若の比較研究ができるようになった。インビトロで神経老化の研究するための基本的なシステムがほぼできあがったといえる。

研究成果の概要(英文)：In a carefully maintained conventional serum-free culture medium, primary cultured rat hippocampal neurons could survive over 5-6 months (M), and significant portion of those neurons could remain nearly one year in the regular culture dishes. In this long term in vitro culture system, neurons initially proliferate, mature, then start to show evidence of senescence after a period of synaptic and/or neuronal elimination, and subsequently leading to the stage of neuronal loss or death, which could be arbitrarily divided into five consecutive phases; the growing phase I (~1M), the maturation phase II (1~2M), the early aging phase III (3~6M), the late aging (or middle senescence) phase IV (7~9M), and the late senescence phase V (10M and over). Even in the senescent phases, some neuronal dendrites retained spines containing postsynaptic components. We propose that this system could be a useful model for the study of non-replicative post-mitotic neuronal cell senescence.

研究分野：分子神経老年学

キーワード：老化 神経細胞 細胞培養 ニューロン 寿命遺伝子 神経変性 蛋白質凝集 寿命

## 1. 研究開始当初の背景

老化研究には「個体老化」の研究といわれる「細胞老化」の研究がある。後者は、主としてインビトロでの培養細胞の寿命（分裂限界、いわゆる Hayflick limit）があることを前提に、細胞増殖期（若齢期）の第 II 相から非分裂期（老化期）の第 III 相に至る機構を明らかにした。中でも重要なのは、細胞老化のクロックとしてのテロメア短縮の現象だった。ヒトの正常二倍体細胞の場合、およそ 50-60 回の分裂（population doubling, PDL）で老化期（senescence）に入る。そして、第 2 相から第 3 相への移行には Cdk などの細胞周期の制御因子の恒久的な変化がその背景にあることが明らかになった。

一方で、「個体老化」に関しては、線虫やショウジョウバエ、さらにマウスの遺伝子変異体を用いた研究から、IGF1-PI3K-AKT-FOXO1 という流れ、いわゆるインスリン様成長因子に起因する細胞内シグナル伝達の流れを抑制することが長寿につながる。これが進化的に保存された寿命制御シグナルであることがわかってきた。このような寿命制御シグナルが、動物個体のどの組織細胞で機能することが重要かということ、少なくとも線虫では栄養知覚性の神経細胞であり、マウス、ラットでは食欲、性欲、体温制御の中核となる脳の視床下部であるらしい。

個体寿命の制御を担うのは、ニューロンである。では、ニューロンはどう老化するのかということ、意外にも明快な答えがない。ニューロンの老化、脳の老化といういわゆるアルツハイマー病などの神経変性疾患の研究は盛んだが、ニューロンの老化の生理的なメカニズムに関しては驚くほど情報が少ない。

成体組織におけるニューロンは原則として（一部の神経幹細胞を除いて）非分裂である。したがって、テロメア短縮はないし、いわゆる試験管内老化（インビトロエイジング）の研究もほとんどなされていない。末梢神経組織を老若動物で比較した研究は多少あるが、老化のメカニズムを明らかにするところまでは至っていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

インビトロ（試験管内）（実際にはシャーレの中）でのニューロンの生存限界（寿命）を知り、それへ至るプロセスと、それを主導する要因を探ることを目的とする。

培養技術の適否にも注意しつつ慎重に研究を進め、非分裂細胞のインビトロエイジングのパラダイム（ここではニューロンの長期培養モデル）を確立し、そこから得られる非分裂細胞老化の様相（おそらくは複数のステージ）とそれを区切る要素を明らかにする。分裂細胞の老化で明らかにされたテロメアの短縮というクロックなしに非分裂性のニューロンは如何に老化してゆくのか？ニューロンの年齢はその細胞のどこに、どのような分子に、どのような形で記録されるのか？ニューロンの試験管内老化の研究手法を確立し、神経老化の分子マーカーを明らかにし、神経老化の主導分子を探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

ラット脳海馬からの初代培養神経細胞を通常の条件で 2 週間（突起伸長期）から 4 週間（シナプス形成期）培養後もそのまま維持し、5-6 ヶ月以降まで形態観察を続ける。培養開始初期の細胞密度、培地組成、培地の交換ないし添加頻度などを比較検討し、海馬神経の長期培養に適した条件を確立することを試みた。次いで、脳その他領域（大脳皮質、視床下部、および中脳黒質）からも同様に長期培養の可否を検討し、想定される若干の至適条件の違いをできる範囲で明らかにしようとした。老化や寿命関連の遺伝子改変動物の神経の長期生存への変化、また、マウスの脳海馬神経の長期培養についても同様に検討を進めた。培養 1 ヶ月程度でのシナプス形成のあと、神経回路形成、神経細胞の代謝変動（解糖系の稼働率や ATP 産生能など）、細胞内小器官（ミトコンドリア、小胞体、リソソーム、オートファゴソーム、老化マーカーとしてのリポフスチン沈着）、シナプス周辺分子の発現変動、神経細胞骨格（微小管とアクチン）の化学的変化を分子生物学的手法および細胞生物学的手法で解析した。

## 4. 研究成果

(1) インビトロにおける初代培養神経細胞の最長寿命と老化プロセス

ラット胎仔脳海馬から Banker 法により神経細胞を 24 穴プレート中の poly-D-Lysine コートしたガラスプレート上に分散培養した。初期のプレーティング時の細胞密度をいろいろトライした結果、長期培養に適した初時濃度はおよそ 3 万細胞/穴、これは 17,000 細胞/cm<sup>2</sup>に相当した（図 1）。

隔週で培養を開始し、各バッチについて数週間、数ヶ月ごとに形態、生存率、シナプス関連分子の遺伝子発現等について観察

を続けた。特に、2ヶ月齢以降の生存細胞に注目し、MAP2 染色等によりニューロンの生存をフォローした。生存性は色素排除能でチェックした。シナプス形成と神経ネットワークの完成期である1ヶ月齢での生存レベルを100%対照とし、10%生存、5%生存、1%生存の時期を特定し、海馬神経の最長寿命を推定していった。5-6ヶ月齢での神経骨格の変化について注意深く検討した。ラット海馬からの系の確立を基本的にめざしたが、同時に中脳黒質のニューロンについても並行して観察していった。全般的には、海馬ニューロンの生存がよく黒質ニューロンの生存率は低かった。(これは培養液などの条件が海馬ニューロンに至適となっているためかもしれない。)

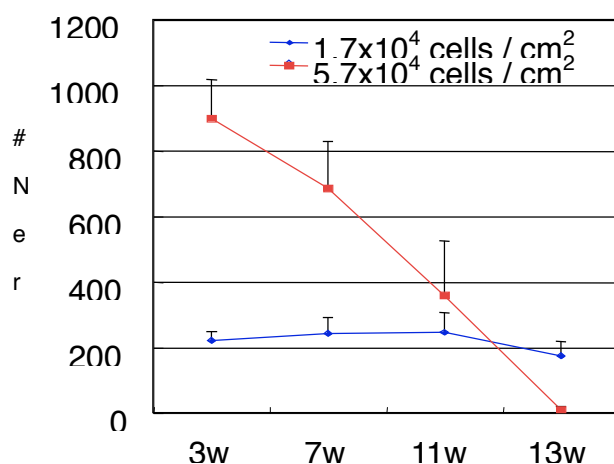
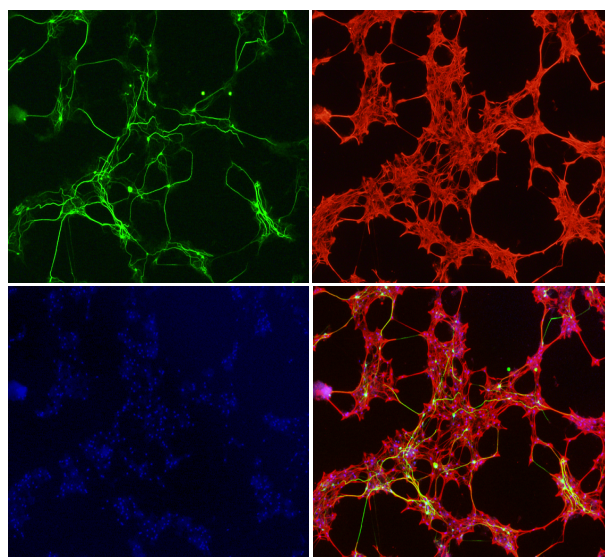


図1：細胞培養密度と神経細胞の長期生存率

胎児脳の海馬から抽出した細胞を24穴のプレートに巻き込む時の細胞密度を高密度培養(赤)と低密度培養(青)とで比較した。縦軸は相対的なニューロンの生存率。これはMAP2陽性細胞の数で判定した。横軸は培養週齢。

## (2) 神経細胞の長期培養への外因と内因効果

細胞の生死が培養環境の影響を多分に受けるのは当然であり、培地の組成や交換の条件などが大きく結果を左右する。中でも最も重要なのは共存しているグリア細胞の寄与である。特に、培養ニューロンを長期間維持するには、シャーレの中でグリアのシートが十分に形成される必要があった。培養4-5ヶ月での老齢ニューロンは、必ずアストログリアのシートの上にはしか生存しないことがわかった(図2)。



500

図2：長期培養ニューロンの形態

これはほぼ1年間のニューロンの例。(左上) MAP2陽性ニューロン。(右上) GFAP染色によるアストロサイト。(左下) DAPI染色による細胞核。(右下) 共染色。グリアのシートの上に長期培養ニューロンが生存していることがわかる。

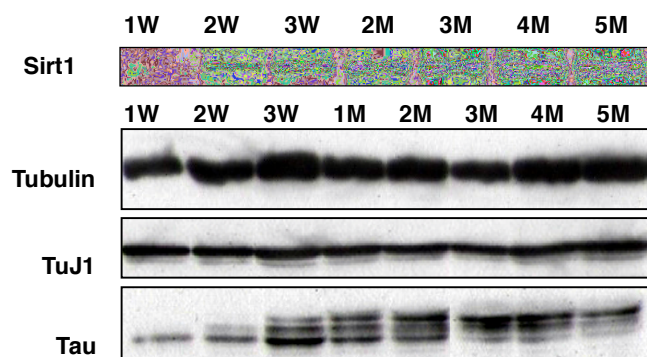
## (3) 長期培養神経細胞内における加齢依存性細胞機構

ニューロンの老化を主導する内因を見いだすことは非常に重要だが、ニューロンの生理的老化の主要な変動要素として細胞骨格、特に微小管とアクチン線維を念頭におき、その質的変動を解析した。その結果、この試験管内老化の過程で軸索微小管の結合因子であるタウのリン酸化が培養後期に亢進していることがあきらかとなった(図3)。微小管の安定性に関する(チューブリンの)アセチル化と末端のチロシン化の程度を各月齢の細胞で比較することを試みたが、有意な変動は観察されなかった。

## (4) 非分裂細胞における細胞老化の刻印(老化マーカー)に関する検討

分裂性細胞の細胞老化の刻印はテロメアの短縮ということがよく知られている。つまり、細胞のテロメア長をみれば、分裂細胞の年齢がわかる。非分裂性のニューロンでそれに代わる「何か」の刻印(老化マーカー)を探することを試みた。分裂細胞の老化でもよく知られているリポフスチンの沈着やβガラクトシダーゼは培養期間とともに増加した。また、寿命遺伝子として知られるSIRT1のレベルも培養期間とともに増加した。また、上述のようにタウのリン酸化も加齢とともに増加した(図3)。一

方、ファロイジンで組織学的に染めるとアクチンのレベルは細胞の年齢とともに減少した。高倍率でニューロンの樹状突起を観察すると、スパインが加齢とともに明らかに減少していくことがわかった。



**図3：長期培養ニューロンにおける遺伝子発現変動**

ウェスタンブロットによる蛋白質レベルを検出している。上段は、寿命遺伝子の SIRT1、下には軸索のマーカーであるタウ。長期培養ニューロンではタウのリン酸化が充進していることがわかる。これはアルツハイマー病などの神経変性疾患の場合に観察される減少とよく似ている。サンプルは左から1～3週、1～5ヶ月齢。

以上の結果を元に論文投稿を何度かトライしたが、インビボでの神経の老年性変化との対応を求められ、そのデータを補充する方向で実験を継続している。また、今後はマウスのニューロンの長期培養も試み、ラットと同様の変化がとらえられるか比較検討することも次の課題である。

##### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

1. 三井洋司, 森望, 磯部健一: 老化の細胞モデル: その挑戦と限界を探る、**基礎老化研究** 39(1), 41-46 (2015) (査読有)

2. Yamazaki H1, Kojima N, Kato K, Hirose E, Iwasaki T, Mizui T, Takahashi H, Hanamura K, Roppongi RT, Koibuchi N, Sekino Y, Mori N, Shirao T., Spikar, a novel drebrin-binding protein, regulates the formation and stabilization of dendritic spines. *J Neurochem.* 2014 Feb; 128(4): 507-522. doi: 10.1111/jnc.12486 (査読有)

3. Wang T, Kusudo T, Takeuchi T, Yamashita Y, Kontani Y, Okamatsu Y, Saito M, Mori N, Yamashita H Evodiamine inhibits insulin-stimulated mTOR-S6K

activation and IRS1 serine phosphorylation in adipocytes and improves glucose tolerance in obese/diabetic mice. *PLoS One.* 2013 Dec 31;8(12):e83264. doi: 10.1371/journal.pone.0083264. eCollection 2013. (査読有)

4. Yasuda K, Ohyama K, Onga K, Kakizuka A, Mori N, Mdm20 stimulates polyQ aggregation via inhibiting autophagy through Akt-Ser473 phosphorylation. *PLoS One.* 2013 Dec 16;8(12): e82523. doi: 10.1371/journal.pone.0082523. eCollection 2013. (査読有)

[学会発表] (計4件)

1. Mori N, Loss of neuroplasticity and oxidative stress response in brain aging, The 4<sup>th</sup> International Symposium of Asian Society for Aging Research, Beijing, China, Nov 7-9, (2014)

2. Matsumoto G, Nukina N, Mori N, p62-mediated selective clearance of damaged mitochondria in senesced neurons, The 5<sup>th</sup> Nagasaki-Pusan Joint Seminar on Aging Research, Nagasaki Univ School of Medicine, Nagasaki, Feb 6 (2015)

3. Ohyama K, Yasuda K, Onga K, Mori N, Aging-dependent TGF-beta 1 signaling in the neuroprotection against oxidative stress, IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, Seoul, Korea, June 23-27 (2013)

4. Okamoto A, Taguchi H, Onga K, Ohyama K, Mori N, An in vitro aging model of Long-term cultured neurons, Cold Spring Harbor-Asia, Suzhou, China, Sept 9-13 (2013)

[図書] (計1件)

“Aging Mechanisms: Longevity, Metabolism, and Brain Aging” Mori N, Mook-Jung I. eds., Springer (Tokyo) (2015) in press

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/anatomy1/>

##### 6. 研究組織

(1)研究代表者

森 望 (MORI, Nozomu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・教授

研究者番号: 00130394