研究課題：アルツハイマー型認知症治療法開発を目指した ゲノム編集による海馬ニューロン新生

代表研究者：東京医科大学 組織･神経解剖学分野・講師　篠原広志
共同研究者：東京医科大学 組織･神経解剖学分野・大学院生　櫻井潤

【まとめ】
アルツハイマー型認知症は認知症の約半数を占め、初期に海馬の萎縮が認められる。課題採択者は既に海馬歯状回における成体期神経幹細胞の形成メカニズムを解明することで、海馬の神経幹細胞を新たに産生させる方法を見いだしており、本研究では、神経幹細胞よりニューロンを産み出す実験を試みた。

１．研究の目的

65 歳以上の高齢者の４分の１が認知症およびその予備軍であることは、「健康寿命」を大きく阻む社会問題である。本研究では、成体期でもニューロン新生が生じる海馬歯状回において、神経幹細胞の起源や形成機構を解明し、意図的にニューロン新生を生じさせることを目的とする。

２．研究の方法・経過

先行研究において成体期神経幹細胞の産生に寄与することがわかった転写因子 Hes5 および緑色蛍光タンパク質である EGFP を発現するコンストラクトを作製した。またこのコンストラクトは、Cre-lox システムにより、Cre が発現することによって､Hes5 の発現は消失し、新たに NeuroD1 および赤色蛍光タンパク質 mCherry が発現するように設計した。さらに本コンストラクトは、トランスポゼース発現プラスミドを共発現することにより、細胞が盛んに細胞増殖を行っても導入遺伝子の発現減少や消失が生じることがないように、トランスポゾンでゲノムに組み込まれる配列となっている。Cre のプラスミドは、生後の神経幹細胞に発現することが知られている *Gfap* プロモーターで制御した。Cre はタモキシフェン誘導型 CreER システムを用いた(図 1)。

胎生期 14 日目（E14.5）の胎仔の脳室面から子宮内電気穿孔法によって、コンストラクトを海馬歯状回前駆細胞へと導入した。その後、生後 2 日目（P2）のマウスへ 4-ヒドロキシタモキシフェンを腹腔内投与した。P15 に脳を採取し、固定、包埋、薄切を行い、免疫組織化学を行った後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

３．研究の成果

３−１．成体期神経幹細胞の起源探索

細胞標識する時期を E12.5, E14.5, E16, P1 と変えて、P15 で成体期神経幹細胞の観察を行った。その結果、顆粒細胞層下帯に存在し、軟膜側に突起を伸ばした標識細胞が神経幹細胞のマーカーである BLBP を発現し、顆粒細胞のマーカーProx1 およびグリアのマーカーs100 β が陰性であるという神経幹細胞の基準を満たした細胞は、E14.5 に細胞標識された P15 の海馬歯状回にて認められた。

３−２．Hes5 過剰発現による成体期神経幹細胞の産生実験

E14.5 の脳室面に子宮内電気穿孔法によって Hes5 および EGFP を導入させると、顆粒細胞層下帯において、EGFP 陽性細胞が観察された。この細胞は神経幹細胞の性質を示すことが確認された。

３−３．Hes5 過剰発現細胞に対するニューロン新生実験

E14.5 の脳室面へ子宮内電気穿孔法によってプラスミドを導入し、Hes5 を強制発現させた。導入細胞は同時に EGFP を発現する（図１）。P2 のマウスへと 4-ヒドロキシタモキシフェンの腹腔内投与を行うと、Hes5 の発現が停止し、新たにニューロン分化を促

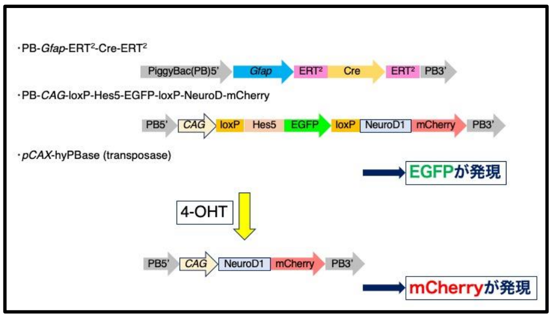

図 1. 作製コンストラクトの模式図

す転写因子 NeuroD1 を発現するようになる。このとき同時に mCherry も発現する（図１）。

P15 にサンプリングを行い、顆粒細胞マーカーProx1 抗体を用いて免疫組織化学を試みた。その結果、EGFP および mCherry を発現する細胞が観察され、さらに Prox1 を発現していることも確認された（図２の矢印）。

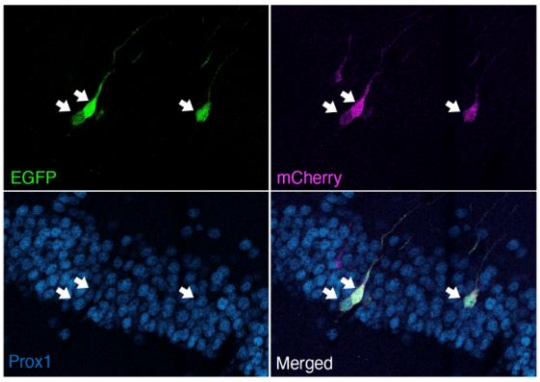

図 2. P15 海馬歯状回顆粒細胞層の写真

この結果は、EGFP の発現が確認されることから、E14.5-P2 の間に Hes5 が発現され、mCherry の発現も認められることから、P2-P15 の間に NeuroD1 が発現したことも示している。さらに Prox1 陽性であったことから、顆粒細胞へとニューロン分化して

いることが確認された。
　これらの結果から Hes5 を強制発現させた細胞にさらに NeuroD1 を過剰発現させると、神経幹細胞の性質を維持させておき任意のタイミングで顆粒細胞へと分化、つまりニューロン新生させることが可能であることが示唆された。

４．今後の課題

　本研究によって成体期神経幹細胞の形成、さらにはその神経幹細胞をニューロンへと新生させることを任意に行うことを可能とした。今後、さらなる解析を行い、将来的にはアルツハイマー型認知症によって変性が生じた海馬領域においてニューロン新生を生じさせ、疾患よって生じる症状が軽減されるかについて解析を行っていきたい。

５．研究結果の公表方法

　上記に示した課題を含めた研究成果を国際誌（Journal of neuroscience など）へと投稿する予定である。