

平成30年6月28日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350984

研究課題名(和文) アルツハイマー病モデルマウス初期病変における不飽和脂肪酸合成酵素SCDの役割

研究課題名(英文) Roles of SCD, an enzyme for unsaturated fatty acid synthesis, in the early lesion of Alzheimer's model mice.

研究代表者

宋 時栄 (Song, Si-Young)

徳島文理大学・大学共同利用機関等の部局等・教授

研究者番号：00399693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：免疫組織化学、in situ hybridization、real-time PCRによる解析から、神経細胞ではSCD1よりもSCD2優位の発現が認められた。生後発達過程で、SCD免疫活性は細い樹状突起へ微細顆粒状の分布するようになるが、生後6ヶ月の3 x Tg AD マウスでは野生型より免疫活性が増大し、樹状突起で粗大顆粒状、分節状の分布を示す。この時期には比較的大型のビーズ状に腫張した棘突起が樹状突起に沿って認められ、synaptobrevin の免疫活性の減少を伴っていた。これらの所見は、海馬の樹状突起にアルツハイマー病の初期病変が発生し、その過程にSCDが関与している可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Analyses by immunohistochemistry, in situ hybridization and real-time PCR revealed SCD2 dominant, rather than SCD1, expression was detected in neurons of mice. SCD-immunoreactivity (IR) tends to distribute in thin dendritic processes showing fine granular patterns during postnatal development, but increased SCD-IR was detected in 3 x Tg AD mice as compared with wild type mice at postnatal six months, showing coarse granular and segmental distribution in dendrites. Relatively large spines, swollen like a bead, were observed along dendrite and synaptobrevin-IR was decreased. These findings suggest the possibility that early lesions of AD appear in dendrite of the hippocampus and SCD is involved in the processes

研究分野：実験神経病理学

キーワード：SCD アルツハイマー病 病態モデルマウス 樹状突起 シナプス 免疫組織化学 laser microdissection

1. 研究開始当初の背景

SCD はステアリン酸、パルミチン酸などの飽和脂肪酸からオレイン酸、パルミトレイン酸など一価不飽和脂肪酸の合成に関わる酵素であり、ヒトでは2つのアイソフォーム (SCD1 と SCD5)、マウスでは4つのアイソフォーム (SCD-1~SCD-4) が同定されている。

SCD-1 は成体での脂質合成やエネルギー代謝に関与しており、SCD-2 は皮膚や肝臓の初期発生に必要な脂質合成に関与していると考えられている (Proc NAS 102:12501-12506, 2005)。しかし脳ではこうした役割分担は不明で、オリゴデンドログリアで SCD-2 が発現しており (Neurochem Res 19: 1091-1099, 1994)、髄鞘形成に関与していることを示唆するデータが得られている (J Neurochem 70: 1719-1726, 1998) 以外には、どの細胞種でどのアイソフォームが発現しているのかの情報も十分ではなかった。

アルツハイマー病 (AD) 患者海馬では SCD 発現が減少している (アイソフォーム不明) という報告 (Hum Mol Genet 12:3259-3267, 2003) と、SCD-1、SCD-5a、SCD-5b の発現が増大しているという報告 (PLoS ONE 6, e24777, 2011) があるが、いずれの報告でも海馬のどの部位での変化かは不明である。

2. 研究の目的

3 x Tg-AD モデルマウスを中心に、脱髄・髄鞘再生、脳虚血モデル動物などの多様な疾患モデル動物を用いて、以下の観点から神経疾患の病理発生における SCD の機能的意義を探る。

- (1) 神経系のどの細胞で SCD のどのアイソフォームが変化しているのかを同定する。
- (2) 3 x Tg-AD モデルマウスの初期病変としてどのような変化が認められ、その成立過程では SCD がどのような意義を持っているかを検討する。

3. 研究の方法

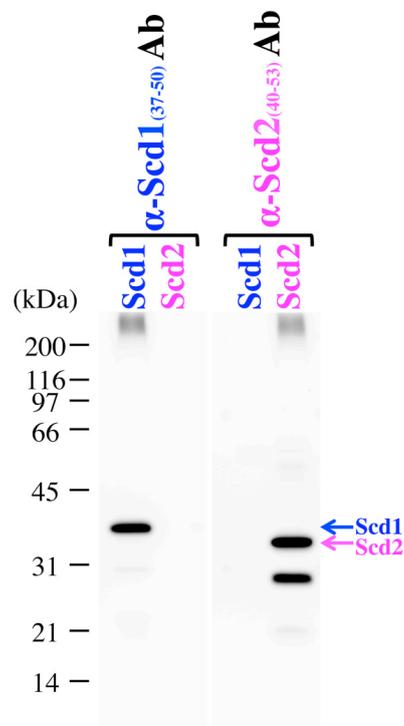
- (1) SCD1、SCD2 特異的抗体を作成し、免疫組織化学的検索によって脳での発現細胞を同定するとともに、野生型マウス、3 x Tg-AD モデルマウスの生後発達過程での発現を比較検討する。シナプス関連分子や神経系で発現している分子に対する特異的抗体を用いて、野生型マウス、3 x Tg-AD モデルマウスでの発現を比較検討する。合わせて、シナプス関連蛋白に対する特異的抗体を用いて、その発現を免疫組織科学的に検索する。
- (2) SCD1、SCD2 特異的 RNA probe による *in situ* hybridization (ISH) によって、脳での SCD1、SCD2 発現細胞を同定する。
- (3) Laser capture microdissection (LCM) を用いて特定領域、特定細胞を採取し、それらの検体から抽出した RNA を用いて real-time PCR による遺伝子発現解析を行う。

- (4) 野生型マウス、3 x Tg-AD マウスの海馬スライスにパッチ電極から biocytin を注入した後に固定し、Alexa-Fluor488 標識 streptavidin と反応させて可視化し、シナプスの形状を観察する。

4. 研究成果

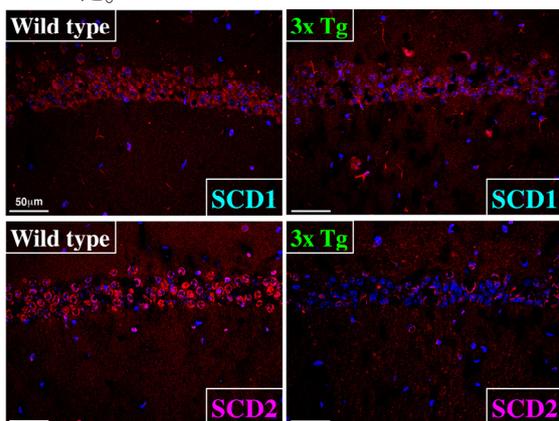
- (1) 成熟マウスの脳の大脳皮質、放射状層、錐体細胞層を LCM で取り分け、マウスの脳は主に発現している SCD1、SCD2 について real-time PCR で発現を解析してみると、それぞれの部位での SCD2 mRNA の発現が SCD1 mRNA の 8 倍、12 倍、34 倍程度多かった。
- (2) SCD1、SCD2 特異的 RNA probe による ISH によって、脳での SCD 発現細胞を検索した結果、SCD2 の発現は、大脳皮質や白質で広範囲に認められたが、SCD1 の発現レベルは低く、検出が困難であった。(1) の結果および、既に知られているオリゴデンドログリアの SCD2 の発現と合わせて、正常の脳内で主に発現しているのは SCD2 であることが分かった。
- (3) 以下の SCD1、SCD2 特異的配列に対して抗体を作成し、それぞれの抗体がリコンビナント SCD1、SCD2 を特異的に認識することを確認した。

SCD1 (37-50) : HLEEDIRPEMKEDI
 SCD2 (40-53) : HWGADVRPELKDDL



- (4) 前項の抗 SCD1、SCD2 特異抗体を用いた免疫組織化学的検索によって、生後 400 日の野生型マウスの海馬錐体細胞では SCD1、SCD2 いずれの免疫活性も検出され、SCD2 免疫活性の方が強いことが分かった。同

齢の 3 x Tg-AD マウスでは、SCD1 の免疫活性は対照動物並みであったが、SCD2 の免疫活性は対照に比べて著しく減少していた。



また SCD1 の免疫活性はいずれのマウスでもオリゴデンドログリアでは検出されず、オリゴデンドログリアでは SCD2 のみが発現していることが確認された。

- (5) 抗 SCD2 特異抗体を用いて生後 0、1、2、3、4、8 週齢ラット海馬での SCD2 免疫活性を免疫組織化学的に検討すると、出生直後では錐体細胞には認められず、周囲の太い突起状構造に強い線状の活性が認められるが、1 週から 2-3 週にかけて細胞体で強い活性が認められるようになり、4 週以降はやや減弱する。一方、樹状突起領域では太い突起での発現が薄れ、突起の全長に亘って弱陽性所見が認められるようになった。
- (6) 生後 200 日の野生型マウスの海馬では、SCD 免疫活性は錐体神経細胞体の周辺部や樹状突起（放射状層、上昇層）に沿った顆粒状の免疫活性として認められ、SCD が小胞体のような細胞内小器官に局在していることを示す可能性が示唆された。一方、3 x Tg-AD マウスでは神経細胞体、樹状突起、neuropil での免疫活性の増大が認められ、粗大顆粒状、分節状の分布を示し、MAP2 免疫活性の分節化も伴っていた。このような変化は、3 x Tg-AD マウスの日齢が進むに連れて CA1 領域全域から CA3 領域への拡大傾向を示した。
- (7) 野生型マウス、3 x Tg-AD マウスについて、シナプス関連蛋白の発現を免疫組織科学的に検索してみると、生後 200 日の 3 x Tg-AD マウスの海馬 CA1 放線状層における synaptobrevin の免疫活性は、野生型マウスに比べて減少していた。一方で VGAT の免疫活性は生後 200 日では差がなかったが、生後 480 日では野生型マウスに比べて 3 x Tg-AD マウスの海馬 CA1 錐体細胞層、放線状層で増大していた。
- (8) 生後 240 日の野生型マウス、3 x Tg-AD マウスの海馬スライスにパッチ電極から biocytin を注入した後に固定し、Alexa-Fluor488 標識 streptavidin

と反応させて可視化し、共焦点レーザー顕微鏡で樹状突起の形状を観察すると、中、小型の棘突起が減少し、比較的大型のビーズ状に腫張した棘突起が樹状突起に沿って認められた。こうした所見と一致して、3 x Tg-AD マウスでは、野生型で見られるような細長い頸部を持つ spine との間に形成される興奮性シナプスが少なく、頸部が短い、扁平隆起状の興奮性シナプスが目立つことが電子顕微鏡観察によって見出された（連携研究員の北里大・安達栄治郎教授による）。

- (9) 生後 750 日の 3 x Tg-AD マウスおよび対照動物の脳切片を用いて、LCM で切り出した錐体細胞層、放線状層および大脳皮質から RNA を抽出し、real-time PCR によりシナプスに関連する約 20 遺伝子の定量的解析を行った。その結果、CaMK II など、両マウスで発現に差の見られる遺伝子をいくつか見出した。
- (10) 実験的脱髄過程での SCD2 の変化：
Cuprizone 経口投与によって誘発した脱髄、それに引き続く髄鞘再生過程での SCD2 mRNA、SCD2 蛋白の発現を real-time PCR、Western blot 分析で検討した。脱髄進行時には白質の FluoroMyelin Green 陽性の髄鞘の面積は対照の 6%程度まで減少し、その単位面積当りの SCD2 蛋白は対照の 80%程度に減少していた。一方、同じ時期に、白質での SCD2 mRNA の発現は対照の 150%程度に増大していた。髄鞘再生期には SCD2mRNA、SCD2 蛋白は対照の 3-4 倍程度の発現を示すことから、脱髄過程では他の髄鞘構成蛋白に先駆けて SCD2 mRNA が増大することが示唆された。
- (11) スナネズミの片側総頸動脈を 10 分間結紮した後に解除する脳虚血モデルでは、虚血側での SCD 免疫活性が増加し、SCD を発現している S100 免疫活性陽性のアストロサイトの数が対照側に比べて野生型に比べて増加していた。

これらの所見は、脳の生後発達過程や様々な病変が成立する過程で、SCD の発現分布、発現細胞に変化の生じることを意味する。特に AD モデルマウスで観察された海馬神経細胞での特徴的な SCD2 免疫活性の変化や、この時期に見られた樹状突起領域でのシナプス形状の変化、シナプス関連蛋白の発現変化は、樹状突起領域に AD の初期病変が発生し、その成立過程に SCD が関与している可能性を示唆している。今後、その実態をさらに解析していく。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Song S.-Y., Hashimoto N., Fujii R., Nakashima K. Effects of modified gene expression of lipid metabolism-related enzymes on remyelination following cuprizone-induced demyelination. 10th FENS Forum European Neuroscience. July 2-6, 2016 Copenhagen, Denmark.
2. Nakashima K., Fukui H., Fujii R., Song S.-Y. (2014). Expression changes of Stearoyl-CoA desaturase isoforms in neuronal and glial cells during the processes of demyelination and neurodegeneration. The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Nov. 25-27, Yokohama, Japan.

〔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 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

宋 時栄 (SONG, SI-Young)
徳島文理大学・神経科学研究所・教授
研究者番号：00399693

(2) 研究分担者

中島 健太郎 (Nakashima Kentaro)
徳島文理大学・神経科学研究所・助手
研究者番号：20449911

(3) 研究協力者

安達栄治郎

北里大学・医療系研究科・
細胞組織再生医学