

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06469

研究課題名(和文)p38 MAPKを介した成体神経幹/前駆細胞老化制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms of aging of adult neural stem/progenitor cells via p38 MAPK

研究代表者

島崎 琢也 (SHIMAZAKI, Takuya)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：00324749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類成体脳における神経新生は加齢とともに低下する。我々はp38 MAPキナーゼの加齢に伴う神経幹/前駆細胞(NSPCs)における発現低下が、その低下の大きな要因であることを発見した。NSPCsにおけるp38ファミリーの主アイソザイムであるp38alphaを欠損させると、幹細胞ではなく、前駆細胞(NPCs)の増殖が特異的に低下した一方、老化したNSPCsに強制発現させると、低下したNPCsの増殖と神経新生が回復した。また、p38はWntシグナルのアンタゴニストの発現抑制に必要であることも発見し、これらの遺伝子のノックダウンを老化マウスNSPCsで行うとNPCsの増殖が促進された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、成体脳における神経新生能の低下に関しては未解明な部分が多かった。p38 MAP-kinaseが成体脳神経新生に必要であり、加齢によるその発現低下が加齢に伴う神経新生能の低下の大きな要因であるという発見は、他の細胞増殖制御因子との関係を含めた成体NSPCsの老化機構の全容解明へ向けた突破口になるものである。さらに、p38の発現およびWntシグナルを制御することによる、老化によって可塑性が低下した脳の、NSPCsの動員による神経再生への期待を高める成果であるとも考えている。

研究成果の概要(英文)：Adult neurogenesis in mammalian brain declines with aging. We identify p38 MAP-Kinase as a key factor in the proliferation of neural progenitor cells (NPCs) but not stem cells in adult neurogenic niches. p38 expression in adult NSPCs is downregulated during aging. Deletion of p38alpha which is a major isozyme of p38 family in NSPCs reduces the proliferation of NPCs but not stem cells. Conversely, forced expression of p38alpha in NSPCs in the aged SVZ restores NPC proliferation and neurogenesis. We also found that p38 is necessary for suppressing the expression of Dickkopf-1(DKK1) and secreted frizzled-related protein 3(SFRP3) which are antagonists of the Wnt signaling. Moreover, the knockdown of either Dkk1 or Sfrp3 facilitates proliferation of NPCs in aged mouse SVZ. Age-related reduction in p38 thus leads to decreased adult neurogenesis via downregulation of Wnt signaling.

研究分野：神経発生

キーワード：神経幹細胞 神経前駆細胞 神経新生 p38 老化 増殖 成体脳

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物中枢神経系における神経幹細胞(NSCs)は自己複製能と多分化能を持つが、常にすべての神経細胞へ分化できるわけではない。NSCsは発生過程において時間とともに分化するニューロンのタイプが変化し、発生初期には無かったグリアへの分化能を獲得すると共に神経新生能が低下し、その後、成体においても神経新生を行っている側脳室下帯(SVZ)と海馬歯状回(DG)顆粒下帯(SGZ)以外の領域ではほとんどがグリア細胞へ分化し、一部が潜在的 NSC あるいは前駆細胞(NPC)として静的状態に残る。これら成体神経幹/前駆細胞(NSPCs)は、脳梗塞や外傷による損傷時には動員され主にグリアの供給源になることが示されている。そして、老化の進行と共に SVZ および SGZ においても神経新生は低下し、潜在的 NSPCs の数も減少していく。つまり、NSCs は発生の進行に伴って可塑性と増殖能が低下して行き、組織修復能も低下して行くのであるが、その制御機構についてはあまり良く分かっていなかった。そこで、このような NSPCs の老化が、「なぜ」そして「いかにして」起こるのかを解明する必要性を感じた。

### 2. 研究の目的

本研究の第一義的な目的は、特に成体脳に存在する NSPCs の老化による増殖および神経新生能の低下機構の解明であり、そこから得られた知見を利用し、老化脳における神経新生能の回復と、NSPCs 数の低下に起因した身体的老化の抑制を目指していた。我々は、それまでの予備的研究により、マウス SVZ と SGZ の NSPCs において、加齢と共に p38 MAP-Kinase の発現が低下し、NSPCs に発現している主要な p38MAP-Kinase のアイソザイムである p38 $\alpha$ (MAPK14)の成体 NSPCs 特異的なコンディショナルノックアウト(CKO)マウスでは、特に NSCs から生まれる中間型前駆細胞 NPCs の増殖が低下していることを発見していた(図1)。それまでに報告された NSPCs における p38 の機能は、その増殖や生存に対して抑制的に働くという報告が主であり、直接的に増殖・生存に促進的に機能することを示した報告は無い。そして、これまで、老化による成体 NSPCs の増殖および神経新生能の低下要因として、増殖因子や増殖因子受容体の発現低下、細胞周期阻害因子の発現上昇、そしてミトコンドリア機能の低下等が報告されていたが、なぜこれらの発現変化が起こるのかは全く分かっていなかった。そこで、老化によって変化する細胞増殖制御因子の発現制御を含めた NSPCs の老化機構における、p38 を介した新たな制御システムの解明を目的として本研究を遂行した。

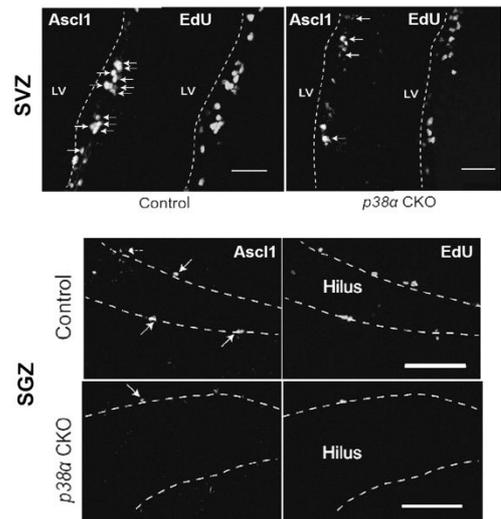


図1 p38 $\alpha$ CKO マウス(10週齢) SVZ および SGZ における Ascl1<sup>+</sup> NPC の増殖低下.

### 3. 研究の方法

#### (1) Mapk14-CKO マウスを用いた解析

Mapk14 遺伝子の成体 NSPCs 特異的な CKO マウスは、Cre-lox システムを用いて作成した。具体的には、アミノ酸配列 40-83 をコードするエクソンを loxP 配列で挟んだノックインマウス と NSPCs 特異的な Nestin 遺伝子のエンハンサー/プロモーター制御下で CreERT2 を発現するトランスジェニックマウス を交配し、4-Hydroxytamoxifen(4-HT)投与によって、Mapk14 遺伝子を任意のタイミングで破壊するシステムを用いて各種解析を行った(図2)。

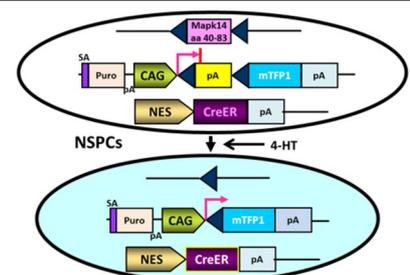


図2 .NSPCs 特異的 p38 $\alpha$ CKO. NES: Nestin 発現制御領域

#### (2) レンチウイルスベクターを用いた解析

p38 およびその下流で機能する遺伝子の強制発現(OE)やノックダウン(KD)実験は、*in vivo* および *in vitro* とともにレンチウイルスベクターを用いて行った。*in vivo* すなわち SVZ への OE および KD は、右側脳室にカニューレを挿入しレンチウイルスベクターを感染させることによって行った。

### 4. 研究成果

(1)加齢による成体脳における神経新生の低下の主要因は p38 の発現低下による神経前駆細胞の増殖能低下である

Mapk14 の NSPCs 特異的な CKO を 6 および 10 週齢で行ったところ、SVZ と SGZ の両方において NSCs から生まれる中間型前駆細胞 NPCs の増殖が低下していたが(図1)、これは neurosphere 法による SVZ の NSPCs の増殖培養系でも同様であり、neurosphere のサイズおよび核酸アナログである EdU の取り込みが顕著に低下していた。なお、Ki67, SOX2 および GFAP 陽性の増殖の遅い NSC についてはその数に変化は見られなかった。また、野生型マウスの 6 週齢および 6 ヶ月齢の SVZ 由来 neurosphere を比較したところ、6 ヶ月齢では neurosphere 形成数お

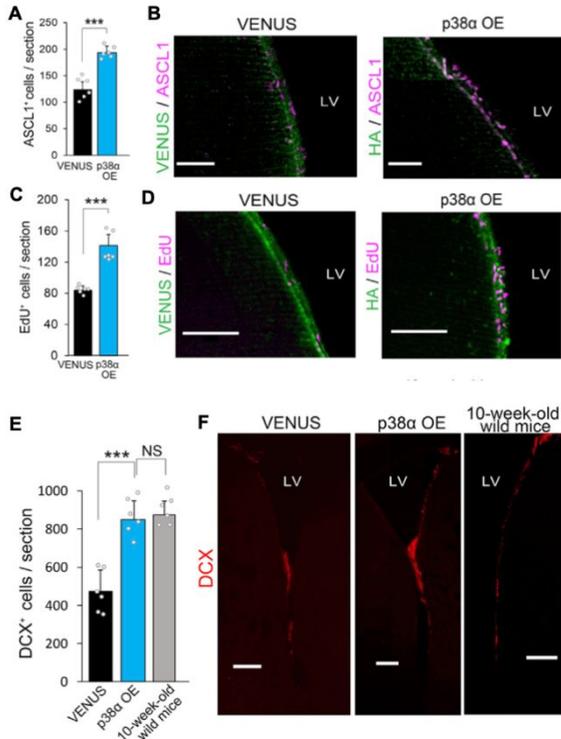


図3 . p38 $\alpha$ の強制発現による神経新生の回復 . 6ヶ月齢マウス aSVZ において、ASCL1 陽性NPCs 数(A, B)とEdU 取り込み増殖細胞数(C, D)が p38 $\alpha$ の強制発現(p38 $\alpha$ OE)によって顕著に上昇し、DCX 陽性ニューロンの数も10週齢マウスのレベルまで回復した(E, F) . VENUS: VENUS 発現コントロールベクター .

よび増殖ともに低下しており、p38 の発現も顕著に低下していた。これらのことは、p38 の発現低下により NSPCs の増殖因子に対する反応性が低下していることを示唆していた。そこでまず、MAPK14 を6ヶ月齢マウス SVZ 由来 NSPCs にレンチウイルスベクターを用いて強制発現させ neurosphere を形成させると、neurosphere の増殖が回復した。さらに、6ヶ月齢マウス SVZ においても同様に MAPK14 を強制発現させたところ、ASCL1 陽性のNPCs の増殖および神経新生の回復が確認され(図3) それは18ヶ月齢に至っても続いていた。一方、NSCs の増殖に変化は見られなかった。これらの結果を総合すると、成体脳における加齢に伴った神経新生の低下は、加齢に伴う

p38 の発現低下による NPCs の増殖能低下が非常に大きな要因であることが分かった。

(2)p38 による NPCs の増殖制御は Wnt シグナリングの制御を介している

p38 がどのように NPCs の増殖制御を行なっているか知るために、まず10週齢のマウス SVZ 由来 neurosphere において *Mapk14* の KD をレンチウイルスベクターを用いて行い、その際、NPCs の増殖に関与することが示唆されている遺伝子群の発現をリアルタイム PCR によって解析した。その結果、Wnt シグナルのアンタゴニストである Dickkopf-1(DKK1)と secreted frizzled-related protein 3(SFRP3)の発現が *Mapk14* の KD によって顕著に上昇することを発見した。そこで、これらの遺伝子それぞれの KD を、*Mapk14*-CKO マウスの SVZ 由来 neurosphere において行なったところ、*Mapk14*-CKO による NPCs の増殖低下がレスキューされた(図4)。

次に、様々な月齢のマウス SVZ 由来 neurosphere における *Dkk1* と *Sfrp3* の発現を調べたところ、加齢とともにこれらの遺伝子の発現が上昇することを確認した。そこで、これらの遺伝子の KD を14週齢マウス aSVZ 由来 neurosphere において行なったところ、NSPCs の増殖が顕著に上昇した。さらに、6ヶ月齢マウス SVZ において同様に KD を行なったところ、NPCs の増殖と神経新生が顕著に上昇した(図5)。また、*Mapk14*-CKO マウスの SVZ における Wnt シグナルの活性化状態を非リン酸化型 $\beta$ CATENIN の免疫染色によって解析したところ、Wnt シグナルの顕著な低下が確認された。これらの結果を総合すると、成体脳における NPC の増殖能は Wnt シグナルに大きく依存しており、加齢に伴う p38 の発現低下と、それに起因する Wnt シグナルアンタゴニストの上昇によって、NPC の増殖が阻害され、その結果、加齢による神経新生の低下が促進されると考えられる。

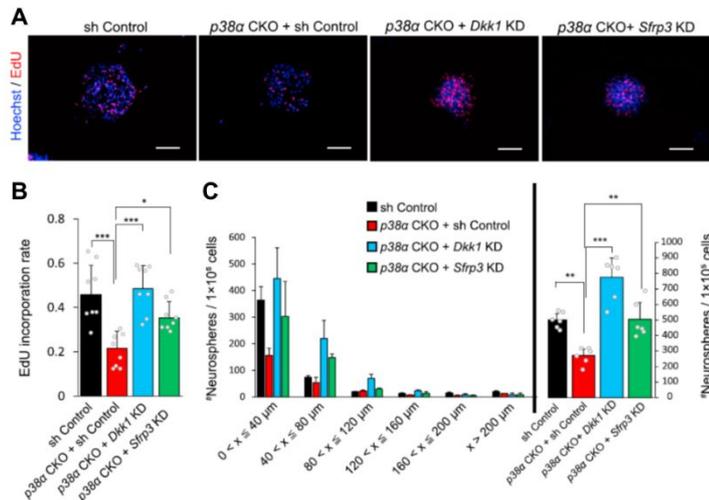


図4 . Wnt アンタゴニストの KD によって *Mapk14*-CKO による NPCs の増殖低下がレスキューされる . *Mapk14*-CKO マウス SVZ 由来 neurosphere において *Dkk1* あるいは *Sfrp3* の KD を行くと、CKO によって低下した EdU の取り込みが回復し(A, B)、neurosphere のサイズおよび自己複製能も回復した (C) .

(3)MAPK14 および Wnt シグナルアンタゴニストの発現制御

マウス成体 NSPCs において、p38 の発現は老化とともに低下して行き、その低下は分化した神経細胞でも同様であり、その発現制御機構の解明が成体 NSPCs の老化機構の解明をさらに前進をもたらすことを示している。そこでまず、p38 の加齢による発現低下がタンパク質レベルのものなのか、mRNA レベルなのか、免疫染色および *Mapk14* mRNA の RT-qPCR によって6週齢と6ヶ月齢マウス SVZ 由来 NSPCs における発現比較を行ったところ、免疫染色による絶対定量ではわずかに検出できる程度までに顕著に低下していたのに対して、qPCR による相対定量では半分程度の低下しか見られなかった。また、既存データベースにより、8週齢と18ヶ月齢のマウス SVZ 由来 NSPCs における *Mapk14* 遺伝子のプロモーターと思われる領域のヒストン H3 のメチル化およびアセチル化状態を比較したところ、顕著な差はみられなかった。これらのことは、MAPK14 の老化による発現低下が、未同定のエンハンサー活性の低下、翻訳効率の低下、および老化による mRNA 全体の転写量が低下に起因していることを示唆していた。また、その下流で発現が制御されている *Dkk1* および *Sfrp3* 遺伝子についても、それらのプロモーターと予想される領域のヒストン H3 のメチル化およびアセチル化状態を比較したところ、加齢による顕著な差はみられなかった。このことは、*Dkk1* および *Sfrp3* 遺伝子の発現は加齢および MAPK14 の発現低下により上昇することから、MAPK14 の下流で活性が制御されているエンハンサーが存在するか、あるいは mRNA の分解の制御が行われている可能性を示唆している。

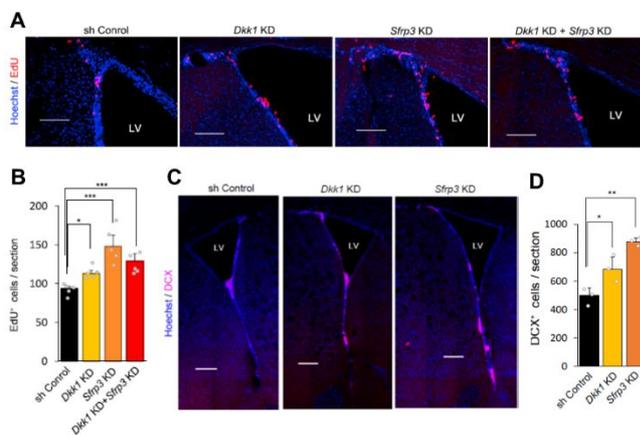


図5 .Wnt アンタゴニストの KD は加齢によって低下した NPCs の増殖を上昇させる . 6ヶ月齢マウス aSVZ において *Dkk1* あるいは *Sfrap3* の KD を行うと、EdU 取り込み細胞が増加し(A,B)、DCX 陽性幼若ニューロンの数も増加した (C,D) .

#### (4)成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

これまで、成体 NSPCs の老化による増殖能および神経新生能の低下に関しては、増殖因子およびそれらの受容体や細胞周期調節因子の加齢による発現変化やミトコンドリアの機能の低下に起因することを示す報告は存在したが、未解明な部分が多かった。その中で本研究は、様々な細胞外シグナルを仲介する伝達分子であり、様々な細胞機能の制御に関与している p38 MAP-kinase がいかに成体 NSPCs の増殖制御に関与しているかを明らかにしたものであり、他の細胞増殖制御因子との関係を含めた成体 NSPCs の老化機構の全容解明へ向けた突破口になるものであると考えている。さらに、p38 の発現および Wnt シグナルを制御することによる、老化によって可塑性が低下した脳の、NSPCs の動員による神経再生への期待を高める成果であるとも考えている。

#### 引用文献

- van Wijngaarden P, Franklin RJ, Ageing stem and progenitor cells: implications for rejuvenation of the central nervous system. *Development* 140, 2013, 2562-2575
- Zhang Y, Kim MS, Jia B et al., Hypothalamic stem cells control ageing speed partly through exosomal miRNAs. *Nature* 548, 2017, 52-57
- Seib DR, Martin-Villalba A, Neurogenesis in the Normal Ageing Hippocampus: A Mini-Review. *Gerontology* 61, 2015, 327-335
- Conover JC, Todd KL, Development and aging of a brain neural stem cell niche. *Exp Gerontol* 94, 2017, 9-13
- Nishida K, Yamaguchi O, Hirotani S et al., p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *Mol Cell Biol*, 24, 2004, 10611-10620
- Imayoshi I, Hirano K, Sakamoto M et al., A multifunctional teal-fluorescent Rosa26 reporter mouse line for Cre- and Flp-mediated recombination. *Neurosci Res* 73, 2012, 85-91

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kase Y, Otsu K, Shimazaki T, Okano H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Involvement of p38 in Age-Related Decline in Adult Neurogenesis via Modulation of Wnt Signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1313-1328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2019.04.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kase Y, Shimazaki T, Okano H.	4. 巻 40
2. 論文標題 Current understanding of adult neurogenesis in the mammalian brain: how does adult neurogenesis decrease with age?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-020-00122-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加瀬義高、島崎琢也、岡野栄之
2. 発表標題 Preventive Role of p38 Against Age-related Decline in Adult Neurogenesis via Modulation of Wnt Signaling.
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加瀬義高、島崎琢也、岡野栄之
2. 発表標題 Preventive Role of p38 Against Age-related Decline in Adult Neurogenesis via Modulation of Wnt Signaling.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会/第62回日本神経化学会大会/ NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加瀬義高、島崎琢也、岡野栄之
2. 発表標題 Preventive Role of p38 Against Age-related Decline in Adult Neurogenesis via Modulation of Wnt Signaling.
3. 学会等名 第77回 Blood Vessel Club
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

加齢に伴う神経新生の低下機構を解明 - 老化による脳萎縮を部分的に防ぐことに成功 -  
<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2019/5/10/28-52993/>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------