

論文の内容の要旨

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

【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、ニューロン新生を促進する GABA 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 agonist 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 inverse agonist 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)。また 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 Scramble(SCR) 配列を組み込んだ (Katayama et al., FBES lett, 2004)。レンチウイルスを構成するコンストラクトおよび、Knock Down(KD)配列および、SCR 配列は Fig.1 に示した。これ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 Striatal 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(Fig.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 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(Fig.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。

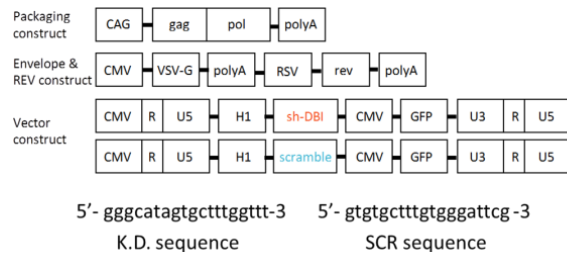


Fig.1 レンチウイルスの配列とコンストラクト
レンチウイルスのコンストラクトおよび、K.D.と SCR 配列を示した。このプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、ウイルスを作製した。

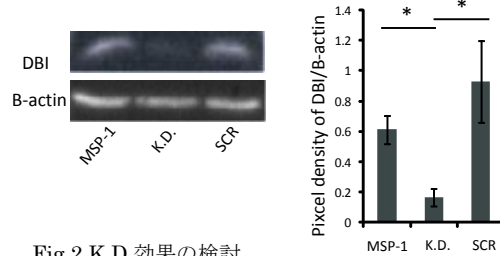


Fig.2 K.D.効果の検討
インタクトな MSP-1 細胞、K.D.および SCR ウイルスを感染させた細胞において DBI の発現量を WesternBlot により比較し効果を確認した。n=3, T-test, *p<0.05

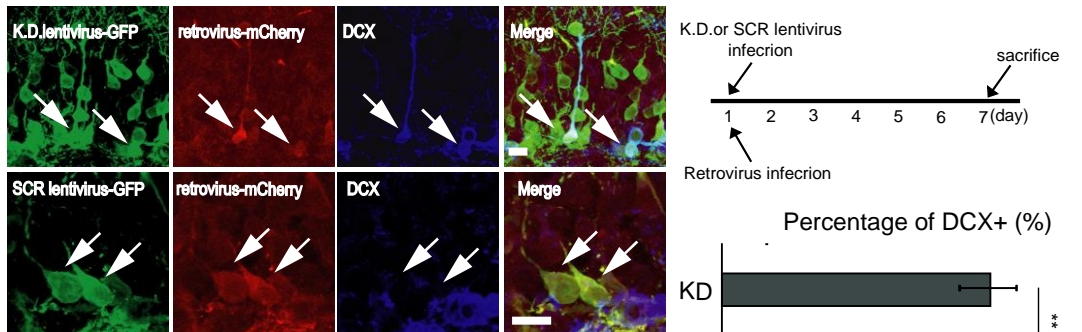


Fig.3 海馬歯状回における DBI の抑制
レンチウイルスを用いた RNAi 法により海馬歯状回の DBI の発現を抑制した。その結果 DBI が抑制された新生細胞において、その分化が促進され、DCX 陽性細胞となる細胞が増加した。Scale bar 10μm 各群 N=3, n=10, T-test, **p<0.01

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^{ΔE9})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 か月齢を超えると明瞭に AD の症状である、A β 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 か月齢から 2 か月間与えることで、早期に認知記憶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(Bruno., et al, J Alzheimers Dis, 2013)。野生型(WT)マウスの 6 か月齢、Tg マウスの 6 か月齢、Tg マウスの 6 か月齢に HFD を給餌したマウス、Tg マウスの 6 か月齢に HFD と Car を給餌したマウス、WT および Tg マウスで 17-19 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 か月齢に HFD を与えた群、Tg マウスの 17-19 月齢で有意な DBI の発現の上昇が見られた (Fig.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。

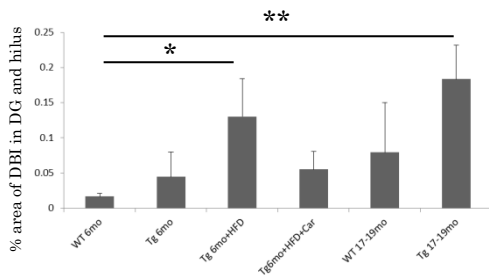
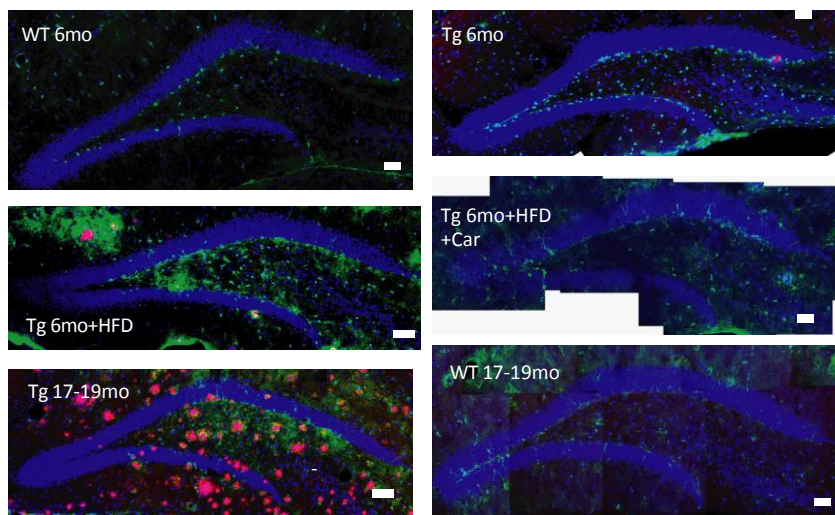


Fig.4 AD モデルマウスの海馬歯状回における DBI の発現 認知機能低下の進行と共に DBI の発現が増加している。 緑:DBI 赤:A β . 青:核. 各群 n=3 Dunnet 検定 *p<0.05, **p<0.01, scale bar 50 μ m

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 月齢、Tg マウスの 6 か月齢、Tg マウスの 6 か月齢に HFD 給餌マウス、Tg マウスの 6 か月齢に 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

その結果、認知記憶障害を示す、Tg マウスの 6 か月齢に HFD を与えた群、Tg マウスの 17-19 月齢で有意な DBI の発現の上昇が見られた (Fig.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。

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(Fig.5)。



Fig.5AD 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, scalebar 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(Fig.6)。

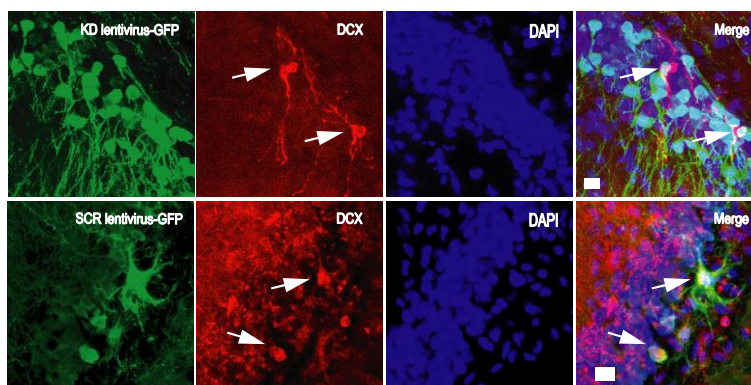


Fig.6 AD モデルマウスにおける DBI 抑制の効果
AD モデルマウスにおいて増加した DBI の発現の抑制を行った結果 DCX 陽性の未成熟ニューロン(矢印)の突起の伸長が見られた。Scale bar 10 μ m

【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。