

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：16201
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K07508
研究課題名(和文)細胞老化によるアストロサイト機能不全が神経変性をもたらす分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms of neurodegeneration caused by dysfunctional senescent astrocytes

研究代表者
千葉 陽一 (Chiba, Yoichi)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：30372113
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)：アストロサイトの細胞老化が神経変性をもたらすメカニズムを明らかにするため、細胞老化を誘導したアストロサイトの蛋白質発現変化を網羅的に解析した。高純度(>99%)のマウス由来初代アストロサイトを単離し、過酸化水素により酸化的ストレスを負荷(200 μ M、2時間)し、その後1週間培養を継続したところ、効率よく細胞老化を誘導された。2D-DIGE法により老化アストロサイトで発現が有意に増加する蛋白質と減少する蛋白質がそれぞれ複数同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞老化は、老化関連疾患の基盤にある現象として近年注目されている。我が国で今後患者数の増加が予想されるアルツハイマー病やパーキンソン病などの加齢性神経変性疾患においても、細胞老化が関わる可能性が示唆されている。アストロサイトは細胞老化関連分泌形質(SASP)因子を発現しうる細胞であり、脳の加齢性変化に密接に関わっている可能性が高い。我々は、老化アストロサイトの形質の変化を蛋白質発現変化の観点から明らかにした。本研究の成果は今後加齢性神経変性疾患の予防や新しい治療を考える上で基盤となる知見をもたらすものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：There is an increasing awareness of the contribution of senescent cells to age-related pathologies. Recent studies suggested astrocytes exhibit cellular senescence phenotypes in aged human brain and Alzheimer's disease. However, the mechanisms that senescent astrocytes affect pathophysiology of brain aging and age-related neurodegenerative diseases remain unclear. Here we investigated changes in protein expression in senescent astrocyte using 2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE). Cellular senescence, assessed by senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) staining, immunoblotting with p21 and lamin B1 antibodies, and H2AX immunocytochemistry, was efficiently induced by treating mouse primary astrocytes with 200 μ M H2O2 for 2 hours. 2D-DIGE analyses revealed that 5 protein spots showed a significant increase in H2O2-treated astrocytes compared with control, whereas 6 spots exhibited significant decrease in H2O2-treated cells.

研究分野：神経病理学

キーワード：神経変性疾患 細胞老化 アストロサイト プロテオミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢は Alzheimer 病をはじめとする神経変性疾患の最大の危険因子であるが、その生物学的な本態は明確ではない。近年、個体老化および老化関連疾患の基盤にある生命現象として細胞老化が注目されている。その端緒となったのが、老化細胞がサイトカインやケモカイン、蛋白分解酵素等を分泌し、周囲の細胞・組織に影響を与えるという、細胞老化関連分泌形質 (Senescence-associated secretory phenotype: SASP) の発見 (Rodier et al. J Cell Biol 192:547-56, 2011) で、最近相次いで報告されている老化細胞除去による老化病態の改善 (Baker et al. Nature 479:232-6, 2011; Barr et al. Cell 169:132-47, 2017) を説明する有力な根拠となっている。

中枢神経系においても、老化マーカーを発現した神経細胞やグリア細胞が存在することが報告されている (Jurk et al. Aging Cell 996-1004, 2012; Chinta et al. Exp Gerontol 68:3-7, 2015)。アストロサイトはヒト脳において最も多数を占める細胞で、物質輸送、シナプス調節、バリア機能などの多彩かつ重要な機能を果たしている。また、アストロサイトは SASP 因子を発現しうる細胞であり (Baht et al. PLoS ONE 7: e45069, 2012) 細胞老化によるアストロサイトの形質変化が周囲の神経細胞に non-cell autonomous に影響を及ぼすことは十分考えられる。最近、変異タウトランスジェニックマウスで、細胞老化マーカーを発現したグリア細胞を除去すると神経変性の発症が抑えられることが報告され (Bussian et al. Nature 2018) 加齢性神経変性疾患の病態形成に細胞老化が重要な役割を果たしていることが示された。しかし、具体的に老化したグリア細胞のどのような変化が神経変性をもたらすのか、その詳細な分子レベルでの理解は未だ不十分である。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では、中枢神経系内で多彩な役割を有し、SASP 因子を分泌するポテンシャルを持つアストロサイトに着目し、「アストロサイトの老化が神経変性をもたらすメカニズムは何か」という問いを設定した。この問いに答えるため、アストロサイトの細胞老化によってどのような形質の変化が起こり、神経変性に寄与するのか、を明らかにすることを目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 高純度マウス初代アストロサイトの単離

C57BL/6 マウス新生仔大脳皮質をトリプシン処理し、得られた細胞を $1.2-1.5 \times 10^7$ cells/T75 フラスコの密度で播種し、10% FBS 添加 DF 培地にて 7 日間培養して混合グリア培養を得た。その後インキュベーター中に設置したオービタルシェーカーにて 37、240 rpm で 2 晩振盪し、培養容器底部に強固に接着したアストロサイトから、その上層に緩く附着しているミクログリアとオリゴデンドロサイト前駆細胞を遊離させ、残ったアストロサイトをトリプシン処理にて回収、 1×10^4 cells/cm² で再播種した。

(2) 初代アストロサイトへの酸化的ストレス負荷による細胞老化誘導

再播種翌日に 200 μ M の過酸化水素を含んだ培地に置換し CO₂ インキュベーターで 2 時間処理した後、通常の培地に置き換えてさらに 7 日間培養を行った。この時点で酸化ストレスを負荷したアストロサイトに細胞老化が誘導されているか否かを確認するため、以下の項目につき解析を行った。

細胞数計測と位相差顕微鏡での細胞形態評価

Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) 染色

γ H2AX 免疫細胞化学

p21、lamin B1 発現の Western Blotting による評価

(3) 老化アストロサイトにおける蛋白質発現変動の網羅的解析

過酸化水素処理により老化を誘導したアストロサイトとコントロールのアストロサイトを 10% トリクロロ酢酸で固定後、蛋白質可溶化液 (7M Urea/2M Thiourea/4% CHAPS) を加えて全蛋白質を抽出し、2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE) 法によりコントロールと老化アストロサイトの間の蛋白質発現の違いを網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) 本研究ではミクログリアの混入が実験結果に影響を及ぼす可能性が考えられたので、まず 3 (1) の方法で得られた培養アストロサイトの純度を glutamine synthase (アストロサイトマーカー) と Iba1 (ミクログリアマーカー) 抗体を用いた蛍光二重免疫染色により解析したところ、ほぼ全ての細胞が glutamine synthase +/Iba1 - のアストロサイトであり、99% 以上の純度であることが確認された (図 1)。

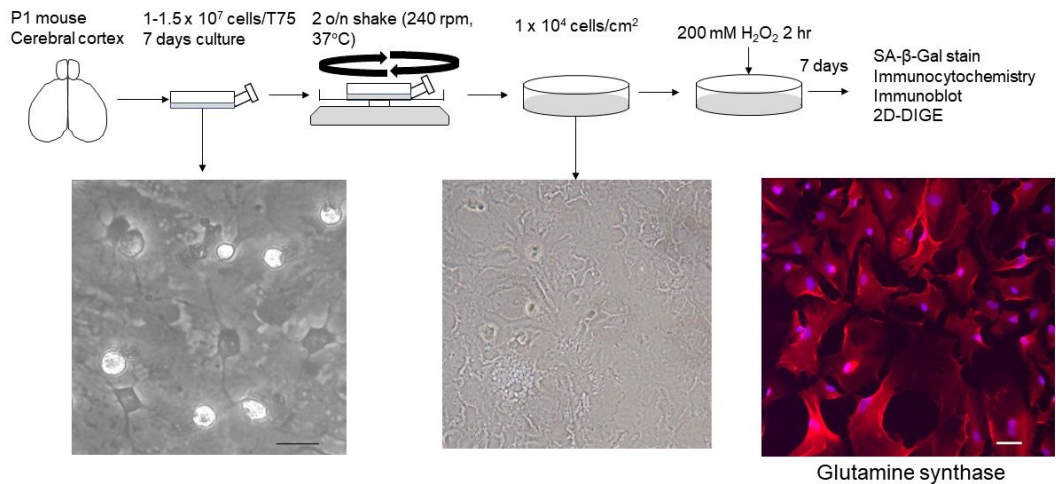


図1 アストロサイト培養のプロトコルと代表的な位相差顕微鏡像、glutamine synthase 免疫染色による純度の確認。

(2) 過酸化水素処理7日後、アストロサイトはコントロールに比べて個々の細胞質が平坦で大きくなり、一般的に知られる老化細胞と同様の形態を示し、confluent 時の細胞密度もコントロールに比べて有意に減少していた(図2)。

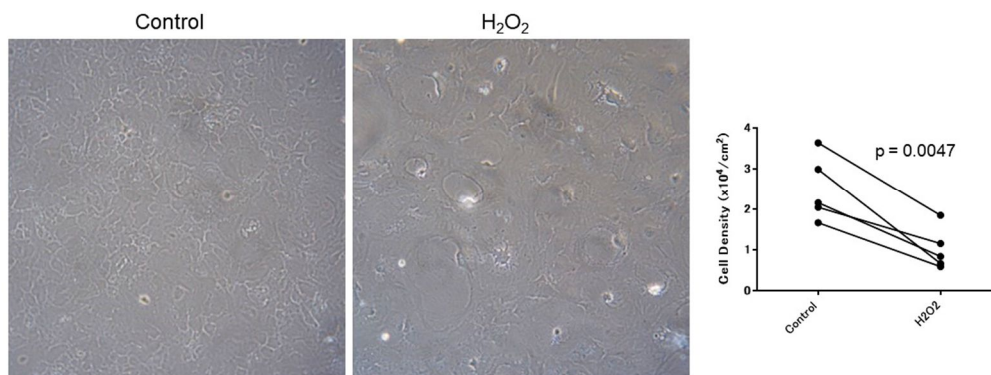
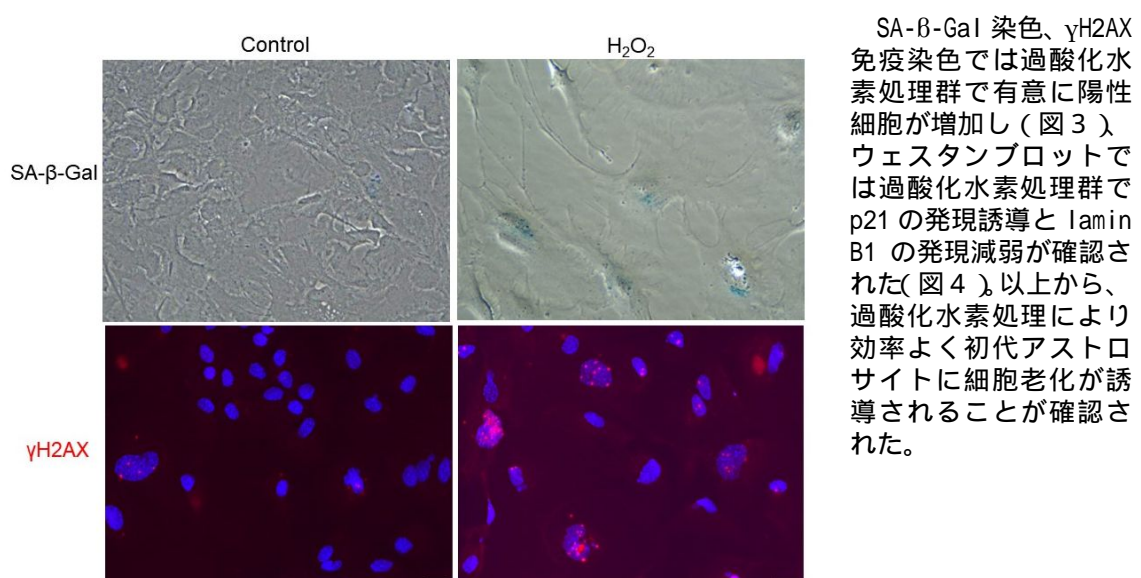


図2 過酸化水素処理によるアストロサイトの形態変化と細胞密度。



SA-β-Gal 染色、γH2AX 免疫染色では過酸化水素処理群で有意に陽性細胞が増加し(図3)、ウェスタンブロットでは過酸化水素処理群で p21 の発現誘導と lamin B1 の発現減弱が確認された(図4)。以上から、過酸化水素処理により効率よく初代アストロサイトに細胞老化が誘導されることが確認された。

図3 過酸化水素処理によるアストロサイトにおける SA-β-Gal と γH2AX の発現

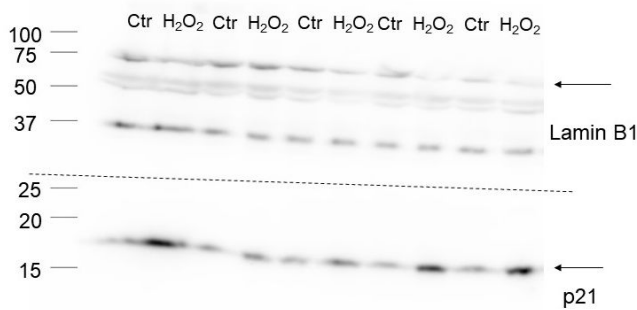


図4 過酸化水素処理によるアストロサイトの細胞老化マーカー発現：ウェスタンブロット

(3) 2D-DIGE 法により、過酸化水素処理により細胞老化を誘導したアストロサイトと、コントロールのアストロサイトとの間の蛋白質発現量を比較した(図5)。解析の結果、過酸化水素処理群で発現が有意($p < 0.05$)に増加した蛋白質スポット5個、有意に減少したスポットが6個同定された。増加あるいは減少する傾向($p < 0.10$)が見られた蛋白質スポットはそれぞれ6個同定された。

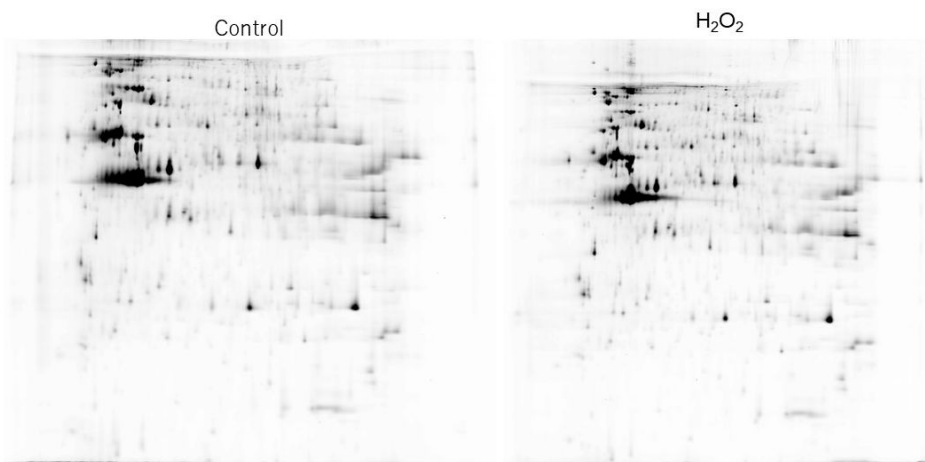


図5 コントロールと過酸化水素処理アストロサイトにおける蛋白質発現の比較：2D-DIGE 法

(4) 現在、2D-DIGE 法で発現に差が見られたスポットから蛋白質を切り出し、質量分析法により蛋白質同定を行っている。今後、同定された蛋白質につき、ウェスタンブロットや免疫細胞化学による発現の差の確認を行い、さらに老齢マウスや老化促進モデルマウス(SAMP8)、ヒト高齢者や神経変性疾患患者の剖検脳での免疫組織化学的解析により、老化および神経変性疾患による *in vivo* でのこれらの蛋白質の発現変化につき検証する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Chiba Yoichi, Sugiyama Yasunori, Nishi Nozomu, Nonaka Wakako, Murakami Ryuta, Ueno Masaki	4. 巻 40
2. 論文標題 Sodium/glucose cotransporter 2 is expressed in choroid plexus epithelial cells and ependymal cells in human and mouse brains	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 482 ~ 491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12665	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 Furukawa Ayako, Kakita Akiyoshi, Chiba Yoichi, Kitaura Hiroki, Fujii Yukihiko, Fukuda Masafumi, Kameyama Shigeki, Shimada Atsuyoshi	4. 巻 168
2. 論文標題 Proteomic profile differentiating between mesial temporal lobe epilepsy with and without hippocampal sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Epilepsy Research	6. 最初と最後の頁 106502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.epilepsyres.2020.106502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chiba Yoichi, Murakami Ryuta, Matsumoto Koichi, Wakamatsu Keiji, Nonaka Wakako, Uemura Naoya, Yanase Ken, Kamada Masaki, Ueno Masaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Glucose, Fructose, and Urate Transporters in the Choroid Plexus Epithelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21197230	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 Murakami Ryuta, Chiba Yoichi, Nishi Nozomu, Matsumoto Koichi, Wakamatsu Keiji, Yanase Ken, Uemura Naoya, Nonaka Wakako, Ueno Masaki	4. 巻 741
2. 論文標題 Immunoreactivity of receptor and transporters for lactate located in astrocytes and epithelial cells of choroid plexus of human brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2020.135479	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akbor Maruf Mohammad, Kurosawa Nobuyuki, Nakayama Hiroki, Nakatani Ayumi, Tomobe Koji, Chiba Yoichi, Ueno Masaki, Tanaka Masashi, Nomura Yasuyuki, Isobe Masaharu	4. 巻 16
2. 論文標題 Polymorphic SERPINA3 prolongs oligomeric state of amyloid beta	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0248027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0248027	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 該当する

1. 著者名 Nakano Yuki, Hirooka Kazuyuki, Chiba Yoichi, Ueno Masaki, Ojima Daiki, Hossain Md Razib, Takahashi Hiroo, Yamamoto Tohru, Kiuchi Yoshiaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Retinal ganglion cell loss in kinesin-1 cargo Alcadein deficient mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	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) 10.1038/s41419-020-2363-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 -

1. 著者名 Yanase Ken, Uemura Naoya, Chiba Yoichi, Murakami Ryuta, Fujihara Ryuji, Matsumoto Koichi, Shirakami Gotaro, Araki Nobukazu, Ueno Masaki	4. 巻 40
2. 論文標題 Immunoreactivities for hepcidin, ferroportin, and hephaestin in astrocytes and choroid plexus epithelium of human brains	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 75 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12611	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishihara Yasuhiro, Itoh Kouichi, Oguro Ami, Chiba Yoichi, Ueno Masaki, Tsuji Mayumi, Vogel Christoph F. A., Yamazaki Takeshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Neuroprotective activation of astrocytes by methylmercury exposure in the inferior colliculus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-019-50377-9	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 該当する

1. 著者名 Fujii Takayuki, Chiba Yoichi, Nakayama-Imahiji Haruyuki, Onishi Shun, Tanaka Aya, Katami Hiroto, Kaji Tatsuru, Ieiri Satoshi, Miki Takanori, Ueno Masaki, Kuwahara Tomomi, Shimono Ryuichi	4. 巻 54
2. 論文標題 Partially hydrolyzed guar gum alleviates small intestinal mucosal damage after massive small bowel resection along with changes in the intestinal microbiota	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Surgery	6. 最初と最後の頁 2514 ~ 2519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpedsurg.2019.08.048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueno Masaki, Chiba Yoichi, Murakami Ryuta, Matsumoto Koichi, Fujihara Ryuji, Uemura Naoya, Yanase Ken, Kamada Masaki	4. 巻 20
2. 論文標題 Disturbance of Intracerebral Fluid Clearance and Blood-Brain Barrier in Vascular Cognitive Impairment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2600 ~ 2600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20102600	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6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 千葉陽一
2. 発表標題 脈絡叢上皮細胞における糖輸送体の発現とその意義
3. 学会等名 第11回日本脳血管・認知症学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千葉陽一、杉山康憲、西望、野中和香子、河内真知、上野正樹
2. 発表標題 脈絡叢上皮細胞と脳室上皮細胞におけるナトリウム・グルコース共輸送体2 (SGLT2) の発現
3. 学会等名 第109回日本病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千葉陽一、杉山康憲、西望、野中和香子、村上龍太、上野正樹
2. 発表標題 脈絡叢上皮細胞と脳室上衣細胞におけるナトリウム・グルコース共輸送体2 (SGLT2) の発現
3. 学会等名 第61回日本神経病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千葉陽一
2. 発表標題 老化と認知症の神経病理：ヒトとSAMマウスの接点を考える
3. 学会等名 第34回老化促進モデルマウス (SAM) 学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉陽一、吉井りつ、野中和香子、松川昭博、佐藤明、上野正樹
2. 発表標題 悪性症候群後に発症し、20年以上の経過後死亡した小脳性運動失調症の一部検例
3. 学会等名 第47回臨床神経病理懇話会・第10回日本神経病理学会中国四国地方会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	古川 絢子 (Furukawa Ayako) (10455537)	鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教 (34104)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	上野 正樹 (Ueno Masaki) (30322267)	香川大学・医学部・教授 (16201)	

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