

加齢健康脳科学研究部

(1) 構成員

部長 丸山和佳子

室長

加齢病態研究室 本山昇

病態制御研究室 南山誠

流動研究員

茨木京子

龍 訥

開発費研究員

永井雅代

能勢 弓

客員研究員

直井 信

脇田英明

Peter Riederer

研究生

早川智久

日坂真輔

伊藤祐基

研究補助員・事務補助員

加藤記代美

山田洋美

金森久美子

(2) 平成 25 年度研究活動の概要

加齢健康脳科学研究部の研究方針 (全体)

1) 「神経老化」は認知症のみならず神経変性疾患発症の最大のリスクファクターである。神経老化の分子メカニズムを

研究することで、新たな切り口による認知症の病態解明と予防、治療法の開発を行う。

2) さらに、疾患研究として老化に伴う認知症の原因となる変性疾患の中でも主にアルツハイマー病以外の疾患を中心に研究を行う。特にレビー小体病(瀰漫性レビー小体病および認知症を伴うパーキンソン病)、前頭側頭葉変性症などの変性疾患について、病因解明、診断、治療の開発に向けて研究を行った。

具体的には

2)-i) 神経変性疾患における神経老化の役割を果たす酸化ストレス傷害の蓄積と、(フォークヘッド型転写因子を中心する)遺伝子発現制御について、主に細胞モデルを用いて分子メカニズムを解明する。

2)-ii) 上記による神経老化モデルを用い、神経変性を惹起する病因遺伝子、タンパクとの相互関係を検討する。

2)-iii) 細胞モデルで得られた結果を基に、神経変性を伴う新たな動物モデルを作成し、ヒト剖検脳との比較対照を行いながら、疾患の病因を明らかにする。

4) 1)-3)の研究を効率的に推進するため、研究所内、近隣研究施設との共同研究を推進する。

部長研究グループ：永井雅代、山田洋美、
日坂真輔、丸山和佳子

レビー小体病の病因解明に関する研究

認知症患者の増加は超高齢社会を迎えた日本において、医療／介護／経済を含む最大の問題である。レビー小体病 (Lewy body disease, LBD) は認知症の原因となる神経変性疾患の中で、アルツハイマー病に次ぐものであり、全認知症の 20% を占めるとされる。レビー小体病は 3 つのタイプに分類される。すなわち 1) Parkinson disease (PD)、2) diffuse Lewy body dementia (DLB)、3) pure autonomic failure (PAF) である。これら 3 つは本質的には同一疾患のスペクトラムに属するものと考えられる。共通の病理像は、神経細胞内の alpha-synuclein (Syn) を主体とするタンパク質異常凝集体の存在である。Syn の点変異、あるいは正常 Syn 遺伝子の重複による発現量の増加も遺伝性 PD の原因となることが示された。さらに近年のゲノムワイドの遺伝子多型分析 (GWAS) により、Syn 遺伝子周辺の多型が孤発性パーキンソン病に関連することが複数のグループから報告された。Syn が PD を含む LBD の原因に直接関与することを示唆している。

LBD の最大のリスクファクターは加齢 (老化) である。老化の原因としての“酸化ストレス学説”は広く受け入れられる概念である。しかしながらそ

の本体については明らかとされていない。本研究室では酸化ストレスにより傷害を受けた生体分子が蓄積することが老化の原因に関与しているとの仮説の基に検討を行った。

脳神経細胞の特徴の一つは細胞膜の構成成分に多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) が多いことであり、PUFA はラジカルと反応することで、それを消去する抗酸化能と同時に、自身が酸化を受けて脂質ラジカルを生成するという 2 面性をもっている。PUFA の酸化生成物が Syn のアミノ酸残基に付加体を形成し、難分解性の細胞毒性をもつ分子を形成する可能性について検討した。

PUFA による Syn の修飾は、タンパク質のオリゴマー化、アミロイド化を惹起することが *in vitro* で示された。さらに細胞内 PUFA の酸化によりミトコンドリア機能障害と脂質過酸化による修飾やリン酸化を受けた Syn 凝集体を伴う細胞死が認められた。本細胞ではタンパク分解系であるプロテアソーム、オートファジーの機能低下が示唆された。LBD 脳で選択的に変性を起こし易い (脆弱性のある) 神経細胞において、細胞死に先行して PUFA 由来の酸化脂質の蓄積が認められた。

加齢病態研究室：研究員氏名 柳野卓也、茨木京子、早川智久、伊藤祐基、金森久美子、丸山和佳子、本山 昇
酸化ストレスに応答した FOXO の活性制御メカニズム

学習・記憶等の認知機能は加齢とともに減少する。また、アルツハイマー病をはじめとする認知症の罹患率は、加齢に伴い対数的に増加する。成人の脳でも神経幹細胞が存在し、一生を通して神経新生が起こっており、学習・記憶などの脳高次機能に大きく関与していることが明らかになってきた。しかし、加齢に伴い神経新生が著しく減少することが示されており、加齢に伴う認知機能の低下の一因であると考えられるが、そのメカニズムは不明である。また、糖尿病・インスリン抵抗性とアルツハイマー病発症との関連も示唆されている。そこで 老化シグナル（インスリン／IGF シグナルカスケード（IIS））に着目して、その制御メカニズムを解明するとともに、学習・認知機能において重要な機能を果たす神経幹細胞の老化および神経新生の減少のメカニズムを明らかにし、加齢に伴う認知機能低下および認知症発症の原因を追究することを目的として研究を行った。

老化シグナルにおいて重要な機能を果たす IIS によって制御されるフォークヘッド型転写因子 FOXO は、神経幹細胞等の組織幹細胞維持に重要な機能を果たしている。FOXO の欠損は、神経幹細胞機能の早期老化を引き起こす。すなわち FOXO 活性制御メカニ

ズムの減弱が神経幹細胞の老化・神経新生の減少に関与していると考えられる。そこで、FOXO の活性制御メカニズムの解明を目指して研究を行った。

線虫 *C. elegans* やマウスにおいて、FOXO の寿命制御において、MST1 (mammalian STE20-like protein kinase 1) による FOXO のリン酸化の重要性が報告された。そこで今年度は、酸化ストレスに応答した FOXO の転写活性化における MST1 の機能解析を行った。MST1、FOXO に対する siRNA を用いたノックダウン細胞を樹立し、FOXO 活性を検討した。酸化ストレスに応答した FOXO による GADD45a などの転写誘導が MST1 ノックダウンによって抑制されたことから、MST1 は FOXO の活性化に必須であることを明らかにした。また、MST1 によるリン酸化部位の Ser を Ala に置換した変異体 (FOXO3-SA)、リン酸化を mimic する Asp 置換体 (FOXO-SD) 導入細胞を樹立し、MST1 による FOXO のリン酸化が FOXO の活性化に必須であることを明らかにした。さらに、MST1 のノックダウンは、酸化ストレスに対する細胞の生存率を著しく低下させた。

以上の結果より、MST は、酸化ストレスに応答した FOXO の転写活性化に必須であることが明らかになった。

病態制御研究室：龍 訥、能勢 弓、南山 誠
長寿関連遺伝子 FOXO3 を用いたレビー小体病モデルの開発と治療・
予防に有効な食品および天然化合物の開発

認知症を伴う神経変性疾患のうち、レビー小体病 (Lewy body disease (LBD)) はパーキンソン病 (PD)、び漫性レビー小体病などを含む一連の疾患として、アルツハイマー病に次いで二番目に多い。治療薬の開発により神経伝達の改善を図ることで一定の症状を改善することができるようになってきてはいるが、他の疾患同様、神経の変性や細胞死を抑止することはできていない。病因解明と治療法の開発のために疾患モデルが開発され、ロテノンを代表とする薬剤誘発性モデルや alpha-synuclein (α -syn) を代表とする病因関連遺伝子導入モデルが開発されている。当研究室では、加齢に伴った神経の変性という特徴を考慮した新たなモデルの開発を行っている。 α -syn の発現をベースに、長寿関連遺伝子 FOXO3 の発現低下を加味した LBD モデルの開発を行うものである。FOXO3 は Insulin / IGF signaling の下流にある遺伝子で、酸化ストレスからの保護作用やアポトーシスに関与する。また、PD 患者の剖検脳においてレビー小体に共在することが報告されており LBD 発症に何らかの役割を果たしている可能性が示唆される。これまでの間、モデル細胞として α -syn を強制発現させた SH-SY5Y (SH-syn) を用いて FOXO3 を RNAi にて発現低下させたときの細胞レベルでの影響を検討してきた。cell

viability の低下、LDH release の上昇が見られ、対照の mock 細胞と比較し脆弱であることも示された。FOXO3 の機能低下による細胞障害の機序について探索したところ、オートファジーの機能低下が要因となっていることが判明した。さらに、SH-syn における α -synuclein モノマーは FOXO3 のノックダウンにより減少することがわかり、FOXO3 の機能低下が細胞毒性を示すと言われているモノマーからオリゴマーへの重合につながるかを確認中である。現在、 α -syn トランスジェニック、Foxo3 ノックアウトの各マウスを交配し、新たな LBD マウスモデルの作成を行っている。今後、その妥当性を多面的に検討する予定である。

昨年度 SH-syn を用いてピックアップできた3つの新規化合物であるが、細胞死を抑制し cell viability を改善する。治療薬の ターゲット が今までに報告がなく、作用機序を一部解明しつつある。今後は知財としての検討を進めていく。

また、食品に含まれる天然化合物ウコンの活性代謝産物、tetra-hydrocurcumin の神経細胞に対する酸化ストレス予防効果について経時的に検討を行ってきた。一部の作用経路の活性化を確認し、その下流についての挙動を探索中である。

研究業績（加齡健康脳科学研究部）

英文例)

Naoi M, Maruyama W, Inaba-Hasegawa K.

Revelation in the neuroprotective functions of rasagiline and selegiline: the induction of distinct genes by different mechanisms.

Expert Rev Neurother. 2013 13(6):671-84.

Naoi M, Maruyama W, Yi H.

Rasagiline prevents apoptosis induced by PK11195, a ligand of the outer membrane translocator protein (18 kDa), in dopaminergic SH-SY5Y cells through preventing cytochrome c release from mitochondria.

J Neural Transm., 2013 120(11):1539-51.

Maruyama W, Naoi M.

Induction of glial cell line-derived and brain-derived neurotrophic factors by rasagiline and (-)-deprenyl: a way to a disease-modifying therapy?

J Neural Transm. 2013 120(1):83-9.

Inaba-Hasegawa K, Akao Y, Maruyama W, Naoi M.

Rasagiline and selegiline, inhibitors of type B monoamine oxidase, induce type A monoamine oxidase in human SH-SY5Y cells.

J Neural Transm. 2013 120(3):435-444.

Murakami M, Horibe H, Iohara K, Hayashi Y, Osako Y, Takei Y, Nakata K, Motoyama N, Kurita K, Nakashima M. The use of granulocyte-colony stimulating factor induced mobilization for isolation of dental pulp stem cells with high regenerative potential. Biomaterials 34: 9036-9047, 2013.

Doi H, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Qiang Q, Tanaka F, Yanagawa T, Warabi E, Ishii T, Sobue G

p62/SQSTM1 differentially removes the toxic mutant androgen receptor via autophagy and inclusion formation in a spinal and bulbar muscular atrophy mouse model.

J Neurosci. May 1; 33(18): 7710-27. 2013

Qiang Q, Adachi H, Huang Z, Jiang YM, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Sobue G.

Genistein, a natural product derived from soybeans, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron disease.

J Neurochem. Jul; 126(1): 122-30. 2013

邦文例)

なし

4. その他

Maruyama W, Shaomoto-Nagai M, Kato Y, Hisaka S, Osawa T, Naoi M.

Role of lipid peroxide in the neurodegenerative disorders.

Subcell Biochem. 2014;77:127-36.

Naoi M, Maruyama W.

Neuromelanin, a modifier for progressive cell death in Parkinson's disease:

Mechanism behind evolving neurotoxicity in protective neuromelanin

Future Drug Therapy (e-book), Advances in Parkinson's disease Management, 2013

5. 新聞・報道,等

なし

6. 特許申請、取得状況

なし

1. 学会・研究会等発表

1. シンポジウム

本山 昇. 酸化ストレス応答におけるフォークヘッド転写因子 FOXO の活性制御メカニズムと機能. 第 86 回日本生化学会大会、シンポジウム「フォークヘッドワールド：フォークヘッド因子の機能と制御」、2013 年 9 月 11 日、横浜.

2. 国際学会発表

Maruyama W., Shamoto-Nagai M., Naoi M., Takatsu Y., Wu X.

Development of new antibody array and its application to evaluate anti-dementia drugs.

Society for Neuroscience

San Diego, USA, Nov. 9-13, 2013

Minamiyama M., Long N., Nose Y., Motoyama M., Shamoto-Nagai M., Ibaraki K., Hayakawa T., Yamada Y., Naoi M., Maruyama W.

The creation trial of the new Lewy body disease model considered aging.

Society for Neuroscience

San Diego, USA, Nov. 9-13, 2013

Shamoto-Nagai M., Hisaka S., Osawa T., Naoi M., Kurokawa-Nose Y., Maruyama W.

DHA peroxidation induced neural cell death、but alpha-synuclein play a neuroprotective role with proteolysis system in SH-SY5Y cells overexpressed alpha-synuclein.

Society for Neuroscience

San Diego, USA, Nov. 9-13, 2013

Naoi M., Inaba-Hasegawa K., Maruyama W.

Interaction of type A monamine oxidase with type B monoamine oxidase.

Society for Neuroscience

San Diego, USA, Nov. 9-13, 2013

Nagai-Shamoto M., Hisaka S., Osawa T., Naoi M, Nose-Kurokawa Y., Maruyama W.

Modification of a-synuclein by lipidperoxide derived from PUFA.

Neuro 2013, Kyoto, June 20-23, 2013

Hayakawa T., Iwai M, Aoki S, Maruyama W., Motoyama N. SIRT1 regulates DNA damage-mediated pro-inflammatory response. The 7th Symposium Mechanisms and Models of Cancer, Aug 8, 2013, La Jolla, CA, USA。

3. 国内学会発表

本山 昇、柳野卓也、伊藤裕貴、Glantschnig H、丸山和佳子。

MST1-mediated phosphorylation of FOXO enhances its transcriptional activity in response to oxidative.

第36回日本基礎老化学会大会、2013年6月5日、大阪

早川智久、岩井美佳、青木哲、丸山和佳子、本山 昇。SIRT1によるヒストン脱アセチル化を介したSASPのエピジェネティックな制御機構。第36回日本分子生物学

会年会、2013年12月3日、神戸

南山 誠、龍 訥、能勢 弓、本山 昇、永井雅代、茨木京子、早川智久、山田洋美、直井 信、丸山和佳子

加齢を考慮したレビー小体病モデルの検討

日本生化学会大会、2013年9月11日、横浜.

Minamiyama M., Long N., Nose Y., Motoyama N., Shamoto-Nagai M., Ibaraki, K. Hayakawa H., Yamada H., Naoi M., Maruyama W.

The development of the new Lewy body disease model considered aging.

第36回日本分子生物学会年会、2013年12月4日、神戸.

Long N., Minamiyama M., Kurokawa-Nose Y., Motoyama N., Shamoto-Nagai M., Ibaraki K., Hayakawa T., Yamada H., Kanamori K., Naoi M., Maruyama W.

The role of FOXO3 in alpha-synucleinopathy.

第6回 NAGOYA グローバルリトリート、2013年2月14日、大府.

4. その他、セミナー等

本山 昇.

アポトーシス・ストレス応答.

名古屋大学医学部講義「免疫と生体防御」. 2013年5月31日、名古屋.

本山 昇.

Impact of DNA damage response on cancer and aging

熊本大学リエゾンラボ研究会 /リーディングプログラム：HIGO 最先端研究セミナー、2013年11月27日、熊本.

本山 昇.

細胞老化の解析.

名古屋大学大学院医学系研究科基礎医科学実習（ベーシックトレーニング）、2013年7月11日、大府.

II. 公的研究費

1. 厚生労働省

なし

2. 文部科学省

丸山和佳子（分担）300万円
科学研究費補助金、基盤研究（A）

「アルキルアミド型付加体をプローブとした脳内老化評価システムの確立と応用」

本山 昇.（代表）150万円

科学研究費補助金、基盤研究（C）

「老化・代謝制御因子 SIRT1 による細胞老化制御メカニズムの解明」

本山 昇.（分担）150万円（代表：平尾 敦）

次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム（P-DIRECT）

がん幹細胞を標的とした根治療法の開発

「幹細胞ストレス応答シグナル制御によるがん根治療法の開発」

3. 財団、その他

なし