

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06587

研究課題名(和文)アルツハイマー病発症機序の解明を目指す神経細胞特異的解析手法の開発

研究課題名(英文)Development of neuron-specific analytical method to elucidate the mechanism underlying AD pathogenesis

研究代表者

渡部 博貴(Watanabe, Hirotaka)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任講師

研究者番号：30422413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病発症初期に病理像が出現する成体マウス脳の嗅内野と海馬における神経細胞を単離する手技を検討する。マウス脳組織スライス片から、実体顕微鏡下で嗅内野第2/3層付近を微小切除し、神経細胞を含む組織片の酵素処理を行った。神経突起を含む分散した神経細胞をマイクロピペットで拾い、単一神経細胞cDNAライブラリーの調製を行った。これらのcDNAライブラリーを用いてRT-PCRを行ったところ、嗅内野の第2/3層特異的なマーカー遺伝子の発現を確認した。

研究成果の概要(英文)：In this research proposal, I aimed to isolate single neuron from entorhinal cortex layer 2/3 of adult mouse, which is most likely vulnerable neuronal population in Alzheimer's disease patients. First, I dissected out entorhinal cortex layer 2/3 from mouse brain slice under stereoscopic microscope, followed by trypsin treatment. Next, I picked single neurons with micropipette, and cDNAs from each single neuron were synthesized for RT-PCR analysis. Several marker genes specific for entorhinal cortex layer 2/3 can be successfully detected by semiquantitative RT-PCR.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 シングルセル 神経変性疾患 モデルマウス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢化社会の日本で約 200 万人以上が罹患しているとされるアルツハイマー病 (Alzheimer's Disease; AD) は、特徴的な神経病理像として、老人斑 (Senile plaque)、神経原線維変化 (Neurofibrillar tangle)、神経細胞死が認められる初老期発症の神経変性疾患である。その病変は脳の限られた領域を始点として、病気の進行とともに他の脳領域へと広がっていく (Braak and Braak 1991 *Acta Neuropathol.*)。1990 年代に家族性 AD で 3 つの原因遺伝子 (*APP*, *PSEN1*, and *PSEN2*) が同定されて以降、AD に係る分子レベルでの研究は飛躍的に発展した。家族性 AD で同定されている変異の約 90% が第 14 番染色体及び第 1 番染色体にコードされている *presenilin1* (*PSEN1*) と *presenilin2* (*PSEN2*) 遺伝子上のミスセンス変異であり、これまでに 200 以上の変異が報告されている (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutation> *sl*)。近年の研究により、AD 病変が進展する分子機序についても次第に分かりつつあるが (de Calignon *et al.* 2012 *Neuron*, Liu *et al.* 2012 *PLoS One*)、病態初期に神経細胞内でのみ起こっている詳細な分子レベルの変化についての記述は非常に少ない。

(2) これまでの AD 研究で使用されているモデルマウスは、家族性 AD/前頭側頭型認知症 (FTD) で同定された変異原因遺伝子産物を過剰発現する *APP* トランスジェニックマウス、*Presenilin* (*PS*) トランスジェニックマウス、*Tau* トランスジェニックマウス、あるいはそれら掛け合わせによる複合モデルである。これらのモデルでは、AD 神経病理のうち、老人斑と神経原線維変化しか再現されておらず、神経細胞死についての報告は非常に稀である。申請者は *PS* の生理学的及び病態生理学的機能を解明するため、複数の *PS* 遺伝子改変マウスを使用して、多角的な視点で *PS* の機能を検討してきた。まず家族性 FTD の患者から同定された *PSEN1* *c.548G>T* 変異を持つ Knock-in (KI) マウスを作製し、*PS1* 発現とその生理的機能が低下して、記憶障害が引き起こされる事を示した (Watanabe *et al.* 2012 *J Neurosci.*)。さらに FAD で同定されている *PS1* *p.435L>F* と *PS1* *p.410C>Y* 変異を持つ KI マウスの解析より、これらの変異が機能喪失変異 (Loss of function) であることを示した (Xia *et al.* 2015 *Neuron*)。また遺伝的に *PS* 機能を減少させた *PS* conditional double knockout (*PS* cDKO) マウスで進行性の神経細胞死が起こることを示している (Saura *et al.* 2004 *Neuron*, Wines-Samuelson *et al.* 2010 *PLoS One*, Watanabe *et al.* 2014 *J Neurosci.*)。これらの *PS* 遺伝子改変マウスを用いた研究から、*PS* が神経細胞の生存、シナプス機能、記憶・学習に重要であり、家

族性 AD/FTD で同定されているミスセンス変異が *PS* の生理的機能を損ねているという事が分かった。以上の知見より、AD モデルマウスとしての KI マウスや cKO マウスの優位性が証明され、これらの遺伝子改変マウスを使用することにより、従来のモデルでは得られない詳細な AD の病態発症・進展機序を解明できる可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究では、AD の病態初期に、特定の神経細胞、及び特定の神経回路で起こっている神経細胞内分子変化を同定する手法を開発する。さらに、AD モデルとしての KI マウスや cKO マウスを用いて、その神経細胞内分子変化がどのように AD 発症・進展を引き起こすのかも検証する。

脳組織は何千種類の異なる細胞から構成される不均一な器官であり、かつ神経細胞同士が複雑に絡み合った神経回路網を形成している (Bota *et al.* 2003 *Nat Neurosci*, Lein *et al.* 2007 *Nature*)。したがって、病態発症に係る遺伝子発現変化を見出すためには、病気の影響を受けうる均一な細胞集団を検討しなければ、影響を受けない細胞群や逆の影響を受けうる細胞群による「希釈効果」により、重要な変化を検出できない可能性がある。実際に *PS* cDKO マウス脳のマイクロアレイ解析では、神経細胞死に起因すると考えられる二次的な活性化グリア細胞での炎症性遺伝子の発現亢進が優勢に検出されている (Beglopoulos *et al.* 2004 *J Biol Chem.*)。さらに、*MeCP2* KO マウスを使用した細胞特異的な遺伝子発現プロファイル実験において、各細胞ごとに特異的な遺伝子発現変動が起こっていることが報告されている (Sugino *et al.* 2014 *J Neurosci.*)。

申請者は、*PS* 遺伝子改変マウスを解析する過程で、マウス脳組織での細胞特異的、及び神経回路特異的な解析の重要性に気付き、細胞特異的トランスクリプトーム解析の検討を行ってきた。予備実験として、Laser capture Microdissection (LCM) 法を用いてマウス海馬 CA1 の錐体神経細胞のみを回収し、qRT-PCR を試行した。海馬全体での発現との比較において、神経細胞特異的遺伝子 (*PS1*, *CaMKII $\alpha$* ) の検出レベルをより増大

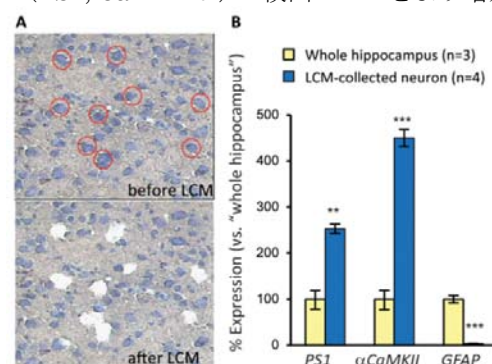


図 1

し、逆にアストロサイト特異的な遺伝子 (*GFAP*) の検出をほぼ完全に排除できる事を確認している (図 1)。本研究では、病態初期に神経細胞内で起こっている AD 発症・進行に係る分子変化を網羅的に解析する手法を確立し、今後の AD 分子標的を基にした創薬・治療に繋げうる可能性を探索する。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス脳組織からの神経細胞の単離

AD 病態初期で特徴的な病理変化がみられる内側嗅領 (entorhinal cortex) 及び海馬 (hippocampus) の神経細胞、及びそれらの領域から投射される領域の神経細胞に絞り、マウス成体脳から神経細胞をマニュアルで分散単離する (Hempel *et al.* 2007 *Nat Protoc.*)。申請者は、留学先のハーバード大学で海馬 CA1 領域の錐体神経細胞の単離法については確立していた (図 2)。

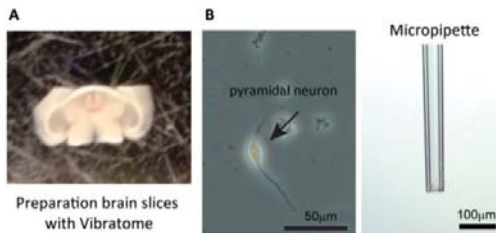


図 2

麻酔下で安楽死させたマウスから新鮮脳を取り出し、ACSF 中で Vibratome もしくは Tissue Chopper で脳切片を調製する。プロテアーゼ (Sigma, P5147) 処理後に、ピペットで単一細胞レベルに解離させ、顕微鏡下で目的の神経細胞を口径 30-50 $\mu\text{m}$  のマイクロピペットで回収する。神経細胞は神経突起の有無でグリア細胞や繊維芽細胞と区別するが、領域特異的な神経細胞の単離には、蛍光トレーサーもしくは蛍光蛋白質を目的神経細胞で発現させたトランスジェニックマウスなどを使用し、蛍光顕微鏡下にて該当神経細胞を回収する。特定の神経回路へ投射する内嗅皮質神経細胞を蛍光ラベルするためには、Fluoro-Gold 等の逆行性トレーサーを目的領域へインジェクトすることで投射神経細胞をラベルする。

#### (2) トランスクリプトーム解析手法の確立

上記(1)で回収した均一な神経細胞から遺伝子発現解析を行う。単一神経細胞における遺伝子発現プロファイリングには、細胞を凍結融解後、SMARTScribe™ Reverse Transcriptase (Clontech) を用いて、直接 cDNA 合成をする。さらに MightyAmp® DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて、PCR 増幅を行うことで、全長 mRNA 由来 cDNA ライブラリーを調製する。このように調製した cDNA ライブラリーを鋳型とし、目的の遺伝子の RT-PCR を行う。

#### (3) 使用マウスの飼育・繁殖

従来のトランスジェニックマウス (Tg2576 や 3xTg-AD の系統) でしばしば問題とされていた、ヒト変異型遺伝子の過剰発現による人為的な負の影響 (外来 APP 遺伝子の過剰発現やゲノムへの挿入部位効果等) を完全に排除する目的で、モデルマウスは内在プロモーターを使用した KI マウス、或いは PS cDKO マウスを使用する。PS cDKO マウスは成体期特異的・前脳神経細胞特異的 Cre トランスジェニックマウスを用いた、約 4 ヶ月齢から顕著な神経変性を起こす AD モデルマウスである (Saura *et al.* 2004 *Neuron*)。留学先の研究室が保有しているため、先方の研究室と Material Transfer Agreement (MTA) を締結し、各種実験計画書を慶應大学内で承認を受けた後に輸送手続きを取る。

#### (4) AD の初期病変領域神経細胞のトランスクリプトーム解析

上記 AD モデルマウス、或いはモデルマウスと掛け合わせた蛍光蛋白質発現マウスを使用して、目的の神経細胞を単離する。AD 患者で変性が顕著な海馬 CA1 領域の錐体神経細胞を最初を選択する。その後、内嗅皮質や大脳基底核のコリン作動性神経細胞へも解析対象を広げていく。該当神経細胞から cDNA ライブラリーを作製し、対照群と比較して AD モデルで有意に変化のみられる遺伝子発現を見付けだす。網羅的解析には次世代シーケンサーを使用し、遺伝子発現レベルの変化のみならず、選択的スプライシングの有無なども検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス内嗅皮質神経細胞の単離

本研究では、AD の Braak ステージ初期で病変のみられる内嗅皮質神経細胞 (Braak and Braak 1991 *Acta Neuropathol.*) の単離を試みた。約 4 週齢の野生型マウス (ICR 系マウス、或いは C57BL/6 マウス) を麻酔下で安楽死させ、新鮮脳を取り出した。新鮮脳を氷冷 PBS 中で冷やした後、Tissue Chopper で約 500 $\mu\text{m}$  の水平方向での急性スライス切片を調製した。実体顕微鏡下でスライス切片から内嗅皮質第 2/3 層 (図 3 の赤線で囲った

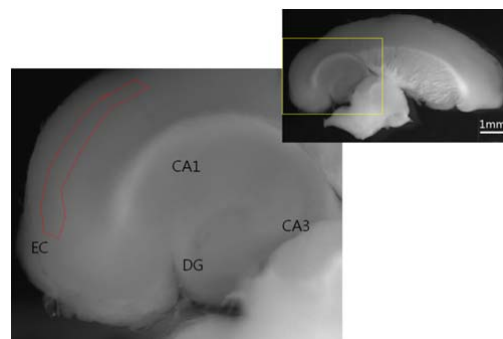


図 3

領域) をカッターで切り出し、プロナーゼで酵素処理する事により、単一細胞に分解させた(図4: 1<sup>st</sup> Plate)。単一細胞にしたプールからマイクロピペットを用いて 14 個の神経細胞を拾い(図4)、直接 cDNA を合成し、単一神経細胞 cDNA ライブラリーを調製した。



図 4

### (2) マウス内嗅皮質第 2/3 層神経細胞のプロファイル解析

内嗅皮質第 2/3 層には投射先や遺伝子発現レベルで異なる性質の神経細胞が存在している事が明らかになっている (Suh *et al.* 2011 *Science*, Kitamura *et al.* 2014 *Science*)。まず、14 個の単一神経細胞の cDNA から、内嗅皮質のマーカーとなる遺伝子の発現などを RT-PCR で検討した。使用した遺伝子は、*CamKIIa* (興奮性錐体神経)、*PSD95* (興奮性神経)、*Calbindin* (内嗅皮質第 2 層錐体神経)、*Reelin* (内嗅皮質第 2 層星状神経)、*Il1rapl2* (内嗅皮質第 2 層星状神経)、*Oxr1* (内嗅皮質第 3 層神経)、*MBP* (オリゴデンドロサイト)、*GFAP* (アストロサイト)、*GAD65* (抑制性神経)、*β-actin* を用いた。RT-PCR によるプロファイルから、#1/#14 は内嗅皮質第 2 層星状神経、#3/#5 は内嗅皮質第 2 層錐体神経、#4/#7/#11 は内嗅皮質第 3 層神経と判明し、予想通り内嗅皮質第 2/3 層は複数の神経細胞種が混在していることが明らかとなった。この解析で、#8/#9/#10/#12 は *β-actin* のシグナルが検出できなかった事から、これらの cDNA ライブラリーはうまく合成されなかったものと思われる。

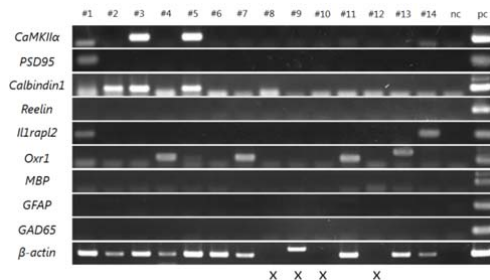


図 5

### (3) マウス内嗅皮質神経細胞のラベリング

内嗅皮質第 2/3 層が複数の神経細胞から成っていることから、特定の細胞集団を蛍光ラベルして単離することを試みた。その目的

のために、名古屋市立大学・医学部・澤本和延先生の研究室にてステレオタキシス実験の見学を行い、必要な試薬や器具の準備を行った。実際にマウスにインジェクションを行うことはできなかったが、申請者が属する研究室にて実験が出来る環境を整える事ができた。

### (4) 問題点と今後の展望

本研究では、単一神経細胞の RT-PCR がうまくワークしていないサンプルがみられた。申請者の前の環境(留学先であるハーバード大学)では、ほぼ 100%で *β-actin* のシグナルは検出できていたことより、プロトコールの変更が一因と考えられる。これは単一神経細胞単離の際に用いる ACSF (Artificial cerebrospinal fluid) の調製が難しかったため、市販のメディアウムを代用した事にあつたと考えられる。さらに、*Reelin* などの発現量が低く、かつ mRNA 長が非常に長い遺伝子のシグナルには成功していないため、留学先のプロトコールを再度導入する事が最善の策である。

また、本研究でモデル動物を用いての解析が出来なかったが、*PS cDKO* マウスはハーバード大学との MTA が締結しており、いつでもこのマウスを飼養し実験に使用する状況にある。単一神経細胞レベルでの網羅的トランスクリプトームは新たな創薬標的を見出す事が出来る可能性を秘めている事から、今後も本研究で培ったノウハウを生かして自身の研究を進めていきたい。

### 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 1 件)

- (1) Toda S, Iguchi Y, Ziqiao L, Nishikawa H, Nagasawa T, Watanabe H, and Minabe Y. (2016) Reconsidering animal models of major depressive disorder in the elderly. *Front Aging Neurosci.* 8: 188. 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

渡部 博貴 (WATANABE, Hirotaka)  
慶應義塾大学・医学部・特任講師  
研究者番号：30422413

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

Jie Shen (Shen, Jie)  
ハーバード大学・医学部・教授