



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Endoplasmic reticulum stress contributes to the decline in doublecortin expression in the immature neurons of mice with long-term obesity

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2022-06-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中川, 潔美 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/88090">http://hdl.handle.net/20.500.12099/88090</a>

氏名（本籍）	中川 潔 美	（熊本県）
学位の種類	博士（再生医科学）	
学位授与番号	甲第1204号	
学位授与日付	令和4年3月25日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Endoplasmic reticulum stress contributes to the decline in doublecortin expression in the immature neurons of mice with long-term obesity	
審査委員	（主査）教授	山口 瞬
	（副査）教授	岩間 亨                      教授 長岡 仁

## 論文内容の要旨

成人海馬の神経新生(adult hippocampal neurogenesis, AHN)は海馬機能において重要な役割を果たす。海馬歯状回で doublecortin(Dcx)を発現する未成熟神経細胞の数は、加齢とともに減少し、特にアルツハイマー病(Alzheimer's disease, AD)の発症初期から後期段階でさらに減少する。中年期の肥満は、晩年期の認知症との関連がある。しかし、肥満の認知症発症における役割は不明のままである。

そこで、本研究は、肥満が認知症の発症および進行に及ぼすメカニズムを解明することを目的に行った。長期肥満モデルマウスを用いて、肥満が海馬の機能や小胞体ストレス、AHNに影響を与えるかどうかを調べた。

### 【対象と方法】

- 1) 長期肥満マウスにおいて小胞体ストレスが海馬機能に及ぼす影響を調べるため、以下の3種類のモデルマウスを用いた。
  - ①: 野生型(C57BL/6)マウスに高脂肪食(high fat diet, HFD)を73週間与えたマウス
  - ②: ADモデル(APP23)マウスにHFDを43週間与えたマウス
  - ③: 糖尿病モデル *Lep<sup>db/db</sup>* (db/db)マウス

①および②とそれぞれの対照群マウス(標準食を与えたマウス)に対して物体位置認識試験(novel object location test, NOL test)を行った。また、③と対照群マウス(野生型マウス)をモリス水迷路(Morris water maze, MWM)で解析した。
- 2) 長期肥満マウスの脳における小胞体ストレスの役割を調べるため、ウェスタンブロットにより、①~③およびそれぞれの対照群マウスの海馬で、小胞体ストレスのマーカーとなるCHOP(C/EBP-homologous protein)とATF4(Activating transcription factor 4)の発現量を解析した。またDcxの発現量を解析した。さらに、③とその対象群マウスの海馬で、小胞体ストレス応答のシグナル伝達分子であるATF6p50(Activating transcription factor 6 p50 fragment)とXbp-1s(the spliced form of X-box binding protein 1)の発現量を解析した。
- 3) 小胞体ストレスがAHNに及ぼす影響を調べるため、10週齢と45週齢の③マウス、69~71週齢の②マウス、およびそれぞれの対照群マウスの脳を4%パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成した。それらに対してKi67(細胞増殖マーカー)およびDcx, CHOPの蛍光免疫組織染色を行い、蛍光顕微鏡または共焦点蛍光顕微鏡で観察した。
- 4) 未成熟神経細胞のDcx発現に対する小胞体ストレスの影響を調べるため、野生型マウス(10日齢)の海馬から神経線維細胞を分離培養し、ラミニン上で5日間分化させた後タプシガルギン処理を行い、小胞体ストレスを誘導した。そして、小胞体ストレスと神経分化のマーカーのウェスタンブロットとリアルタイム RT-PCR、およびmicro RNA(miRNA)シーケンスの解析を行った。

## 【結果】

- 1) 長期肥満ADモデルマウスでは、対照群マウスと異なり、NOL試験において、移動物体に対する探索時間が、移動前より移動後の方が有意に短かった ( $p < 0.05$ )。長期肥満野生型マウスでは、対照群マウスと異なり、NOL試験において、移動物体に対する探索時間が移動前と移動後で有意な差を示さなかった。*db/db*マウス(18週齢)は、MMM解析において、プラットフォームを横切る回数が対照群マウスと比較して有意に少なかった ( $p < 0.05$ )。
- 2) ウェスタンブロットによる解析では、長期肥満野生型マウスと *db/db*マウスの海馬で、ATF4とCHOPの発現が対照群と比較して有意に多かったが(いずれも  $p < 0.05$ )、*Dcx*の発現に違いはみられなかった。長期肥満ADモデルマウスの海馬では、*Dcx*の発現が有意に減少していた ( $p < 0.02$ )。また、*db/db*マウスの海馬でATF6p50、Xbp-1sの発現は検出されなかった。
- 3) *db/db*マウスの海馬歯状回におけるKi67の陽性細胞数および*Dcx*陽性細胞数は、対照群マウスと比較して有意な差がみられなかった。しかし、共焦点蛍光顕微鏡で観察すると、*db/db*マウスの*Dcx*陽性細胞は対照群マウスの*Dcx*陽性細胞より短い突起をもち、突起における*Dcx*の染色性も低下していた。また *db/db*マウスおよび長期肥満のADモデルマウスの海馬歯状回の*Dcx*陽性細胞ではCHOPの発現を認めた。
- 4) マウス海馬の未成熟神経細胞に対してタプシナルギン処理で小胞体ストレスを誘導すると、*Dcx*タンパク質の発現は減少したが、他の神経マーカータンパク質の発現に変化はみられなかった。また、半定量的RT-PCRにて*Dcx* mRNAの減少を認めた。さらに、*Dicer*に対するshRNAとsiRNAが発現するレンチウイルスを使ってあらかじめ*Dicer*をknockdownしておくと、タプシナルギン処理による*Dcx* mRNAの減少は抑制された。  
miRNAシーケンシングにより、タプシナルギン処理した未成熟神経細胞で、miR-148a-5p, miR-129b-3p, miR-135a-2-3pの有意な増加を認めた。

## 【考察】

NOL試験の結果から長期肥満は認知機能に影響を与える可能性、またMMM解析の結果から長期肥満は運動機能または空間記憶に影響を与える可能性が示唆された。長期肥満野生型マウスおよび *db/db*マウスの海馬におけるATF4、CHOPの発現レベルは有意に高いこと、そして、*db/db*マウスの海馬では *Xbp-1s* mRNA や *Xbp-1s* タンパク質、ATF6p50 タンパク質が検出されなかったことから、長期肥満が海馬における小胞体ストレス、特に統合的ストレス応答を誘発することが示唆された。長期肥満マウスの海馬歯状回 *Dcx* 陽性細胞では対照群よりも短い突起が観察され、突起における *Dcx* の染色性も低下していた。さらに同細胞ではCHOPの発現が認められた。これらのことから、長期肥満マウスの海馬歯状回の未成熟顆粒細胞では、小胞体ストレスによって *Dcx* の発現が抑制されたり、樹状突起の分枝伸長が妨げられたりしている可能性が考えられた。*Dcx* mRNAの分解は *Dicer* が関わっていると考えられ、今後、*Dcx* mRNAの分解におけるmiRNAの役割、特にmiR-129b-3pの役割を明らかにする必要がある。

## 【結論】

長期肥満マウスの海馬歯状回の未成熟神経細胞において、小胞体ストレスが活性化され、*Dcx* の発現が低下すること、*Dcx* 陽性細胞で突起が短くなることを明らかにした。これらの結果は、中年期の肥満が、小胞体ストレスを介して成人海馬の神経新生に影響を与え、晩年期の認知症発症に関わる可能性を示唆する。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 中川潔美は、長期肥満マウスで認知/記憶機能の低下がみられることを示した。さらに、長期肥満マウスの成体海馬神経新生過程において、小胞体ストレスが活性化され、doublecortin(*Dcx*)陽性の未成熟顆粒細胞で *Dcx* の発現が低下していることや、*Dcx* 陽性細胞で突起が短くなっていることを見出し、これらが認知/記憶機能の低下を生じさせる一因となっている可能性を示した。本研究の成果は、神経科学および神経病理学、神経再生医学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Kiyomi Nakagawa, Saiful Islam, Masashi Ueda, Toshiyuki Nakagawa: Endoplasmic reticulum stress contributes to the decline in doublecortin expression in the immature neurons of mice with long-term obesity  
Scientific Reports 12, 1022 (2022) doi:10.1038/s41598-022-05012-5