

博士論文

論文題目

海馬ニューロン新生における

Diazepam binding inhibitor (DBI)の分化抑制機能

氏 名 金子 順

目次

要旨	4
【序論】	4
【結果と考察】	5
1.ニューロン新生における DBI の機能	5
2.AD モデルマウスでの DBI の発現とニューロン新生.....	6
3.AD モデルマウスにおける DBI の発現抑制がニューロン新生に与える作用	8
【結論】	9
はじめに	10
 第一章 ニューロン新生における DBI の役割	
1.1 序論.....	14
1.2 実験方法	17
1.2.1 実験動物	17
1.2.2 293T 細胞	17
1.2.3 Plat-GP cell.....	18
1.2.4 Mouse striatal precursor-1 (MSP-1) 細胞.....	18
1.2.5 レンチウイルス.....	19
1.2.6 レトロウイルス.....	20
1.2.7 プラスミドの増幅、精製.....	20
1.2.8 Western Blot.....	21
1.2.9 灌流固定	22
1.2.10 切片作成	23
1.2.11 免疫染色	23
1.2.12 レンチウイルスの作製.....	27
1.2.13 レトロウイルスの作製.....	29

1.2.14	マウスへのウイルスを用いた RNAi.....	29
1.2.15	神経幹細胞、神経前駆細胞での発現.....	32
1.2.16	DBI の抑制効果の評価.....	32
1.2.17	新生細胞における DBI の抑制.....	32
1.3	結果.....	34
1.3.1	海馬での DBI の発現.....	34
1.3.2	DBI の発現抑制.....	38
1.4	考察.....	49
 第二章 アルツハイマーモデルマウスにおける DBI とニューロン新生		
2.1	序論.....	54
2.2	実験方法.....	56
2.2.1	実験動物.....	56
2.2.2	High Fat Diet と Carnosine の投与.....	56
2.2.3	免疫染色による DBI の発現.....	59
2.2.4	アルツハイマーモデルマウスにおける DCX の発現.....	61
2.2.5	DBI の抑制後のニューロン新生の作用.....	63
2.3	結果.....	65
2.3.1	アルツハイマーモデルマウスにおける DBI の発現.....	65
2.3.2	アルツハイマーモデルマウスにおけるニューロン新生と DBI の抑制.....	70
2.4	考察.....	83
総括.....		87
略語一覧ならびに主要な専門用語の簡単な解説.....		90
引用文献.....		93
謝辞.....		109

要旨

【序論】

従来成体の脳では新たに神経が産み出されることはないと言われていた。しかし近年の研究により、生涯にわたり脳の特定の領域においては、持続的にニューロン新生が生じていることが明らかになった。海馬はニューロン新生領域の一つであり、記憶や学習といった脳の高次機能を担っており、これらの機能に対して新生ニューロンの寄与が示唆されている。事実、ニューロン新生を増加させたマウスでは、海馬依存的な記憶学習の成績の向上が見られ、その一方で、放射線や遺伝子操作によりニューロン新生を減少させると、記憶学習機能は低下することが明らかにされている。またアルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) やうつ病などの神経疾患においても、新生ニューロンの機能低下や減少などが報告されており、神経疾患との関係も示唆されている。特にアルツハイマー病モデルマウスにおいて、GABA (γ (gamma)-aminobutyric acid) シグナルのインバランスが生じ、その結果としてニューロン新生の障害が起きているとの報告がある (Sun et al., Cell Stem Cell, 2009)。そのため、ニューロン新生を制御する要因や、病態モデルにおけるニューロン新生の関わりを解明することが求められている。

当研究室の先行研究において、GABA 刺激によって海馬におけるニューロン新生が促進する事が明らかにされている (Tozuka et al., Neuron, 2005)。そこで GABA アゴニストである、Diazepam と Pentobarbital を投与する実験を行った。その結果 Pentobarbital にはニューロン新生の促進効果がみられたが、Diazepam には見られなかった (Nochi et al., J Neurosci Res 2013)。これにより、内因性の GABA シグナルを抑制する機構の存在が示唆された。そこで本研

究では GABA 受容体のインバースアゴニストである Diazepam Binding Inhibitor (DBI) に着目した。DBI とそのフラグメントである Octadecaneuropeptide proteolytic product (ODN) は GABA_A 受容体に結合し、Cl⁻の流入を抑制する事が知られている (Alfonso et al., Cell Stem Cell, 2011)。さらに DBI は神経幹細胞および神経前駆細胞で発現していることを確認した (Nochi et al., 2013)。本研究では、海馬内における DBI の発現、及び機能を RNAi 法により明らかにする事と、AD モデルマウスにおける DBI の発現とニューロン新生に与える作用を明らかにすることを目的とした。

【結果と考察】

1. ニューロン新生における DBI の機能

DBI に対する RNAi 配列を設計し、この配列を組み込んだレンチウイルスベクターを作製した。またコントロールベクターには、既に報告のある何の作用もないスクランブル (Scramble, SCR) 配列を組み込んだ (Katayama et al., FASEB J, 2004)。レンチウイルスを構成するコンストラクトおよび、ノックダウン (Knock Down, KD) 配列および、SCR 配列は図 1 に示した。これ

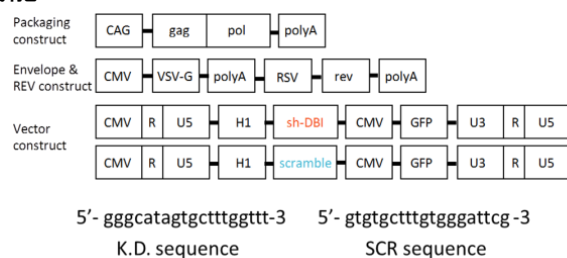


図 1 レンチウイルスの配列とコンストラクト
レンチウイルスのコンストラクトおよび、K.D.と SCR 配列を示した。このプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、ウイルスを作製した。

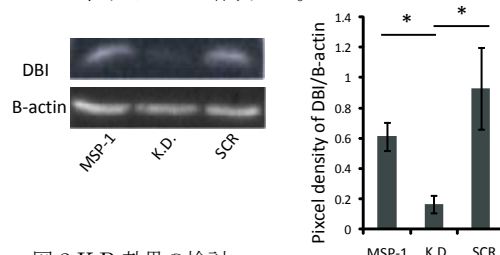


図 2 K.D.効果の検討
インタクトな MSP-1 細胞、K.D.および SCR ウイルスを感染させた細胞において DBI の発現量を WesternBlot により比較し効果を確認した。n=3, T-test, *p<0.05

らのプラスミドを用いて 293T 細胞よりレンチウイルスを作製した。DBI 抑制効果の検討は p53 ノックアウトマウスの胎仔期における大脳基底核から樹立さ

れた神経幹細胞様細胞株である Mouse Striatum Precursor-1 (MSP-1)細胞において行った。感染 1 週間後、タンパク質を抽出し、Tricine-SDS PAGE を用いた Western Blot 法により DBI の抑制効果を確認した(図 2)。

作製した KD ウイルスおよび、SCR ウイルスをマウスの海馬に直接投与し、歯状回の細胞に感染させた。また mCherry がレポーターとして組み込まれたレトロウイルスを同時に感染させ新生ニューロンを標識した。感染 1 週間後、灌流固定を行い、脳切片を作製した。レトロウイルスの mCherry を発現している細胞を新生細胞とし、これらに KD または SCR のウイルスが感染した GFP 陽性細胞に対して、分化の進行度を未成熟ニューロンマーカーである DCX により評価した。その結果 DBI が抑制された KD 群では DCX 陽性の細胞が有意に増加し、分化の亢進が見られた(図 3)。これにより海馬における DBI は神経幹細胞や神経前駆細胞の分化を抑制している事が示唆された。

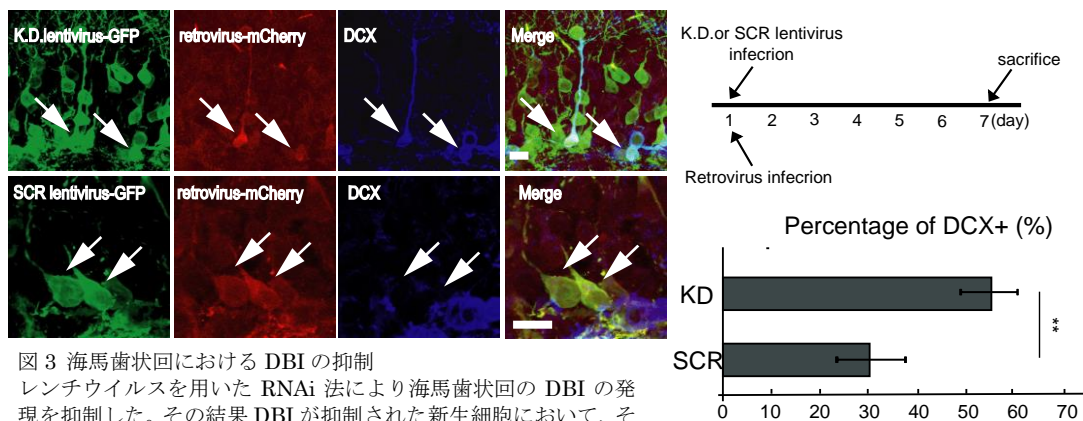


図 3 海馬歯状回における DBI の抑制
レンチウイルスを用いた RNAi 法により海馬歯状回の DBI の発現を抑制した。その結果 DBI が抑制された新生細胞において、その分化が促進され、DCX 陽性細胞となる細胞が増加した。Scale bar 10 μ m 各群 N=3, n=10, T-test, **p<0.01

2. AD モデルマウスでの DBI の発現とニューロン新生

AD モデルマウスとして用いられるトランスジェニックマウス (Tg, APP^{swe}/PS1 Δ E9) の、海馬歯状回における DBI の発現を免疫染色により比較した。この Tg マウスは 12 ヶ月齢を超えると明瞭に AD の症状である、アミロ

イド B (Aβ) の蓄積や海馬依存的な認知記憶に障害を示すモデルマウスである。これに加えて、先行研究において High Fat Diet (HFD) を生後 4 カ月齢から 2 カ月間与えることで、早期に認知記憶

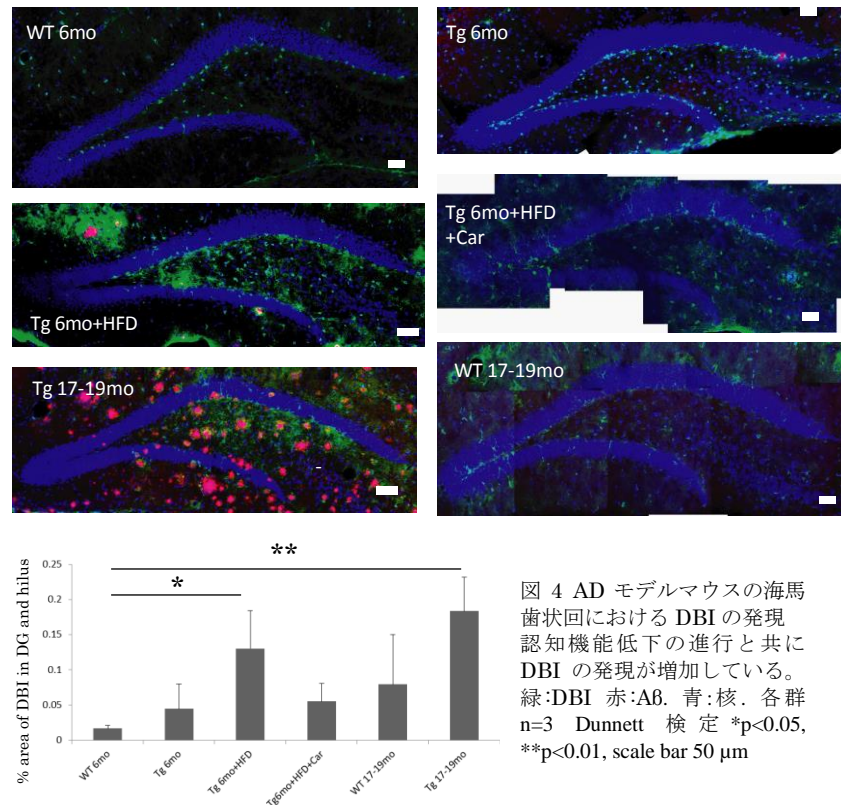


図 4 AD モデルマウスの海馬歯状回における DBI の発現。認知機能低下の進行と共に DBI の発現が増加している。緑:DBI 赤:Aβ. 青:核. 各群 n=3 Dunnett 検定 *p<0.05, **p<0.01, scale bar 50 μm

障害を誘導できることが示されている。またこの症状は抗酸化物質である Carnosine (Car) を HFD 投与開始 2 週間後より 6 週間与えると、認知記憶の低下が抑制される (Herculano., et al, J Alzheimers Dis, 2013)。野生型 (WT) マウスの 6 カ月齢、Tg マウスの 6 カ月齢、Tg マウスの 6 カ月齢に HFD を給餌したマウス、Tg マウスの 6 カ月齢に HFD と Car を給餌したマウス、WT および Tg マウスで 17-19 カ月齢の 6 群を用いて、海馬歯状回および hilus 部における DBI の発現領域の割合を比較した。その結果、認知記憶障害を示す、Tg マウスの 6 カ月齢に HFD を与えた群、Tg マウスの 17-19 カ月齢で有意な DBI の発現の上昇が見られた (図 4)。さらに認知記憶障害が改善される Car を投与した群では DBI 発現が抑制されており、DBI の増加と認知記憶の低下が一致していた。

次に分化を抑制すると考えられた DBI が AD モデルマウスにおいて増加しているため、未成熟ニューロンへの影響を DCX 染色により評価した。DBI の海馬

における発現が AD モデルマウスのニューロン新生に影響があるのかを調べるために WT マウスの 6 ヶ月齢、Tg マウスの 6 ヶ月齢、Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD 給餌マウス、Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD および Car 給餌した 4 群で DCX 陽性の未成熟ニューロンにおける突起の形態を比較した。顆粒細胞層にいる未成熟ニューロンは分子層まで突起を伸長させ、貫通繊維と連絡し回路を形成する。貫通繊維層まで突起が伸長している DCX 陽性細胞が全 DCX 陽性細胞に占める割合を各群で比較した。その結果、認知記憶障害を示し、DBI の発現が高かった Tg マウスに HFD を給餌した群では有意な減少が見られ、新生ニューロンの成熟に障害が起きている可能性が示唆された。またこの成熟、分化に与える影響は Car 投与群では回復し、DBI の発現と一致している結果となった (図 5)。

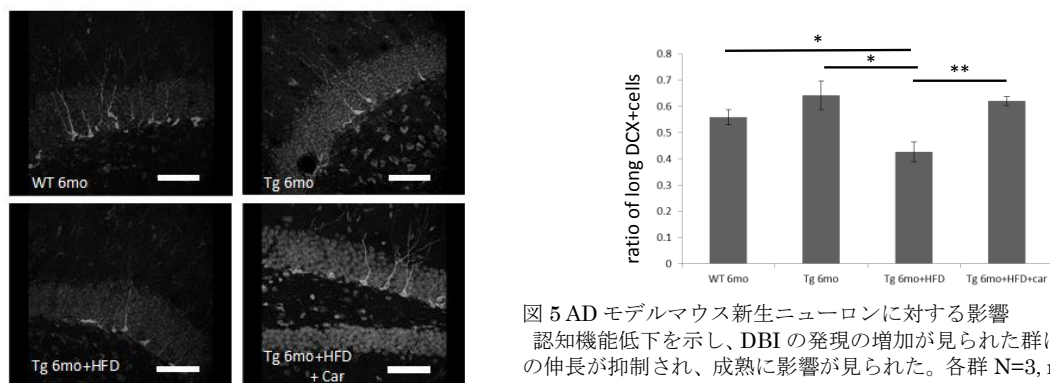


図 5 AD モデルマウス新生ニューロンに対する影響
認知機能低下を示し、DBI の発現の増加が見られた群において突起の伸長が抑制され、成熟に影響が見られた。各群 N=3, n>20, T-test, *p<0.05 **p<0.01, scale bars 50 μ m

3. AD モデルマウスにおける DBI の発現抑制がニューロン新生に与える作用

Tg マウスに HFD を与え、早期に AD を発症させたマウスに対して、海馬領域における増加した DBI の発現をレンチウイルスの感染により抑制した。ウイルス感染後、1 週間で灌流固定をした。免疫染色によりウイルスが感染した歯状回領域における DCX 陽性細胞の突起の伸長を比較すると DBI の抑制により、AD モデルマウスで低下した新生ニューロンの突起の伸長が回復している様子

が観察された (図 6)。

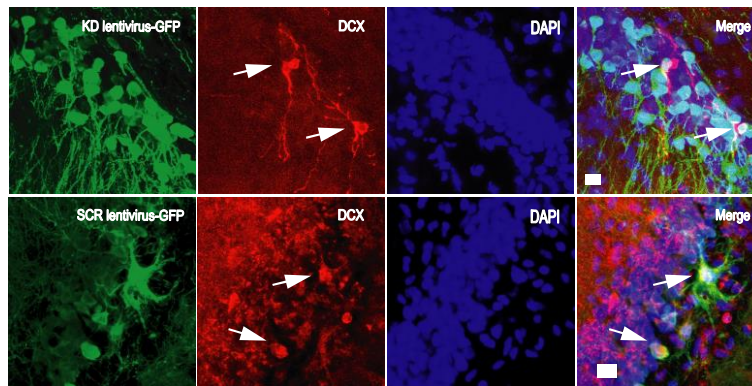


図.6 AD モデルマウスにおける DBI 抑制の効果

AD モデルマウスにおいて増加した DBI の発現の抑制を行った結果 DCX 陽性の未成熟ニューロン(矢印)の突起の伸長が見られた。Scale bars 10 μ m

【結論】

DBI は神経幹細胞および神経前駆細胞に強く発現し、これらの細胞の分化を抑制することで海馬歯状回における未分化細胞を維持する事に関与していると推察された。神経幹細胞や神経前駆細胞から細胞外に放出された DBI が GABA_A 受容体に結合することで相対的に GABA シグナルを低下させ、分化を抑制していると考えられる。その一方で、AD モデルマウスの海馬歯状回では DBI 発現が増加している。この DBI の産生が正常なニューロン分化を抑制してしまい、AD の症状である認知記憶障害を引き起こす可能性が示唆された。

はじめに

神経科学、特に脳領域は依然として未解明な領域が多く存在する分野である。脳は記憶、学習、記憶、等様々な高次機能を持ち、それぞれが徐々に解明されつつある。その中で、時として大きなパラダイムシフトを生み出すことがある。本研究でのメインテーマであるニューロン新生もその一つである。20 世紀初頭、神経は胎生期から新生期に形成され、成体期では新たに作られることはないと言われていた。しかし、ラジオアイソトープを利用した研究などにより、成体期になっても新たに神経細胞が作り続けられている事が明らかになった (Altaman., 1962)。この成体期のニューロン新生は脳領域全域で起きているのではなく、特定の領域で起きている。その一つが海馬である。海馬は記憶や学習といった脳の高次機能を担っている。これらの機能は生後に獲得されるものであり、生後のニューロン新生との関わりが考えられた。事実、成体ニューロン新生は記憶や学習との関わりを示す報告がされるようになった (Van der Borgh et al., 2007; Van Pragg et al 1999)。

また、その一方で、ニューロン新生がうつ病やアルツハイマー病といった神経疾患との関与を示唆されるようになってきた (Warner JL et al., 2006; Winner B et al., 2011; Mu Y et al., 2011; Eisch et al., 2012)。うつ病の治療薬であるセロトニンやノルアドレナリンといったモノアミンを増加させる薬剤が

中心として用いられているが、その作用機序に関して不明なこともある。抗うつ薬の投与により、脳内のモノアミンは数時間で増加するのに対して、治療効果は抗うつ薬の慢性的な投与を数週間持続させないと効果が得られない。そこでニューロン新生との関与が取りただされるようになった。なぜならば、抗うつ剤の投与はニューロン新生を増加させ、逆にうつ病発症の危険因子とされるストレスによって抑制される。これにより抗うつ薬による治療メカニズムの新しい仮説として注目されている。

アルツハイマー病においても、ニューロン新生が低下しているとの報告があり (Verret L, et al. 2007)、アルツハイマー病の症状の一つである、記憶機能の低下はこのニューロン新生の低下によるものとする仮説がある。そのため、ニューロン新生を低下させている原因や機構を明らかにすることはアルツハイマー病の症状の低減につながると考えられる。

この様にニューロン新生は脳の記憶や学習といった恒常的な機能に加え、それに付随する疾患とも関与するとされている。そのため、ニューロン新生を制御するメカニズムを明らかにすることは、疾患への臨床応用も考えられ、意義のある研究の一つである。

本研究では GABA 受容体のインバースアゴニストであり (Bormann et al., 1988; Costa et al., 1991)、かつアルツハイマー病患者の脳脊髄液中や前頭前野

皮質で増加している Diazepam binding inhibitor (DBI) に着目し (Luchetti et al., 2011)、第一章では野生型マウスを用いて、ニューロン新生における DBI の機能を明らかにすることを目的として研究を行なった。その結果、DBI は神経幹細胞や神経前駆細胞といった未分化な細胞に発現し、これらの細胞の分化を抑制する機能を持つことが示唆された。

また第二章ではアルツハイマーモデルマウスを用いて、DBI の発現の変化、及びニューロン新生に与える作用について調査した。アルツハイマーモデルマウスでは、海馬歯状回およびハイラス部の DBI の発現が増加し、この過剰な DBI の発現がアルツハイマーモデルマウスのニューロン新生を抑制している事が示唆された。

一章 ニューロン新生における DBI の役割

1.1 序論

従来成体の脳では新たに神経が産み出されることはないと言われていた。しかし近年の研究により、生涯にわたり脳の特定の領域においては、持続的にニューロン新生が生じていることが明らかになった (Allen et al., 1912; Messier et al., 1958; Altman et al., 1962; Altman et al., 1965a; Altman et al., 1965b)。海馬はニューロン新生領域の一つであり、記憶や学習といった脳の高次機能を担っており、これらの機能に対して新生ニューロンの寄与が示唆されている (Williams et al., 2001; Brown et al., 2003; Kitamura et al., 2009; Sahay et al., 2011)。事実、ニューロン新生を増加させたマウスでは、海馬依存的な記憶学習の成績の向上が見られ (Van der Borght et al., 2007; Van Pragg et al., 1999)、その一方で、放射線や遺伝子操作により新生ニューロンを減少させると、記憶学習機能は低下することが明らかにされている (Madsen et al., 2003; Raber et al., 2004; Rola et al., 2004)。

そこでニューロン新生を促進する機構を明らかにするため、多くの研究が行われた。その一つとして、GABA 刺激によって海馬におけるニューロン新生が促進する事が明らかにされている (Tozuka et al., 2005)。そこで GABA アゴニストである、Diazepam と Pentobarbital を投与する実験を行った。その結果 Pentobarbital にはニューロン新生の促進効果がみられたが、

Diazepam には見られなかった (Nochi et al., 2013)。これにより、内因性の GABA 入力を抑制する機構の存在が示唆された。そこで本研究では GABA 受容体のインバースアゴニストである DBI に着目した。DBI はラット脳から単離された 10 kDa の小さなペプチドである (Guidotti et al., 1983)。DBI はアシル化された脂肪酸の輸送、蓄積、保護に加え、ミトコンドリアへのコレステロールの輸送等その機能は多岐にわたるため、その発現は広範に渡って発現している。中枢神経系においては特に嗅球、海馬に強く発現し、GABA 受容体のインバースアゴニストとしても機能することが知られている (Alho et al., 1985; Shoyab et al., 1986; Ferrarese et al., 1989; Tong et al., 1991; Slobodyansky et al., 1992; Yanase et al., 2002; Siiskonen et al., 2007)。これらの機能に加え、ニューロン新生領域である側脳室下帯において DBI とそのフラグメントである Octadecaneuropeptide proteolytic product (ODN) は細胞増殖を促すことが報告された (Alfonso et al., 2011)。一方同じくニューロン新生領域の海馬では DBI は神経幹細胞や神経前駆細胞のマーカーとして用いられる FABP7 (Fatty acid binding protein 7) と共発現している事が報告されている (Yanase et al., 2001)。そのため海馬においても DBI がニューロン新生に対してなんらかの関与が示唆されている。

そこで本研究では DBI の海馬ニューロン新生過程における発現の推移、及

びニューロン新生における機能を明らかにするために、免疫抗体染色および RNAi を用いて機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

1.2 実験方法

1.2.1 実験動物

東京大学山口正洋博士より提供頂いた Slc:ICR マウス血統の NestinP-GFP トランスジェニックマウス (Yamaguchi et al., 2000) (6 週齢)及び Slc:ICR マウス (三共ラボ) (6 週齢)を用いて実験を行った。これら実験動物は、研究室にあるクリーンルームにて飼育用のケージに入れられ、室内気温 24 ± 1 °C、12 時間周期で昼夜を切り替える (午前 8 時に飼育室の電気を点灯し、午後 8 時に消灯するサイクル) 環境で飼育した。飼育は W220 mm × L320 mm × H135 mm のプラスチックケージの中で滅菌した脱イオン水および固形飼料 MF (オリエンタル酵母) を与えて行った。また、実験動物の取り扱いについては、東京大学規定の “Experimentation protocols approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Tokyo” に則って実施され、使用実験動物数を最小限にするように努めた。

1.2.2 293T 細胞

レンチウイルスを作成するにあたって、理化学研究所バイオリソースセンター細胞運命情報解析技術開発サブチームの三好浩之博士により供与された

293T 細胞を用いた。この 293T 細胞は SV40 large T antigen を発現している胎児腎細胞 (293 細胞) 由来である。培地の組成は DMEM (high glucose, GIBCO)、に 10% FBS (lot, No. A70180-1555, PAA THE CELL CULTURE COMPANY)、1% 抗生物質-抗真菌剤混合溶液 (100 倍濃縮, 濾過滅菌済み, Nacalai Tesque)、L-グルタミン 2 mM (Wako) を使用し、10% CO₂、37°C の条件下で培養した。継代は細胞がコンフルエントになった段階で行った。

1.2.3 Plat-GP cell

レトロウイルスを作製するにあたって、富山大学井ノ口馨博士より供与頂いたパッケージング細胞、Plat-GP 細胞を用いた。培地の組成は DMEM (high glucose, GIBCO)、に 10% FBS (lot, No. A70180-1555, PAA THE CELL CULTURE COMPANY)、1% 抗生物質-抗真菌剤混合溶液 (100 倍濃縮, 濾過滅菌済み, Nacalai Tesque)、L-グルタミン 2 mM (Wako) を使用し、10% CO₂、37°C の条件下で培養した。継代はコンフルエントになった段階で行った。

1.2.4 Mouse striatal precursor-1 (MSP-1)細胞

胎仔期 p53 ノックアウトマウスの大脳基底核から樹立された神経細胞様株 (Yamada et al., 1999; Muramatsu et al., 2005)。DMEM/F12 (GIBCO) に炭酸

水素ナトリウム 1.21 g/l (Wako)、1%抗生物質-抗真菌剤混合溶液 (100 倍濃縮, 濾過滅菌済み Nacalai Tesque)、10%FBS (lot, No.A70180-1555, PAA THE CELL CULTURE COMPANY)および basic fibroblast growth factor (bFGF) 10 µg/ml (Invitrogen) を添加した培地を使用し、5%CO₂、37℃の条件下で培養した。継代はコンフルエントになった段階で行った。

1.2.5 レンチウイルス

レンチウイルスの作製に用いたプラスミドは理化学研究所バイオリソースセンター細胞運命情報解析技術開発サブチームの三好浩之博士により供与されたプラスミドを用い作製した。Knock Down (以下 KD) および Scramble (以下 SCR) のベクタープラスミドは先行研究 (木村 修士論文, 2010) により作成されたものを用いた。DBI の抑制には以下の配列 (5'-gatcccc ggccatagtgctttggttt acgtgtgctgtccgt aaaccaaggcattatgtcc ttttt ggaaat-3') を EF-1α プロモーターを持つ CS-RfA-EG short hairpin expression Vector に組み込まれたものを使用した。コントロールとして何の作用も確認されていない以下の配列 (5'-gatcccc gcgcgctttgtaggattcg acgtgtgctgtccgt cgaatcctacaaagcgcgc tttttggaaat-3'), (Katayama et al., 2004) を、KD と同様に組み込んだものを使用した。パッケージングプラスミドには CAG プロモーター下に gag および pol が組み込まれた

pCAG-HIVgp、CMV プロモーター下に VSV-G、RSV プロモーター下に Rev が組み込まれた、pCMV-VSV-G-RSV-Rev を用いた。

1.2.6 レトロウイルス

レトロウイルスの作製には富山大学の井ノ口馨博士により供与されたレトロウイルスベクター、pMX-sSIN-CAG-mCherry および VSV-G を使用した。レトロウイルスは細胞分裂中の細胞においてのみ、組み換えを生じさせるためウイルス感染時に分裂していた細胞でのみ mCherry を発現させることが出来る。そのため新生細胞を標識するために用いた。

1.2.7 プラスミドの増幅、精製

使用したプラスミドは TE Buffer (ニッポンジーン) に懸濁し、大腸菌 (DH5 α , TAKARA) にトランスフォームした。コロニー単離後、13.3% グリセロールストック (Wako) を作成した。このグリセロールストックを、プラスグロウ培地 (Nacalai Tesque) で培養し Mega prep kit (QIAGEN) により増幅、精製し、吸光度計 (Amersham Bioscience, Ultrospec 6300 pro) によりプラスミド溶液の吸光度から濃度を測定した。精製したプラスミドを電気泳動し、塩基数から

精製されたプラスミドを確認した。

1.2.8 Western Blot

海馬における DBI の発現、抗 DBI 抗体の親和性、及び RNAi 法による DBI の発現抑制効果を評価するために Western Blot を行った。タンパク質の調整には ICR マウスの海馬と小脳を用いた。小脳は DBI の強い発現が確認されている、脳領域であるためコントロールとして用いた。

頸椎脱臼法により安楽死させた。その後、即時抜脳し、冷却した PBS 中で海馬と小脳を脳組織から切り取り、採取した。採取した海馬と小脳は Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.5 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM DTT, 25 mM β-glycerophosphate, and 1 mM sodium orthovanadate) に入れ、氷上で超音波破碎装置 (UR-20P, トミー精工) にてホモジェナイズした。この溶液を 4°C、13200 rpm で 15 分遠心し (Centrifuge 5415R, eppendorf)、上清をサンプル溶液とした。このサンプルを -80°C に保存し、適宜使用した。

Bio Rad タンパクアッセイ (Bio-Rad) を用いてタンパク質の濃度を測定し、40 µg のタンパク質を loading buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.25 mg/ml bromophenol blue, 5% β-mercaptoethanol) と混ぜ、95°C で

5 分間還元処理を行った。タンパク質を分離するために 12%ポリアクリルアミド Tricin ゲルを用いて、SDS-PAGE を行った。その後、湿式法により polyvinylidene fluoride membranes (PVDF) (PALL, Pensacola, FL) に転写した。転写が終了した後、5%スキムミルク/ wash buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) で一時間、室温でブロッッキングし、抗 DBI 抗体、抗 beta-actine 抗体で一晩インキュベートした。PVDF 膜を洗浄した後、HRP-conjugated 二次抗体と 1 時間室温で反応させた。洗浄後、LaminateTM Forte Western HRP substrate (Millipore) と 5 分間反応させ LAS1000 (GE healthcare) により検出した。

RNAi の抑制効果の確認においては、インタクトな MSP-1 細胞、及び KD ウイルス、及び SCR ウイルスを感染させた MSP-1 細胞を 4 日間培養し、培地を除去し、PBS で洗浄した後、Lysis buffer 500 μ l/100 mm dish を添加し、タンパク質を抽出した。この溶液を 4°C、13200 rpm で 5 min 遠心し、上清をサンプルとした。Western Blot は同様の方法を用いた。

1.2.9 灌流固定

マウスに麻酔した後、腹部を切開し心臓を露出させた。左心房に針を刺し、PBS を 40 ml 灌流した後、40 ml の 4%パラホルムアルデヒド (Wako) で灌流固定した。脳を取り出し、24 時間、4°Cで、4%パラホルムアルデヒドに漬け置

き（後固定）、30%スクロース（Wako）/PBS に交換して、同じく 4℃で二日間置いた。

1.2.10 切片作成

溶液を除去し、コンパウンド（Tissue Tek O.C.T Compuond）で包埋し、-80℃で一時間以上凍結させた。凍結後クライオスタット（Microm 社）で海馬を 40 μm の厚さで切り出した。切り出した切片は PBS で一度すすいだ直後、クライオプロテクトANT（0.2 M Na_2HPO_4 12.8 ml/l（Wako）, 0.2 M NaH_2PO_4 3.2 ml/l（Wako）, DW 384 ml/l, ethylen glycol 300 ml/l（Wako）, glycerol 300 ml/l（Wako））に漬けて遮光した上で-30℃で保存した。

1.2.11 免疫染色

切片を TBS で 10 分間 3 回洗った後、100%メタノール（Wako, Osaka, Japan）で室温下 30 分間処理をした。TBS で 10 分間洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液で 90℃、5 分間インキュベーションした。室温まで放置し、TBS で 10 分間洗浄した。1 M の塩酸で 37℃、30 分間処理し、その後 0.1 M ホウ酸緩衝液で 10 分間中和し、TBS で 10 分間、2 回洗浄した。この切片を、ブロッキング溶液（0.1 % Triton X-100

及び 5 % Normal Donkey Serum (NDS) を含む Tris Buffer Saline (TBS)) で、室温下で 30 分間保持し、その後、一次抗体をブロッキング液中に加え 4℃で 3 日間反応させた。その後 TBS にて 10 分間 3 回洗浄し、その後二次抗体を含むブロッキング液で室温 2 時間反応させた。この切片を TBS で 10 分間 3 回洗浄した。TBS で 10 分間 1 回、15 分間で 2 回洗浄した後、スライドガラスにのせ、ImmuMount (Shandon, Pittsburgh, PA) で封入した。本実験で使用した抗体について、一次抗体については Table1 に、二次抗体については Table2 にまとめた。

Table1: 使用した一次抗体

抗体名	供給元	由来	希釈率
一次抗体			
Anti-DBI	北海道大学 岩永敏彦博士	rabbit IgG	1:200
Anti-GFP	Nacalai tesque	rat IgG	1:2000
Anti-GFAP	Sigma	mouse IgG	1:200
Anti-DCX	Millipore	guinea pig IgG	1:4000
Anti-Sox2	SantaCruz	goat IgG	1:400
Anti-Prox1	Millipore	rabbit IgG	1:1000
Anti-DsRed	Clontech	rabbit IgG	1:500
Anti-S100β	Sigma	mouse IgG	1:500

Table2: 使用した二次抗体

二次抗体(蛍光)	供給元	Anti-X	希釈率
Alexa 488	Molecular Probes	Anti-rabbit IgG, Anti-mouse IgG Anti-rat IgG	1:1000
Rhodamine	Jackson ImmunoResearch	Anti-rat IgG Anti-rabbit IgG Anti-goat IgG Anti-mouse IgG	1:200
Cy5	Jackson ImmunoResearch	Anti-mouse IgG Anti-guinea pig IgG	1:200

1.2.12 レンチウイルスの作製

293T 細胞を 1×10^6 cells/100 mm dish で細胞を播種し、一晚培養した。培養した後、精製したプラスミド三種類、ベクタープラスミド (KD or SCR) 20 μ g、パッケージングプラスミド 10 μ g、エンベローププラスミド 10 μ g をリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした。なお培養中の CO_2 濃度は常時 10% CO_2 濃度で培養をし、トランスフェクション時だけ 3% CO_2 濃度に落とした。トランスフェクション後のウイルス産生期間は、再び 10% CO_2 濃度戻して、培養を 2 日間行った。なおトランスフェクションを行った翌日に Forskorin 10 μ M (Sigma) を加え、ウイルスの産生能を高めた。上清を回収し $50000 \times g$ 、 4°C 、1.5 時間遠心した後上清を除去した。HBSS (Hanks' Balanced Salt Solutions GIBCO) 200 μ l に再懸濁し、再び $50000 \times g$ 、 4°C 、1.5 時間遠心した。上清除去後、HBSS 10 μ l に再懸濁しウイルス液とした。

作製したウイルスは希釈系列を作製し 293T 細胞に感染させた。感染後 4 日で FACS により GFP 陽性細胞数を係数し、ウイルスの力価を測定した (Fig.1)。

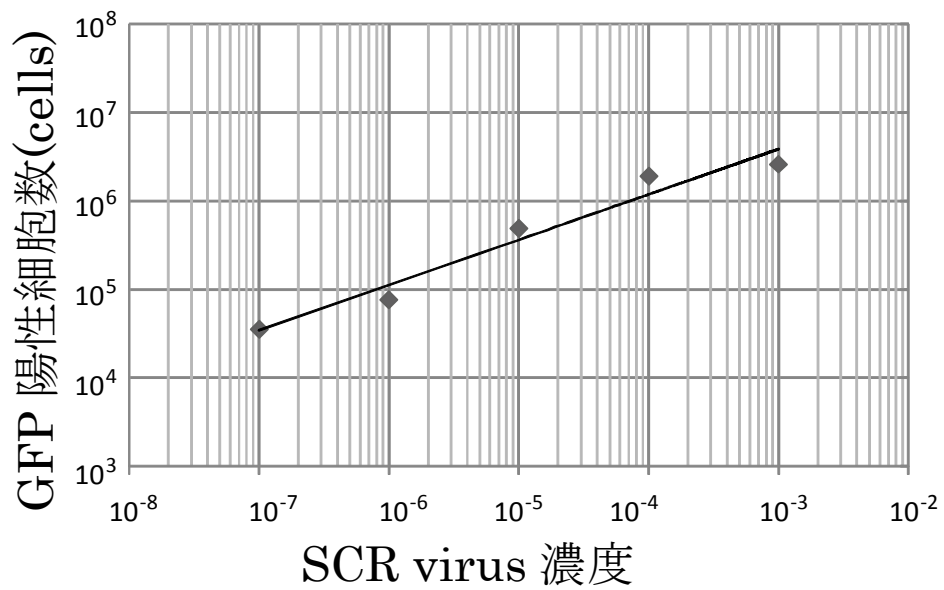
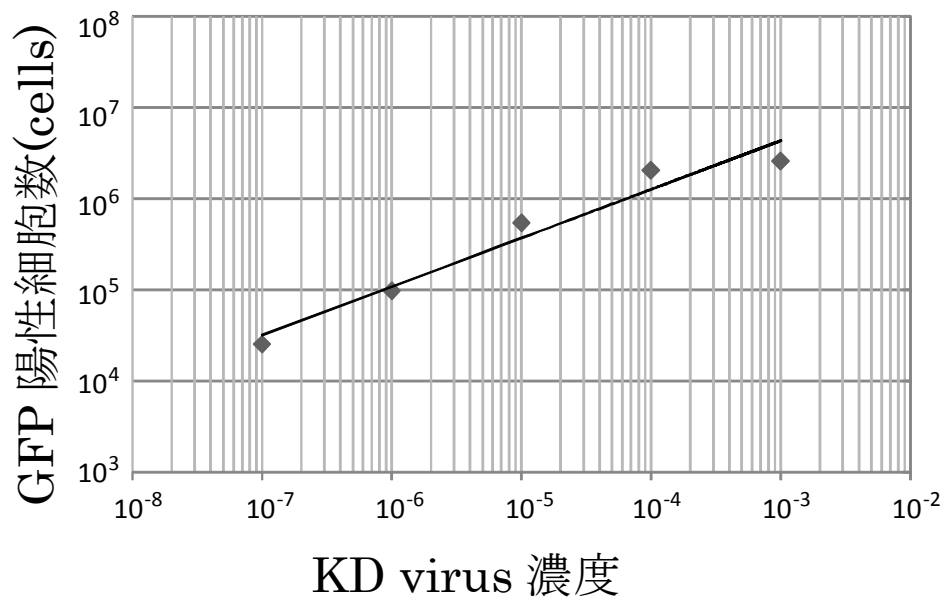


Fig.1 FACS による力価測定

FACS により GFP 陽性細胞数を係数し、ウイルスの力価を測定した。KD (Knock Down)、SCR (Scramble) 共に 1×10^8 IU/ml 程度の高力価かつ同程度のウイルスを作製した。近似直線は測定値より対数近似にて算出した。

1.2.13 レトロウイルスの作製

Plat-GP 細胞を 1×10^6 cells/100 mm dish で細胞を播種し、一晚培養した。培養した後、精製したプラスミド 2 種類、ベクタープラスミド 20 μ g、エンベローププラスミド 10 μ g をリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした。なお培養中の CO_2 濃度は常時 10% CO_2 濃度で培養をし、トランスフェクション時だけ 3% CO_2 濃度に落とした。トランスフェクション後のウイルス産生期間は再び 10% CO_2 濃度戻して培養を 2 日間行った。上清を回収し $50000 \times g$ 、 4°C 、1.5 時間遠心した後上清を除去した。HBSS (Hanks' Balanced Salt Solutions GIBCO) 200 μ l に再懸濁し、再び $50000 \times g$ 、 4°C 、1.5 時間遠心した。上清除去後、HBSS 10 μ l に再懸濁しウイルス液とした。

1.2.14 マウスへのウイルスを用いた RNAi

ケタラル®50 50 mg/ml (第一三共) およびセラクター®2%注射液 5 mg/ml (バイエルメディカル) を 4:1 で混合した。使用前に作成した麻酔液を生理食塩水 (大塚製薬) と 1:4 で混合し、大腿部に筋肉注射することで麻酔した。麻酔後、頭毛を剃り、固定機 (David Kopf instruments, Model 900) に固定した。頭皮を切り開き頭蓋を露出させ、Bregma を起点に AP 方向 (前後方向) に -1.5 mm、L 方向 (側方向) に ± 1.5 mm の部位に電気ドリルで頭蓋骨に穴をあけた。その穴

より、100mm dish 4 枚分の上清を濃縮したウイルス液を充填したガラス電極を 2.0 mm 挿入した (Fig.2)。ウイルス液を Nanoject- II (Drummond Scientific Company) を用いてマウスの左右の海馬にそれぞれ 50 nl/ 6 sec のペースで 50 回打ち込んだ。術後頭皮を縫合し、37℃のホットプレート上で温めて回復させた後 1 週間通常通り飼育した。

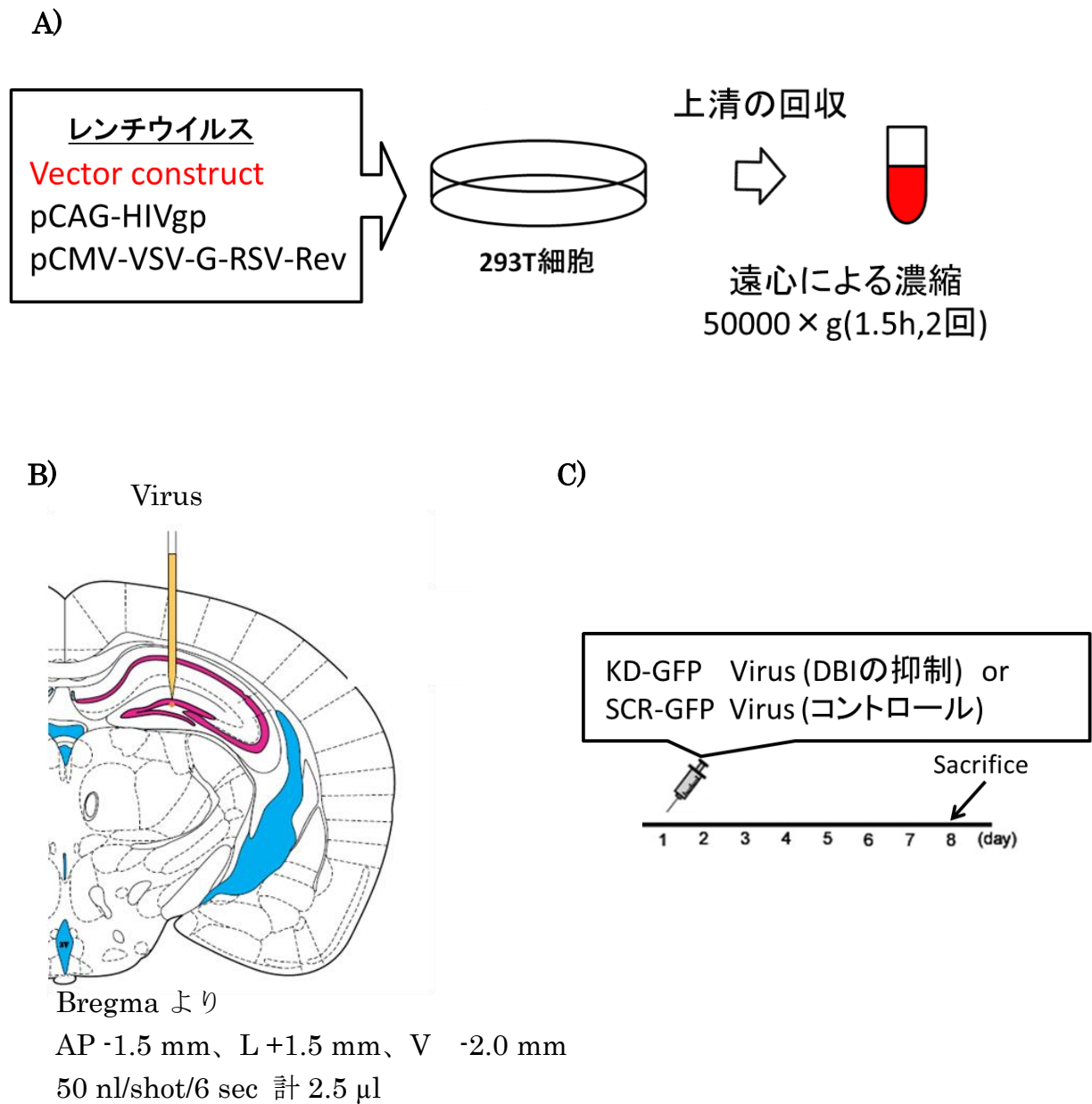


Fig.2 マウスへのレンチウイルスの感染

- A) レンチウイルスを構成する 3 種類のプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、遠心により 10 μl に濃縮した。
- B) マウス海馬へのインジェクション位置。Bregma を基準に AP (前後方向) -1.5 mm、L (側方向) +1.5 mm、V (深さ) -2.0 mm の位置にインジェクションした。
- C) ウイルス投与後の実験スケジュール。感染後 1 週間でサクリファイスし、サンプルとした。

1.2.15 神経幹細胞、神経前駆細胞での発現

1 個体から冠状断の凍結切片を作製し海馬の前方より 480 μm 毎に 4 枚の切片を使用し染色した。各切片に含まれる Nestin 陽性かつ GFAP 陽性の細胞を神経幹細胞とした。また Nestin、DCX、DBI の 3 重染色においては Nestin 陽性かつ DCX 陰性の突起のないものを神経前駆細胞前期とし、Nestin、DCX 共に陽性な細胞を神経前駆細胞後期とした。さらに、Nestin 陰性、DCX 陽性細胞を未成熟ニューロンとして、これらの細胞種における DBI の発現割合を評価した。

1.2.16 DBI の抑制効果の評価

1 個体から GFP 陽性細胞が確認できる 4 枚の切片を取出し、海馬顆粒細胞下帯における、GFP 陽性細胞における神経幹細胞のマーカーである GFAP、及び Sox2 陽性となる細胞の割合を算出した。同様に、未成熟ニューロンのマーカーである Prox1 と GFP 陽性細胞の割合を算出した。

1.2.17 新生細胞における DBI の抑制

1 個体から GFP 陽性細胞が確認できる 4 枚の切片を取出し、海馬顆粒細胞下帯における、mCherry 陽性の新生細胞かつ、レンチウイルスが感染した GFP 陽性の DCX 陽性細胞の発現割合を測定した (Fig.3)。

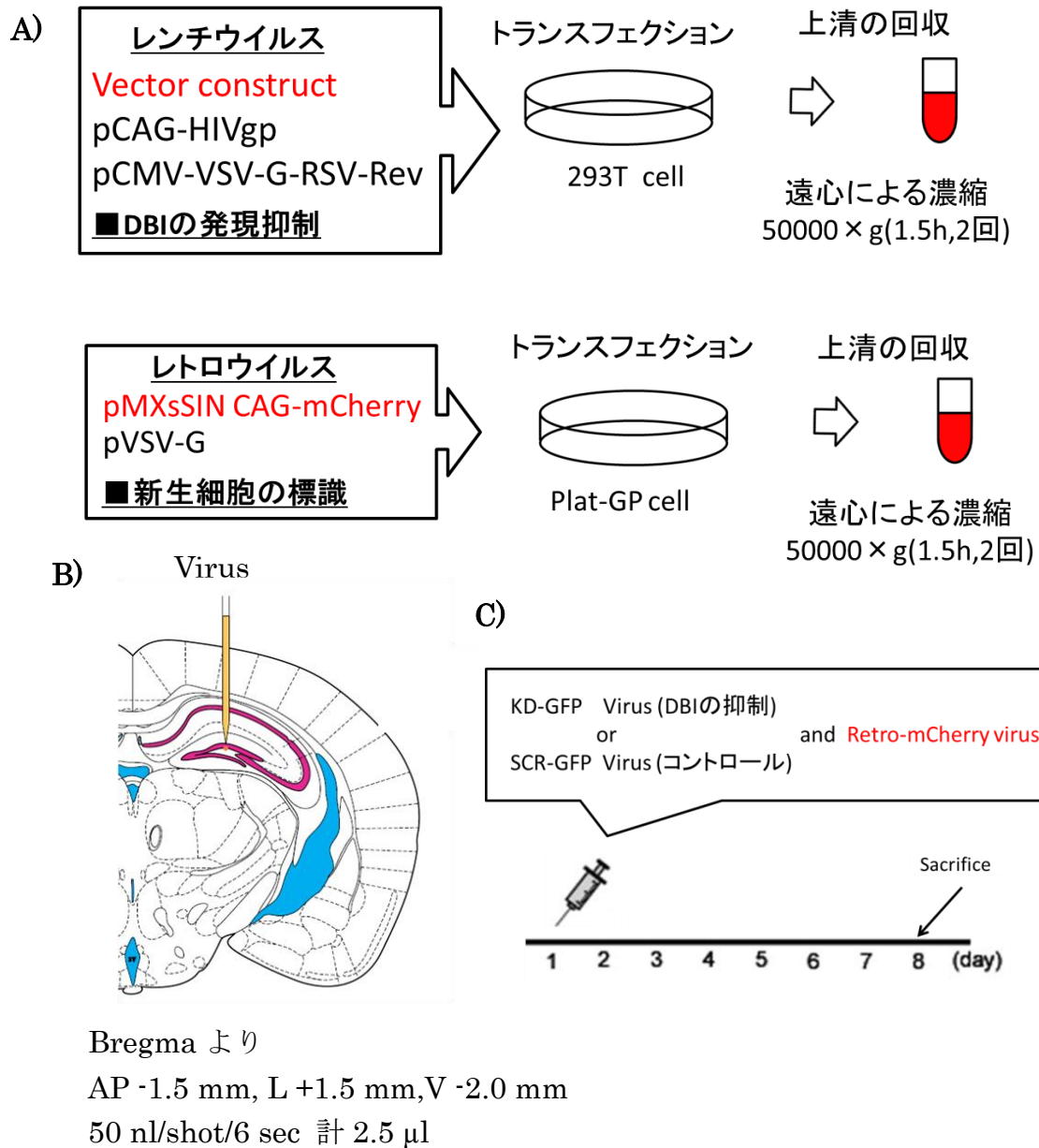


Fig.3 マウスへのレンチウイルスおよびレトロウイルスの感染

- A) それぞれのウイルスを構成するプラスミドを 293T 細胞または Plat-GP 細胞にトランスフェクションし、ウイルス液を混合し遠心により 10 μl に濃縮した。
- B) マウス海馬へのインジェクション位置。Bregma を基準に AP (前後方向) -1.5 mm、L (側方向) +1.5 mm、V (深さ) -2.0 mm の位置にインジェクションした。
- C) ウイルス投与後の実験スケジュール。感染後 1 週間でサクリファイスし、サンプルとした。

1.3 結果

1.3.1 海馬での DBI の発現

海馬および小脳から摘出した組織から抽出したタンパク質で Western Blot を行った結果、10 kDa のバンドが観察された。これにより、DBI は海馬領域においても発現があり、また非特異的なバンドは観察されなかったため、抗体の親和性にも問題ないと考えられる (Fig.4)。また海馬領域における DBI の免疫染色の結果、海馬歯状回の顆粒細胞下帯の細胞においても DBI の発現が確認された (Fig.4)。海馬歯状回の顆粒細胞下帯は神経幹細胞が存在し、ニューロン新生が生じている領域である。そこで DBI のニューロン新生の過程における発現を調べるために Nestin-GFP マウスを用いて DBI と神経幹細胞のマーカーである GFAP や神経前駆細胞から未成熟ニューロンに発現している DCX との多重免疫染色を行った (Fig.5)。その結果、Nestin+ / GFAP+ の神経幹細胞では $90.0 \pm 3.3\%$ 、Nestin+ / DCX- で突起のない神経前駆細胞前期は $72.2 \pm 4.8\%$ 、Nestin+ / DCX+ の神経前駆細胞後期は $60.0 \pm 6.9\%$ 、Nestin- / DCX+ の未成熟ニューロンは $4.4 \pm 1.1\%$ の割合で DBI が共染色された。DBI の発現は未分化な細胞ほどその発現が強く、分化の進行と共に DBI の発現が減少する傾向にあった (Fig.6)。これは先行研究 (岡田 修論論文, 2006) ととも一致していた。

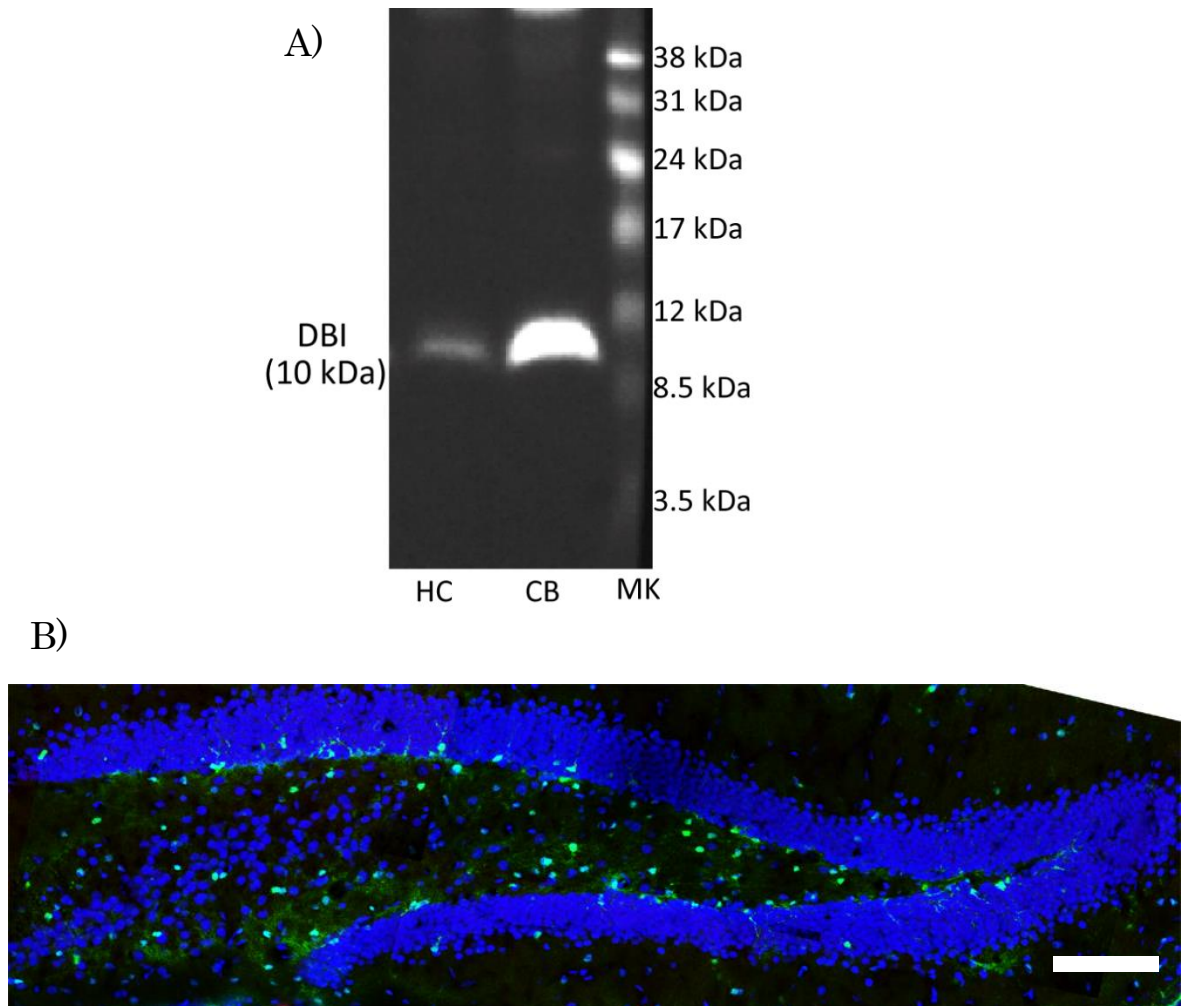


Fig.4 マウス海馬における DBI の発現

- A) マウスの海馬 (HC) および小脳 (CB) を用いて、抗 DBI 抗体によるウェスタンブロットを行った。その結果 10 kDa に DBI のバンドが検出された。これにより海馬での DBI の発現及び非特異的な反応は見られず、DBI の特異的な結合をウェスタンブロットにより確認した。MK, マーカー
- B) 海馬歯状回における DBI の発現を免疫染色により観察した。歯状回における DBI の発現は、顆粒細胞下帯に加え、ハイラス部に存在する細胞などにもみられる。緑:DBI 青:DAPI (核) Bar, 100 μ m

A)

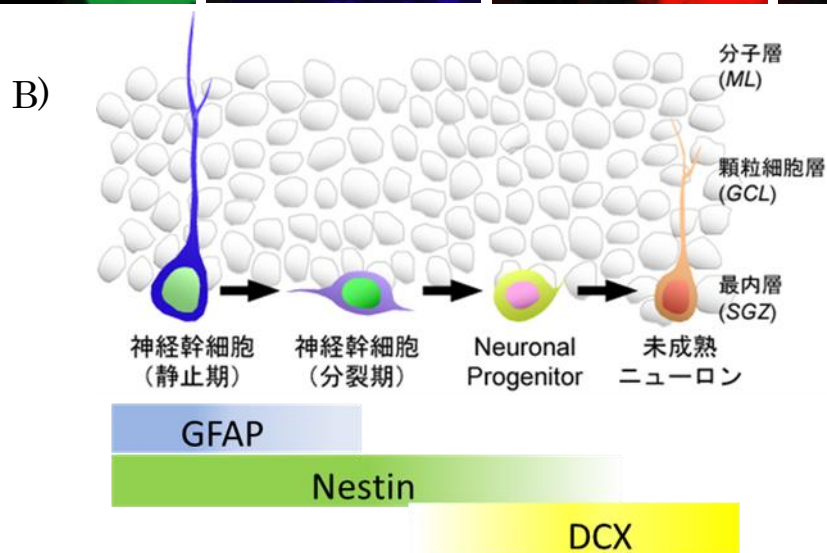
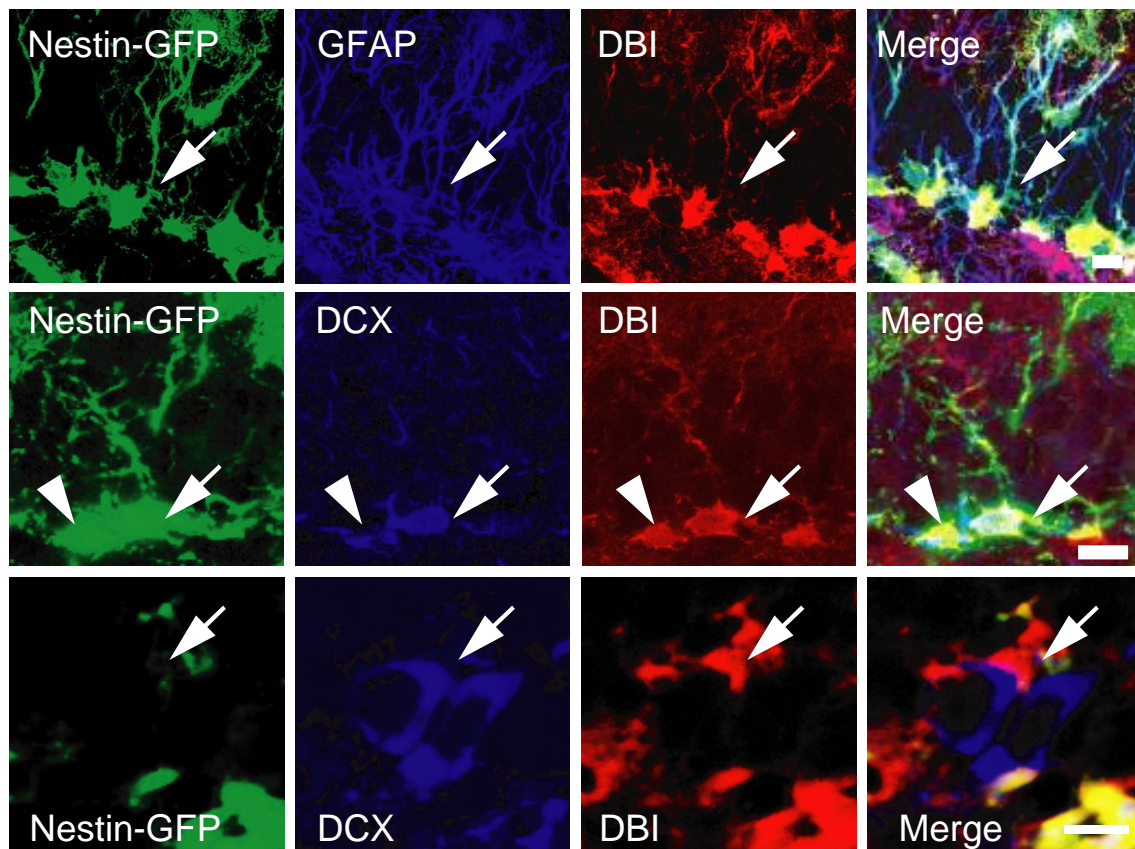


Fig.5 Nestin-GFP マウスを用いた DBI の染色

A) ニューロンの成熟過程における DBI の発現。矢印で示した細胞が DBI 陽性細胞を示す。Bars, 10 μ m

B) ニューロンの成熟過程とその際の発現マーカータンパク質

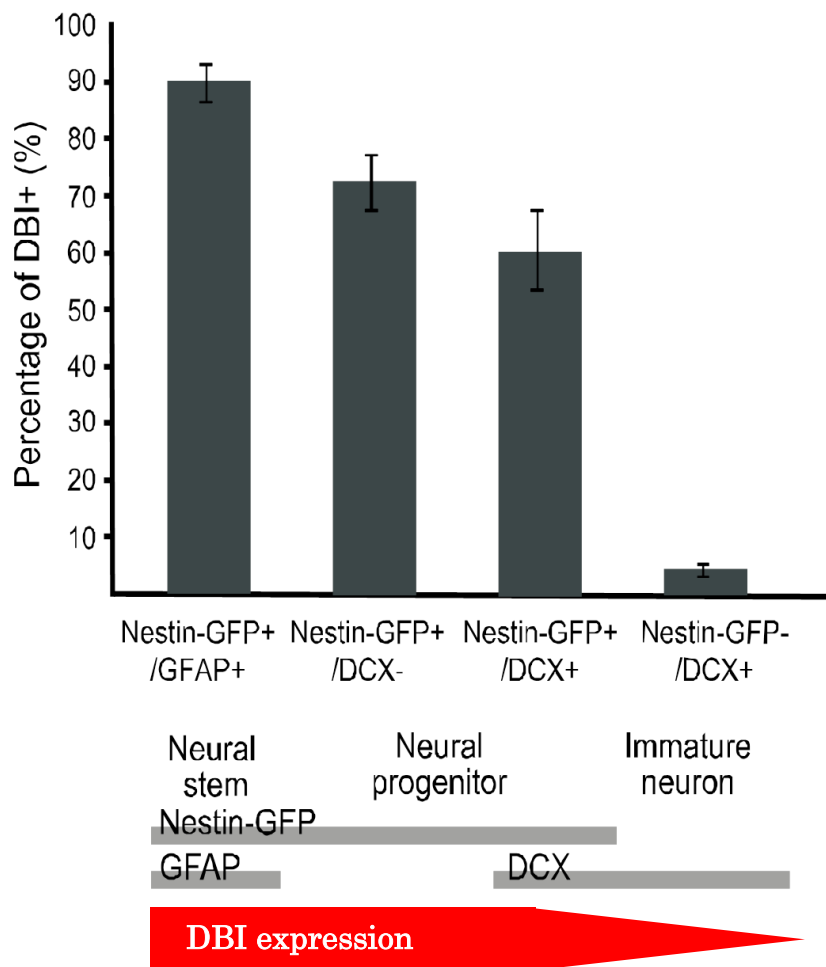


Fig.6 ニューロンの成熟過程における DBI の発現
 神経幹細胞や神経前駆細胞では DBI の強い発現が見られる。しかし分化の進行と共に DBI の発現は減少している。N=3, n=30

1.3.2 DBI の発現抑制

DBI の発現を抑制する RNAi ウイルス (KD ウイルス) とコントロールである SCR ウイルスを作成し、293T 細胞により Titer 測定した結果、 1×10^8 IU/ml の力価で KD、SCR で同程度であることを確認した。また KD ウイルスまたは SCR ウイルスを感染させた MSP-1 細胞と、インタクトな MSP-1 細胞からタンパク質を回収し、Western Blot により DBI のタンパク質の相対量を比較した結果、KD 群では DBI の発現が低下している事が確認した。これにより DBI が RNAi により抑制されている事を示した (Fig.7)。

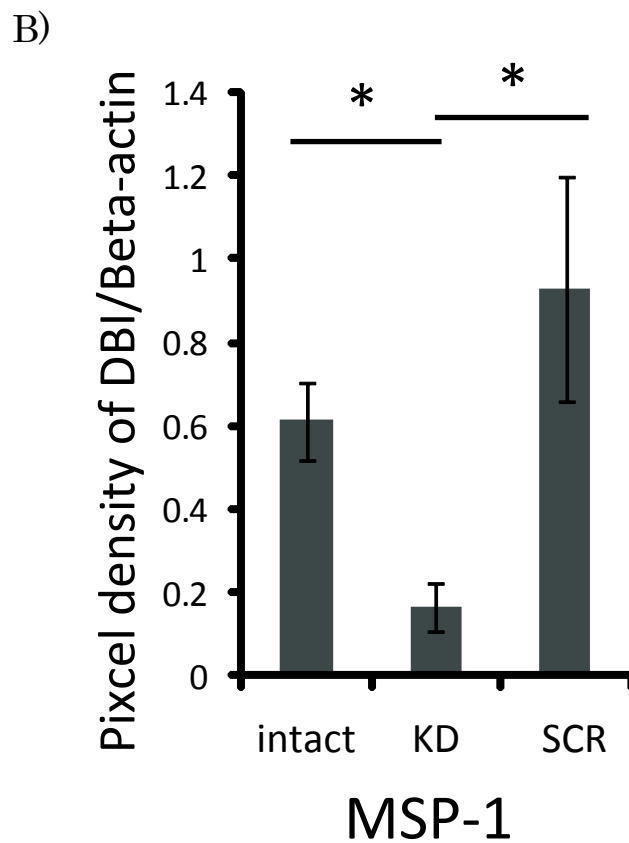
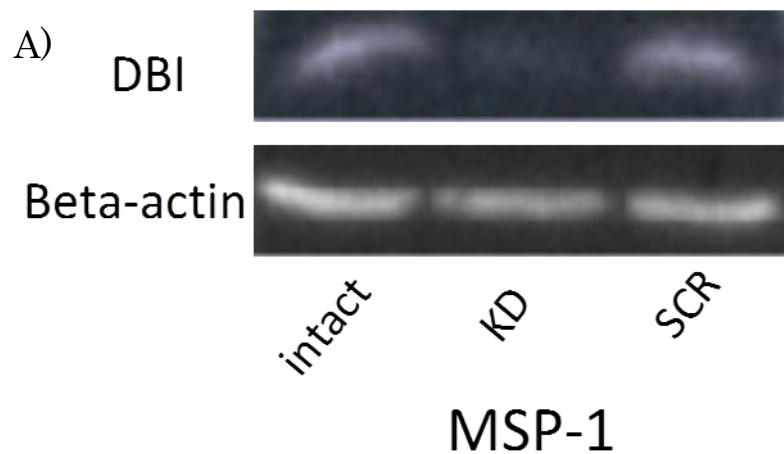


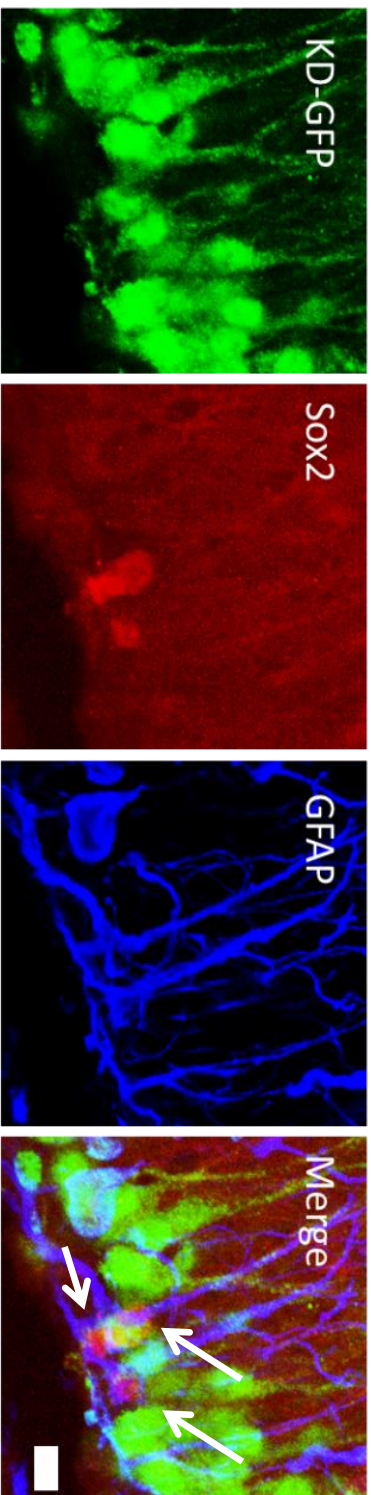
Fig.7 MSP-1 細胞における DBI の抑制

- A) 作製した DBI の KD ウイルスおよび、SCR ウイルスを感染させた MSP-1 細胞、インタクトな MSP-1 細胞からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットを行った。
- B) DBI のウェスタンブロットの結果を Beta-actin により標準化し、バンドの濃度を ImageJ により比較した。n=3, T-test, $p < 0.05$

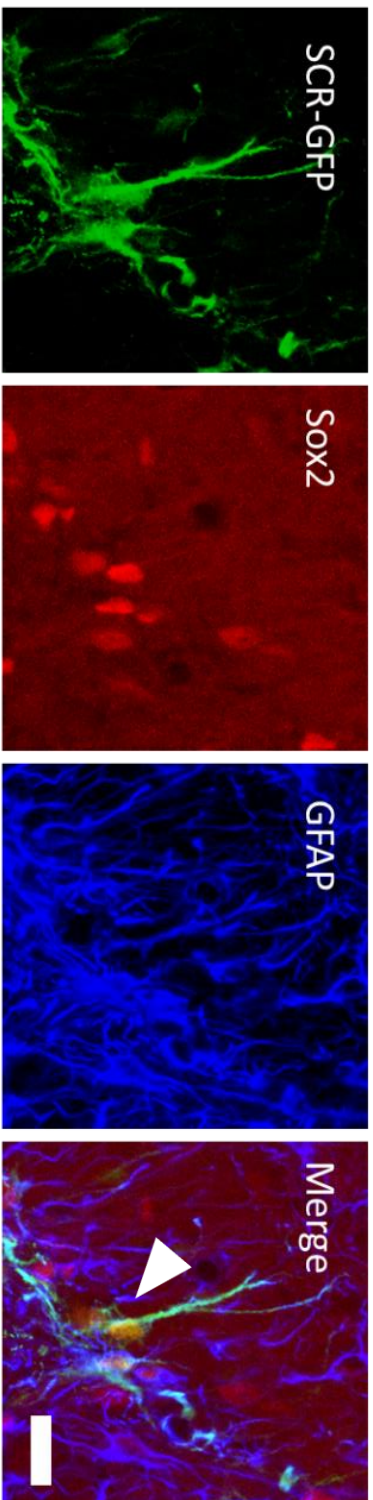
KD ウイルスにより DBI の発現が抑制されることが明らかにされたので、マウスの海馬に直接ウイルスを投与し、1 週間飼育した。海馬の切片を作製し、ウイルスが感染した KD または SCR ウイルスが感染した GFP 陽性細胞かつ、神経幹細胞のマーカーである GFAP、Sox2、未成熟ニューロンのマーカーである Prox1 と共染色した (Fig.8)。その結果、KD ウイルスに感染した GFP 陽性細胞では Sox2 の発現が著しく低下していた ($2.2 \pm 1.1\%$) のに対して SCR ウイルス実験群では比較的保たれていた ($40 \pm 1.9\%$) (Fig.9)。その一方で、GFP 陽性細胞中の Prox1 陽性細胞は KD ウイルス実験群において SCR ウイルス実験群と比較して有意に増加していた (Fig.9)。このことは、DBI の発現が抑制されると神経幹細胞としての性質を維持する事が困難となることを示唆している。先行研究により報告されている、側脳室下帯における神経幹細胞を用いた研究の結果と同様であった (Alfonso et al., 2012)。

A)

K.D. ウイルス感染後の免疫染色



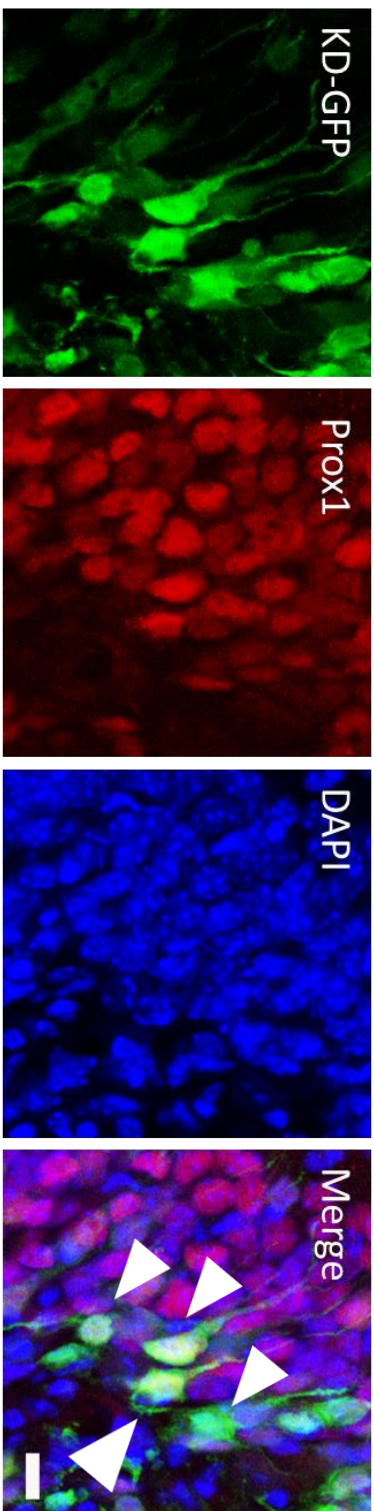
SCRウイルス感染後の免疫染色



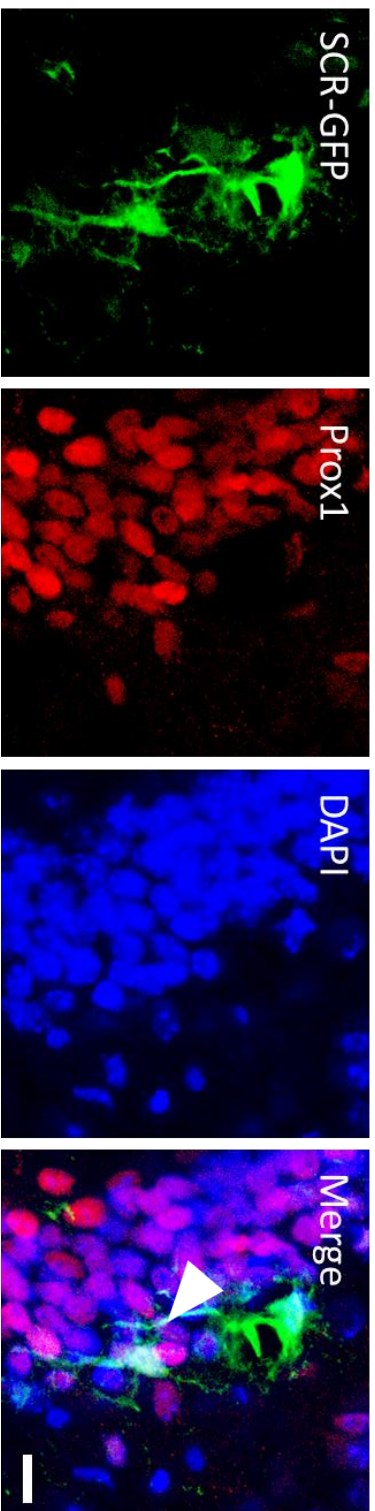
Bar, 上段 10 μ m, 下段 50 μ m

B)

K.D. ウイルス感染後の免疫染色



SCRウイルス感染後の免疫染色



Bars, 10 μ m

Fig.8 DBI 抑制細胞における神経幹細胞および未成熟ニューロンの割合

- A) KD ウイルスおよび、SCR ウイルスを感染させた後、顆粒細胞下帯における GFP 陽性細胞（緑）と神経幹細胞のマーカーである Sox2（赤）、及び GFAP（青）により三重染色した。矢印は Sox2 陽性細胞を示し、矢頭は GFP/Sox2/GFAP 陽性細胞を示す。KD ウイルス陽性細胞では Sox2/GFAP 陽性となる神経幹細胞が見られないが SCR ウイルスが感染した細胞では Sox2/GFAP 陽性が見られる。Bars, 上段 10 μ m, 下段 50 μ m
- B) KD ウイルスおよび、SCR ウイルスを感染させた後、顆粒細胞下帯における GFP 陽性細胞（緑）と未成熟ニューロンのマーカーである Prox1（赤）、及び DAPI（青）により三重染色した。矢頭は GFP/Prox1/GFAP 陽性細胞を示す。Bars, 10 μ m

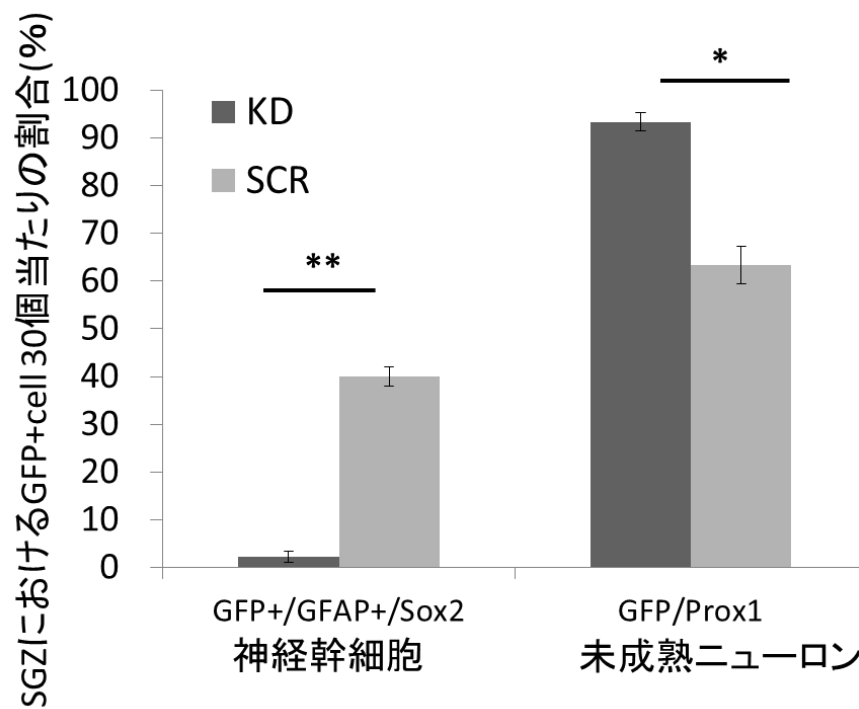


Fig.9 顆粒細胞下帯 (SGZ) における DBI の抑制効果

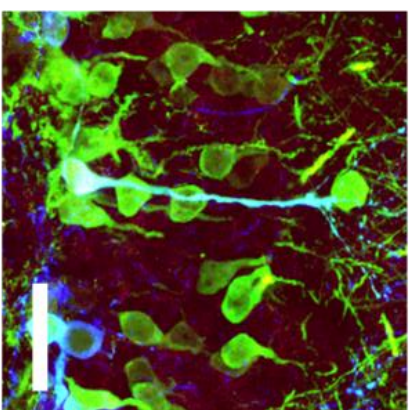
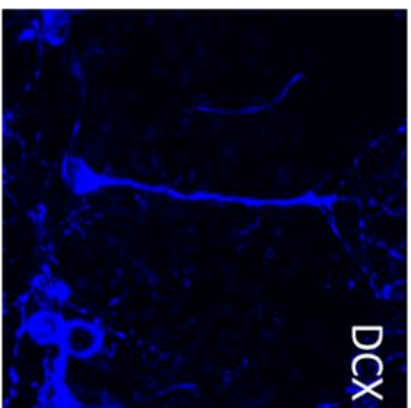
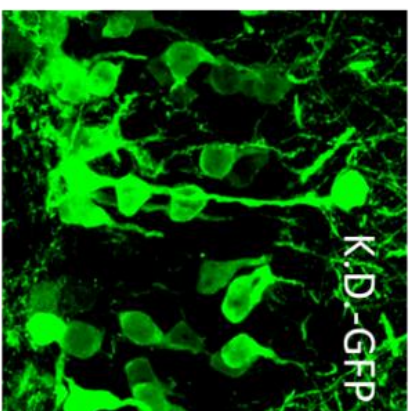
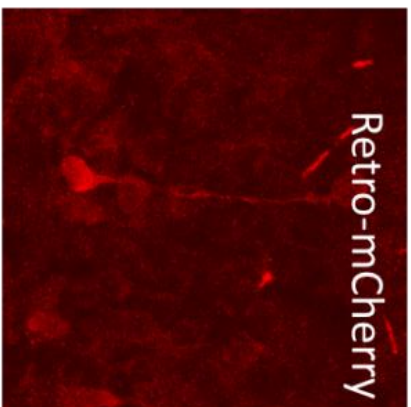
顆粒細胞下帯における KD ウイルスおよび SCR ウイルス陽性細胞における神経幹細胞の割合、及び未成熟ニューロンの割合を示した。KD により神経幹細胞の割合は減少し、未成熟ニューロンの割合は増加した。

N=3, n=30, T-test, *p<0.05, **p<0.01

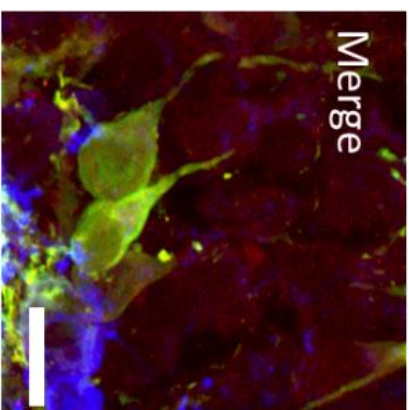
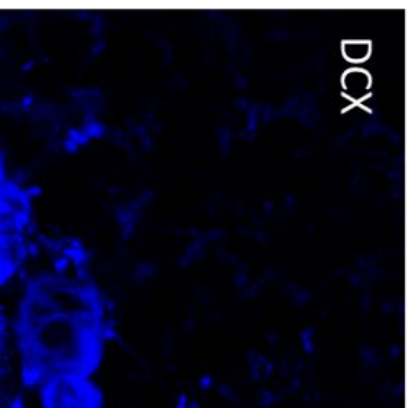
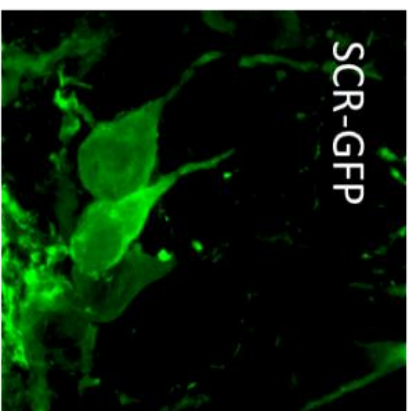
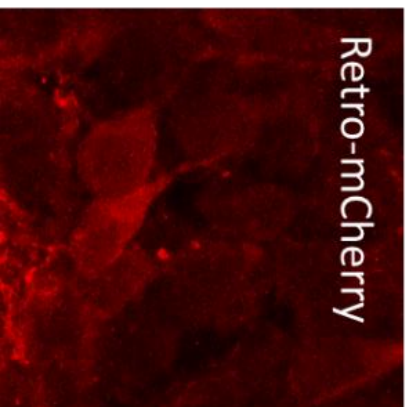
DBI の抑制により、分化が促進される可能性が示唆されたため、これが新生細胞において確かに促進されているかを確認するため、mCherry をレポーターとするレトロウイルスを KD または SCR ウイルスと同時に感染させることで、新生細胞における効果を確認した。レトロウイルスに感染して mCherry 陽性の新生細胞かつ GFP 陽性の KD または SCR ウイルスが感染した細胞における DCX 陽性細胞の割合を比較した。その結果、コントロールである SCR 群と比較して、KD 群では DCX 陽性細胞の割合が増加し、やはり DBI の抑制により、新生細胞の分化が促進した (Fig.10)。

A)

K.D. ウイルス感染後の免疫染色



SCRウイルス感染後の免疫染色



B)

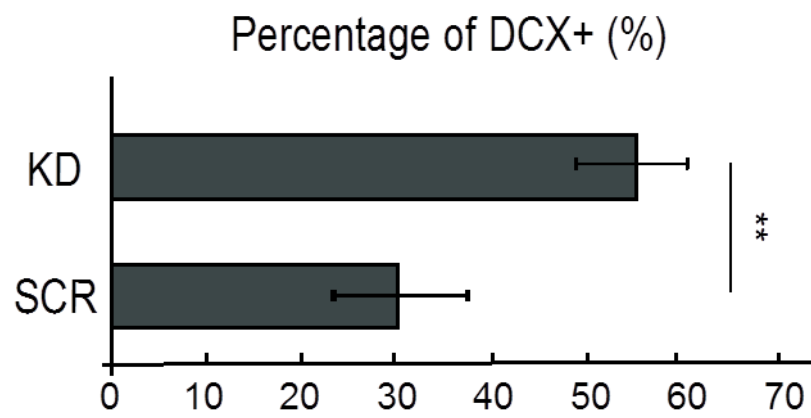


Fig.10 新生細胞における DBI の抑制効果

- A) mCherry 陽性 (赤) の新生細胞かつ、KD ウイルスまたは SCR ウイルス陽性 (緑) の細胞における DC X (青) を染色した。Bars, 10 μ m
- B) 新生細胞における DBI の発現の抑制により DCX 陽性となる細胞の割合が増加し、DBI の抑制により分化が促進した。N=5, n=50, T-test, **p<0.01

1.4 考察

海馬に発現する DBI は神経幹細胞や神経前駆細胞に発現し、分化が進行すると共に発現が低下することから、神経幹細胞の維持に寄与していると考えられる。また KD ウイルスを感染させた細胞において神経幹細胞の割合が著しく低下し、未成熟ニューロンの割合がコントロールと比較して増加したことから、DBI の発現が抑制されると、神経幹細胞を維持する事が出来なくなる可能性が示唆された。つまり DBI は神経幹細胞において、分化を抑制する機能を持ち、DBI の発現が抑制されると分化が促進すると考えられる。さらにレトロウイルスにより標識した新生細胞においても DBI 発現を抑制した群では DCX 陽性細胞の割合が増加し、分化の促進を示唆した。これにより、DBI を抑制することで新生ニューロンの分化が促進することが明らかになった。

これは先行研究による興奮性の GABA 刺激により新生ニューロンの分化が促進することと一致している (Tozuka et al., 2005)。神経前駆細胞は GABA の入力を受けると、脱分極を生じさせ、これによりニューロン分化が促進されるため、GABA 受容体のインバースアゴニストである DBI の発現により、GABA 受容体が抑制され、新生ニューロンの分化が抑制されていると考えられる。GABA 受容体を抑制する DBI の発現が低下した事により、GABA 受容体の抑制が解除され、脱分極が相対的に増加し、分化が進行したと考えられる (Fig.11)。

しかし、DBI の発現が何によってコントロールされるのかは明らかでない。そのため、DBI の発現の抑制自体を制御している機構の解明が今後の研究課題である。おそらく通常状態では、何らかの DBI の発現制御機構のもと DBI の発現が調整され、オートクリンやパラクリンにより放出された DBI が GABA 受容体へ結合し、脱分極を抑制することで、分化を抑制し、神経幹細胞や神経前駆細胞のプールを維持しているのではないかと考えられる。

また DBI にはミトコンドリアへのコレステロールを輸送する機能があることが知られており (Papadopoulos et al., 1995; Majewska et al., 1992; Robel et al., 1995; Belelli et al., 2005)、この機構はニューロステロイド合成の第一段階である。これにより輸送されたコレステロールが開裂、修飾を受けて様々なニューロステロイドが合成される。これらのニューロステロイドには GABA のモジュレーターである物質もあり、こちらの機構が作用している可能性もある。

さらに先行研究により報告されている嗅球におけるニューロン新生、主に側脳室下帯で生じているニューロン新生において DBI は細胞分裂の促進に寄与していると報告されている (Alfonso et al., 2012)。本研究では海馬ニューロン新生において、増殖の観点からは実験を行っていないが、海馬でも同様に DBI は増殖に関与しているかもしれない。しかし、神経幹細胞や神経前駆細胞の分化を抑制することで、本来分化する運命にある細胞が、神経幹細胞や神経前駆細胞

胞のままであるならば、見かけ上これらの細胞数は増加することになる。そのため本研究とも矛盾のない一致が見られる。

いずれにしろ DBI が海馬および嗅球のニューロン新生の過程において関与している事は明らかである。DBI は GABA 受容体を介してニューロン新生を制御している可能性が示唆されたが、DBI が直接 GABA 受容体に結合して作用しているか、ニューロステロイドを介して、GABA 受容体に作用しているかは、更なる実験が必要である。

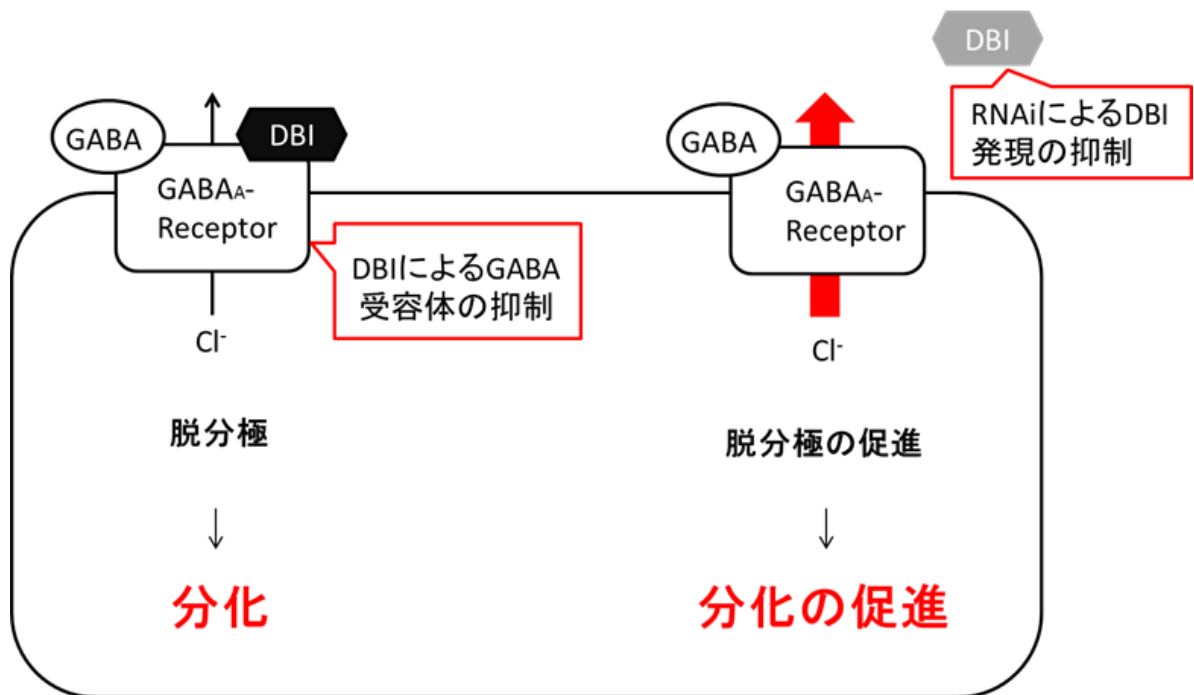


Fig.11 DBI によるニューロン新生の制御機構の模式図

ニューロン新生は GABA の入力により分化が促進されることが知られている。DBI が GABA 受容体に結合することで、GABA 受容体を抑制し、脱分極を抑制している。この抑制が解除されると相対的に脱分極が促進され分化が進行すると考えられる。

二章 アルツハイマーモデルマウスにおける DBI とニューロン新生

2.1 序論

現在深刻な高齢社会を迎えている日本において、認知症の増加が社会問題になっている。認知症には血管性認知症、アルツハイマー病型認知症、レビー小体型認知症などがあり、更にアルツハイマー病型認知症には遺伝的要因による家族性のものと、孤発性のものとに分類される。特に孤発性のアルツハイマー病は、加齢に伴って有病率が増加する。特に 80 歳を超えると指数関数的に増加するため、高齢社会である日本において憂慮すべき疾患の一つである。近年の研究により原因遺伝子にプレセニリンとアミロイド前駆タンパク質 (amyloid precursor protein, APP) の変異が報告されている (Goate et al., 1991; Thorlakur et al., 2012)。さらにリスク遺伝子として apolipoprotein E (APOE) の $\epsilon 4$ が報告されている (Farrer et al., 1997; Liu et al., 2013)。病理学的所見としては、神経細胞脱落、A β の蓄積による老人斑、神経原繊維変化が生じる。症状としては記憶力障害、視空間認知が障害され、更に進行すると、失行、失認、失語が見られるようになり、昼夜逆転、せん妄、失禁、徘徊が見られるようになる。

また近年、アルツハイマーモデルマウスを用いた研究により、ニューロン新生の低下が報告されている (Verret et al., 2007)。ニューロン新生は先述の様に、海馬依存性の記憶機能や学習機能に関与しているため、アルツハイマー病の症

状を引き起こす原因の一つである可能性がある。最近の報告によるとアルツハイマー病におけるこのニューロン新生の低下は GABA 回路の低下によるものであるとする報告がある (Li et al., 2009; Sun et al., 2009)。これは海馬のニューロン新生が GABA 刺激により促進されている事が明らかにされており、アルツハイマー病では、この GABA 入力低下がニューロン新生の低下を引き起こしていると考えられる。

DBI は GABA 受容体のインバーサゴニストでもあるため (Guidotti et al., 1983)、GABA 回路を介してニューロン新生に関与している可能性が考えられる。また DBI はアルツハイマー病の脳脊髄液中において、増加することが明らかにされており (Barbaccia et al., 1986; Ferrarese 1990; van Kammen et al., 1993)、海馬でも同様に増加している可能性も十分考えられる。

本研究ではアルツハイマーモデルマウスで生じている、GABA 回路の変調を生じさせる原因の一つとして、DBI に着目し、海馬ニューロン新生領域におけるその発現の変化、及び、DBI の発現とニューロン新生に与える作用について明らかにすることを目的としている。

2.2 実験方法

2.2.1 実験動物

B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9}) 85Dbo/J (Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) より購入、以下 Tg)を用いて実験した。これら実験動物は、研究室にあるクリーンルームにて飼育用のケージに入れられ、室内気温 24 ± 1 °C、12 時間周期で昼夜を切り替える（午前 8 時に飼育室の電気を点灯し、午後 8 時に消灯するサイクル）環境で飼育した。飼育は W220 mm × L320 mm × H135 mm のプラスチックケージの中で滅菌した脱イオン水および固形飼料 MF（オリエンタル酵母）を与えて行った。また、実験動物の取り扱いについては、東京大学規定の“Experimentation protocols approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Tokyo” に則って実施され、使用実験動物数を最小限にするように努めた。

2.2.2 High Fat Diet と Carnosine の投与

High Fat Diet (HFD) 投与群においては HFD-32（脂質成分が 32%配合、クレア）を 4 ヶ月齢から 2 ヶ月間、自由摂取させた。また脂質成分の酸化を考慮し、HFD は 2 日に一度交換した。また通常食と HFD の違いを Table3 に示し

た。Tg マウスに 4 ヶ月齢から 2 ヶ月間 HFD を給餌させると、アルツハイマー病の症状である、認知記憶障害を早期に誘起する事が出来る。これは 2 型糖尿病のリスクを加えることで、アルツハイマー病を早期に発症させていると考えられている。さらに、この早期にアルツハイマー病を誘起したマウスに Carnosine (以下 Car) を投与することで、認知記憶の低下を抑制することが出来る (Helcurano et al., 2013)。Car 投与群では Car を水に 1 g/l 作成し、HFD 給餌開始週間後より摂取させ、実験終了まで自由摂取させた。

Table3 通常食と HFD との成分比較

	MF Feed	HFD-32
Water (g/100g)	7.7	6.2
Protein (g/100g)	23.6	25.5
Fat (g/100g)	5.3	32
Fiber (g/100g)	6.1	2.9
Ash (g/100g)	2.9	4.0
Nitrogen-free extract (g/100g)	54.4	29.4
Calories (kcal/100g)	360	507.6

2.2.3 免疫染色による DBI の発現

野生型 (WT) マウスの 6 ヶ月齢、Tg マウスの 6 ヶ月齢、Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD を給餌したマウス、Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD と Car を給餌したマウス、WT および Tg マウスで 17-19 ヶ月齢の 6 群を用いて、1 個体から 480 μm おきに 3 枚の切片を取出し、1.2.11 と同様に DBI、X-34 (A β)、TOTO3 による核染色を行った。この染色画像を東京大学朽名夏磨博士に作成して頂いた ImageJ のプラグインにより、指定領域における DBI 陽性の領域を測定し、その割合を比較した (Fig.12)。

また DBI およびアストロサイトのマーカーである S100 β 、及び Congo Red の改変物質であり A β と結合する X-34 を使用して染色を行い、AD モデルマウスにおける DBI の発現並びにアストロサイトにおける発現を観察した。



WT	6 ヲ月齡
Tg	6 ヲ月齡
Tg	6 ヲ月齡+HFD (認知記憶障害):AD モデル
Tg	6 ヲ月齡+HFD+Carnosine
Tg	17-19 ヲ月齡 (認知記憶障害):AD モデル
WT	17-19 ヲ月齡

Fig.12 アルツハイマーモデルマウスでの DBI の発現

海馬領域において DBI の発現領域を比較した。比較領域はニューロン新生が生じる顆粒細胞下帯およびヒラス部 (図中の囲まれた部分) 内の DBI の発現を比較した。下の表は使用したマウスの一覧を示した。

2.2.4 アルツハイマーモデルマウスにおける DCX の発現

WT マウスの 6 ヶ月齢、Tg マウスの 6 ヶ月齢、Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD 給餌マウス、Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD および Car 給餌した 4 群で DCX の免疫染色を 1.2.1 に示した方法と同様に染色を行い、染色された DCX 陽性の未成熟ニューロンにおける突起の形態を比較した。顆粒細胞層にある未成熟ニューロンは分子層まで突起を伸長させ、貫通繊維と連絡し回路を形成する。貫通繊維層まで突起が伸長している DCX 陽性細胞が全 DCX 陽性細胞に占める割合を各群で比較した (Fig.13)。

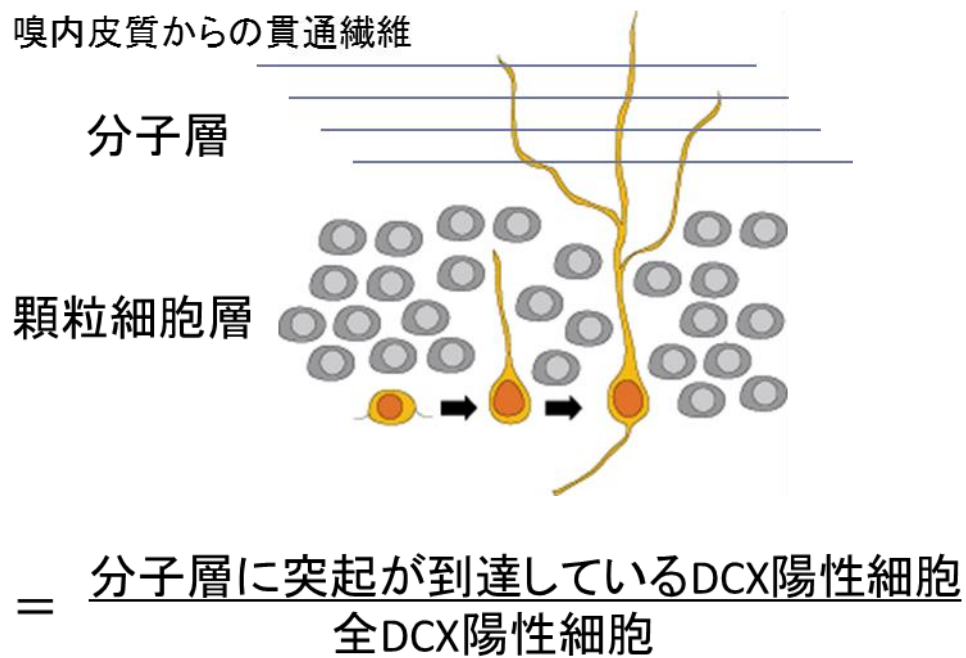


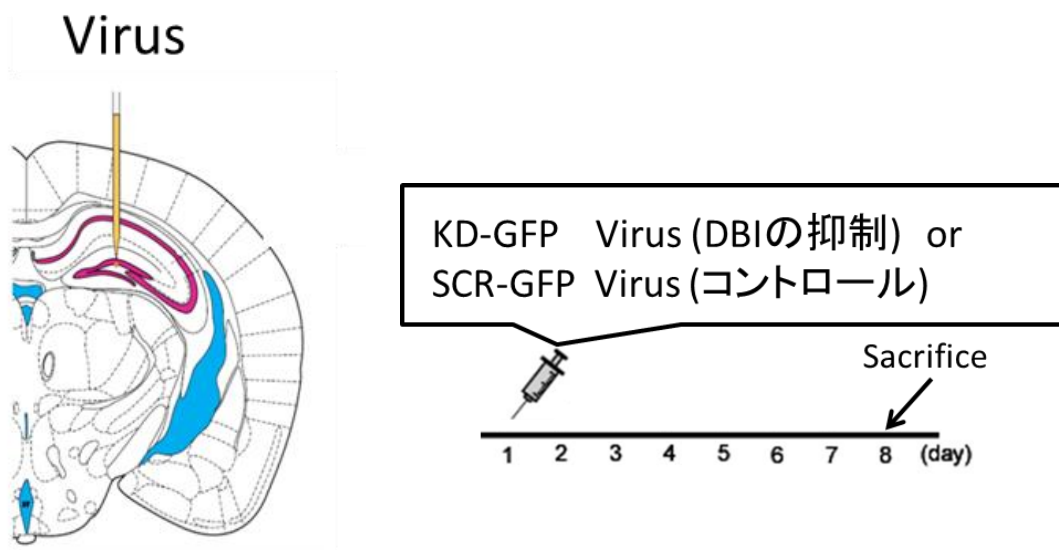
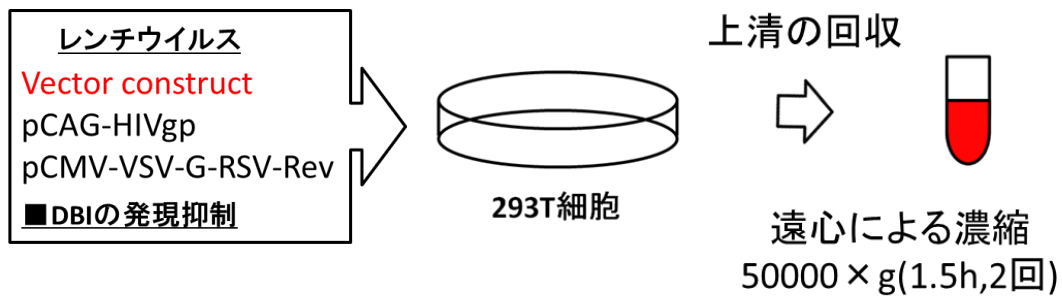
Fig.13 DCX 陽性細胞の評価

DCX 陽性細胞は成熟すると共に分子層へと突起を伸長させる。そのため、分子層まで伸長した細胞をより成熟した DCX 陽性細胞とし評価した。

2.2.5 DBI の抑制後のニューロン新生の作用

Tg マウスに HFD を与え、早期に AD を発症させたマウスに対して、海馬領域における増加した DBI の発現をレンチウイルスの感染により抑制した (Fig.14)。これらのマウスにおいて 1.2.11 と同様に DBI の免疫染色を行い、DBI の発現がコントロールと比較して低下している事を観察した。

これらのレンチウイルスが感染した顆粒細胞領域における DCX 陽性細胞を分子層への突起の伸長の程度により評価した。



Bregma より
AP -1.5 mm, L +1.5 mm, V -2.0 mm
50 nl/shot/6 sec 計 2.5 μ l

Fig .14 Tg 6 カ月齢マウス＋HFD へのレンチウイルスの感染

Tg 6 カ月齢マウスに HFD を給餌し、アルツハイマー病を早発させたマウスを用いた。このマウスは DBI の発現が増加しているためレンチウイルスにより DBI を抑制した。

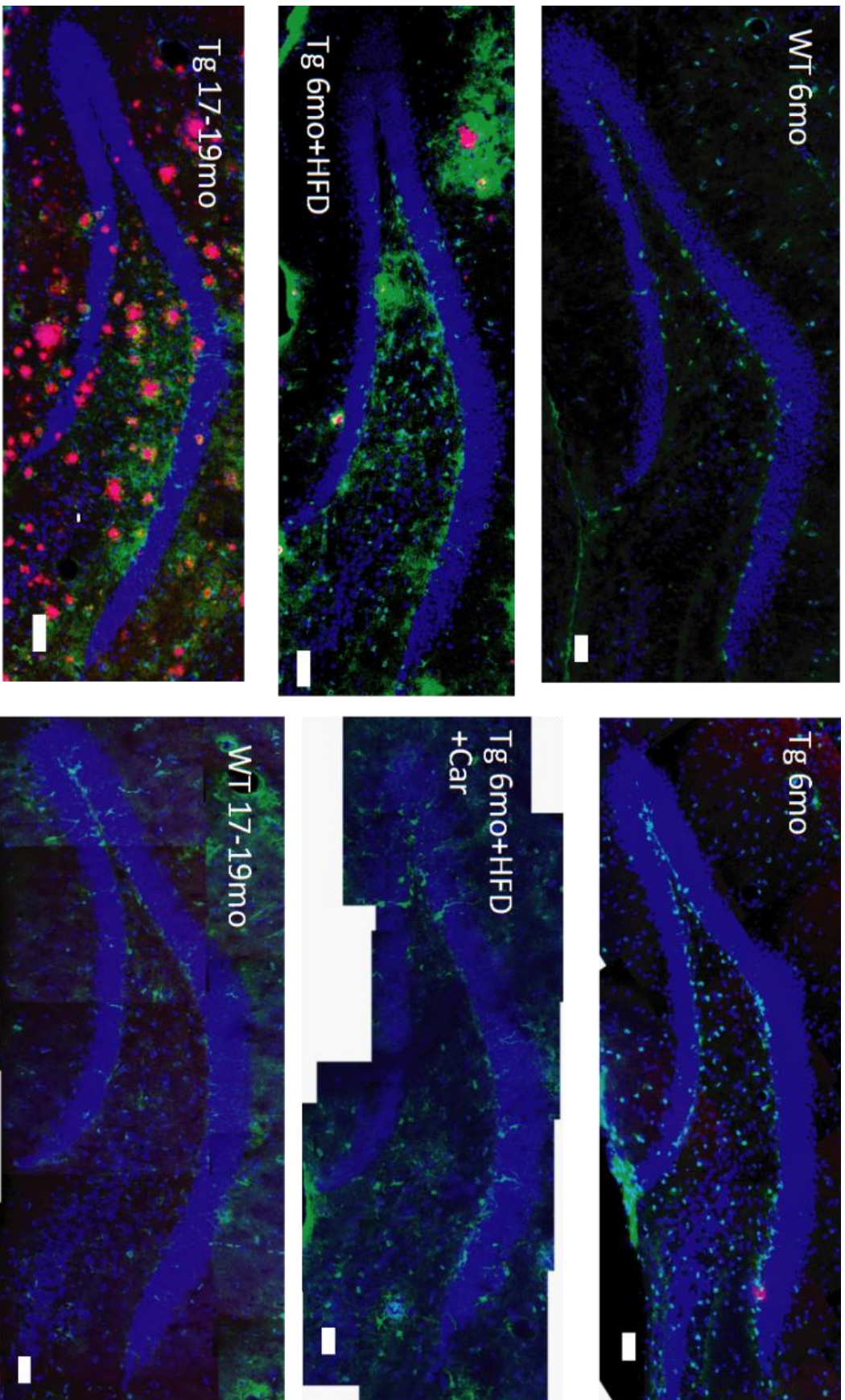
- レンチウイルスを構成する 3 種類のプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、遠心により 10 μ l に濃縮した。
- マウス海馬へのインジェクション位置。Bregma を基準に AP (前後方向) -1.5 mm、L (側方向) +1.5 mm、V (深さ) -2.0 mm の位置にインジェクションした。
- ウイルス投与後の実験スケジュール。感染後 1 週間でサクリファイスし、サンプルとした。

2.3 結果

2.3.1 アルツハイマーモデルマウスにおける DBI の発現

野生型 (WT) マウスの 6 ヶ月齢、Tg マウスの 6 ヶ月齢、Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD を給餌したマウス、Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD と Car を給餌したマウス、WT および Tg マウスで 17-19 ヶ月齢の 6 群を用いて海馬歯状回およびヒッポカンプ部における DBI の発現を比較した。先行研究により、この Tg マウスは 12 ヶ月齢を超えると、認知記憶障害を示し、アルツハイマー病の症状を示す (谷口 修士論文, 2009)。また、6 ヶ月齢では Tg マウスであっても認知記憶障害を示さないが、HFD を給餌させると認知記憶障害を示す。またこの 6 ヶ月齢の HFD を給餌している Tg マウスに Car を投与することにより、認知記憶の低下が抑制される (Heruclano et al., 2013)。6 ヶ月齢の WT マウスと比較して、この認知記憶低下を示す AD モデルマウス、つまり 17-19 ヶ月齢の Tg、6 ヶ月齢の Tg に HFD を給餌しているマウスでは DBI の発現の増加が観察され、認知記憶障害を HFD によって誘発させた Tg マウスに Car 投与群では DBI の増加が抑制されていた (Fig.15)。また、この Tg マウスでは AD により神経幹細胞や神経前駆細胞が増加することはないため (谷口 修士論文, 2009)、これらの増加した DBI は神経幹細胞や神経前駆細胞に由来するものではなく S100 β と共染色されることから、アストロサイトでの発現であることが示唆された (Fig.16)。

A)



B)

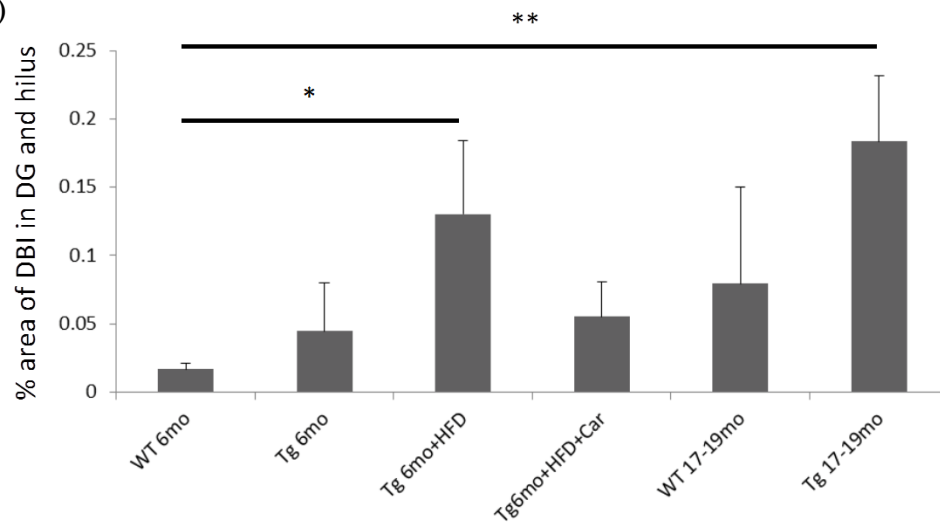


Fig.15 海馬歯状回およびハイラス部における DBI の発現

- A) 野生型 (WT) マウスの 6 ヶ月齢、Tg マウスの 6 ヶ月齢、Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD を給餌したマウス、Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD と Car を給餌したマウス、WT および Tg マウスで 17-19 ヶ月齢の 6 群における DBI (緑) と X-34 (A β ,赤)、TOTO3 (核,青) の染色 Bars, 50 μ m
- B) 海馬歯状回 (DG) および、ハイラス (hilus) 部における DBI の発現領域の割合を示した。認知記憶障害を示す 6 ヶ月齢の Tg に HFD を給餌したマウス、17-19 ヶ月齢のマウスにおいて DBI の増加が見られる。その一方で Car 投与により認知記憶機能の低下を抑制したマウスでは DBI の増加は見られなかった。

N=3, Dunnett 検定 (vs WT 6mo), * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$

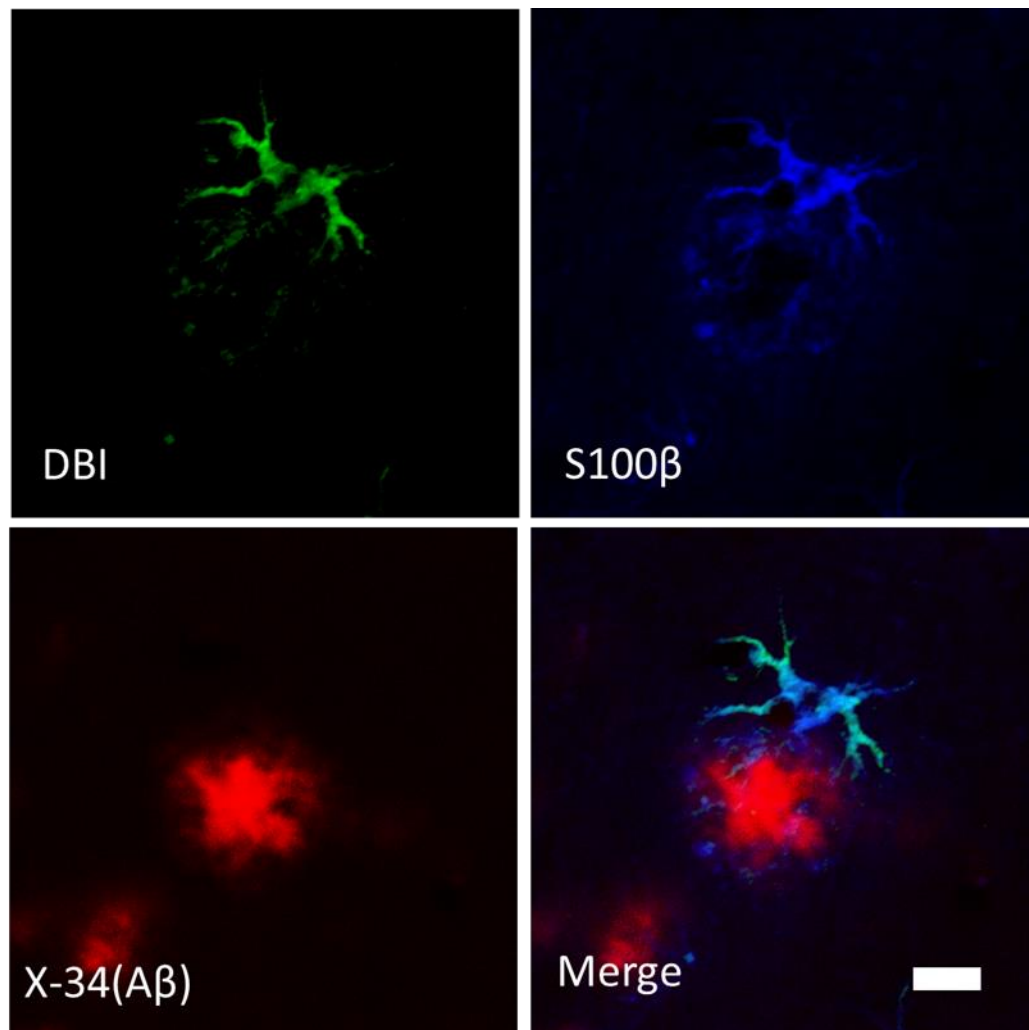


Fig.16 アストロサイトでの DBI の発現

DBI (緑) と X-34 (Aβ,赤)、S100β (アストロサイト,青) の染色結果。アルツハイマーモデルマウスでの DBI の発現はアストロサイトでの発現が増加していると考えられる。Bar, 10 μ m

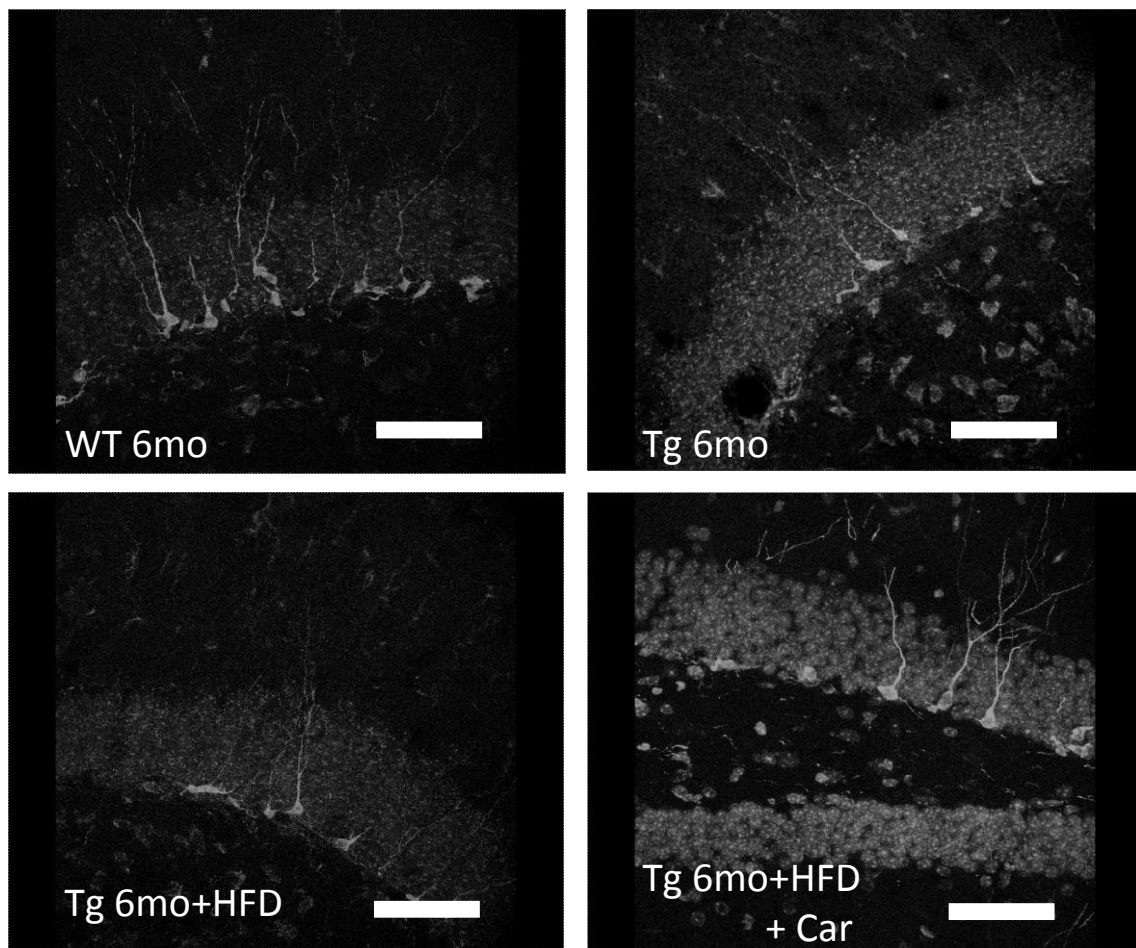
2.3.2 アルツハイマーモデルマウスにおけるニューロン新生と DBI の抑制

WT マウスの 6 ヶ月齢、Tg マウスの 6 ヶ月齢、Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD 給餌マウス、Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD および Car 給餌した 4 群で DCX 陽性の未成熟ニューロンにおける突起の形態を比較した。この際、DCX 陽性細胞の分子層への突起の伸長を指標に成熟度を評価した結果、DBI の発現が増加し、認知記憶機能が低下した Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD を給餌したマウスでは伸長が抑制されていた (Fig.17)。これは先行研究とも一致していた(松田 日本神経科学学会ポスター発表, 2013)。特に本研究における新しい知見として、Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD および Car を給餌し、DBI の増加、及び認知記憶機能の低下を抑制した群では、この突起の伸長の抑制は見られなかった (Fig.17 A 右下)。

DBI の発現が増加し、認知記憶機能が低下した、Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD を給餌したマウスにおいて、レンチウイルスにより DBI の発現の抑制実験を行った。DBI の発現を KD ウイルスおよび、SCR ウイルスを導入した各群で免疫染色した結果を Fig.18 並びに Fig.19 に示した。この染色画像を、東京大学朽名夏磨博士に作成して頂いた ImageJ のプラグインにより、指定領域における DBI 陽性の領域を測定し、その割合を比較した結果、DBI 発現の抑制を確認した (Fig.20)。次いで、DCX の形態を、GFP 陽性細胞が多く存在する DBI の発現が

抑制された歯状回の領域において比較した。その結果 DCX の突起の伸長が有意に回復していることがわかった (Fig.21～25)。

A)



B)

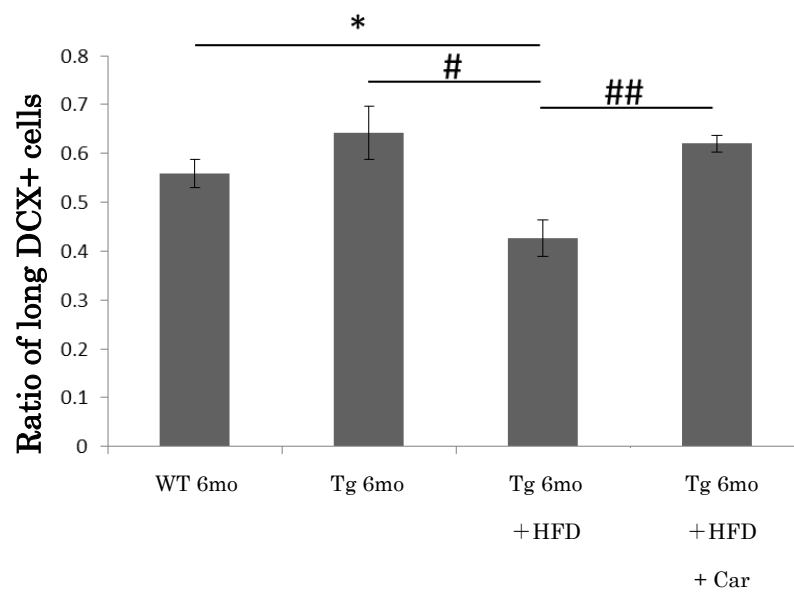


Fig.17 AD モデルマウスでのニューロン新生への影響

- A)** WT マウスの 6 カ月齢、Tg マウスの 6 カ月齢、Tg マウスの 6 カ月齢に HFD 給餌マウス、Tg マウスの 6 カ月齢に HFD および Car 給餌した 4 群における DCX の染色。Bars, 50 μ m
- B)** 認知機能低下を示し、DBI の発現の増加が見られた、Tg マウスの 6 カ月齢に HFD 給餌マウスにおいて突起の伸長が抑制され、成熟に影響が見られた。各群 N=3, n>30, Dunnett (vs Tg 6mo HFD): #p<0.05、##p<0.01, T test : * p<0.05,

Tg 6 カ月齢 HFD+KD

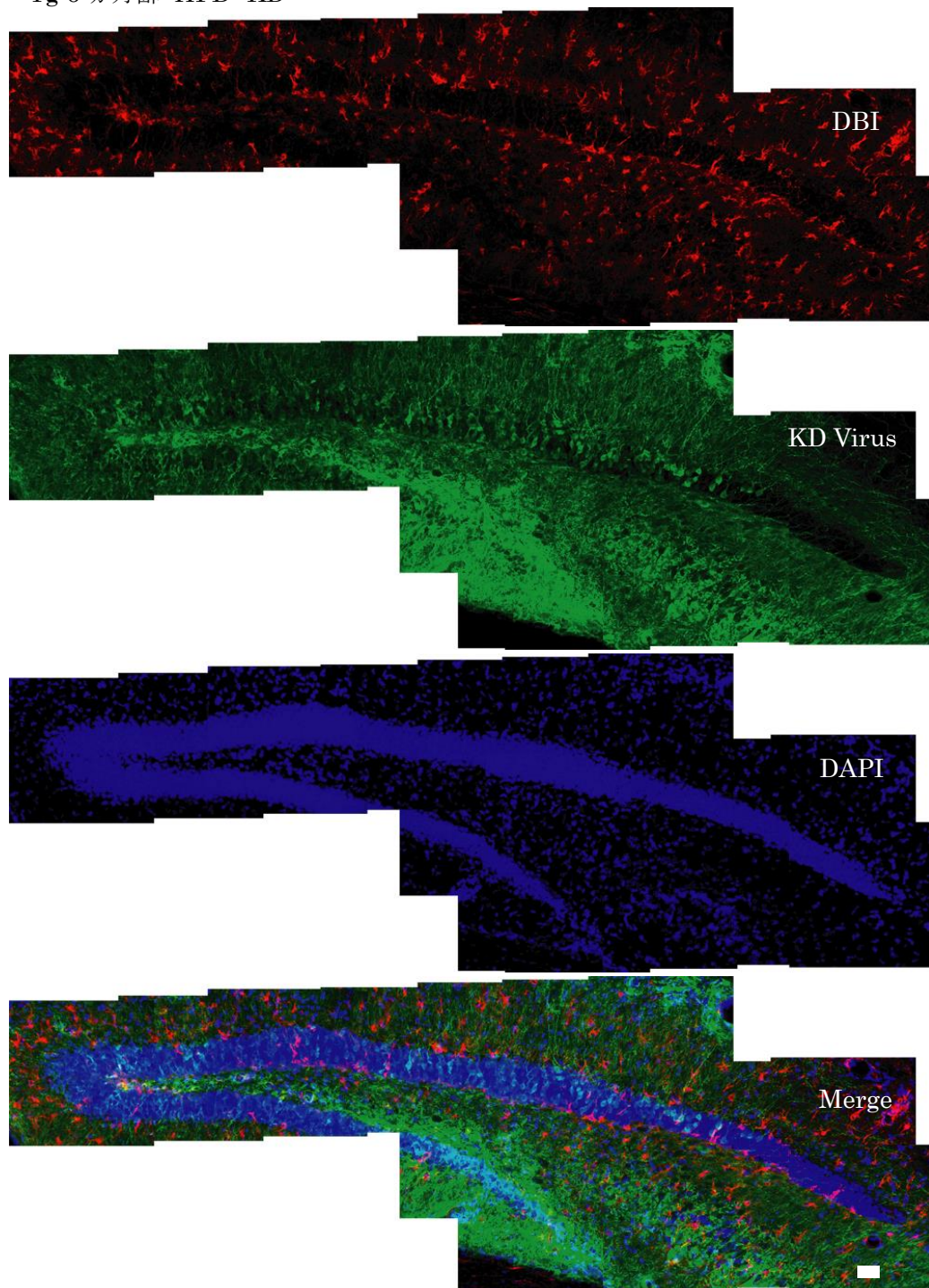


Fig.18 Tg 6 カ月齢 HFD+ KD の DBI 染色

Tg マウスの 6 カ月齢に HFD 給餌マウスに、レンチウイルスにより DBI をノックダウンした。DBI が抑制された歯状回における DBI の染色。KD レンチウイルスは緑、DBI は赤、DAPI (核) は青で表示した。Bar, 100 μ m

Tg 6 カ月齢 HFD+ SCR

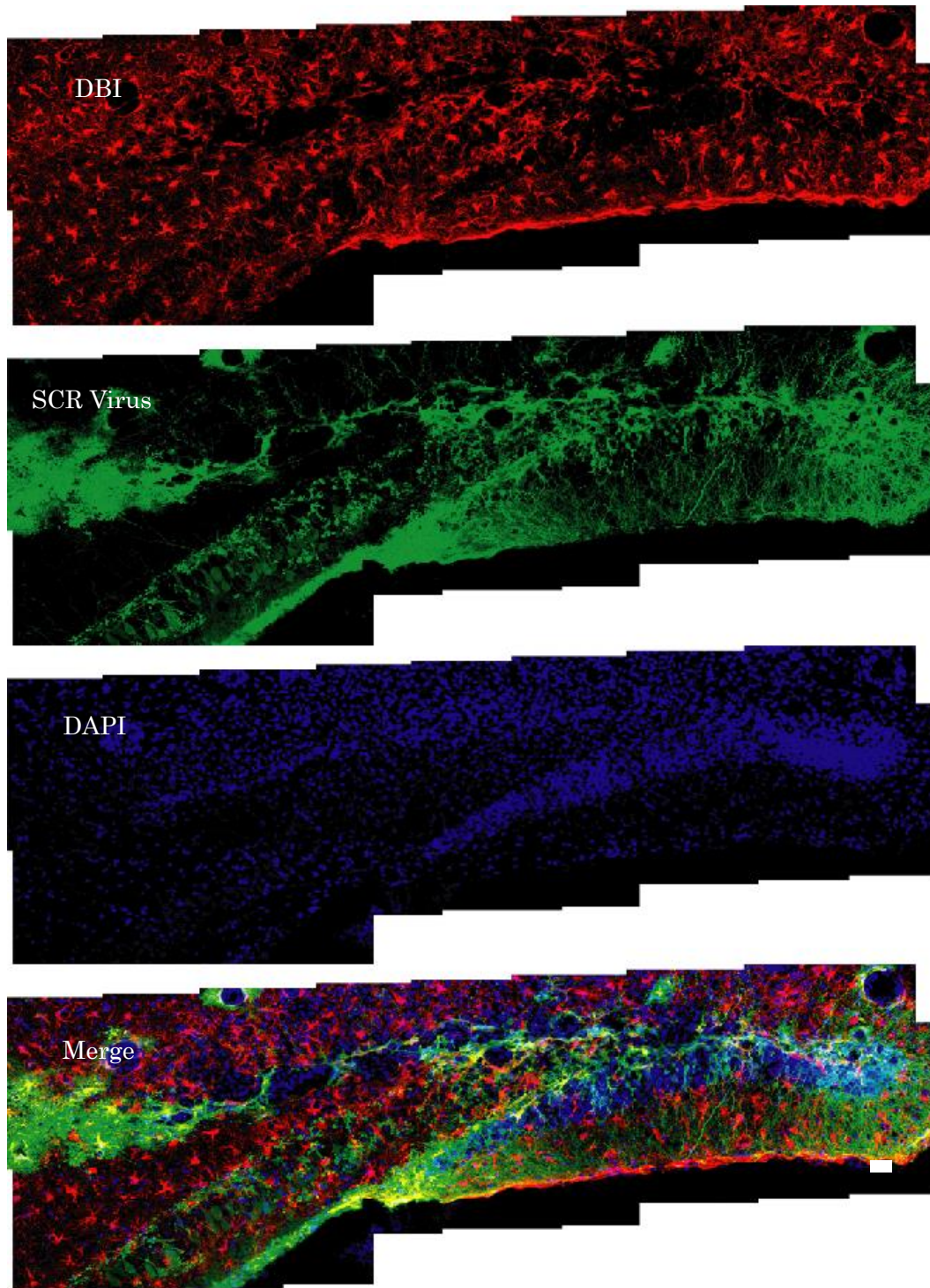


Fig.19 Tg 6 カ月齢 HFD+ SCR の DBI 染色

Tg マウスの 6 カ月齢に HFD 給餌マウスに、レンチウイルスにより DBI をノックダウンした。DBI が抑制された歯状回における DBI の染色。SCR レンチウイルスは緑、DBI は赤、DAPI (核) は青で表示した。Bar, 100 μ m

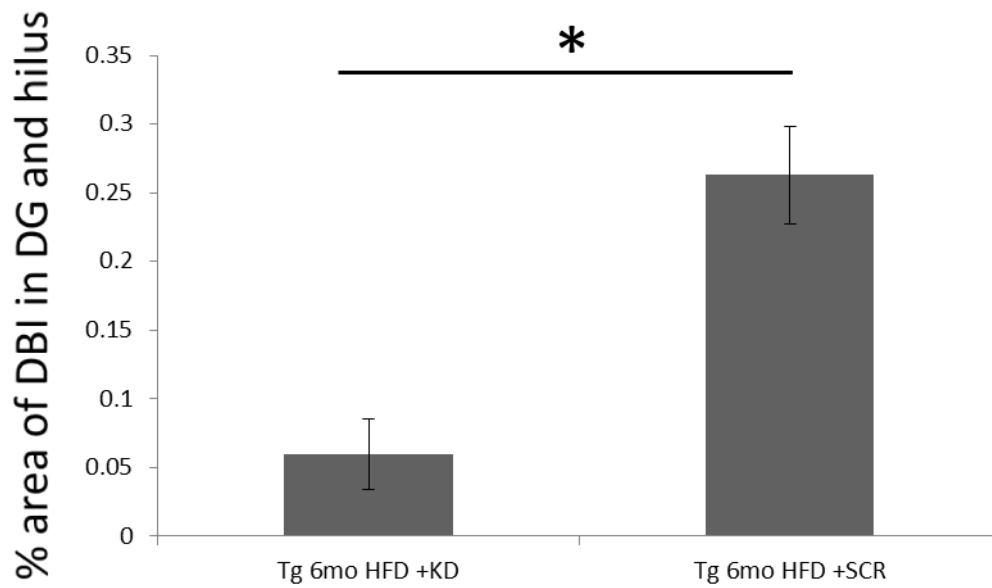


Fig.20 AD モデルマウスにおけるレンチウイルス感染後の DBI の発現

HFD を給餌した 6 ヶ月齢の Tg マウスに KD ウイルスまたは SCR ウイルス感染させた後、海馬歯状回 (DG) および、ヒラス (hilus) 部における DBI の発現領域の割合を示した。KD ウイルスが感染した AD モデルマウスでは DBI の発現の抑制が確認された。各群 N=3, T-test, * $p < 0.05$.

Tg 6 ヲ月齡 HFD+KD

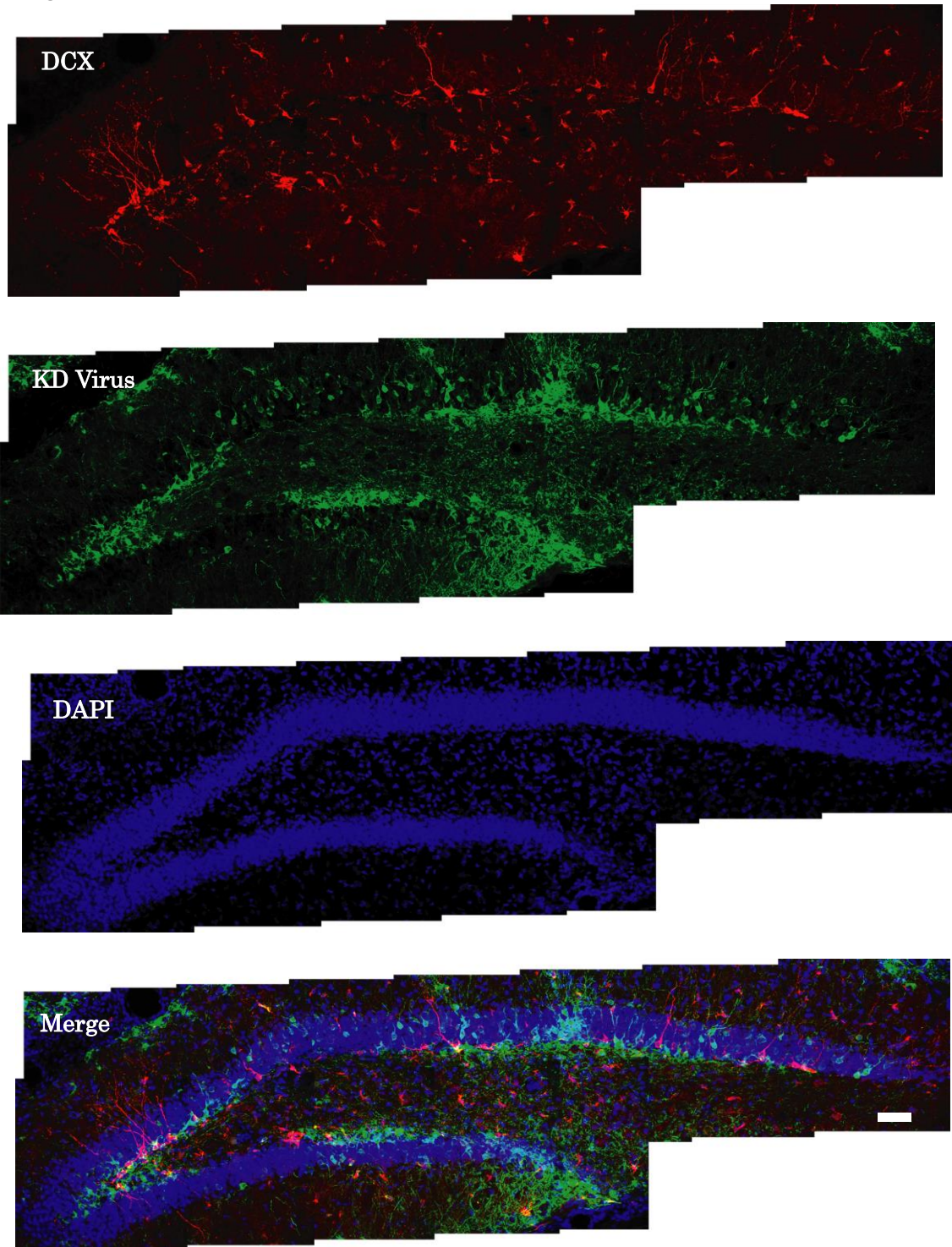


Fig.21 AD モデルマウスでの KD ウイルス感染後の DCX 染色

Tg マウスの 6 ヲ月齡に HFD 給餌マウスに KD ウイルスを感染させ DBI をノックダウンした。DBI が抑制された齒状回における DCX の染色。KD レンチウイルスは緑、DCX は 赤、DAPI (核) は青で表示。Bar, 100 μ m

Tg 6 カ月齢 HFD+SCR

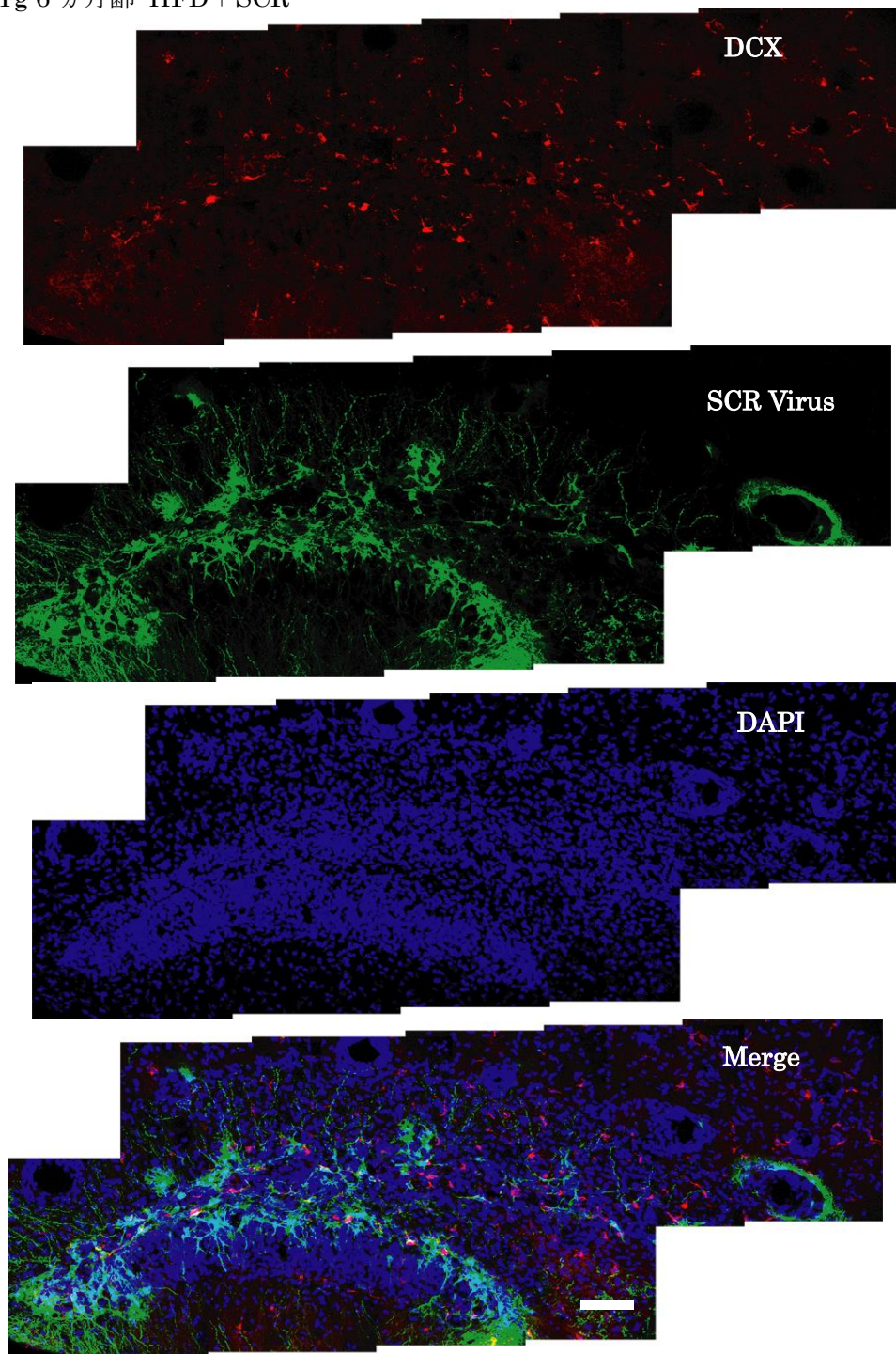


Fig.22 AD モデルマウスでの SCR ウイルス感染後の DCX 染色

Tg マウスの 6 カ月齢に HFD 給餌マウスに、SCR ウイルスを感染させ Control とし、歯状回における DCX を染色した。SCR レンチウイルスは緑、DCX は赤、DAPI (核) は青で表示。Bar, 100 μ m

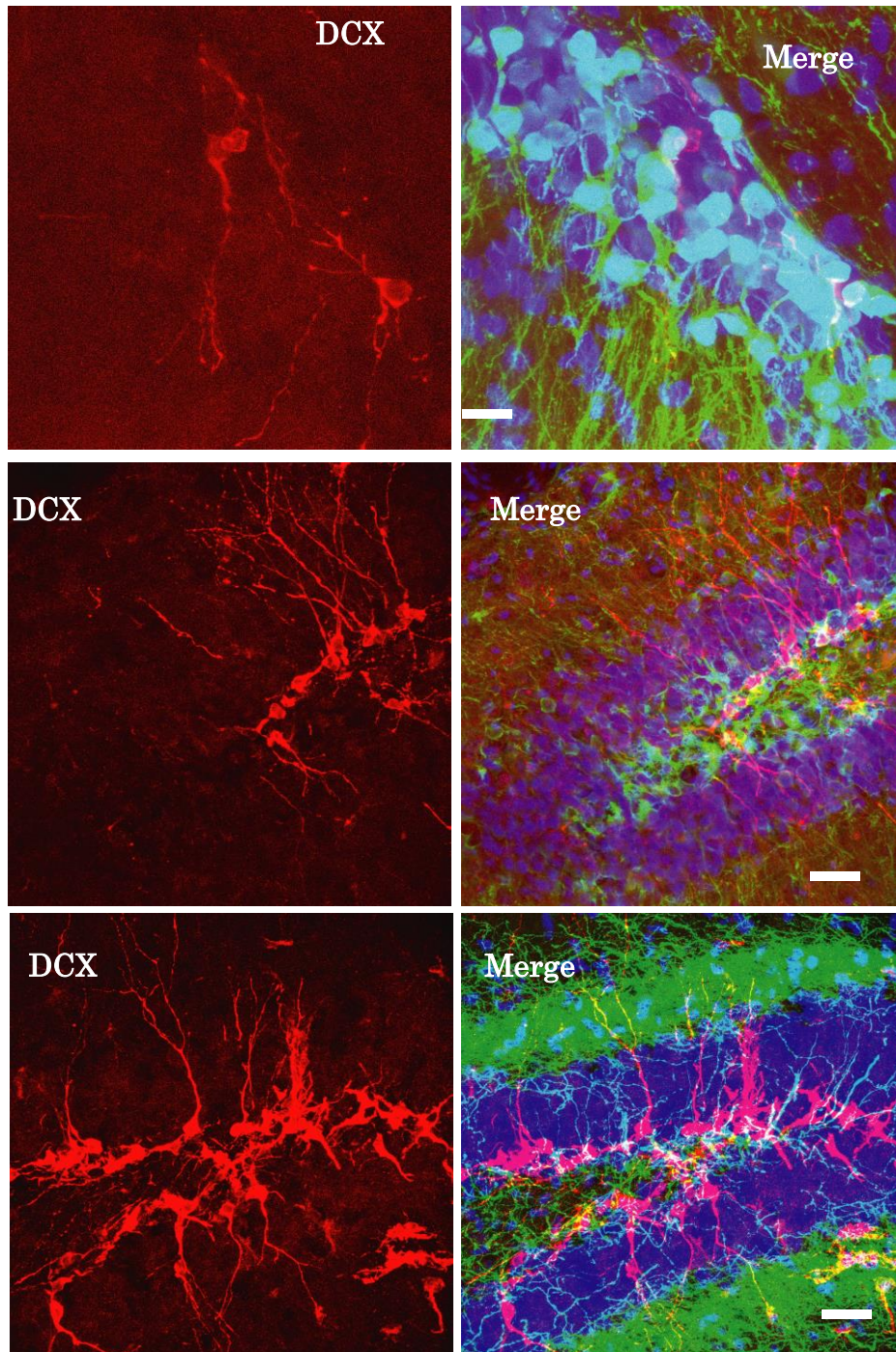


Fig.23 AD モデルマウスでの KD ウイルスの感染

Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD 給餌マウスにおいて DBI の抑制を行った。KD ウイルスまたは SCR ウイルスが感染した細胞 (緑) が分布する領域において、DCX (赤) と DAPI (核, 青) の染色を行った。Bars, 上段 10 μ m, 中下段 50 μ m

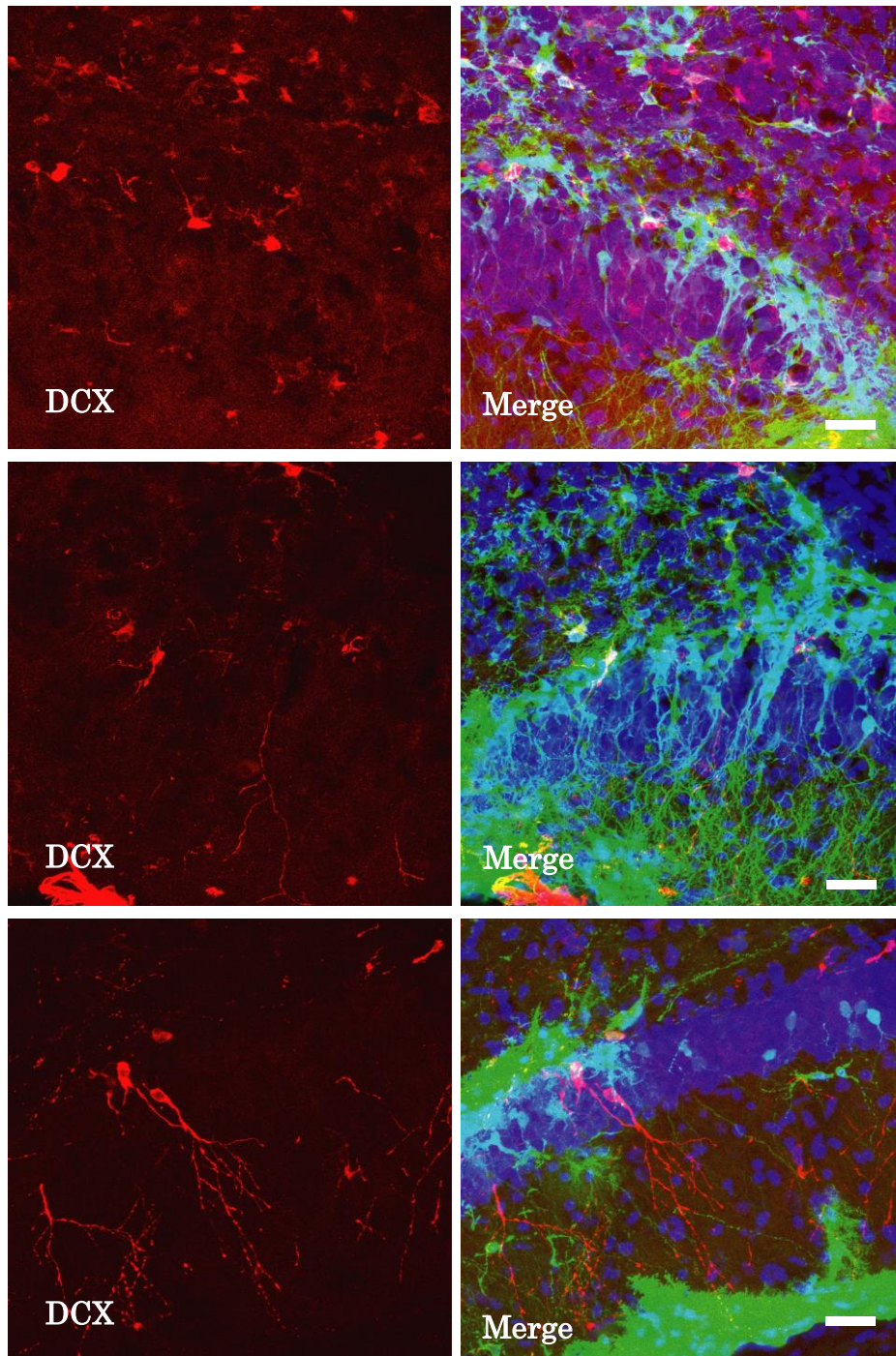


Fig.24 AD モデルマウスでの SCR ウイルスの感染

Tg マウスの 6 カ月齢に HFD 給餌マウスにおいて SCR ウイルスの感染を行った。SCR ウイルスが感染した細胞 (緑) が分布する領域において、DCX (赤) と DAPI (核, 青) の染色を行った。Bars, 10 μ m

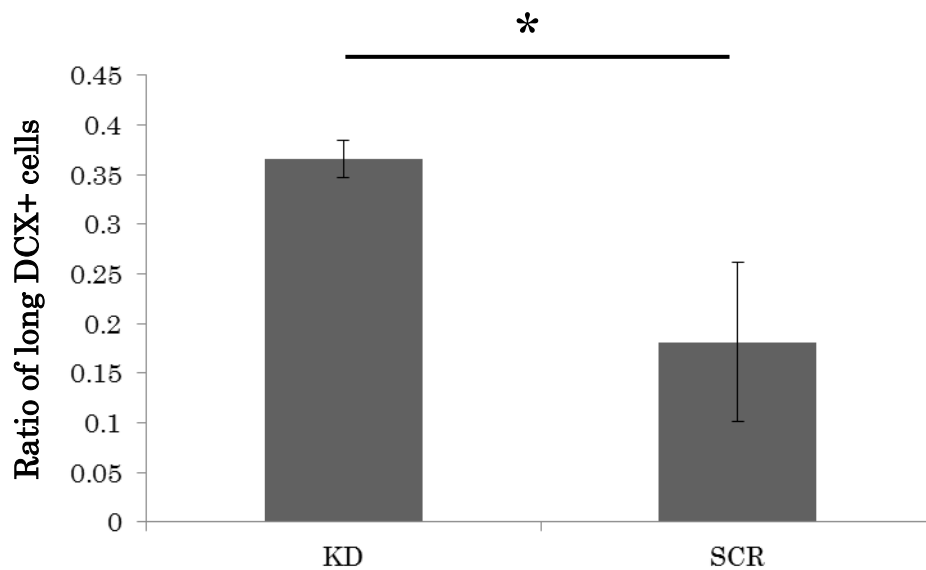


Fig.25 AD モデルマウスでの DBI の抑制

Tg マウスの 6 ヶ月齢に HFD 給餌マウスに、KD および SCR ウイルスを感染させた。DBI が抑制された歯状回における DCX 陽性細胞の内、分子層に突起が到達する成熟した DCX 陽性細胞の割合を係数した。その結果 DBI の抑制により、DCX の伸長に回復が見られた。

各群 N=3, n>43, T-test , * $p<0.05$,

2.4 考察

AD の症状を示す高齢 Tg マウスにおいて DBI の発現の増加がみられ、また HFD により早期に発症させた Tg でも同様に増加がみられた。さらに早期に誘発するモデルにおいて Car の投与により認知記憶の低下を抑制したモデルでは増加がみられなかったことから、AD の症状、認知記憶の低下に伴って DBI の増加が表れていると考えられる。これらの AD モデルマウスでの DBI の増加は前章で述べた神経幹細胞や神経前駆細胞が増加したことによるものとは考えにくい。先行研究においても、加齢により神経幹細胞数は変わらない、もしくは減少するとされているためである (Aizawa et al., 2005; Verret, et al., 2007)。

使用した AD モデルマウスにおいても、神経幹細胞数は変化しない事が観察されている。AD モデルマウスで増加した DBI の発現は S100 β との共発現からアストロサイトでの発現であると考えられる (Fig.16)。ラットのアストロサイトの培養系を用いた研究において、A β を培地中に添加すると DBI の発現が増加するといった報告があり、アルツハイマー病の症状の一つである A β が、DBI の発現を促進することを示し、本研究の結果と一致している (Tokay et al., 2005)。

またアルツハイマーモデルマウスの海馬内では炎症が生じている事が示唆されていることから、この炎症がアストロサイトの増殖、活性化を誘導し、このアストロサイトでの DBI の発現が増加していると考えられる (Biscaro et al.,

2011)。Car の投与群ではこの炎症が抑制されたために、アストロサイトの活性化が起こらず、DBI の増加が見られなかったのではないかと考えられる。

さらに DBI の増加した AD モデルマウスでは、DCX 陽性細胞の突起の伸長に抑制が生じている。これは第一章で示した様に DBI により新生ニューロンの分化が阻害されたためと考えられる。炎症により活性化したアストロサイトより、DBI が過剰に海馬中に放出され、神経幹細胞や神経前駆細胞にある GABA 受容体に結合することによりチャネルの特性が変化し、このために脱分極の抑制が起こり、これがアルツハイマーモデルマウスのニューロン新生を阻害しているのではないかと考えられる。この結果が DCX 陽性細胞の伸長が低下、つまり DCX 陽性細胞の成熟不良を生じさせ、この成熟不全が認知記憶機能の低下につながっているとも推測される (Fig.25)。これは DBI を過剰発現させたマウスでは、海馬依存的な認知記憶の低下が見られることとも一致しており (Siiskonen et al., 2007)、アルツハイマー病における認知記憶機能の低下の一端をこの DBI の増加で説明できる可能性を示唆している。AD モデルマウスで過剰な DBI の発現が新生ニューロンの成熟不良の原因と考えられる。

そこで AD モデルマウスで DBI の発現抑制実験を行った場合、DCX 陽性細胞の成熟不全は改善されるかについて調べるため、レンチウイルスを用いて AD モデルマウスの海馬内において局所的に DBI の発現を抑制する実験を行った。

その結果レンチウイルスのレポーターである **GFP** 陽性の海馬領域における **DCX** の伸長の程度をコントロールである **SCR** ウイルス感染マウスの海馬の **DCX** 陽性細胞と比較したところ、**DBI** 抑制群では **DCX** の伸長の回復が見られた。本研究では **GFP** 陽性細胞と **DCX** 陽性細胞が同一の細胞で重なることがほとんど観察されなかったことから、周囲のアストロサイトから放出される **DBI** が **DCX** の伸長に対して影響を及ぼしたものと考えられる。また、本実験ではウイルス投与により若干ではあるが海馬自体にも軽微な損傷を与えてしまうため、認知記憶行動テスト等の海馬依存的な行動試験は行えなかったが、**AD** モデルマウスの海馬において、何らかの方法により **DBI** の発現を抑制することが出来れば認知記憶機能の改善につながると考えられる。先行研究により、示されている **Car** の投与によってアルツハイマーモデルマウスの認知記憶機能が改善効果した結果 (Herculano et al., 2013) は、**Car** の投与により炎症反応が抑えられ、その結果として過剰な **DBI** の発現が抑制されたためであると考えられる。

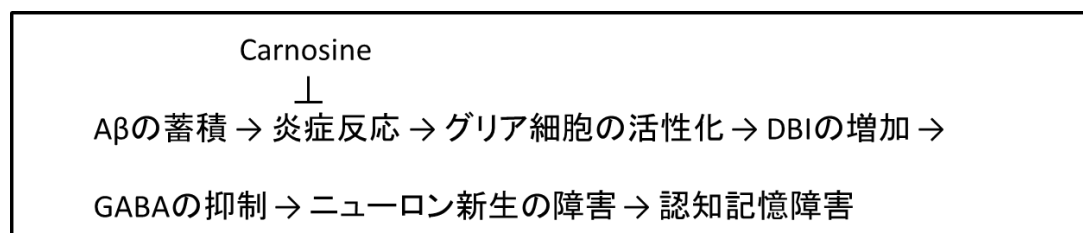
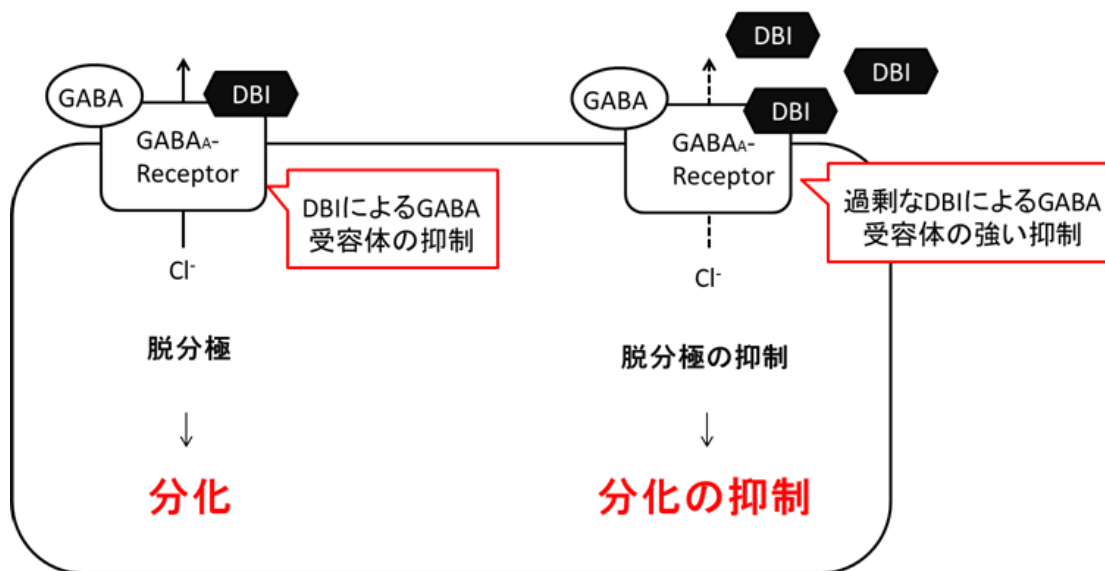


Fig.25 アルツハイマーモデルマウスにおける DBI の作用

アルツハイマーモデルマウスにおけるニューロン新生過程に DBI の作用を模式的に示した。アルツハイマーモデルマウスでは DBI が過剰にあるため、GABA 受容体が抑制され、脱分極が抑制され、分化が抑制されると考えられる。DBI はアルツハイマー病により誘起された炎症によりアストロサイトが活性化することで増加したと考えられる。Car には抗炎症作用があり、これにより炎症が抑制され、DBI の発現が抑制されていると考えられる。

DBI はニューロン新生過程において、神経幹細胞や神経前駆細胞に強く発現し、分化が進行するとこの発現は低下することが免疫染色により示された。さらに、この DBI は GABA 受容体の抑制を介してニューロン新生を制御していることが RNAi を用いた結果により示唆された。ニューロン新生は GABA 入力により、促進されることが明らかにされており、DBI は GABA のインバースアゴニストである。この DBI が神経幹細胞および神経前駆細胞に発現し、GABA 受容体を抑制することでこれらの細胞を維持していると考えられる (Fig.5 および Fig.6)。分化が進行するとともに DBI の発現が低下し、GABA 受容体の抑制が解除され分化が進行している (Fig.11)。つまり DBI は適切な時期にニューロン新生を生じさせるために使われていて、別の言葉で表現するならば神経幹細胞や神経前駆細胞のプールを維持するために機能しているとも考えられる。今後の課題として、この DBI の発現が何によって制御されているのか、DBI の発現が抑制された神経幹細胞や神経前駆細胞では GABA に対する反応性が確かに向上するのか、パッチクランプ法などにより調べる必要があると考えられる。

DBI は通常状態では上述のように分化を抑制し、未分化細胞のプールを維持していると考えられるが、アルツハイマー病では、この DBI が海馬領域において過剰に発現している。これはアルツハイマー病の発症によって炎症反応が生じ、

それにより活性化したアストロサイトにおいて DBI の発現が増加したためと考えられる。この過剰に発現した DBI がアルツハイマーモデルマウスのニューロン新生を阻害していることが示唆された。このアルツハイマーモデルマウスでの DBI の過剰発現は Car の投与により認知記憶低下の改善とともに DBI の発現増加も抑制されていた。Car の投与によりアルツハイマーモデルマウスで生じていたニューロン新生の障害が改善された。さらに RNAi 法を用いた、DBI の抑制実験によってもニューロン新生の障害は抑制された。そのため、DBI の過剰発現による、ニューロン新生の障害が、アルツハイマーモデルマウスの認知記憶障害の一因になっている可能性が示唆された。今後の課題として、DBI の発現の抑制により認知記憶障害が改善されるか行動試験により評価する必要がある。

本研究により、DBI のニューロン新生における機能および (Fig.11)、ニューロン新生の障害が関与しているとされる神経疾患の一つである、アルツハイマーモデルマウスでの DBI の影響を示唆した (Fig.25)。つまり通常状態では、DBI はニューロン新生過程において分化を抑制するために機能しているが、この DBI が過剰に発現するアルツハイマーモデルマウスでは、DBI が持つこの分化抑制機能によりニューロン新生そのものが障害されている可能性が示唆された。この過剰な DBI の発現を引き起こす原因はアルツハイマー病により脳内の炎症

反応によるものと考えられ、アルツハイマー病による認知記憶の低下はこの炎症反応を抑制することが出来れば、アルツハイマー病の症状を改善する可能性が示唆された。先行研究により示されていた **Car** によるアルツハイマーモデルマウスでの認知記憶機能の低下の抑制も、炎症を抑制することによるニューロン新生に対する障害が抑制された結果であったと考えられる。

本研究結果はアルツハイマーモデルマウスにおいて **DBI** の発現抑制がアルツハイマー病の症状である、認知記憶障害を改善につながる可能性を示唆した。

AP (Anterior-Posterior)

前方(頭)-後方(尾)。体軸の前後軸。

Car (Carnosine)

カルノシン。β-アラニンとヒスチジンからなるジペプチド。生体内においてラジカルスカベンジャーとして働く抗酸化剤。

DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole)

紫外光で励起される蛍光色素。核内に取り込まれ DNA に結合する。本研究では海馬歯状回の顆粒細胞層を可視化する目的で使用している。

DCX (Doublecortin)

未成熟ニューロンの形態形成に関与する微小管結合タンパク質。新生未成熟ニューロンのマーカーとして使用した。本研究では分子層に突起を伸長させている細胞をより成熟した DCX 陽性細胞とした。

DBI (Diazepam binding inhibitor)

脳内においては嗅球、海馬、小脳において強く発現する 10 kDa の内因性ペプチド。GABA 作動性アゴニストである Diazepam と競合して、その薬効を阻害する。また DBI 自身にも GABA 受容体に対してインバーサアゴニストとして機能する。

FABP7 (Fatty acid binding protein 7)

別名 BLBP (Brain lipid binding protein)。ラジアルグリア様神経幹細胞に発現する脂質結合タンパク質。海馬の神経幹細胞にも発現している。

GABA (γ-aminobutyric acid)

ニューロンに対して抑制性の神経伝達物質として作用するアミノ酸。その一方で神経前駆細胞においては脱分極を促進し、分化を促進する。

GCL (Granular cell layer)

海馬歯状回の顆粒細胞層。

GFAP (Glial fibrillary acidic protein)

アストロサイトおよびアストロサイト様神経幹細胞に発現が見られる中間径フィラメント。本研究では神経幹細胞のマーカーとして使用した。

HBSS (Hanks' Balanced Salt Solutions)

ハンクス平衡塩溶液。

KD (Knock Down)

ノックダウン。レンチウイルスにより **shRNAi** を感染した細胞に組み込み、特定のタンパク質の発現を抑制する。本研究では **DBI** に対して行った。

L (Lateral)

左右方向の体軸。

ML(Molecular layer)

分子層。顆粒細胞層の外側の領域であり貫通繊維の投射がある。

Nestin

主に神経幹細胞から神経前駆細胞にかけて発現している中間径フィラメント。本研究では神経幹細胞や神経前駆細胞のマーカーとして使用した。

PBS (Phosphate buffered saline)

リン酸緩衝生理食塩水。

Prox1 (Prospero-related homeobox 1)

顆粒細胞に発現が認められる **prospero** 関連ホメオボックス 1 転写因子。神経前駆細胞以降の分化段階において発現している。

SCR (Scramble)

ノックダウンに対してコントロールとして、何の作用もないことが確認されている配列。これをレンチウイルスに組み込みノックダウン実験のコントロールとし本研究では使用した。

SGZ (Subgranular zone)

顆粒細胞下帯。海馬歯状回の最内層の領域であり神経幹細胞が存在し、ニューロン新生が生じる。

Sox2 (Sex-determining region Y-box2)

神経幹細胞や神経上皮細胞に発現が認められる転写因子。神経幹細胞的性質の維持に関与しているとされる。本研究では神経幹細胞および神経前駆細胞のマーカーとして使用した。

S100β

カルシウム結合ドメインを持つ分子量 8~14 kDa の低分子タンパク質。中枢神経系ではアストロサイトに発現する。

TBS (Tris buffered saline)

トリス緩衝生理食塩水。

TOTO3

643nm で励起される蛍光色素。核内に取り込まれ DNA に結合する。本研究では海馬歯状回の顆粒細胞層を可視化する目的で使用している。

V (Vertical)

背中と腹を結ぶ体軸。

引用文献

Aizawa K, Ageyama N, Terao K, Hisatsune T. 2011. Primate-specific alterations in neural stem/progenitor cells in the aged hippocampus. *Neurobiology of Aging* 32(1):140-150.

Alfonso J, Le Magueresse C, Zuccotti A, Khodosevich K, Monyer H. 2012. Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by Reducing GABA Signaling. *Cell Stem Cell* 10(1):76-87.

Alho H, Costa E, Ferrero P, Fujimoto M, Cosenzamurphy D, Guidotti A. 1985. Diazepam-binding inhibitor - A neuropeptide located in selected neuronal populations of rat-brain. *Science* 229(4709):179-182.

Allen E. 1912. The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. *Journal of Comparative Neurology* 22(6):547-568.

Altman J. 1962. Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine. *Experimental Neurology* 5(4):302-318

Altman J, Das G. 1965a. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology* 124(3):319-335

Altman J, Das G. 1965b. Post-natal origin of microneurons in rat brain. *Nature* 207(5000):953-956

Barbaccia M, Costa E, Ferrero P, Guidotti A, Roy A, Sunderland T, Pickar D, Paul S, Goodwin F. 1986. Diazepam-binding inhibitor - a brain neuropeptide present in human spinal-fluid - studies in depression, schizophrenia, and Alzheimers-disease. *Archives of General Psychiatry* 43(12):1143-1147.

Belelli D, Lambert JJ. 2005. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nature Review Neuroscience* 6(7):565-575.

Bormann J. 1988a. Electrophysiology of GABAA and GABA_B receptor subtypes. Trends Neuroscience 11(3):112-116.

Biscaro B, Lindvall O, Tesco G, Ekdahl CT, Nitsch RM. 2012. Inhibition of microglial activation protects hippocampal neurogenesis and improves cognitive deficits in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. Neurodegenerative diseases 9(4):187-198.

Brown J, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn C, Winkler J, Aigner L, Kuhn H. 2003. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. Journal of Comparative Neurology 467(1):1-10.

Costa E, Guidotti A. 1991. Diazepam binding inhibitor (DBI): a peptide with multiple biological actions. Life Science 49(5):325-344.

Eisch AJ, Petrik D. 2012. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? Science 338(6103):72-75.

Farrer L, Cupples L, Haines J, Hyman B, Kukull W, Mayeux R, Myers R, PericakVance M, Risch N, vanDuijn C. 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease - A meta-analysis. *Jama-Journal of the American Medical Association* 278(16):1349-1356.

Ferrarese C, Appollonio I, Frigo M, Gaini S, Piolti R, Frattola L. 1989a. Benzodiazepine receptors and diazepam-binding inhibitor in human cerebral-tumors. *Annals of Neurology* 26(4):564-568.

Ferrarese C, Appollonio I, Frigo M, Meregalli S, Piolti R, Tamma F, Frattola L. 1990. Cerebrospinal-fluid levels of diazepam-binding inhibitor in neurodegenerative disorders with dementia. *Neurology* 40(4):632-635.

Ferrarese C, Appollonio I, Frigo M, Piolti R, Tamma F, Frattola L. 1989b. Distribution of a putative endogenous modulator of the GABAergic system in human-brain. *Neurology* 39(3):443-445.

Goate A, Chartierharlin M, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericakvance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimers-Disease. *Nature* 349(6311):704-706.

Guidotti A, Forchetti CM, Corda MG, Konkel D, Bennett CD, Costa E. 1983. Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 80(11):3531-3535.

Herculano B, Tamura M, Ohba A, Shimatani M, Kutsuna N, Hisatsune T. 2013. Beta-alanyl-L-histidine rescues cognitive deficits caused by Feeding a high fat diet in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease* 33(4):983-997.

Jonsson T, Atwal J, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson P, Bjornsson S, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J, Hoyte K, Gustafson A, Liu Y, Lu Y, Bhangale T, Graham R, Huttenlocher J, Bjornsdottir G, Andreassen O, Jonsson E, Palotie A, Behrens T, Magnusson O, Kong A, Thorsteinsdottir U, Watts R, Stefansson K. 2012. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488(7409):96-99.

Katayama K, Wada K, Miyoshi H, Ohashi K, Tachibana M, Furuki R, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakajima A, Kadowaki T, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Kamisaki Y, Mayumi T. 2004. RNA interfering approach for clarifying the PPAR gamma pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA. *Febs Letters* 560(1-3):178-182.

Muramatsu D, Sato Y, Hishiyama S, Miyamoto Y, Hisatsune T. 2005. Transplantation of GABAergic neurons into adult mouse neocortex. *Experimental Neurology* 194(1):1-11

Kitamura T, Saitoh Y, Takashima N, Murayama A, Niibori Y, Ageta H, Sekiguchi M, Sugiyama H, Inokuchi K. 2009. Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell* 139(4):814-827.

Li G, Bien-Ly N, Andrews-Zwilling Y, Xu Q, Bernardo A, Ring K, Halabisky B, Deng C, Mahley R, Huang Y. 2009. GABAergic interneuron dysfunction impairs hippocampal neurogenesis in adult apolipoprotein E4 knockin mice. *Cell Stem Cell* 5(6):634-645.

Liu C, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. 2013. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews Neurology* 9(2):106-118.

Luchetti S, Bossers K, Van de Bilt S, Agrapart V, Morales RR, Frajese GV, Swaab DF. 2011. Neurosteroid biosynthetic pathways changes in prefrontal cortex in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 32(11):1964-1976.

Madsen T, Kristjansen P, Bolwig T, Wortwein G. 2003. Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience* 119(3):635-642.

Majewska MD. 1992. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Progress in Neurobiology* 38(4):379-395.

Messier B, Leblond C, Smart I. 1958. Presence Of Dna Synthesis And Mitosis In The Brain Of Young Adult Mice. *Experimental Cell Research* 14(1):224-226.

Mu Y, Gage FH. 2011. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration* 6:85.

Nochi R, Kaneko J, Okada N, Terazono Y, Matani A, Hisatsune T. 2013. Diazepam treatment blocks the elevation of hippocampal activity and the accelerated proliferation of hippocampal neural stem cells after focal cerebral ischemia in mice. *Journal of Neuroscience Research* 91(11):1429-1439.

Papadopoulos V, Brown AS. 1995. Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 53(1-6):103-110.

Raber J, Rola R, LeFevour A, Morhardt D, Curley J, Mizumatsu S, VandenBerg S, Fike J. 2004. Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiation Research* 162(1):39-47.

Robel P, Baulieu EE. 1995. Neurosteroids: biosynthesis and function. *Critical reviews in neurobiology* 9(4):383-394.

Rola R, Raber J, Rizk A, Otsuka S, VandenBerg S, Morhardt D, Fike J. 2004. Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Experimental Neurology* 188(2):316-330.

Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R. 2011. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472(7344):466-470.

Shoyab M, Gentry L, Marquardt H, Todaro G. 1986. Isolation and characterization of a putative endogenous benzodiazepineoid (endozepine) from bovine and human-brain. *Journal of Biological Chemistry* 261(26):1968-1973.

Siiskonen H, Oikari S, Korhonen V, Pitkanen A, Voikar V, Kettunen M, Hakumaki J, Wahlfors T, Pussinen R, Penttonen M, Kiehne K, Kaasinen S, Alhonen L, Janne J, Herzig K. 2007. Diazepam binding inhibitor overexpression in mice causes hydrocephalus, decreases plasticity in excitatory synapses and impairs hippocampus-dependent learning. *Molecular and Cellular Neuroscience* 34(2):199-208.

Slobodyansky E, Kurriger G, Kultasilinsky K. 1992. Diazepam binding inhibitor processing in the rhesus-monkey brain - an immunocytochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 5(2):169-180.

Sun B, Halabisky B, Zhou Y, Palop J, Yu G, Mucke L, Gan L. 2009. Imbalance between GABAergic and Glutamatergic transmission impairs adult neurogenesis in an animal model of Alzheimer's disease. *Cell Stem Cell* 5(6):624-633.

Tokay T, Masmoudi O, Gandolfo P, Leprince J, Pelletier G, Vaudry H, Tonon MC. 2005. Beta-amyloid peptides stimulate endozepine biosynthesis in cultured rat astrocytes. *Journal of Neurochemistry* 94(3):607-616.

Tong Y, Toranzo D, Pelletier G. 1991. Localization of diazepam-binding inhibitor (DBI) messenger-RNA in the rat-brain by high-resolution insitu hybridization. *Neuropeptides* 20(1):33-40.

Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. 2005. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47(6):803-815.

Van der Borght K, Havekes R, Bos T, Eggen B, Van der Zee E. 2007. Exercise improves memory acquisition and retrieval in the Y-maze task: Relationship with hippocampal neurogenesis. *Behavioral Neuroscience* 121(2):324-334.

van Praag H, Christie B, Sejnowski T, Gage F. 1999. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(23):13427-13431.

Vankammen D, Guidotti A, Kelley M, Gurklis J, Guarneri P, Gilbertson M, Yao J, Peters J, Costa E. 1993. CSF diazepam-binding inhibitor and schizophrenia - clinical and biochemical relationships. *Biological Psychiatry* 34(8):515-522.

Verret L, Jankowsky JL, Xu GM, Borchelt DR, Rampon C. 2007. Alzheimer's-Type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Neuroscience* 27(25):6771-6780.

Warner-Schmidt JL, Duman RS. 2006. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16(3):239-249.

Williams B, Luo Y, Ward C, Redd K, Gibson R, Kuczaj S, McCoy J. 2001. Environmental enrichment: Effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. *Physiology & Behavior* 73(4):649-658.

Winner B, Kohl Z, Gage FH. 2011. Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience* 33(6):1139-1151

Yamada K, Hisatsune T, Uchino S, Nakamura T, Kudo Y, Kaminogawa S. 1999. NMDA receptor mediated Ca^{2+} responses in neurons differentiated from p53^{-/-} immortalized Murine neural stem cells. *Neuroscience Letter* 264(1-3):165-167.

Yamaguchi M, Saito H, Suzuki M, Mori K. 2000. Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport* 11(9):1991-1996.

Yanase H, Shimizu H, Kanda T, Fujii H, Iwanaga T. 2001. Cellular localization of the diazepam binding inhibitor (DBI) in the gastrointestinal tract of mice and its coexistence with the fatty acid binding protein (FABP). Archives of Histology and Cytology 64(4):449-460.

Yanase H, Shimizu H, Yamada K, Iwanaga T. 2002. Cellular localization of the diazepam binding inhibitor in glial cells with special reference to its coexistence with brain-type fatty acid binding protein. Archives of Histology and Cytology 65(1):27-36.

岡田夏美 修士論文 2006「成体海馬ニューロン新生に内在性ペプチド DBI が及ぼす役割の研究」

谷口香里 修士論文 2009「アルツハイマー病モデルマウスに於ける海馬ニューロン新生の動態解析」

木村康太 修士論文 2010「成体マウス海馬を構成する細胞に対する RNA 技術の確立」

松田孟士 日本神経科学学会 2013 「The role of hippocampal cholinergic system on the maturation of adult born neurons」

謝辞

本研究を進めるにあたり、研究の方向性、文章作成、発表等、研究に関する多くのことをご指導して頂き、また研究を進めるにあたって通常では得難い経験を得る機会を与えて頂いた、東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻細胞応答化学分野の久恒辰博准教授にはこの場を借りて厚くお礼申し上げます。

北海道大学医学研究科医学専攻解剖学講座の岩永敏彦博士には抗 DBI 抗体を提供して頂きました。本研究の DBI とニューロン新生の関係を研究するにあたって、この抗体は無くてもならないものでありました。心よりお礼申し上げます

理化学研究所バイオリソースセンター細胞運命情報解析技術開発サブチーム三好浩之博士には RNAi 実験を行う上で必要なレンチウイルスに使用するプラスミドをはじめ 293T 細胞等のバイオリソースを供与して頂き、さらにはウイルスを作製する上での技術等様々な事を教えて頂きました。心よりお礼申し上げます。

富山大学医学薬学研究部生化学講座の井ノ口馨博士、大川宜昭博士には新生細胞を標識するためのレトロウイルスベクターおよびパッケージング細胞である Plat-GP 細胞を許与して頂きました。これにより本研究を発展させるきっかけとなりました。心よりお礼申し上げます。

東京大学大学院医学研究科細胞分子生理学分野の山口正洋博士には Nestin-GFP マウスを供与して頂きました。本研究を行う上で必要不可欠な動物を提供して頂いたことに改めて、心よりお礼申し上げます。

本学研究科の先生方をはじめ研究員の方、本研究室の卒業生、先輩方、そして同期や後輩の皆様には研究および実験に関する議論や相談にのって頂いただけでなく、何度も挫折しそうになった際励ましの言葉をたくさん頂きました。修士時代から 5 年間、研究生活が有意義なものとなったのは皆様のおかげです。心より感謝申し上げます。

最後に学部時代から 6 年間にわたり、研究生活という不規則な生活をサポートしてくれた両親に深く感謝いたします。本当にありがとうございました。

2014 年 1 月
金子 順