

76. ヒト神経細胞を用いた神経変性メカニズムの解明

藤田 幸

島根大学 大学院医学系研究科 発生生物学

Key words : 脳, 神経, 遺伝子

緒言

疾患に関連した変異は、その 90%以上が non-coding 領域上に生じている。この変異と関連して発現変動を示す遺伝子が多数存在する事実は、脳内での複数病変の混在や、患者間の病変が均一ではないという症状の複雑化に繋がり、病態機序の解明を困難にしている。疾患関連分子が多数あり、遺伝子治療で操作可能な範囲に限定できないことが、ゲノムワイドな解析が可能となった現在においても、認知症の発症や進行を抑制する治療薬開発を妨げる原因となっている。

認知症治療法開発のために、アルツハイマー病 (AD) における病態の根幹として注目されてきた A β や Tau といった病変タンパク質を過剰に発現する動物や細胞モデルを用いた研究が進められてきた。認知症に関連する多くの遺伝子が報告されているが、それら全てを一度に治療標的とするのは困難を極めることが考えられる。発症の原因、つまり、下流の多数の遺伝子発現変化の起点となるメカニズムを同定することが、多様な神経病変を包括的に制御する手法を開発するために重要である [1]。

ヒト神経芽細胞腫細胞株 SK-N-SH は、AD および関連する神経変性疾患における病態生理や変性メカニズムの研究に広く用いられている。SK-N-SH 細胞は様々な物質を用いてニューロン様細胞 (SK-N-SH 由来ニューロン) に分化させることができる。SK-N-SH 細胞は、レチノイン酸 (RA) と脳由来神経栄養因子 (BDNF) で処理することにより、AD 研究に適したコリン作動性神経様細胞に分化させることができることがこれまでに報告されている。そこで、本研究では、RA と BDNF で分化させたヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞を用いて、A β ペプチドの影響を調べた。

方法

1. 細胞培養

SK-N-SH 細胞 (ATCC) は、10% FBS とペニシリン/ストレプトマイシン溶液を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 中で、37°C、5% CO₂ で培養した (Gibco, Thermo Fisher Scientific)。培地は 2~3 日ごとに交換し、0.25% トリプシン-EDTA 溶液を用いて細胞を継代した。

神経突起の伸長と分化を誘導するため、細胞をポリ-L-リジンでコートしたマイクロプレート (Greiner Bio-one) に播種した。細胞は分化の前に 1 日培養した。翌日、10% FBS 添加 DMEM に 10 μ M の RA を添加し、RA 添加培地は毎日交換した。RA で 4 日間培養した後、BDNF を最終濃度 50 ng/ml で、血清無添加の DMEM に 2 日間添加した。6 日間の分化の後、細胞を実験に使用した。

2. A β 投与

ヒト A β ペプチドを 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) で 1mM に希釈し、RT で 1 時間インキュベートした。サンプルは -20°C で保存し、各アッセイ毎に解凍し、5 mM の濃度で DMSO で希釈し、使用した。

3. 遺伝子発現変化の解析

RNA の単離は、Trizol (Invitrogen) を用いて全 RNA を単離し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて 5 μ g の全 RNA を精製した。100~200 ng の mRNA を加水分解して断片化し、精製した (RNeasy Minelute Kit; QIAGEN)。Truseq Standard mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina) を用いて Illumina TrueSeq プロトコルに従ってライブラリーDNA を調製し、Nextseq 500/550 High Output v2.5 Kit (Illumina) を用いて Illumina NextSeq 500 (Illumina) でシーケンスした。得られたリードをマウスゲノム (mm10) にアライメントし、low-quality ends を除去した。Quality check 後のデータセットの遺伝子発現プロファイルのカウントは、公開ソフトウェア RNAseqChef を用いて解析した。

結果

RA と BDNF で分化させたヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞において、A β ペプチドによるトランスクリプトームへの影響を明らかにするために、RNA-seq 解析を行った。RNAseqChef を用いて、RNA-seq データセットから有意に発現変動のある遺伝子を検出した。Control (Con) または A β で処理した SK-N-SH 細胞において、主成分分析を行った。Control 群と比較して、A β で処理した SK-N-SH 細胞群では、158 の発現変動遺伝子が検出された。A β 処理により 102 遺伝子が発現上昇し、76 遺伝子が発現低下した (図 1)。A β 処理に関連する生物学的シグナル伝達経路を明らかにするために、遺伝子セットに基づく濃縮解析を行った。82 個の発現上昇遺伝子に関連する signal pathway の上位には、TNF α signaling、Interferon gamma response、Inflammatory response など、炎症関連の signal pathway が濃縮された。これらの中には、TNF α や IL-1 β などの遺伝子が含まれていた (図 2)。

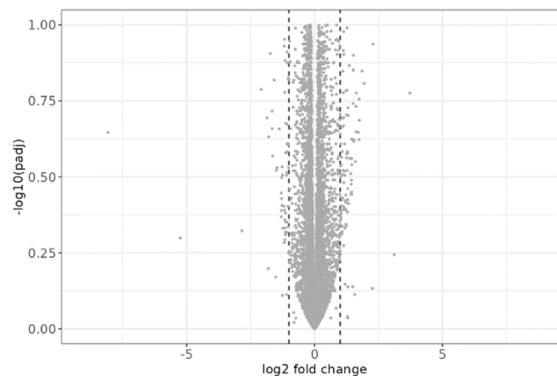


図 1. 発現変動遺伝子の解析

発現変動遺伝子を解析した結果、A β 処理により 82 の発現増加遺伝子と、76 の発現減少遺伝子が検出された。

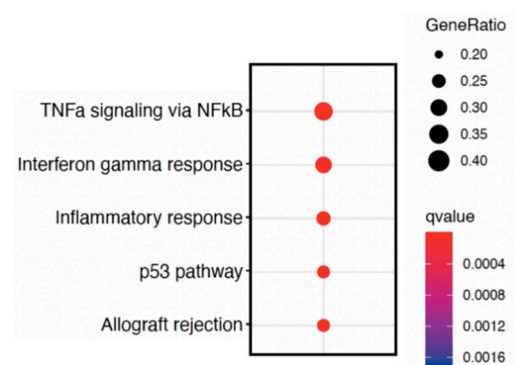


図 2. 発現上昇遺伝子に関連する signal pathway

上位には、TNF α signaling、Interferon gamma response、Inflammatory response など、炎症関連の signal pathway が濃縮された。

考 察

本研究では、RA と BDNF で分化させたヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞を用いて、A β ペプチドの影響を調べた。遺伝子発現変化については、A β ペプチドで処理した細胞では、炎症関連の **signal pathway** が濃縮された。これらの中には、炎症性サイトカインである IL-1 β などの遺伝子が含まれていた。A β が、脳内の免疫担当細胞であるミクログリアの受容体を刺激し、IL-1 β や TNF α などの炎症性サイトカイン産生を促すことが知られており、A β によるグリア細胞を介した神経炎症、神経障害の持続による神経変性の進行の可能性が考えられる。これまでに我々は、脳発達期には、ミクログリアが栄養因子を分泌し、神経細胞の生存に寄与することを見出してきた。しかし、このような神経保護性のミクログリアは、成長とともに消失する [2, 3]。成長や病態下におけるミクログリアの性質の変化の詳細の解明が期待される。グリア細胞と神経細胞間のシグナルを解明するとともに、軸索変性の詳細な分子機序を明らかにし、特異的な分子標的を同定することが、神経疾患克服へ向けた今後の重要な課題である。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人上原記念生命科学財団から研究助成金による多大なるご支援を賜りましたこと、厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Fujita Y, Pather SR, Ming GL, Song H. 3D spatial genome organization in the nervous system: From development and plasticity to disease. *Neuron*. 2022 Sep 21;110(18):2902-2915. Epub 2022 Jul 02. PMID: 35777365 DOI: 10.1016/j.neuron.2022.06.004
- 2) Fujita Y, Yamashita T. Mechanisms and significance of microglia-axon interactions in physiological and pathophysiological conditions. *Cell Mol Life Sci*. 2021 Jan 28. Epub 2021 Jan 29. PMID: 33507328 DOI: 10.1007/s00018-021-03758-1
- 3) Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, Yamashita T. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature neuroscience*. 2013 May;16(5):543-51. Epub 2013 Mar 24. PMID: 23525041 DOI: 10.1038/nn.3358