

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830042

研究課題名(和文)アルツハイマー病細胞モデルにおけるエピジェネティック制御とシナプス機能の研究

研究課題名(英文)Research on the relationship between epigenetic modification and synaptic function

研究代表者

石塚 佑太(Ishizuka, Yuta)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50614179

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)：本研究は、アミロイドの神経細胞毒性をポストシナプスタンパク質ドレブリンの集積度を指標とすることにより、アミロイドによる神経細胞死に先立ってシナプス機能異常が惹起されること、およびこの異常がヒストン脱アセチル化酵素(HDAC: Histone deacetylase)の阻害剤であるSAHA(suberoylanilide hydroxamic acid: 別名ボリノスタット)の添加により防がれる事を明らかにした。近年、アミロイドはアルツハイマー病だけでなく、うつ病でも増加する事が報告されている。以上によりHDAC阻害薬が今後精神疾患の治療に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrate that ADDLs induce drebrin loss from dendritic spines in cultured hippocampal neurons without reducing drebrin expression or dendritic protrusion density. In addition, the inhibition of HDAC by SAHA attenuated ADDL-induced drebrin loss from dendritic spines. These results strongly suggest that the regulation of histone acetylation/deacetylation plays an important role in modulating actin cytoskeletal dynamics by inducing gene expression under cellular stress. Our findings provide insight into the mechanisms of amyloid toxicity and suggest that HDAC inhibitors may hold therapeutic potential in neuropsychiatric disorders, such as Alzheimer's disease and depression.

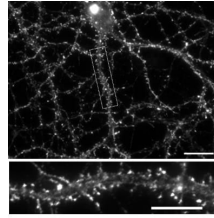
研究分野：神経薬理学

キーワード：神経細胞 シナプス 樹状突起スパイン Drebrin アルツハイマー病 A オリゴマー エピジェネティクス ヒストン脱アセチル化酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) Drebrin (ドレブリン)

drebrin は樹状突起スパインに局在し、スパインの形成・メンテナンスに関わるアクチン結合タンパク質である(右図は免疫細胞染色によって培養神経細胞における drebrin の局在を示している)。



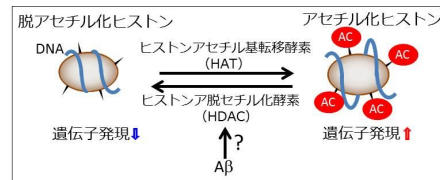
drebrin

また、drebrin は様々な刺激によってスパインからシャフト、またその逆にシャフトからスパインへも局在を変化させる。また、drebrin の局在の変化に伴いスパインの形態が変化する事から、シナプス機能に非常に重要な働きをしていると考えられている(引用文献 1, 2)。さらに、アルツハイマー病や認知機能障害において drebrin の発現量が顕著に低下している事から、認知機能と drebrin の関連性が強く示唆される(引用文献 3)。しかしながら、アルツハイマー病や認知機能障害における drebrin が減少するメカニズムは未だ明らかになっていない。

(2) エピジェネティクスとアルツハイマー病

アルツハイマー病モデルマウスにおいて、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) 活性が上昇している事(ヒストンの脱アセチル化亢進 = 遺伝子発現抑制) HDAC を阻害する事で認知機能障害が弱まる事が明らかとなり、アルツハイマー病においてエピジェネティックな変化が生じている事が強く示唆されている(引用文献 4)。しかしながら、アルツハイマー病における HDAC の活性変化がどのようなメカニズムでシナプス障害を引き起こしているのかは明らかとなっておらず、HDAC、drebrin、アルツハイマー病の相互関係を明らかにする事は病因の究明および治療にとって非常に重要である。また、近年、繊維化したアミロイドベータ ( $A\beta$ ) よりも可溶性  $A\beta$  オリゴマーが強い神経毒性をもっており、健常時、 $A\beta$  は分解され代謝されるが、ストレスなどで  $A\beta$  の代謝異常が引き起こされると連続的な可溶性  $A\beta$  オリゴマー暴露により、神経細胞の機能低下が生じ、認知機能障害やアルツハイマー病を発症するという仮説が立てられている。さらに、うつ病治療法(電気けいれん療法)で  $A\beta$  の作用を抑制できる事、うつ病の既往歴がアルツハイマー病発症のリスクファクターである事より、うつ病とアルツハイマー病の連続性も示唆されている(引用文献 5, 6)。本研究では、神経細胞を可溶

性  $A\beta$  オリゴマーに暴露させ、初期のアルツハイマー病を細胞レベルで再現した。



< 引用文献 >

- 1) Sekino Y, Tanaka S, Hanamura K, Yamazaki H, Sasagawa Y, Xue Y, Hayashi K, Shirao T. "Activation of N-methyl-D-aspartate receptor induces a shift of drebrin distribution: disappearance from dendritic spines and appearance in dendritic shafts." *Mol Cell Neurosci.* (2006) **31**:493-504.
- 2) Takahashi H, Yamazaki H, Hanamura K, Sekino Y, Shirao T. "Activity of the AMPA receptor regulates drebrin stabilization in dendritic spine morphogenesis." *J Cell Sci.* (2009) **122**:1211-1219.
- 3) Counts SE, He B, Nadeem M, Wu J, Scheff SW, Mufson EJ. "Hippocampal drebrin loss in mild cognitive impairment." *Neurodegener Dis.* (2012) **10**:216-219.
- 4) Kilgore M, Miller CA, Fass DM, Henning KM, Haggarty SJ, Sweatt JD, Rumbaugh G. "Inhibitor of class I histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease." *Neuropsychopharmacology.* (2010) **35**:870-880.
- 5) Yamamoto K, Ueta Y, Wang L, Yamamoto R, Inoue N, Inokuchi K, Aiba A, Yonekura H, Kato N. "Suppression of a neocortical potassium channel activity by intracellular amyloid- $\beta$  and its rescue with Homer1a." *J Neurosci.* (2011) **31**:11100-11109.]
- 6) Geerlings MI, den Heijer T, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. "History of depression, depressive symptoms, and medial temporal lobe atrophy and the risk of Alzheimer disease." *Neurology.* (2008) **70**:1258-1264.

2. 研究の目的

本研究ではマウス海馬培養神経細胞を用いて、アルツハイマー病におけるアクチン結合タンパク質 drebrin の減少のメカニズムを細胞・スパインレベルで明らかにする事を目的とする。また、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase; HDAC) 阻害剤 SAHA が  $A\beta$  オリゴマーによる drebrin のスパインへの集積低下を防ぐメカニズムをエピジェネティック制御に着目して明らかにする。アルツハイマー病や認知機能障害など、神経細胞の機能異常を呈する疾患を細胞・シナプスレベルで明らかにする事で、病因の究明およびエピジェネティクスを用いた新たな治療のアプローチ

## の基盤とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス海馬神経細胞初代培養法

胎生 16 日のマウス脳から海馬を取り出し、0.25%トリプシンを含んだ 5 ml の Hank's balanced salt solution (HBSS) で 37 度、10 分間インキュベートする。トリプシン処理後、上清を除去し、HBSS 5ml を加えて 37 度、5 分間インキュベートする (2 回繰り返す)。HBSS による 2 回のインキュベーション後、上清を除去し、HBSS を 5 ml 加える。組織の分散は以下の 2 種類のパストゥールピペットを用いて行う (A: ガスパナーによる若干の熱処理により先端部の角を丸くしたパストゥールピペット, B: ガスパナーで先端を細くした分散用パストゥールピペット)。まず、A で組織をピペッティングにより分散し (10 回)、続いて B でピペッティングし (5 回)、細胞懸濁液とする。培養前日に 9 cm ペトリディッシュにあらかじめ 1 mg/ml Poly-L-lysine でコートしたカバースリップ (18 mm 丸型; MATSUNAMI, Osaka) を 16 枚置き、10% FBS 入り MEM (Plating MEM) を入れておいたものに細胞密度 10,000 個/cm<sup>2</sup> になるように細胞懸濁液を添加する。3 時間後、細胞が付着しているカバースリップを取り出し、グリアのフィーダー層の上に、神経細胞が対面するようにセットし 35.8 度で共培養を開始した。細胞維持用培養液は B27 supplement (Life Technologies) を含んだ無血清 MEM を使用した (6 ml)。培養 7 日目、14 日目に 1/3 量の培地交換を行った。

#### (2) アストロサイト培養法

生後 1 日の新生ラット大脳皮質を単離し、0.25%トリプシン、0.1% DNase I を含んだ HBSS で、37 度で 15 分間インキュベート後、パストゥールピペットで適度に組織を分散させ、Fetal bovine serum (FBS) を加えた。その後、細胞溶液をレンズペーパーでろ過し、10% FBS を含んだ Minimum essential medium (MEM) 培養液を用いて、75 ml 培養プラスチック (PRIMARIA; FALCON, Franklin Lakes, NJ) で 37 度、0.5% CO<sub>2</sub> で培養した。細胞密度がコンフルエントな状態になるまで 10% FBS を含んだ MEM で、1 週間に 2 度培地交換をして培養した。その後、HBSS で 1 度洗浄し、トリプシン処理を行い細胞回収し、FBS を加え遠心分離機にかけた後、上澄みを取り除き、培養液で懸濁した。あらかじめ凍結用培養液が 500  $\mu$ l 入ったセラムチューブ (住友ベークライト, Tokyo) に、細胞懸濁液を 500  $\mu$ l 加えて、凍結した。培養神経細胞との共

培養 2 週間前に、前述の凍結大脳皮質グリア細胞を解凍し、60 mm 細胞培養ディッシュ (PRIMARIA; FALCON) に蒔き直し、細胞の密度が 60~70% の状態になるまで培養した。

#### (3) A $\beta$ オリゴマーの作製

ヒト A $\beta$  プロテイン (Peptide Institute, Inc., Osaka) 0.5 mg を室温に 30 分置く (平衡化)。ドラフト内で、氷で冷やした HFIP (1, 1, 1, 3, 3, 3-Hexafluoro-2-Propanol) で 1 mM にし、ポルテックスにより懸濁する。テフロンプラグのガラスシリンジでタンパク質低吸着 1.5 ml チューブに移し、パラフィルムで封をし、アミロイド  $\beta$ /HFIP 溶液を 2 時間室温でインキュベートする (モノマー化)。チューブの蓋を開け、バキューム遠心 (800g、室温) でチューブの底に透明のフィルム状の A $\beta$  タンパク質が見えるまで遠心する。フィルム状の A $\beta$  に DMSO (Dimethyl sulfoxide) を添加し、5 mM の A $\beta$  溶液とし、10 分間の超音波処理で再懸濁する。0.1 M リン酸緩衝液を加えて 100  $\mu$ M 溶液とし、4 度で 24 時間インキュベートする (オリゴマー化)。遠心で不溶化物を取り除き、A $\beta$ オリゴマー (ADDL) とした。

#### (4) cDNA のトランスフェクション法

cDNA のトランスフェクションは培養 7 日目に Lipofectamine 2000 を用いて行った。培養神経細胞が播種されたカバースリップを一度アストロサイトとの共培養から取り出し、pEGFP-C1 vector (Clontech, Palo, CA, USA) を遺伝子導入した。1 時間 35.8 度でインキュベートした後、アストロサイトとの共培養を再開した。

#### (5) ウェスタンブロット法

500  $\mu$ l の TBS (Tris-buffered saline, 20 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, プロテアーゼインヒビターカクテルを含む) を用いて一つの実験群につき 10 枚のカバースリップから細胞を 1.5 ml チューブへ回収した。遠心により、細胞を沈殿させ、上清を除去した後、100  $\mu$ l の細胞溶解バッファー (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2% SDS, 20 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, プロテアーゼインヒビターカクテル含む) を加え、超音波処理によりタンパク質を可溶化した。タンパク質濃度は DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) により決定した。次に、サンプルを等量 (10-20  $\mu$ g) 使用し、Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。電気泳動後のゲルを Immobilon-P polyvinylidene difluoride

membranes (Merck Milipore) にトランスプロットセル (Bio-Rad Laboratories) を用いて転写し、10% BSA/TBS (0.05% tween-20 含む) でブロッキング後、適切な一次抗体、二次抗体とインキュベーションし、化学発光にてシグナルの検出を行った ( Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Merck Milipore )。

### 一次抗体

抗アセチルヒストン H3 抗体 Lys9/14 ( Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA )、抗ヒストン H3 抗体 ( Cell Signaling Technology )、抗  $\beta$  アクチン抗体 ( Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA )、抗  $A\beta$  タンパク質 1-16 ( クローン 6E10、Covance Inc., Princeton, NJ, USA )

### 二次抗体

HRP ( horseradish peroxidase )- conjugated sheep anti-mouse IgG 抗体 ( GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK ), HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG 抗体 ( GE Healthcare UK Ltd. )

## (6) 免疫細胞化学

神経細胞を 4 % Paraformaldehyde ( 0.1 M リン酸緩衝液 ) で、15 分間固定し、生理食塩水 ( PBS ) で 4 回洗浄した後、0.1 % Triton X-100 を含む PBS で 5 分間処理し、さらに PBS で 4 回洗浄した。次に 3 % Bovine serum albumin を含む PBS ( PBSA ) で 1 時間ブロッキング処理を行い、PBSA で希釈した一次抗体を 4 で一晩反応させた。その後、PBS で 5 回洗浄し、二次抗体を室温で 2 時間反応させた。PBS で 5 回洗浄後、水溶性封入剤 ( PermaFluor ; Thermo, CA ) で封入した。

## (7) 画像取得・解析法 ( クラスター解析 )

細胞の画像は蛍光顕微鏡 ( Axio Imager 2, Zeiss, Jena, Germany ) を用いて、MetaMorph software ( Meta Imaging software Version 7.7; Universal Imaging, West Chester, PA ) により取得し、同 software を使って解析を行った。シナプスタンパク質 ( drebrin, synapsin I, PSD95 ) のクラスターを測定するために、培養神経細胞を抗 drebrin, synapsin I および PSD95 抗体、および細胞体・樹状突起が観察できる Rhodamine-Phalloidine ( F-actin ) で染色した。樹状突起内に 3 本線を引き、3 本線の輝度から、平均輝度を算出し、樹状突起の輝度とする。この平均輝度の 2 倍以上の値を持つ領域を drebrin クラスターとし、樹状突起 100  $\mu$ m 当たりの個数を

算出した。

## (8) 画像取得・解析法 ( dendritic protrusion 解析 )

GFP ( Green Fluorescent Protein: 緑蛍光タンパク質 ) を過剰発現させた培養神経細胞における dendritic protrusion ( 樹状突起上の突起でスパインとフィロポディアを区別しない ) 密度を計測した。長さが 0.5  $\mu$ m より大きく 8  $\mu$ m 未満の protrusion と定義し、100  $\mu$ m 当たりの密度を算出した。

## (9) 統計処理

一元配置分散分析を行い、各実験において適切な Post-hoc 比較 ( Dunnett 検定、Bonferroni 検定、Tukey-Kramer 検定 ) により危険率 0.05 を有意水準とした。

## 4. 研究成果

### (1) $A\beta$ オリゴマーの作製

まず始めに  $A\beta$ オリゴマーを作製し、オリゴマー化はウェスタンブロッティングにより確認した ( 図 1 )。



### (2) SAHA によるヒストンアセチル化の変化

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 ( SAHA ) を投与後 1 時間および 24 時間後で、ウェスタンブロットによりヒストンのアセチル化を検討したところ、両経過時間において、SAHA の用量依存性にアセチル化ヒストンの量が増加していた ( 図 2 )。

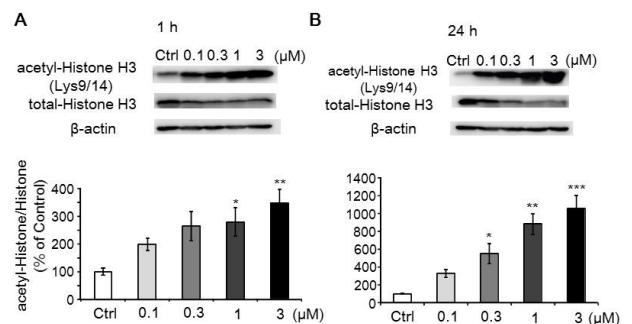


図2 SAHA 添加によるヒストンアセチル化の亢進培養神経細胞に SAHA ( 0.1-3  $\mu$ M ) を添加し、1 時間 ( A ) および 24 時間 ( B ) 後のヒストンのアセチル化をウェスタンブロット法により計測した。



(3) SAHA による dendritic protrusion 密度の変化

GFP 発現培養神経細胞に濃度をふって SAHA を添加し、dendritic protrusion (樹状突起上の突起)の密度を計測したが、SAHA による密度の変化は認められなかった(図3)。

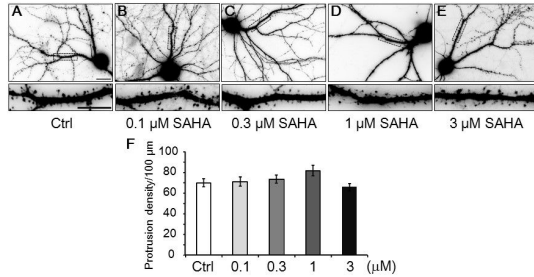


図3 SAHA添加によるdendritic protrusion密度の変化  
培養神経細胞にSAHA (0.1-3 μM) を添加し、24時間後のprotrusion密度を計測した。

(4) SAHA による drebrin および synapsin I クラスタ密度の変化

培養神経細胞に濃度をふって SAHA を添加し、drebrin および synapsin I クラスタの密度を計測したが、SAHA による密度の変化は認められなかった(図4)。

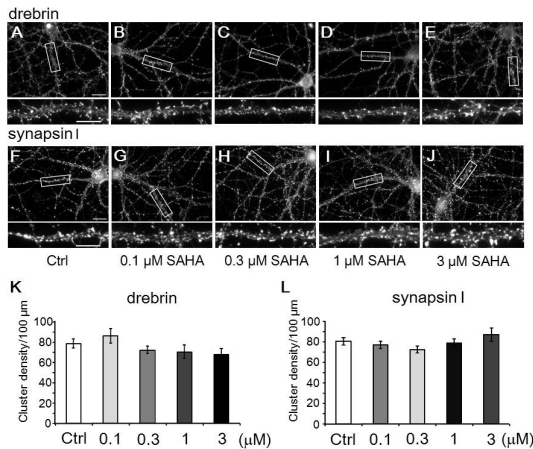


図4 SAHA添加によるクラスター密度の変化  
培養神経細胞にSAHA (0.1-3 μM) を添加し、24時間後のdrebrin およびsynapsin Iのクラスター密度を計測した。

(5) Aβオリゴマー暴露による drebrin クラスタ密度の減少

培養神経細胞に 100 nM の Aβオリゴマーを添加したところ、6 時間後、24 時間後のクラスター密度が低下した(図5K: Ctrl vs A 6 h & A 24 h)。一方、プレシナプスタンパク質である synapsin I クラスタは Aβオリゴマー暴露によるクラスターの密度低下は認められなかった(図5L)。

(6) SAHA は Aβオリゴマーにより惹起される drebrin クラスタの密度低下を防ぐ

1 μM の SAHA を添加しておくことで、Aβオリゴマー暴露による drebrin クラスタ減少を防ぐことができる(図5K)。

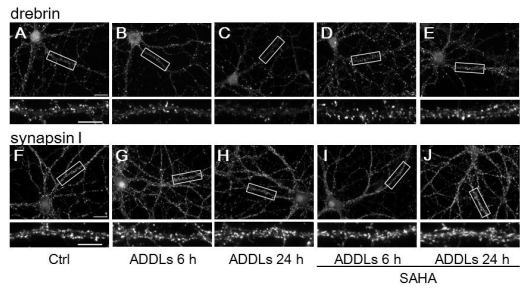


図5 アミロイドβオリゴマー暴露によるクラスター密度低下、および SAHA 添加による阻害  
培養神経細胞に1 μM SAHA を添加1時間後に100 nM アミロイドβオリゴマーを添加し、24時間後のdrebrinおよびsynapsin Iのクラスター密度を計測した。

(7) Aβオリゴマー暴露は PSD95 タンパク質のクラスター密度の低下を引き起こさない。

培養神経細胞に SAHA および 100 nM アミロイドβオリゴマーを添加し、6 時間後、24 時間後に drebrin と同じポストシナプスに集積するタンパク質である PSD95 のクラスター密度を計測したが、Aβオリゴマーによるクラスター低下および SAHA による変化は認められなかった(図6)。

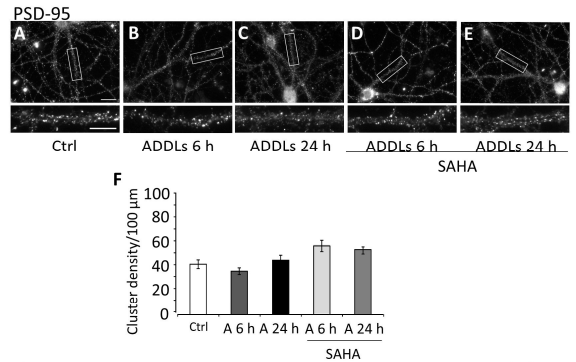


図6 SAHAおよびアミロイドβオリゴマー暴露によるPSD95クラスター密度変化、およびSAHA添加による阻害  
培養神経細胞に1 μM SAHAを添加1時間後に100 nM アミロイドβオリゴマーを添加し、24時間後のPSD95のクラスター密度を計測した。

(8) 100 nM Aβオリゴマーは drebrin のタンパク質量は減少させない。

本研究で用いた比較的低濃度(100 nM)および drebrin のタンパク質量を低下させると報告されている濃度(500 nM)の Aβオリゴマーを培養神経細胞に暴露させ、24 時間後の drebrin のタンパク質量をウェスタンブロット法により解析した。500 nM では先行研究同様、タンパク質量が低下したが、100 nM ではタンパク質量は低下しなかった(図7)。これらの結果より、Aβオリゴマーにより惹起されるスパインからの drebrin の消

失は、タンパク質量の低下ではなく、drebrin の局在がスパインから樹状突起のシャフトへ変化する、ということが考えられる。

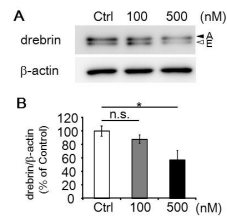


図7 アミロイドβオリゴマー暴露によるdrebrinタンパク質量の変化  
培養神経細胞に100 nM および500nM アミロイドβオリゴマーを添加し、24時間後のdrebrinのタンパク質量をウェスタンブロット法により計測した。

(9) 100 nM Aβ オリゴマーは dendritic protrusion の密度低下および形態変化を引き起こさない。

本研究で用いた Aβ オリゴマーの dendritic protrusion の密度および形態に対する影響を調べるために、100 nM Aβ オリゴマーを添加し、6 時間後および 24 時間後の密度と形態変化の解析を行ったが、Aβオリゴマーによる変化は認められなかった(図8)。

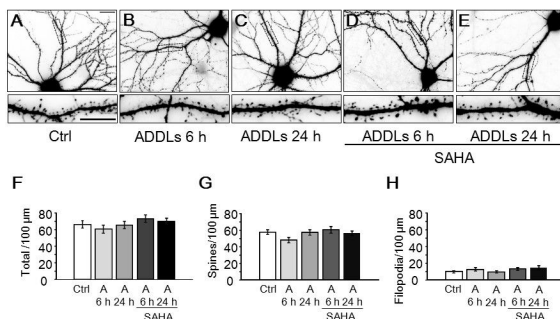


図8 SAHAおよびアミロイドβオリゴマー暴露によるdendritic protrusionの密度と形態変化の解析  
GFP発現培養神経細胞に1 uM SAHAおよび100 nM アミロイドβオリゴマーを添加し、24時間後のdendritic protrusionの密度および形態変化を解析した。

<結論>

本研究により、Aβ の毒性により細胞死に先立ってシナプス機能異常が惹起されること、およびこのシナプス異常がヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を阻害する事で防がれる事を明らかとした。近年、Aβ はアルツハイマー病だけでなく、うつ病でも増加する事が報告されている。以上によりHDAC 阻害薬が今後精神疾患の治療に応用できる可能性が示唆された。

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. Ishizuka Y, Shimizu H, Takagi E, Kato M, Yamagata H, Mikuni M, Shirao T. (2014) “Histone deacetylase mediates the decrease

in drebrin cluster density induced by amyloid beta oligomers.” *Neurochem Int.* 76: 114-121. 査読有  
DOI: 10.1016/j.neuint.2014.07.005.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Ishizuka Y, Shimizu T, Shirao T. (2015) “Histone deacetylase mediates the decrease in drebrin cluster density induced by amyloid beta oligomers.” The 58<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Omiya, Japan. 2016/09/12 (Symposium, Invited, “Therapeutic targets and strategies for Alzheimer’s and Parkinson’s diseases.”) (大宮ソニックシティ)
2. Ishizuka Y, Shimizu T, Shirao T. (2015) “Histone deacetylase mediates drebrin loss from dendritic spines induced by amyloid beta oligomers.” The 25<sup>th</sup> Biennial Meeting of ISN-APSN, Cairns, Australia. 2015/08/26-27
3. Ishizuka Y, Shimizu T, Shirao T. (2015) “Histone deacetylase mediates the decrease in drebrin cluster density induced by amyloid β-derived diffusible ligands.” The 5<sup>th</sup> International Society of Radiation Neurobiology, Gunma, Japan. 2015/02/21 (高崎シティギャラリー)
4. Ishizuka Y, Shimizu T, Shirao T. (2014) “Amyloid beta oligomers induce drebrin exodus from dendritic spines via histone deacetylase.” The 6<sup>th</sup> special conference of the International Society for Neurochemistry, Tokyo, Japan. 2014/09/21-22 (東京大学)
5. Ishizuka Y, Shimizu T, Shirao T. (2014) “Amyloid beta oligomers induce drebrin exodus from dendritic spines via histone deacetylase” The 57<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Nara, Japan. 2014/09/29 (奈良県文化会館)
6. Ishizuka Y, Shimizu T, Shirao T. (2014) “Histone deacetylase is involved in the decrease of drebrin cluster density induced by amyloid beta oligomers.” The 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuroscience 2014), Yokohama, Japan. 2014/09/12 (パシフィコ横浜)

〔その他〕

ホームページ等  
群馬大学大学院 医学系研究科 神経薬理学  
<http://neuro.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石塚 佑太 (ISHIZUKA, Yuta)

群馬大学大学院・医学系研究科・神経薬理学・助教

研究者番号：50614179