

初代培養ラット胎児由来神経細胞
を用いた細胞老化機構の解析

石川 正真

目次	1
要旨	3
略語表	4
第一章 序論	6
1-1 はじめに	7
1-2 脳と老化	7
1-3 古典的細胞老化	11
1-4 DNA 損傷応答の活性化と細胞老化	14
1-4-1 テロメア短小化と細胞老化	14
1-4-2 修復困難 DNA 損傷と細胞老化	14
1-5 細胞老化と組織恒常性	15
1-6 老化細胞の生存およびその維持機構	16
1-7 mTOR 経路と老化	17
1-7-1 mTOR 経路	17
1-7-2 老化制御シグナル経路としての mTOR 経路	19
1-8 終末分化細胞における細胞老化	19
1-9 本研究の目的	20
第二章 材料と方法	22
2-1 試薬	23
2-2 初代培養ラット胎児神経細胞の長期培養	23
2-3 レンチウイルス感染による遺伝子導入	23
2-4 抗体	24
2-5 化合物および阻害剤	25
2-6 Senescence-associated β -galactosidase (SA β -gal) アッセイ	25
2-7 蛍光免疫染色	25
2-8 チオフラビン S 染色	26
2-9 テロメア fluorescent in situ hybridization (FISH)	26
2-10 EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) 標識による DNA 複製の可視化	27
2-11 ウェスタンブロッティング	28
2-12 Triton X-100 不溶性蛋白質の分画および不溶性ユビキチン化蛋白質の検出	28
2-13 オートファジーフラックス解析	29
2-14 ミトコンドリア膜電位の測定	29

2-15 細胞浸透性プローブ CM-H ₂ -DCFDA を用いた ROS 産生量の可視化	29
2-16 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法による分泌 A β ₄₂ レベルの測定	29
2-17 メチオニンアナログを用いた新規合成蛋白質の可視化	30
2-18 定量 RT-PCR	30
第三章 結果	32
3-1 ラット胎児海馬神経細胞の長期初代培養系の構築	33
3-2 長期培養神経細胞における細胞老化の検討	35
3-2-1 長期培養神経細胞における古典的細胞老化表現型の検出	35
3-2-2 長期培養神経細胞における加齢性変化	40
3-3 初代培養神経細胞における長期培養誘導性細胞老化の原因解明	42
3-3-1 AraC 処理が長期培養誘導性の神経細胞老化にもたらす影響の検討	42
3-3-2 活性酸素種が長期培養誘導性の神経細胞細胞老化に及ぼす影響の検討	43
3-3-3 持続的 DDR 活性化が長期培養誘導性の神経細胞老化に与える影響の検討	45
3-3-4 初代培養神経細胞における蛋白質恒常性の経日的観察	49
3-3-5 AD 関連蛋白質毒性が長期培養誘導性の神経細胞老化に及ぼす影響	56
3-4 蛋白質恒常性の改善と長期培養神経細胞における細胞老化表現型	59
3-4-1 mTOR経路阻害が長期培養神経細胞与える効果の検討	59
3-4-2 mTOR経路阻害によるオートファジー活性化と蛋白質恒常性の解析	62
3-4-3 蛋白質翻訳阻害が長期培養神経細胞にもたらす影響の解析	64
3-5 長期培養ラット大脳皮質神経細胞における細胞老化の検討	68
3-6 長期培養神経細胞が細胞老化に至る生理学的意義の検証	73
第四章 考察	81
4-1 蛋白質恒常性の破綻と細胞老化誘導	82
4-2 神経細胞老化と脳老化	83
参考文献	89
謝辞	105

要旨

生物は不断の環境変動下で柔軟に適応し生存するために、生体内外からのさまざまなストレスに対して種々の適応的な生体応答を備えている。細胞老化は分裂細胞における非致死性ストレス応答のひとつであり、非可逆的な細胞周期停止をもって定義される。細胞老化はがん抑制作用を有する一方で、長期的には個体老化に伴う生理機能の低下や加齢性疾患の原因となるという負の側面ももつ。非再生組織である脳にあって、老人斑などの蛋白質凝集体による分裂細胞（神経膠細胞や乏突起膠芽細胞）の細胞老化誘導は、病的認知症の重症化に寄与することが示唆されている。しかし、分裂終了細胞（終末分化細胞）である神経細胞の細胞老化機構の研究はほとんど進んでいない。

本研究では、古典的細胞老化の概念を終末分化細胞に拡張できるかを明らかにするため、ラット胎児の脳海馬に由来する初代培養神経細胞の長期培養系を確立し、長期培養海馬神経細胞が広範な細胞老化表現型（SA- β -gal (senescence-associated β -galactosidase), p16 上昇, SASP (senescence-associated secretory phenotype), lamin B1 減少) を呈することを示した。また、それら細胞において、細胞内外 A β (amyloid β) の蓄積や刺激応答性増強など、分子から機能レベルにわたる老化脳に特徴的な加齢性変化が見られ、長期培養系が老化過程における細胞性ストレス応答解析に有用であることが示唆された。海馬神経細胞で細胞老化が誘導される分子機構を解明するため、まず、A β 蛋白質毒性を中心とした蛋白質恒常性破綻の影響について検討を行った。A β 凝集を解消する低分子化合物の処理によって、長期培養海馬神経細胞で認められた細胞老化表現型は消失した。また、家族性アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) に関連した変異型アミロイド前駆蛋白質の過剰発現、あるいは凝集性の組換えヒト A β 蛋白質の培地への添加が、SA- β -gal 活性や p16 上昇を早期に引き起こすことを明らかにした。これらの結果から、神経細胞老化は部分的に A β 蛋白質毒性に起因すると結論した。mTOR 経路の遮断は、全般的な翻訳抑制およびオートファジー活性亢進を介して、個体寿命延長に資する細胞内恒常性の向上をもたらす。mTOR 阻害剤ラパマイシンの存在下で培養を行った長期培養海馬神経細胞では、翻訳効率の低下とオートファジー活性の増強に加えて、蛋白質毒性と細胞老化表現型の出現が顕著に抑制されたことから、mTOR 経路の神経細胞老化制御への関与が明らかとなった。また、多様なストレスに対する感受性の比較によって、老化神経細胞はストレス抵抗性を獲得しており、細胞老化が細胞自律的な神経保護機構であることを示唆する結果を得た。これらと一致して、ラット大脳皮質神経細胞の解析においても、培養日数依存的な蛋白質恒常性破綻、細胞老化表現型ならびにストレス抵抗性が観察されたことから、終末分化細胞における細胞老化機構の普遍性を見出した。したがって、本研究で明らかになった AD 初期病変により誘起される細胞老化は、症候性病的老化の素過程である神経細胞死に抗する生理学的な防御機構として神経細胞の生存に貢献し得ると考えられる。生理的な老化は海馬神経細胞の脱落をその特徴としないことから、本研究で得られた知見は、非再生組織で生涯維持される終末分化細胞の細胞生存戦略の理解にも繋がると期待される。

略語

4E-BP1	eIF4E binding protein 1
AD	Alzheimer's disease
ADAM10	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
APH1	anterior pharynx defective 1
APP	amyloid β -precursor protein
APP α/β	α/β -secretase-generated APP ectodomain fragment
ATG5/7	autophagy related 5/7
ATM	ataxia telangiectasia mutated
A β	amyloid beta
BACE2	β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1/2
BCL	B-cell lymphoma protein
BSA	bovine serum albumin
BafA	bafilomycin A1
CCCP	carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
CDK	cyclin-dependent kinase
CXCR2	CXC chemokine receptor 2
D-APV	D-2-amino-5- phosphonopentanoate
DDR	DNA damage response
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSB	DNA double-strand break
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
EPPS	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinepropanesulphonic acid
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
FBS	fetal bovine serum
FIP200	FAK family-interacting protein of 200 kDa
FOXO4	forkhead box-containing protein, O sub-family 4
FRAP	FKBP12-rapamycin associated protein
RAFT1	rapamycin and FKBP12 targets 1
GATA4	GATA binding protein 4
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HPG	L-homopropargylglycine
MJD2C	jumonji C domain-containing oxygenase D2C
LSD1	Lysine-specific demethylase 1
LTP	long-term potentiation
MCI	mild cognitive impairment

MK2/MAPKAPK2	MAPK activated kinase 2
NAC	N-acetyl-L-cysteine
NCT	nicastrin
NFT	neurofibrillary tangle
NMDA	N-methyl-D-aspartate
mTOR	mechanistic/ mammalian target of rapamycin
mTORC1/2	mTOR complex1/2
PBS	phosphate buffered saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PEN2	presenilin enhancer 2
PFA	paraformaldehyde
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
PLL	poly-L-lysine
PS1	presenilin 1
Puma	p53-upregulated modulator of apoptosis
REST	repressor element-1 silencing transcription factor
ROS	reactive oxygen species
NRSF	neuron-restrictive silencer factor
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SA- β -gal	senescence-associated β -galactosidase
SAHF	senescence-associated heterochromatic foci
SASP	senescence-associated secretory phenotype
SQSTM1	sequestosome 1
TAF	telomere-associated focus
TASCC	the TOR-autophagy spatial coupling compartment
TERC	telomerase RNA component
TERT	telomere reverse transcriptase
TIF	telomere dysfunction-induced focus
Thio-S	Thioflavin-S
ULK1	unc-51 like autophagy activating kinase
VDCC	voltage-dependent/gated calcium channels
ZFP36L1	ZFP36 ring finger protein like 1

第一章

序論

1-1 はじめに

あらゆる生物にとって、その究極要因は子孫を残すことである。そのためには、日々変動する環境下において、まず個体が維持されなければならない。生物は、進化の過程で、環境の好悪に応じて子孫の再生産または自己保存に有利となるような応答(すなわち、適応(的)応答)を獲得してきた。また、生殖年齢以降にある生物では、生体システムの綻びが刻々に顕現し、やがてその個体は死を迎える。この過程が生物学・医学的に定義される老化(特に個体老化)であり、生活史の後半である老化は、その前半に重要な適応応答の拮抗的多面性に依拠する。

1-2 脳と老化

ヒトを含む高等生物を構成する全生体組織のうち、脳組織は殆どの生命活動を支配する、いわば生体組織内の制御基盤である。よって、生涯を通じたその機能維持が個体生存に極めて重要であることは明白である。脳は、細胞分裂を行わない分化成熟(終末分化)した「神経細胞」ならびに適切な条件下で細胞分裂を行うことができる「神経膠細胞(グリア細胞, 神経細胞の機能を支持する役目をもつ)」を主たる構成要素とし、近年では、ヒトではそれぞれの細胞がおよそ 1000 億個、同程度の比率で存在すると考えられている(von Bartheld *et al.*, 2016)。神経細胞は、シナプスと呼ばれる接合部位(出力側の神経細胞から伸びる軸索と入力側の神経細胞の樹状突起との間隙)を介して、特定の神経細胞と連続した機能的な神経回路を形成している。外界からの情報・刺激は、それら神経回路上で電気的興奮として軸索上を伝播し、シナプスで化学信号、すなわち神経伝達物質に変換されることで伝達される。この機能的回路の精密性および複雑性が、多様かつ複雑な脳機能に帰結する。

一般に、年齢の増加に伴って、つまり老化の過程で個体を構成する生体組織の機能は徐々に低下し、それはしばしば加齢性疾患を引き起こす(たとえば、加齢性の骨格筋量低下は身体機能を著しく低下させる(サルコペニア))。個体の老化は、生物が自然に歳を重ねて生じた加齢性変化によりもたらされる生理的老化と、病的要因によってそれが加速される病的老化に大別される。多くの組織において、後者は生命の存続を脅かす危険度が総じて高い。生理的に老化した健常高齢者の場合、認知機能(物事の理解力・判断力ならびに記憶力などの知的機能を指す)は、60 歳以降から次第に衰え始めるが(Fjell *et al.*, 2014)、アルツハイマー型認知症(Alzheimer's disease; AD)のような病的老化で認める認知機能障害と比較して、その程度は極めて軽度である。一方で、AD は、記憶障害と妄想を主徴とする進行性認知症であり、その神経病理学的特徴として、(1) 老人斑(senile plaque)と(2) 神経原線維変化の出現(neurofibrillary tangle; NFT) (アミロイド β /amyloid β ; $A\beta$ とリン酸化タウ蛋白質が、それぞれ神経細胞外または細胞内に凝集・沈着したもの)、(3) 神経細胞の脱落を三大所見とする。また、AD 発症前段階のひとつに、日常生活に支障のない程度の認知機能低下をその診断基準とする軽度認知症(mild cognitive impairment; MCI)があり、MCI は軽度の AD 病理所見を呈することが知られている。MCI 罹患患者の脳組織、特に記憶・学習に必須である海馬お

よび嗅内野において、神経細胞死が生じており、また、AD 脳におけるそれは、MCI 脳と比べてさらに発生頻度が高い(Price JL *et al.*, 2001)。

生理的老化から病的老化への臨界的状態遷移を先導する分子基盤について、「アミロイド仮説」が現在最も支持を集めている(Hardy JA & Higgins GA, 1992)。仮説によれば、A β 産生に端を発して老人斑形成および炎症が惹起され、次いで神経原線維変化が加速される。さらに、それらの相乗作用によって神経伝達異常をきたし、最終的に神経細胞死を引き起こすとされる(Long JM & Holtzman DM, 2019)(図 1-1)。A β はおよそ 40 アミノ酸残基からなるペプチドで、21 番染色体上の APP 遺伝子にコードされる膜貫通型蛋白質であるアミロイド前駆体蛋白質(amyloid β -precursor protein; APP)が、 β セクレターゼと γ セクレターゼによる連続切断を受けて生成される(図 1-2a)。そのアミノ末端側 28 残基(APP の細胞外領域に相当)は親水性である一方で、カルボキシ末端側の 29~40 残基 (APP の膜貫通領域に相当)は疎水性に富む(図 1-2b)。このような両親媒性の性質は、細胞膜表面での A β の安定化および凝集に寄与していると考えられている(Itoh SG *et al.*, 2019)。APP 遺伝子において、A β 産生総量の増加を招く Swedish 変異(KM670/671NL)や、特に高い凝集性を示す A β ₄₂ の産生比率を亢進させる Indiana 変異(V717F)が、優勢遺伝形質を示す家族性 AD の遺伝学解析により同定されており(Murrell J *et al.*, 1991; Mullan M *et al.*, 1992)、アミロイド仮説を裏付ける科学的根拠となっている(図 1-2)。実際に、それら変異型ヒト APP を有するトランスジェニックマウスは AD 様の認知機能障害を早期に呈するようになり、また、それら病学的および行動学的な症状は、A β ₄₂ ワクチン療法により改善されることが報告されている(Schenk D *et al.*, 1999; Janus C *et al.*, 2000; Chen G *et al.*, 2000)。しかし、興味深いことに、加齢依存的な老人斑蓄積および神経原線維変化は、健常高齢者の脳組織においても観察される(Bennett DA *et al.*, 2006)。一見、このような加齢脳は生理的な老化を経た状態と区別されない。しかし、今日の概念的分類に従えば、それは AD 初期病理陽性の無症候期、すなわち前臨床段階(Preclinical stage)に位置づけられ、病的老化のごく初期段階にあると理解される(Sperling R *et al.*, 2014; Petersen RC, 2018)。したがって、脳老化は、同じ時間軸上で生理的な老化から病的老化の状態へと遷移する加齢性変化の連続スペクトラムとして捉えると、その全容を理解しやすい(図 1-1)。

これまでに、A β 病変やタウ病変などを標的としたさまざまな分子標的薬について、MCI 患者と AD 患者を対象とした臨床試験がなされてきたが、有効な AD 治療薬の開発には未だ至っていない(Mangialasche F *et al.*, 2010)。そのような背景から、AD 治療法の確立に向けて、無症候段階のような早期段階での治療的介入の必要性、さらには、その時点における分子病態の理解の深化の重要性が唱えられている(Long JM & Holtzman DM, 2019)。近年、健常高齢者の海馬神経細胞において、転写共役因子である repressor element-1 silencing transcription factor(REST)(または neuron-restrictive silencer factor; NRSF)がそれら細胞の核内に蓄積していることが報告された。この核内 REST は、アポトーシス関連因子および AD

関連因子の転写を抑制することで、生理的老化から病的老化への状態遷移の防壁として、海馬神経細胞の保護に寄与するとされる(Lu T *et al.*, Nature 2014)。

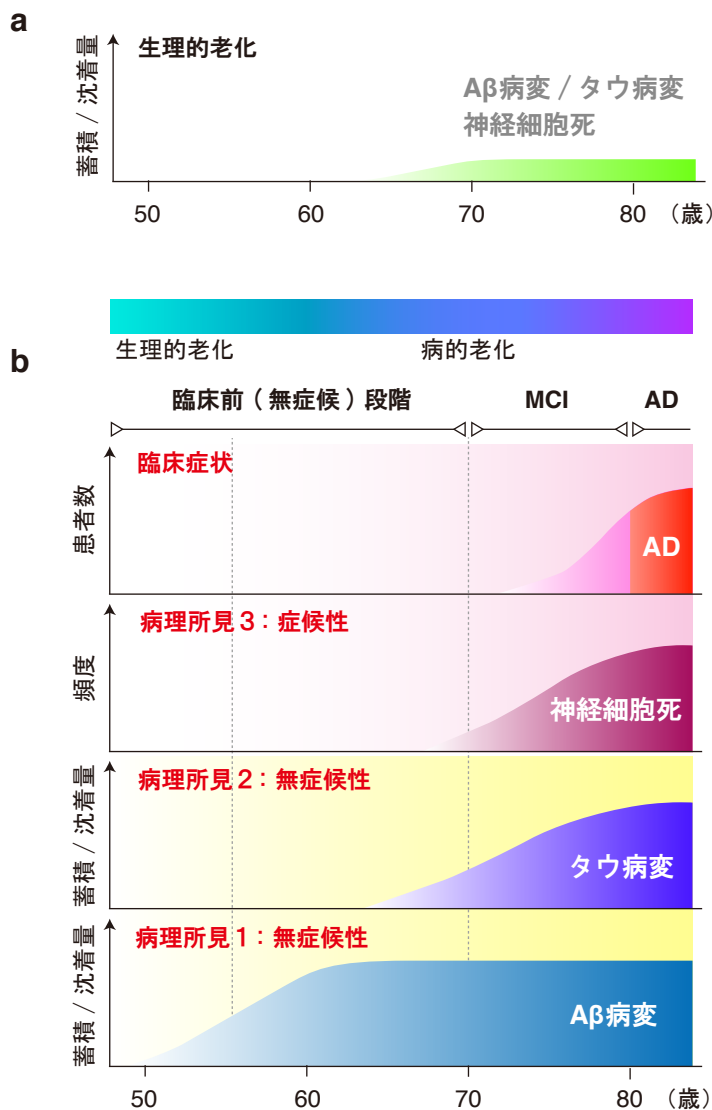


図 1-1 AD 病理所見の経年変化と病的脳老化

a) 生理的に老化した脳組織では、AD 病理三大所見 (老人斑沈着、神経原線維変化と神経細胞死) を認めず、嗅内野および海馬領域における神経細胞数は保持される。

b) Sasaguri H *et al.*, 2017 を参考に作成した。前臨床段階は AD 病理所見のうち、Aβ/タウ病変を呈するが、神経細胞脱落を伴っておらず、患者は無症候性を示す。

神経変性による脳萎縮部位は、Aβ 病変とは一致せず、一方で、リン酸化タウ沈着領域と強く相関があるとされる。

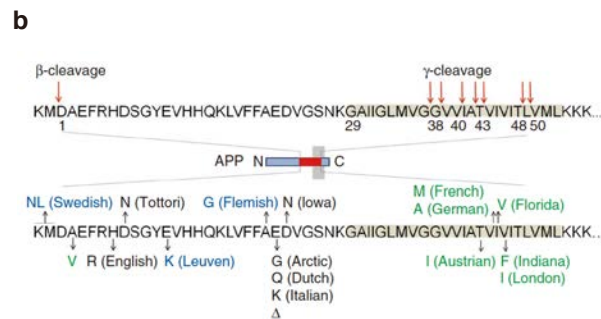
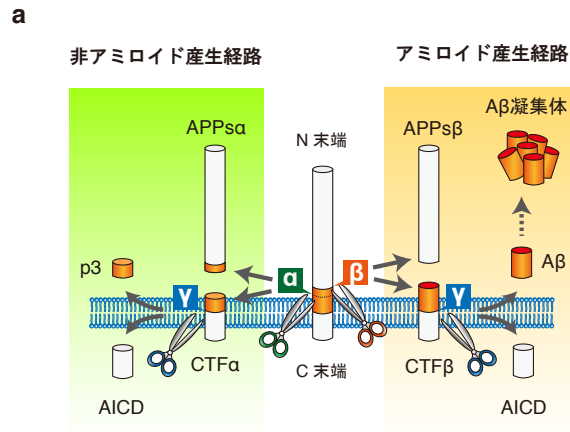


図 1-2 古典的アミロイド前駆蛋白質 (APP) 代謝経路と APP 変異

a) 非アミロイド経路とアミロイド経路。図は Müller UC *et al.*, Nat Rev Neurosci. 2017;18(5):281-298 を参考に作成した。非アミロイド経路では、APP は α セクレターゼによる切断を受けた後、その C 末端側 (C-terminal fragment α ; CTF α) は細胞膜中に残存し、さらに γ セクレターゼによる切断を受ける。その結果、p3 と APP 細胞内ドメイン (APP intracellular domain; AICD) が産生される。 α セクレターゼによる APP 切断部位は、A β 領域内 (オレンジ) に存在しているため、同経路では A β は産生されない。一方で、アミロイド経路の場合、APP は β セクレターゼおよび γ セクレターゼによる切断を受け、AICD と凝集能の高い A β 生じる。 γ セクレターゼ切断箇所に応じて、長さの異なる A β 断片が産生される (A β 37, A β 38, A β 40, A β 42 または A β 43)。

APP α/β : α/β -secretase-generated APP ectodomain fragment

b) 家族性 AD に関連する APP 上の点突然変異。青色は総 A β 量が増加する点変異、緑色は A β 質的量的変化をきたす点変異の位置を示す。灰色は膜貫通ドメイン。図は Benilova I *et al.*, Nat Neurosci Rev 2012 より引用。古典的 APP 代謝に寄与する主要なプロテアーゼは以下の通り。

α セクレターゼ: ADAM10 (disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10);

β セクレターゼ: BACE1 および BACE2 (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1/2);

γ セクレターゼ複合体: PS1/2 (presenilin 1/2), NCT (nicastrin), PEN2 (presenilin enhancer 2) および APH1/2 (anterior pharynx defective 1/2)

1-3 古典的細胞老化

1960年代に、L. Hayflick 博士らは、健康人の皮膚から採取した正常線維芽細胞を試験管内で繰り返し継代培養すると、はじめは活発に細胞分裂を行う対数増殖期にあって、その細胞数を指数関数的に増加させるが、やがて細胞増殖を停止して、分裂限界に達することを見出した(Hayflick L & Moorhead PS, 1961)。このように正常再生組織の体細胞が有限回数分裂した後に、分裂寿命を迎えることを「細胞老化」と呼ぶ(特に複製老化という)(図 1-3)。細胞老化は、十分な栄養や増殖因子の存在する順境であっても、決して細胞増殖を再開することができない非可逆的な現象である。ヒト線維芽細胞において、がん抑制因子である p53 および Rb を同時に阻害すると、細胞老化は回避されることから、両経路が細胞老化誘導に必要であることがわかっている(Shay JW *et al.*, 1991; Beauséjour CM *et al.*, 2003)。細胞老化状態にある細胞、すなわち老化細胞は、活発に代謝を行って生存しながら、種々の特徴的な性質を示す(図 1-3)。例えば、SA-β-gal(senescence-associated β-galactosidase)、扁平肥大化した細胞形態ならびにサイクリン依存性キナーゼ(cyclin-dependent kinase; CDK)阻害因子である p16Ink4a (以下、p16) の発現上昇は、老化細胞を評価する際に最も汎用される指標である(Kuilman T *et al.*, 2010; Salama R *et al.*, 2014)。これら細胞老化表現型を呈する細胞は、加齢依存的にさまざまな生体組織で蓄積することが報告されており(Dimri *et al.*, 1995; Childs BG *et al.*, 2015; Xu M *et al.*, 2018; Ogrodnik M *et al.*, 2017; Kirkland JL & Tchkonian T, 2017)、細胞老化は生体内で実際に起こる現象であると考えられている。また近年、細胞老化が個体老化の一因であることが遺伝子改変マウスを用いた実験により直接的に証明された(Baker DJ *et al.*, 2016; van Deursen JM, 2014)。D. Baker 博士らは、p16 陽性細胞でアポトーシス誘導蛋白質が発現するような遺伝子改変マウス(INK-ATTAC マウス)(Baker DJ *et al.*, 2011)を用いて、老齢個体の各組織から老化細胞を細胞死誘導により除去した場合に、動脈硬化、白内障および筋力低下(またはサルコペニア)などの加齢性疾患の症状が改善することを示した(Baker DJ *et al.*, 2016)。老化細胞は、固有のトランスクリプトーム変化によって、数多の炎症性サイトカインや細胞増殖因子、または細胞外基質分解酵素を産生・分泌するようになる。この性質は、senescence-associated secretory phenotype(SASP)とよばれ(Coppe *et al.*, 2008; Acosta JC *et al.*, 2008)、高齢者において慢性的な炎症状態をきたす一因となり、ひいては全身の加齢性変化に貢献すると考えられている(Rodier F & Campisi J, 2011; van Deursen JM, 2014)(図 1-4)。

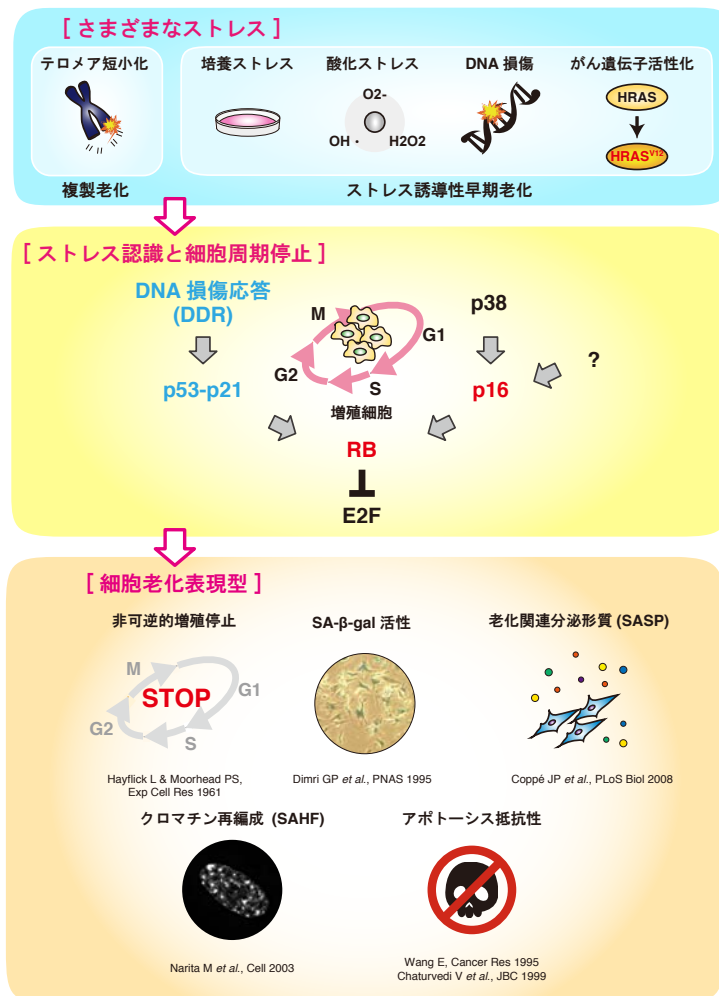


図 1-3 古典的細胞老化

細胞老化は、テロメア DNA 短小化に依存的な複製老化と非依存的なストレス誘導性早期老化に分類される(上段)。複製老化は、繰り返し細胞分裂を経て、ある閾値以下の長さに達したテロメア DNA が損傷 DNA として認識されることで誘導される。一方で、ストレス誘導性早期老化は、細胞がさまざまな非致死的なストレスを受けることで、そのテロメア長とは無関係に速やかに誘導される。いずれの場合も、ストレスに曝された正常分裂細胞は、がん抑制因子 p53 と Rb、またはそれらどちらかを活性化をして、細胞老化に至る。p53 により転写誘導される CDK 阻害因子 p21 は、Cyclin E/CDK2 複合体を阻害することで、また、p16 は Cyclin D/CDK 4,6 を阻害することで、Rb の低リン酸化を引き起こす。その結果、転写因子 E2F の活性が抑制され、細胞は細胞周期を G1 期で停止する(中央)。また、老化細胞は、非可逆的な細胞周期停止に加えて、老化関連 SA-β-gal 活性、分泌蛋白質パターンの変化 (Senescence-associated secretory phenotypes; SASP)、ならびにアポトーシス抵抗性などの細胞性質の変化によって特徴づけられる。それら種々の細胞老化関連表現型ならびに老化細胞の不可逆性は、局所的なクロマチン凝縮 (Senescence-associated heterochromatic foci, SAHF) を伴うダイナミックなクロマチンの構造変動に基づくトランスクリプトーム変化によってもたらされる(下段)。



図 1-4 古典的細胞老化の生体内における役割

正常細胞において、点突然変異による Ras や BRAF などのがん遺伝子の異常活性化や、細胞内外で生じるさまざまなストレスによる細胞傷害は、p53-p21 経路および p16-Rb 経路の活性化を介して、細胞増殖を安定に停止させる。このとき、非可逆的な細胞周期停止は自身のがん化を未然に防ぐ。がん抑制遺伝子 p53 または Rb の機能を喪失した細胞では、細胞老化は起こらず、細胞はがん化する。また、老化細胞は、損傷組織の修復や発生過程の組織形成時に、SASP を介して組織の再構築やその構造維持に必須の役割を果たす。若い個体では、これら老化細胞は、NK 細胞などの免疫細胞のはたらきによって組織中から排除される (免疫監視機構) (左下)。しかし、加齢に伴い免疫監視機構による老化細胞の除去効率が低下すると、老化細胞が組織内で蓄積する (Ovadya Y *et al.*, 2018)。長期的な SASP は慢性炎症を惹起し、さまざまな加齢性変化や疾患をもたらす原因となる。また、成長因子や血管新生因子といった SASP 因子は、がん悪性化を助長する。

1-4 DNA 損傷応答の活性化と細胞老化

1-4-1 テロメア短小化と細胞老化

正常体細胞の生涯にわたるのべ細胞分裂回数は、繰り返し DNA 配列(哺乳類では 5'-TTAGGG-3')とそれらに結合する種々の蛋白質から成る染色体末端部分のテロメアの長さによって規定される。細胞分裂の際、DNA 合成酵素はテロメア最末端領域を完全に複製することができないため(末端複製問題)、テロメア伸長酵素(テロメラーゼ)を発現していないほとんどの体細胞では、テロメア長が細胞分裂のたびに徐々に短小化する。ある一定の長さに達して脱保護状態にあるテロメアは、DNA 二重鎖切断(DNA double-strand break; DSB)として認識されるために、染色体末端融合や DNA 組換え、または不適切な酵素反応による DNA 消化の危険に曝される(Karlseder J *et al.*, 2002)。実際、脱保護状態のテロメアでは、 γ H2AX(139 番目セリンがリン酸化されたヒストン H2AX)や 53BP1 などの DNA 損傷チェックポイント因子、またそれら上流キナーゼである ATM(ataxia telangiectasia mutated)や CHK1/2(checkpoint kinase 1/2)の集積が認められ、DNA 損傷応答(DNA damage response; DDR)が恒久的に活性化されている(d'Adda di Fagagna F *et al.*, 2003; Herbig U *et al.*, 2004)。このような持続的な DDR は、p53 を介して CDK 阻害因子 p21Waf1/Cip1(以下、p21)の誘導を促すことで、閾値以下まで短くなったテロメアを有する細胞の細胞増殖停止、遂には細胞老化を引き起こす(Herbig U *et al.*, 2004) (図 1-3)。テロメラーゼ触媒ユニットをコードする *TERT* 遺伝子を過剰発現させたヒト正常線維芽細胞は、テロメアの長さを維持するだけでなく、ほぼ無限に細胞増殖可能である(Bodnar AG *et al.*, 1998)。また、テロメア結合蛋白質複合体シエルタリンの構成因子 TRF2(telomeric repeat binding factor 2)の過剰発現は、テロメアの短小化をさらに早めるが、テロメア末端を保護することで複製老化を回避する(Karlseder J *et al.*, 2002)。したがって、テロメア短小化による染色体末端脱保護は、分裂細胞において細胞老化を誘導する原因であると言える。

1-4-2 修復困難 DNA 損傷と細胞老化

さまざまな非致死性的ストレスは、テロメア長とは無関係に、比較的短時間で複製老化と類似した現象を誘導することが知られており、ストレス誘導性早期老化と呼ばれる(Kuilman T *et al.*, 2010)(図 1-3)。一般に、細胞老化という言葉は、複製老化とストレス誘導性早期老化を合わせて指す。ヒト正常線維芽細胞を非致死量の過酸化水素水や電離放射線で処理すると、老化表現型が誘導される(Chen Q & Ames BN, 1994; Di Leonardo A *et al.*, 1994)。しかし、それは *TERT* 遺伝子の過剰発現によるテロメラーゼ活性誘導によっては回避されない(Gorbunova V *et al.*, 2002)。通常、過酸化水素水処理や電離放射線照射によって生じる DSB は一過性であるが(DNA 修復機構により 24 時間以内に修復される)、それらのストレスで誘導した老化細胞では、一部の修復困難な DSB がテロメア領域または非テロメア領域に長期間残存して、持続的に DDR の発動を誘起する(Rodier F *et al.*, 2009, 2011; Fumagalli M *et al.*, 2012; Hewitt G. *et al.*, 2012)。このとき、ATM または H2AX のノックダウ

ンによって、細胞増殖停止や SASP などの老化関連表現型が抑制されることがわかっている (Rodier F *et al.*, 2009, 2011)。

ストレス誘導性早期老化のうち、がん遺伝子誘導性老化を特に *Oncogene-induced senescence* (OIS) という。正常線維芽細胞において、発がん性変異 (G12V) をもつ H-Ras 遺伝子 (H-RasG12V) を異所的に過剰発現すると、はじめは S 期における複製起点の異常発火と細胞増殖の亢進を示す (Serrano M *et al.*, 1997; Di Micco *et al.*, 2006)。このとき、複製フォークの進行がテロメア領域で阻害されるため、H-RasG12V 過剰発現細胞で修復困難なテロメア DNA 損傷が蓄積する (Suram A *et al.*, 2012)。その結果、それらの細胞の多くは、DDR に依存して G1 期で細胞増殖を非可逆的に停止する (Serrano M *et al.*, 1997; Di Micco *et al.*, 2006)。したがって、細胞老化は、分裂寿命到達 (テロメア DNA 短小化) のほか、テロメア DNA 長に依存しない DNA 傷害 (テロメア領域、または非テロメア領域における修復困難 DNA 損傷の蓄積) とそれに付随して起こる DDR の恒久的な活性化によっても誘導されると考えられている (Nakamura AJ *et al.*, 2008; Rossiello F. *et al.*, 2014; Victorelli S & Passos J, 2017) (図 1-3)。

1-5 細胞老化と組織恒常性

OIS は、がん遺伝子変異による過剰な細胞増殖刺激が DDR を恒常的に活性化することで、急速に誘導される。内在性の活性化がん遺伝子 *K-Ras* (G12V) を持つマウスでは、肺や膵臓において、まず前がん状態である腺腫が高頻度に形成されて、やがてそれらが悪性化すると腺がんを生じる (Guerra C *et al.*, 2003)。M. Collado 博士らは、その発がんモデルマウスの腺腫内において、SA- β -gal や p16 といった複数の細胞老化マーカーを示す細胞の存在を報告した (Collado M *et al.*, 2005)。重要なことに、老化細胞は前がん状態でのみ認められ、悪性となった腺がんでは観察されない。このような発がん過程における時期特異的な老化細胞の蓄積は、さまざまなヒトがんで報告がなされている (Collado M & Serrano M, 2010)。また、ほくろは、皮膚の基底層にある色素産生細胞のメラノサイトが、*Ras* がん遺伝子の下流にある *B-Raf* がん遺伝子の発がん性変異 (V600E) により、過度に細胞増殖することで生じる良性腫瘍である。ほとんどの場合で、ほくろが悪性腫瘍とならないのは、*B-Raf* がん遺伝子の活性化による一過的な細胞増殖能の亢進とともに大量に産生される活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) が、細胞老化を引き起こすためである (Michaloglou C *et al.*, 2005; De Keizer PL *et al.*, 2010)。これらの知見から、OIS は生体内で細胞自律的ながん抑制機構として機能すると考えられている (Schmitt CA, 2003; Collado M & Serrano M, 2010)。一方で、周囲の細胞に対して、細胞老化は SASP を介して細胞非自律的にがん抑制と悪性進展の双方に貢献する (Di Mitri D & Alimonti A, 2016; Faget DV *et al.*, 2019) (図 1-4)。

また、外傷を受けた皮膚などの再生組織や (Krizhanovsky V *et al.*, 2008 ; Jun JI & Lau LF, 2010; Demaria M *et al.*, 2014)、発生過程にある組織において (Muñoz-Espín D *et al.*, 2013; Storer M *et al.*, 2013)、細胞老化は各局所で一過性に誘導され、それら組織の修復・(再)構

築に寄与している(図 1-4)。これらには SASP が重要であり、SASP は、損傷部位での線維化の終息・解消、細胞分化誘導ならびに免疫細胞の動員を時間的空間的に支配する。通常、生じた老化細胞は、SASP を介して局所に誘引された natural killer(NK)細胞による細胞死誘導やマクロファージによる貪食作用によって積極的に組織から排除される(Xue W *et al.*, 2007; Krizhanovsky V *et al.*, 2008; Sagiv A *et al.*, 2013; Prata LGPL *et al.*, 2019)。このようにして免疫監視機構の制御下で短期的に誘導される細胞老化は、組織恒常性の維持に必須の適応的応答として機能する(図 1-4)。

1-6 老化細胞の生存およびその維持機構

老化したヒト正常線維芽細胞や表皮角化細胞(ケラチノサイト)はアポトーシスによる細胞死を起こしにくいことが知られている(Chaturvedi V *et al.*, 1999; Wang E, 1995)。たとえば、複製老化した正常ヒト線維芽細胞は、血清飢餓、過酸化水素水、タプシガルギン(小胞体ストレス誘導剤)により誘導されるアポトーシスに対して抵抗性を示す(Wang E *et al.*, 1995; Ryu SJ *et al.*, 2007; Sanders YY *et al.*, 2013)。この分子機構の一つに、老化細胞では、ストレス条件下であっても抗アポトーシス蛋白質 B-cell lymphoma (BCL) 2 が分解されないまま維持されることが挙げられる(Wang E 1995; Ryu SJ *et al.*, 2007)。また、BCL-2をはじめ、BCL-xL や BCL-W を含む Bcl-2 ファミリーに属する抗アポトーシス蛋白質は、複製老化、DNA 損傷誘導性老化ならびに OIS でその発現が亢進しており、老化細胞にアポトーシス抵抗性を賦与すると考えられている(Yosef R *et al.*, 2016)。一方で、血管内皮細胞は、老化すると、BCL-2 蛋白質量の減少を認め、アポトーシスを引き起こしやすい状態にあることがわかっている(Hoffmann J *et al.*, 2001; Zhang J *et al.*, 2002)。近年、老化細胞選択的にアポトーシスを引き起こす老化細胞死誘導薬(Senolytic drug と呼ばれる)として、Bcl-2 ファミリー蛋白質阻害剤である Navitoclax/ ABT-263(BCL-2 および BCL-xL に対する特異的阻害剤)や ABT-737(BCL-2, BCL-xL and BCL-W に対する特異的阻害剤)が同定された(Zhu Y *et al.*, 2016; Yosef R *et al.*, 2016; Chang J *et al.*, 2016; Wang L *et al.*, 2017)。老化細胞の生存・維持の分子機構については未だほとんど明らかになっていないが、これらの報告は、Bcl-2 ファミリー蛋白質の量的増加が、老化細胞のストレス抵抗性獲得に寄与しているほか、その生存・維持にも重要であることを示唆する。

また、アポトーシス促進因子について、複製老化細胞では、アポトーシス進行に必須のシステインプロテアーゼであるカスパーゼ 3 の発現量が低下していることや(Marcotte R *et al.*, 2004)、シスプラチン処理や紫外線照射で生じる DNA 傷害による p53 の安定化が起こらないということが分かっている(Seluanov A *et al.*, 2001)。一方で、前述の知見とは対照的に、電離放射線照射により誘導したヒト正常線維芽細胞は、BCL-2 の発現低下ならびにカスパーゼ 3 の発現亢進を示すという報告もある(Baar MP *et al.*, 2017)。このとき、恒常的な DNA 損傷応答によって、p53 は ATM 依存的なリン酸化を受けており、活性型として存

在する。しかし、forkhead box-containing protein, O sub-family 4(FOXO4)が p53 との直接相互作用を介してその転写活性を抑制するため、アポトーシスの誘導は起こらない。

1-7 mTOR 経路と老化

1-7-1 mTOR 経路

ラパマイシンは、1970 年代に同定・単離された放線菌 *Streptomyces Hygroscopicus* が産生するマクロライド化合物(12 以上の原子から構成される大環状ラク톤を有する有機化合物の総称) のひとつで、古くから免疫抑制作用および抗腫瘍効果を示すことが知られている (Johnson SC *et al.*, 2013)。ラパマイシンの標的分子である mTOR(mechanistic/ mammalian target of rapamycin)は真核生物において高度に保存された蛋白質であり(分裂酵母および出芽酵母におけるホモログは TOR)、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ(phosphatidylinositol-3 kinase; PI3K)ファミリーに属するセリン・スレオニンキナーゼである。まず、出芽酵母を用いた遺伝学的解析によって、ラパマイシンと分子量 12kDa の FK506 結合蛋白質(FKBP12)との相互作用がもたらす細胞毒性(細胞周期の G1 期で細胞増殖を停止させる)に対する薬剤耐性変異株の原因遺伝子として、TOR1/2 が同定・クローニングされた(Cafferkey R *et al.*, 1993; Kunz J *et al.*, 1993)。その後まもなく、生化学的解析によって、哺乳類細胞における mTOR(FRAP (FKBP12-rapamycin associated protein) または RAFT1 (rapamycin and FKBP12 targets 1))が、分子量およそ 250kDa のラパマイシン-FKBP12 複合体結合因子として単離・精製された(Brown EJ *et al.*, 1994; Sabatini DM *et al.*, 1994; Sabers CJ *et al.*, 1995)。

mTOR は、構成因子の種類に応じて、mTOR 複合体 1/mTORC1(mTOR、Deptor、PRAS40、Raptor、mLST8 および TTI1/TEL2 から成る)ならびに複合 2/mTORC2(mTOR、Deptor、Protor、mLST8、mSIN1、Rictor および TTI1/TEL2 から成る)として存在する(図 1-5)。それら二つの mTOR 複合体のうち、mTORC1 はラパマイシンによる阻害を受ける一方で、mTORC2 はラパマイシン非感受性であるとされる(Laplante M & Sabatini DM, 2012; Johnson SC *et al.*, 2013; Gaubitz C *et al.*, 2015)。ただし、持続的な mTORC1 阻害は mTORC2 形成に影響しうることがわかっている(Phung TL *et al.*, 2006; Sarbassov DD *et al.*, 2006; Lamming DW *et al.*, 2012)。mTORC1 は、アミノ酸などの栄養要因、成長因子、エネルギー代謝や酸化還元ストレスなど、細胞内外の環境変化を感知および統合して、異化・同化作用を制御しており、細胞成長・増殖に要する資源を供給する。たとえば、好適環境では、インスリンや他の成長因子による PI3K/AKT シグナル経路の活性化が mTORC1 を活性化する(Laplante M & Sabatini DM, 2012)。活性化した mTORC1 は、さらに S6 キナーゼ 1 や 4E-BP1(eIF4E binding protein 1)のリン酸化を介して、リボソーム生合成ならびに mRNA の翻訳を促すことで、蛋白質合成に対して正にはたらく(図 1-5)。その際、mTORC1 は、オートファジー誘導に必須である Atg13-ULK1-FIP200 複合体のうち、Atg13 および ULK1 を直接リン酸化することで、オートファジーを負に制御する(Hosokawa N *et al.*, 2009)(図 1-5)。

一方で、栄養が枯渇した場合には、mTORC1 活性が低下するため、それら標的蛋白質のリソ酸化レベルが減少して、その結果、翻訳の抑制とオートファジー活性の亢進が起こる(図 1-5)。また、mTORC2 は、主に成長因子に応答して、細胞の生存・増殖ならびに細胞骨格の制御に寄与していることが知られている(Laplante M & Sabatini DM, 2012)。

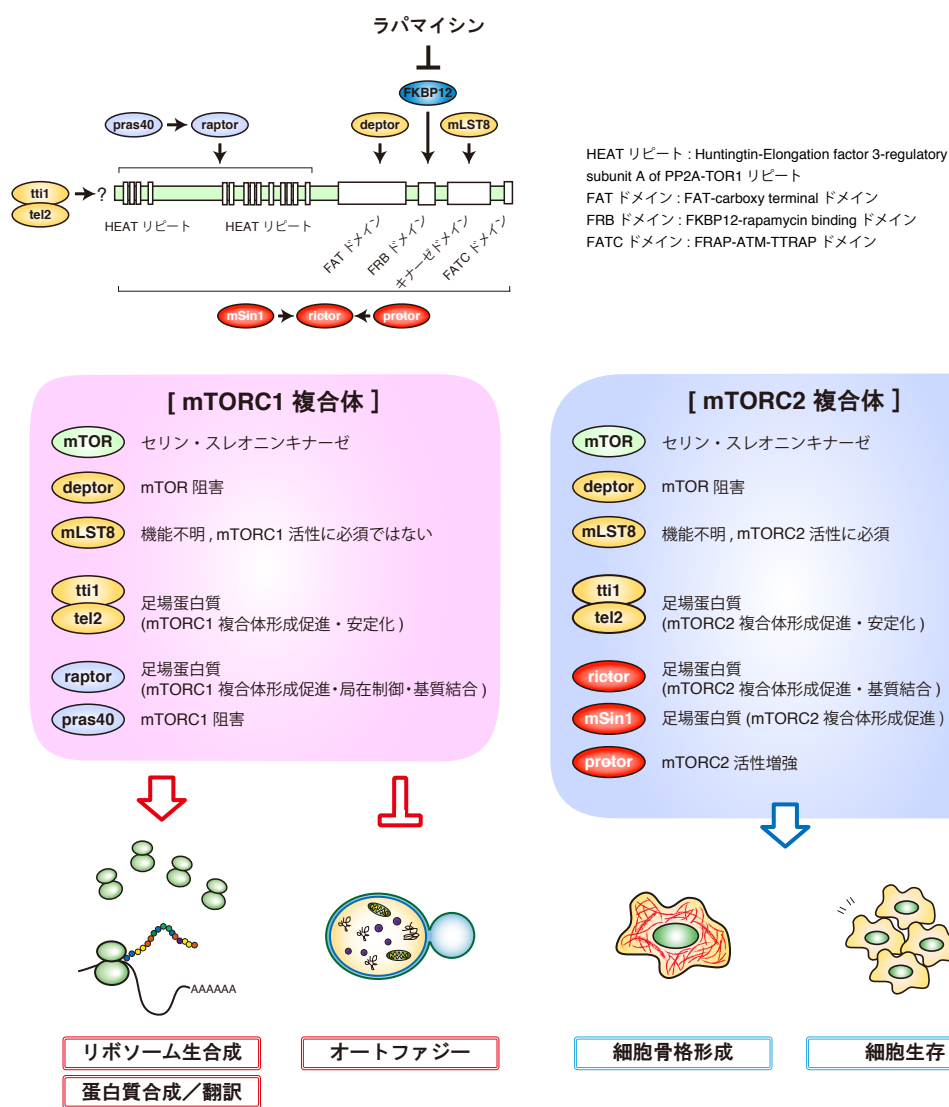


図 1-5 mTOR 複合体

図は Laplante M & Sabatini DM, Cell 2012 を参考に作成した。

mTOR は mTOR 複合体 1(mTORC1) または複合体 2(mTORC2) の機能的に異なる二種類の蛋白質複合体として存在する。mTORC1 は raptor と prasa40 を構成因子に含み、一方で mTORC2 は rictor、mSin1 ならびに protor をその特異的構成因子とする。mTORC1 は、蛋白質合成(リボソームの供給と翻訳開始頻度の調節による)とオートファジーをそれぞれ正と負に制御する。mTORC2 は細胞骨格制御と細胞の生存に寄与するが、mTORC1 と比べて、その他の機能は不明な点が多い。詳細は本文参照。

1-7-2 老化制御シグナル経路としての mTOR 経路

これまでに、酵母(Kaeberlein P *et al.*, 2005; Powers RW *et al.*, 2006; Medvedik O *et al.*, 2007)、線虫(Vellai T *et al.*, 2003; Robida-Stubbs S *et al.*, 2012)、ショウジョウバエ(Kapahi P *et al.*, 2004; Bjedov I *et al.*, 2010)、マウス(Harrison DE *et al.*, 2009; Miller RA *et al.*, 2011; Anisimov VN *et al.*, 2011)といったさまざまなモデル生物において、mTOR 遺伝子の突然変異およびノックダウン、またはラパマイシン投与による mTOR 経路抑制が寿命の延長(出芽酵母では、静止期に到達した細胞の生存可能期間、すなわち暦寿命/ chronological lifespan の延長)をもたらすことが示されている(Johnson SC *et al.*, 2013)。mTORC1 の抑制は、食餌カロリーの制限下での寿命延長にも寄与すると考えられている(Kapahi P *et al.*, 2004; Kaeberlein P *et al.*, 2005; Hansen M *et al.*, 2007; Zid BM *et al.*, 2009)。脳老化については、ラパマイシン処理は加齢性の認知機能低下を予防しうること、また、それは A β 沈着とそれに伴う病的認知機能障害、すなわち AD 病様症状を緩和することが、それぞれ野生型および AD 病モデルマウスを用いた実験によって示唆されている(Caccamo A *et al.*, 2010; Spilman P *et al.*, 2010; Majumder S *et al.*, 2012)。

mTORC1 活性は、細胞老化の誘導においても重要である。正常ヒト網膜上皮細胞およびヒト線維芽細胞において、さまざまなストレスによって引き起こされる細胞老化は、ラパマイシン処理により抑制または遅延されることが知られている(Demidenko ZN *et al.*, 2009; Leontieva OV *et al.*, 2012; Kolesnichenko M *et al.*, 2012; Astle MV *et al.*, 2012; Wang R *et al.*, 2017)。近年の報告によると、mTORC1 はとりわけ SASP 応答を正に制御をされると考えられている(Young AR *et al.*, 2009; Narita M *et al.*, 2011; Herranz N *et al.*, 2015; Laberge RM *et al.*, 2015)。その分子機構として、1)mTORC1 とオートファジーが空間的に集積(the TOR-autophagy spatial coupling compartment; TASCC)することによる異化作用の亢進(Narita M *et al.*, 2011)、2)炎症性サイトカイン誘導に重要な転写因子である NF κ B を介した SASP 因子の転写亢進(Laberge RM *et al.*, 2015)、3) MK2(または MAPKAPK2)による RNA 結合蛋白質 ZFP36 ring finger protein like 1(ZFP36L1)のリン酸化に依存した SASP 因子 mRNA の安定化(Herranz N *et al.*, 2015)などが知られている。

1-8 終末分化細胞における細胞老化

細胞老化は、細胞の非可逆的な細胞増殖停止をもって定義されるため、長年の間、分裂細胞でのみ起こる現象として考えられてきた。リポフスチンは、リソソーム内に沈着する不溶性色素であり、酸化された蛋白質および不飽和脂肪酸の消化残余物質からなるとされる。近年、リポフスチンの蓄積が、ストレスや細胞の種類によらず、生体内または試験管内で老化細胞を検出する際の有用な指標となることが示唆された(Evangelou K *et al.*, 2017)。加齢によるリポフスチンの沈着は、分化して生理的に細胞分裂を停止した終末分化細胞(心筋細胞や神経細胞など)においても、1970年以前に既に観察されていた(Strehler BL *et al.*, 1959; Reichel W *et al.*, 1968a, 1968b)。それからおよそ半世紀して、ラットまたはマウスの海馬領域で、加

齢依存的な SA- β -gal 活性の上昇が報告された(Geng YQ *et al.*, 2010; Piechota M *et al.*, 2016)。さらに、ラット新生仔海馬や胎児大脳皮質に由来する初代培養神経細胞においても、培養日数の経過(培養 6 日から 20 日)に伴って SA- β -gal 活性陽性細胞が現れることが分かっている(Geng YQ *et al.*, 2010; Piechota M *et al.*, 2016)。D. Jurk 博士らは、32 か月齢の老齢マウスの大脳皮質および小脳領域の神経細胞において、SA- β -gal 活性のほか、リン酸化 p38(活性化 p38)(Iwasa H *et al.*, 2003)、SASP、老化細胞特有のヘテロクロマチン構造(senescence-associated heterochromatic foci; SAHF (Narita M *et al.*, 2003))の構築に寄与するヒストンバリエーションである macroH2A の発現亢進のような古典的細胞老化表現型ならびに DSB の蓄積を報告した(Jurk D *et al.*, 2012)。また、テロメラーゼ鋳型 RNA をコードする遺伝子(*TERC*)の遺伝子欠損によりテロメア長が極端に短くなった *TERC*^{-/-}第四世代マウスの脳内では、12 か月齢の時点で、DNA 損傷ならびに老化細胞様の所見を示す神経細胞数が顕著に増加する。それらは、p21 をコードする *CDKN1A* 遺伝子を *TERC* 遺伝子と同時に欠損させることで回避されることから、DDR 活性化とそれに付随した p21 蛋白質の発現誘導が、神経細胞の細胞老化を誘導しうることを示唆する。

近年、ヒトおよびマウス加齢心筋において、ミトコンドリア機能不全によって過剰に産生される ROS がテロメア領域での修復困難 DNA 損傷を生み、その結果、テロメア DNA 長とは無関係に、心筋細胞が p16 および p21 の発現亢進を伴う細胞老化様の状態に至ることを示唆する堅牢な実験的根拠が報告された(Anderson R *et al.*, 2019)。INK-ATTAC マウスを用いて、または Bcl-2 ファミリータンパク質阻害剤 Navitoclax/ ABT-263 の投与により、老齢マウスより老化心筋細胞を含む p16 陽性細胞の細胞死を惹起することで、心肥大や繊維化のような心筋能低下を来す加齢性変化の改善が認められる(Anderson R *et al.*, EMBO J. 2019)。また、テロメア領域の修復困難 DNA 損傷の蓄積が、老齢マウスの骨格筋細胞や海馬神経細胞(Anderson R *et al.*, EMBO J. 2019)、さらには骨細胞においても観察されることから(Farr JN *et al.*, 2016)、それは終末分化細胞で細胞老化様の現象をもたらす共通の分子基盤である可能性が考えられる。ただし、よく研究されてきた古典的細胞老化に比べ、非分裂細胞の細胞老化様現象について、その特徴や詳細な分子機構、ひいては生理学的意義はほとんど明らかにされていない。

1-9 本研究の目的

本研究では、終末分化細胞におけるストレス応答をさらに解析するため、古典的細胞老化の概念を援用して、分子生物学的解析を用いたその分子機構の探索と機能の解明を試みることにした。特に、哺乳動物であるラットの初代培養胎児神経細胞の長期培養系において、ヒト老化脳で確認される分子・機能レベルでの加齢性変化が露呈することに着目し、これらの系を利用して神経細胞における細胞老化機構を明らかにすることを目指した。

AD 病変により老化した神経膠細胞が、症候性病的老化への遷移を牽引することが近年明らかにされ、細胞老化がもたらす脳老化過程への影響は強い関心を集めている(Bussian TJ *et*

al., 2018; Zhang P *et al.*, 2019)。同時に、神経細胞において細胞老化の分子機構を解明することは、老化過程における脳組織恒常性の維持・変容機構に関する分子基盤を理解する上で重要である。



図 1-6 終末分化非分裂細胞における細胞老化

脳、心臓および骨は、いずれも終末分化により細胞周期を脱して静止期にある非分裂細胞を構成因子とする(それぞれ神経細胞、心筋細胞ならびに骨細胞)。自然に老化したヒトまたはマウスの各組織において、これら終末分化細胞は、非可逆的細胞周期の停止以外の種々の古典的細胞老化表現型を示す(Jurk D *et al.*, 2012; Farr JN *et al.*, 2016; Anderson R *et al.*, 2019)。終末分化細胞における細胞老化様の現象を誘導する共通の分子機構として、修復困難なテロメア DNA 損傷を端に発動する恒久的な DDR により、p53-p21 経路が活性化することが重要であると考えられている。古典的細胞老化で理解されているような、細胞老化が個体にとって有益な適応応答であることを支持する実験的証拠はこれまで報告されていない。

第二章

材料と方法

2-1 試薬

本研究では、特に記さない限り、試薬はナカライテスク社、酵素はタカラバイオ社の製品を用いた。

2-2 初代培養ラット胎児神経細胞の長期培養

初代培養神経細胞の培養には poly-L-lysine(PLL)(SIGMA, P2636)コート(0.1 μ g/mL)を施した丸カバーガラス(12 丸 No.1 C012001)敷いた 4-well(Nunc)または 24-well 培養皿(IWAKI, Greiner)、あるいは 60 mm または 100 mm 培養皿を用いた(Corning, FPI)。PLL 溶液は細胞播種の前の少なくとも 2 時間前に培養皿に加えて、37°C CO₂ インキュベーター内に静置した。その後、PLL 溶液除き、培養皿を滅菌水で 2 回洗浄した。初代培養神経細胞は、日本 SLC(株)より搬入された妊娠ラット(胎齢 18 日目)を 48 時間内に解剖して、用時調製した。調製に用いた。妊娠ラットをイソフルラン(WAKO)の吸引により安楽死させた後、速やかに子宮を摘出し、氷冷 Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS)に浸した。その後、ラット胎児から取り出した脳組織を氷上に置いた培養皿に回収して、実体顕微鏡下で海馬および大脳皮質を単離した。それら組織を氷冷 DMEM 培養液、氷冷 HBSS 溶液で洗浄後、終濃度 40 U/Kuniz の DNase I(SIGMA, DN25)を含む 0.025%トリプシン溶液で 37°C 20 分間、適宜攪拌しながら処理した。5% fetal bovine serum(FBS)(Gibco)を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, ニッスイ)を細胞に加えて、トリプシンを中和した後、ピペッティング操作を慎重に行い(10 回)、細胞を分散させた。その後、細胞懸濁液を 40 μ m セルストレイナー(Falcon, 352340)で濾過した。遠心操作の後、上清を除き、新たに 5 mL の DMEM を加えて、ピペッティング操作を慎重に 5 回行って細胞を再懸濁した。血球計算版を用いて細胞数の計測を行い、海馬由来神経細胞は 1×10^5 細胞/mL、大脳皮質由来神経細胞は 2×10^5 細胞/mL で予め洗浄しておいた PLL コート培養皿に播種した。5 時間後、DMEM 培養液を除き、Neurobasal B27 培地(Neurobasal 培地(Thermo Fisher Scientific, 21103049)に B27 サプリメント(Thermo Fisher Scientific, 17504044)、0.12 x GlutaMax(Thermo Fisher Scientific, 35050061)および 96 U/ml Penicillin G(SIGMA)、72 U/ml Streptomycin(SIGMA)を添加した培地)で洗浄後、新鮮な Neurobasal B27 培地を加えた。神経膠細胞の細胞分裂・増殖を阻害する目的で、大脳皮質由来神経細胞を終濃度 2.5 μ M の AraC(WAKO, 030-11951)で培養 2 日目から 36 時間、海馬由来神経細胞を 5.0 μ M で培養 3 日目から 24 時間処理した。その後、培地を新鮮な Neurobasal B27 培地に交換し、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。培地は一週間に 2 回、半量ずつ交換を行った。阻害剤などの化合物を持続的に処理する際には、特に記述のない限り、培地交換ごとに新たに試薬を添加した。

2-3 レンチウイルス感染による遺伝子導入

293T 細胞は DMEM、0.16% NaHCO₃、10% FBS(Gibco)、2 mM L-glutamine(SIGMA)、96 U/ml Penicillin G(SIGMA)、72 U/ml Streptomycin(SIGMA)を用いて 5% CO₂ 存在下、37°C で

培養した。プラスミド DNA は Gene Elute Plasmid Midiprep Kit(SIGMA)を用いて精製し、-20°C で保存した。1.0 x 10⁶ ~ 1.5 x 10⁶ 細胞/ 60 mm、または 4.0 x 10⁶ 細胞/ 100 mm ディッシュで細胞を播種し、24~36 時間培養した後、293T 細胞の密度が 90%程度になったことを確認し、Lipofectamin 2000(Invitrogen)または Polyethylenimine Max(Polysciences, Inc.) を用いて、レンチウイルスベクターを導入した。導入後 12 時間後に新鮮な培養液に交換してさらに 24 時間培養を行った。レンチウイルス培養上清を回収後、0.45 μm フィルターで濾過した後、Amicon Ultra-15 100K 遠心管を用いて遠心分離によりウイルスの濃縮を行った(4000 rpm, 20 分間, 4°C)。濃縮ウイルス溶液は使用まで-80°C で保存した。標的となる初代培養海馬細胞は 2 x 10⁵/mL の密度で PLL コート(0.1 μg/mL)を予め施した 4-well プレートまたは 60 mm 培養皿に播種した。培養 2 日目に、濃縮ウイルス溶液を Neurobasal B27 培地に再懸濁して、2 x ウイルス溶液を作成した。培養液を半分除き、等量の 2x ウイルス溶液を加えて、ウイルス感染を 24 時間行った。その後、ウイルスを含む培養液を除き、AraC(ノックダウン実験では 5 μM, 過剰発現実験では 2.5 μM の濃度)を含む培地で細胞をさらに 24 時間培養した。培養 7 日目までに、EGFP 発現により 70-90%の神経細胞で目的遺伝子導入を確認した。

293T 細胞、レンチウイルスベクター(pCS2-shLuciferase-IRES-EGFP)およびレンチウイルスパッケージングベクター(pCMV-VSV-G-RSV-Rev 及び pCAG-HIVgp)は米原伸教授(京都大学)より分与された。shRNA の標的配列は以下の通りである。

pCS2-shLuciferase-IRES-EGFP: 5'-TAAGGCTATGAAGAGATAC-3' (firefly luciferase); pCS2-shPuma-IRES-EGFP: 1726-TAGATATACTGGAATGAATTTT-1748 (rat *Puma/Bbc3*)

hAPP 過剰発現には、pLenti-EF1-EGFP-P2A-STOP、pLenti-EF1-EGFP-P2A-hAPP695 および pLenti-EF1-EGFP-P2A-hAPP695 Swe/Ind を用いた。野生型または変異型 hAPP695 配列は、Addgene より購入した pCAF APP695 ベクター(plasmids #30137 and #30145, Young-Pearse TL, *et al.*, 2007)から PCR サブクローニングして、pLenti-EF1-EGFP-P2A-STOP に挿入した後、hAPP-P2A-EGFP 塩基配列を DNA シークエンス解析により確認した。

2-4 抗体

本研究で用いた抗体は以下の通りである。抗mouse IgG抗体(HRP-conjugated, GE healthcare, NA931)、抗rabbit IgG抗体(HRP-conjugated, GE healthcare, NA934)、抗mouse IgG抗体(Cy3-conjugated, Jackson, 115-165-146)、抗rabbit IgG抗体(Alexa488-conjugated, Molecular Probes, A11034)、抗mouse IgG抗体(Cy5-conjugated, Jackson, 115-175-146)、抗rabbit IgG抗体(Cy5-conjugated, Amersham, PA45004)、抗actin抗体(Millipore, MAB1501R)、抗p16抗体(Santa Cruz, sc468; Abcam, ab54210)、抗lamin B1抗体(Abcam, ab16048)、抗リン酸化p38抗体(Promega, V1211)、抗H3K9me3抗体(Abcam, 8898)、抗histone H3抗体(Abcam, ab1791)、抗Cxcl1抗体(R&D systems, MAB515)、抗GATA4抗体(Santa Cruz, sc9053)、抗c-fos抗体(Santa Cruz, sc52)、抗γH2AX抗体(Millipore, 05-636)、抗beta-Amyloid抗体(Abcam, ab10148)、抗Ub抗体(FK2)(Nippon Bio-test Labo., MFK004)、抗K48鎖poly-Ub抗体(Cell Signaling Technology

(CST, 8081)、抗K63鎖poly-Ub抗体(CST, 5621)、抗REST抗体(Santa Cruz, sc25398)、抗p62/SQSTM1抗体(MBL, PM045)、抗LC3抗体(CST, 4108)、抗Ribosomal protein S6抗体(Santa Cruz, sc74459)、抗リン酸化S6 (S235/236) 抗体 (R&D Systems, AF3198)、抗4E-BP1抗体(CST, 9452)、抗リン酸化4E-BP1(T37/T46)抗体(CST, 9459)、抗Bcl-2抗体(Novus Biologicals, NB100-56101)、抗NeuN抗体(Millipore, ABN78)、抗MAP2抗体(Santa Cruz, sc32791)、抗GFAP抗体(CST, 3670)。

2-5 化合物および阻害剤

本研究で使用した化合物および阻害剤は以下の通りである。ブレオマイシン(SIGMA, 1076308)、エトポシド(SIGMA, E1383)、カンプトテシン(SIGMA, C9911)、タプシガルギン(Santa Cruz, sc-24017)、N-acetyl-L-cysteine(NAC)(SIGMA, A7250)、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinepropanesulphonic acid(EPPS)(SIGMA, E9502)、ピューロマイシン(SIGMA, P7255)、シクロヘキシミド(SIGMA, 7698)。MG132(Boston Biochem, I-130)、LY29400(Santa Cruz, sc-201426)、Bafilomycin A1(Santa Cruz, sc-201550)、チオフラビンS(Santa Cruz, sc-391005)、ラパマイシン(東京化成工業, R0097)、過酸化水素水(WAKO, 7722-84-1)、リコンビナントヒト Amyloid beta 42(Peptide Institute Inc., 4349-V)。

2-6 Senescence-associated β -galactosidase (SA β -gal) アッセイ

2-1 で記述したように PLL コート (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を施した丸カバーガラス (Matsunami) を敷いた 4-well (Nunc) または 24-well 培養皿 (Greiner) に、海馬または大脳皮質神経細胞を播種し、薬剤存在下または非存在下で適当な培養日数に達するまで培養を行った。細胞の固定は、培養液を除いて PBS で一回洗浄した後、0.5% glutaraldehyde を含む PBS を加えて、室温で 15 分間静置することで行った。PBS で 3 回洗浄後、洗浄バッファー (1 mM MgCl_2 , 1x PBS, pH 6.0) で室温 5 分間処理した。その後、染色液 (0.65 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal), 1 mM MgCl_2 , 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1x PBS, pH 6.0) を加えて 37°C で 48 時間反応させた。PBS で洗浄後、位相差顕微鏡での観察および SA β -gal 活性陽性神経細胞を計測した。それぞれの独立した実験で、各実験条件につき 200 以上の神経細胞について解析を行った。

2-7 蛍光免疫染色

2-6 で記述した方法と同様に、薬剤存在下または非存在下で培養を行った海馬または大脳皮質神経細胞に対して、PBS で洗浄した後、4% paraformaldehyde (PFA) を含む PBS を加え、室温で 15 分間固定処理を行なった。固定試料を PBS で 3 回洗浄後、続きの操作を直ちに行わない場合には、4°C でそれらを一時保管した。PBS を除き、0.1 M グリシンを含む PBS で室温 15 分間処理した (クエンチング)。再度 PBS で洗浄し、0.5% Triton X-100 buffer (0.5% Triton X-100, 20 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 50 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 0.3 M スク

ロース)を用いて室温で5分間、透過処理を行なった。ブロッキングは室温で30分間または1時間行ない、一次抗体反応を室温で1時間行なった。ブロッキング剤として、0.1% Skim milk(BD)と0.1% BSA(Bovine serum albumin)を含むPBSを用い、また、それを抗体希釈液としても使用した。その後PBSで洗浄し、再度ブロッキング剤で5分間処理した後、二次抗体反応を室温、暗所で1時間行なった。PBSで洗浄後、1 µg/ml DAPIを含むPBSを用い15分間染色した。再びPBSで洗浄後、マウント剤(VECTASHIELD)を用いてスライドガラスにマウントし、高解像度蛍光顕微鏡 Delta Vision Elite(GE Health Care)でのプレパラートの観察および画像撮影を行なった。使用した対物レンズは、それぞれ20 x UPlanFI (NA 0.50, Olympus), 40 x UPlanFI (NA 0.75, Olympus), 油浸40 x UApo/340 (NA 1.35, Olympus), 油浸60 x Plan ApoN (NA 1.42, Olympus)。カメラはCoolSNAP HQ2 Monochrome Interline CCDカメラ(Photometrics)を用いた。得られた画像のz-projection解析ならびにバックグラウンド補正(明暗およびコントラスト補正)はSoftWorxソフトウェアを用いて行った。これらの画像処理操作は同一条件で全画像に反映させた。

2-8 チオフラビンS染色

培養4日目から42日目の海馬神経細胞を氷冷PBSで洗浄後、氷冷100%メタノールで氷上15分間固定した。その後、PBSで洗浄を三回行った。2-7で示した方法でブロッキング処理まで行った後、0.025% Thioflavin-S(wt/vol)(Santa Cruz, sc391005)で含むPBS下で、固定試料を室温5分間でインキュベートした。染色液を除き、80%エタノールで洗浄後(5分間 x 3)、PBSでさらに5分間洗浄した。その後、2-7に記述した手順に従い、MAP2に対する蛍光免疫染色により神経細胞を標識した。チオフラビンSシグナルの検出に用いた対物レンズは20 x UPlanFI(NA 0.50, Olympus)である。得られた画像のz-projection解析ならびにバックグラウンド補正(明暗およびコントラスト補正)はSoftWorxソフトウェアを用いて行った。これらの画像処理操作は同一条件で全画像に反映させた。

2-9 テロメア fluorescent in situ hybridization (FISH)

培養14日目または28日目の海馬神経細胞を、2-8に示した方法でメタノール固定した。2-7に記述した手順に従いNeuNおよびγH2AXに対する蛍光免疫染色を行った(一次抗体:抗NeuN抗体, 1:500; 抗γH2AX抗体, 1:500; 二次抗体:抗マウス抗体 Cy5-conjugated, 1:250; 抗ウサギ抗体 Alexa488-conjugated, 1:250)。蛍光シグナルの光褪色を防ぐため、以降の操作は全て遮光して作業を行った。試料を4% PFAを含むPBS中で室温15分間、後固定した。PBSで洗浄後、0.1 M グリシンを含むPBSで室温15分間処理した(クエンチング)。PBSで洗浄後、スライドガラス上に移した染色試料(丸カバーガラス)上に50 µLのテロメアプローブ反応溶液を滴下した(以下参照)。パラフィルムで試料を覆い、スライドガラスを80°Cに熱したメタルブロック上に3分間放置した。その後、37°Cでさらに4時間インキュベートした。その後、カバーガラスを4 well 培養皿に移し、50%ホルムアミドを

含む 2x SSC 溶液中で洗浄した(室温, 30 分間 x 2)。続いて、洗浄溶液を除き、2 x SSC で洗浄を行った(室温, 10 分間 x 2)。PBS で洗浄後、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI を含む PBS を用い 15 分間染色した。再び PBS で洗浄後、マウント剤(VECTASHIELD)を用いてスライドガラスにマウントし、Delta Vision Elite(GE Health Care)でのプレパラートの観察および画像撮影を行なった。使用した対物レンズは 40 x UPlanFI(NA 0.75, Olympus)。画像は各視野につき z 軸方向 0.8 μm 間隔で 4 - 7 枚撮影した。得られた画像の z-projection 解析ならびにバックグラウンド補正(明暗およびコントラスト補正)は SoftWorx ソフトウェアを用いて行った。これらの画像処理操作は同一条件で全画像に反映させた。

テロメアプローブ反応溶液：

0.3 $\text{pg}/\mu\text{L}$ Cy3-conjugated (CCCTAA)₃ peptide-nucleic acid (PNA)

1 x ハイブリダイゼーション溶液(50% ホルムアミド, 2 x SSC, 10% Dextran sulfate, 5 x Denhardt's)

2-10 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) 標識による DNA 複製の可視化

EdU 標識には Click-iT™ EdU imaging kits(Invitrogen)を用いた。PLL コート(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を施した丸カバーガラス(Matsunami)を敷いた 4-well 培養皿(Nunc)にラット胎児海馬由来細胞を $1 \times 10^5/\text{well}$ の密度で播種して、それらを培養 7 日目まで維持した。2-1 で記述したように、培養 3 日目から 5 μM AraC を含む培地で 24 時間処理を行い、分裂性細胞の細胞増殖を阻害した。また、新規 DNA 合成を可視化する際の陽性対照として、AraC 未処理(培地交換のみ)の初代培養細胞も同時に用意した。培養 7 日目に培地を除去したのち、10 μM EdU を含む培地で 24 時間、細胞をインキュベートした。その後、PBS で洗浄し、4% paraformaldehyde(PFA)を含む PBS を加え、室温で 15 分間固定処理を行なった。PBS で洗浄後、0.5% Triton X-100 buffer(0.5% Triton X-100, 20 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 50 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 0.3 M スクロース)を用いて透過処理を 5 分間、室温で行なった。添付のプロトコルに従い Click-iT™ 反応液を調製し、室温、暗所で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、2-7 で示した手順に従い(ただし全操作は遮光して行った)、神経細胞マーカー NeuN(Millipore)とアストロサイトならびに神経前駆細胞マーカー GFAP(CST)について、蛍光免疫染色を行った。二次抗体反応は、ブロッキング溶液で 500 倍希釈した抗 rabbit IgG 抗体(Cy5-conjugated, Amersham)および抗 mouse IgG 抗体(Cy3-conjugated, Jackson)を 50 μL 滴下し、室温で 1 時間静置した。PBS で洗浄後、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI(4',6'-diamidino-2-2 phenylindole dihydrochloride)を含む PBS を用い 10 分間染色した。再び PBS で洗浄後、マウント剤(VECTASHIELD (Vector Laboratories))を用いてスライドガラスにマウントし、プレパラートを作成した。プレパラートは高解像度蛍光顕微鏡 Delta Vision Elite(GE Health Care)での観察および計測を行なった。使用した対物レンズとカメラは、それぞれ 20 x UPlanFI(NA 0.50, Olympus)および CoolSNAP HQ2 Monochrome Interline CCD カメラである(Photometrics)。画像は各視野につき z 軸方向 1.2 - 2.0 μm 間隔で 4 - 7 枚撮影した。得られ

た画像の z-projection 解析ならびにバックグラウンド補正(明暗およびコントラスト補正)は SoftWorx ソフトウェアを用いて行った。これらの画像処理操作は同一条件で全画像に反映させた。

2-11 ウェスタンブロッティング

適当な培養日数にある神経細胞を氷冷 PBS で洗浄した後、細胞をセルスクレーパーで回収した。遠心後(3000 rpm, 4°C, 3 分 x 2)、上清を除いて、30-100 μ L の 1 x SDS サンプルバッファー(2% SDS, 10% glycerol, 62.5 mM Tris, 4% β -mercaptoethanol, pH 6.8)を添加した。ピペッティングにより細胞を破碎した後、105°C で 5 分間熱変性処理を行った。調整した全細胞抽出液は 6-14% SDS-PAGE ゲルで展開した後、セミドライ法で PVDF メンブレン (immobilon-P, Millipore) に電圧 12V、60 分間の条件で転写した。トランスファーバッファーは、62.5 mM Tris、2% SDS、10% Glycerol、20% エタノールを用いた。適当なブロッキング剤で室温 30 分間から 1 時間、メンブレンをインキュベートした後、一次抗体反応を 4°C 一晩または、室温 1 時間で行った。ブロッキング剤、また抗体希釈溶液として、3% BSA を含む TNT バッファー(20 mM Tris-HCl (pH7.5), 140 mM NaCl, 0.05% Tween 20 (vol/vol))、あるいはブロッキングワン(ナカライテスク)を用いた。その後、TNT バッファーで 5000 倍希釈した二次抗体溶液を室温で 1 時間反応を行い、ECL/ ECL prime(GE Health Care)または Chemi-Lumi One/ Super/ Ultra(ナカライテスク)により検出した。

2-12 Triton X-100 不溶性蛋白質の分画および不溶性ユビキチン化蛋白質の検出

Triton不溶性画分はBartlett BJ *et al.*, 2011らの手法に従い行った。用時調整した氷冷細胞溶解液(50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1%SDS, 1% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM Na₃VO₄, 1 x phosphatase inhibitor cocktail, 30 mM β -Glycerophosphate)を適当な条件で培養を行った初代培養神経細胞に添加した後、ピペッティングで細胞を破碎して、氷上に30分間静置した。その後、遠心を行い(14,000 rpm, 4°C, 10 min)、回収した上清に等量の2 x SDSサンプルバッファー(4% SDS, 20% glycerol, 125 mM Tris, 4% β -mercaptoethanol, pH 6.8)を加えてTriton可溶性画分とした。沈殿物は30-50 μ Lの1 x SDSサンプルバッファー(2% SDS, 10% glycerol, 62.5 mM Tris, 4% β -mercaptoethanol, pH 6.8)で溶解して、Triton不溶性画分とした。両画分は105°Cで5分間熱変性処理を行った。内部標準として可溶性actinを用いた(Dai S *et al.*, 2015)。それぞれの可溶性画分におけるactinの相対量より、対応する不溶性画分の使用量を決定した (Dai S *et al.*, 2015)。2-10で示した手順に従い、10-20% Extra PAGE One Precast Gel(ナカライテスク)を用いて不溶性画分を展開して、不溶性ユビキチンまたはポリユビキチン鎖を検出した。ユビキチン鎖の検出後、TNTバッファーで洗浄したメンブレンにおいて、Coomassie染色による総不溶性蛋白質の可視化を行った。ユビキチンシグナルおよび総不溶性蛋白質量(Coomassie染色シグナル)のシグナル定量解析にはImage Jを用いた。

2-13 オートファジーフラックス解析

10 nM bafilomycin A1の存在下で4時間培養を行い、オートファジーを後期過程(オートファゴリソソーム形成)で阻害した。全細胞抽出液を用いたウエスタンブロッティングにより、LC3-IIを検出した。また、p62は蛍光免疫染色によって検出した(2-7に記述した手法に従った)(Garcia-Prat, L, *et al.*, 2016)。シグナルの定量にはImage Jを用いた。

2-14 ミトコンドリア膜電位の測定

2-2 で述べたように、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で PLL コートを施したマルチウェルガラスボトム ディッシュ(Matsunami)上で、初代培養海馬神経細胞の培養を行った。培養7日目または28日目に培地を抜き、PBSで洗浄後、JC-1プローブ(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Cosmo Bio)と Hoechst33342(20 ng/mL)を添加したフェノールレッドフリーDMEM培地(Gibco)に交換して30分間培養を行った。陰性対照群として、脱共薬剤である carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone(CCCP)を50 μM の濃度で上述の反応培地に添加した。試料の観察には高解像度蛍光顕微鏡 Delta Vision Elite(GE Health Care)を用いた。使用した対物レンズとカメラは、それぞれ20x UPlanFI(NA 0.50, Olympus)および CoolSNAP HQ2 Monochrome Interline CCD カメラである(Photometrics)。画像はひとつの光学切片を示す(励起波長475/28 nm; 発光波長525/48 nmおよび597/45 nm)。得られた画像のバックグラウンド補正(明暗およびコントラスト補正)はSoftWorxソフトウェアを用いて行った。これらの画像処理操作は同一条件で全画像に反映させた。

2-15 細胞浸透性プローブ CM-H₂-DCFDA を用いた ROS 産生量の可視化

適当な培養日数に達した初代培養海馬神経細胞を1 μM の濃度のCM-H₂-DCFDA(Thermo Fisher, C6827)を含む培地で30分間培養した。フェノールレッドフリーDMEM(Gibco)で細胞を洗浄後、再度新鮮なフェノールレッドフリーDMEM培地に置換して、Delta Vision Elite (GE Health Care) を用いて、蛍光性酸化型 DCF のシグナルを検出した(10x UPlanFL N (NA 0.3 Ph1); 励起波長475/28 nm; 発光波長525/48 nm)。N-acetyl-L-cysteine(NAC)による抗酸化作用の検証には、500 μM のNACで1時間処理した培養7日目の初代培養海馬神経細胞を用いて、上述と同様の方法でROSを検出した(ただし、1 μM CM-H₂-DCFDAの存在下で40分間培養を行った)。

2-16 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法による分泌 A β ₄₂ レベルの測定

培養液中 A β ₄₂ の測定には、Human/Rat β Amyloid (42) kit Wako High-sensitive を用いた(Wako, 292-64501)。1 mL の培養液を各培養時点で回収し、測定まで-80°Cで保存した。試料はキット付属のサンプルバッファーで10倍希釈したものを測定に用いた。実験操作はキット添付のプロトコルに従った(技術的反復実験, 2回; 生物学的反復実験, 4回)。

2-17 メチオニンアナログを用いた新規合成蛋白質の可視化

AraC 処理後の培養 4 日目から、ラット胎児海馬由来細胞を DMSO、ラパマイシン(100 nM)、またはシクロヘキシミド(100 nM)をそれぞれ含む Neurobasal B27 培地下で維持した。培養 14 日目における新規蛋白質合成は Click-iT HPG Alexa Fluor 488 Protein Synthesis Assay Kit(Thermo Fischer Scientific, Cat# C10428)を用いて評価した。各細胞培養 14 日目に培地を除き、50 μ M の濃度で Click-iT-標識 L-homopropargylglycine(HPG)を含むアッセイ培地(L-メチオニン・L-システイン不含 DMEM (Gibco, 21013-024), 200 μ M システイン (SIGMA, C7880), HEPES (DOJINDO, 342-01375), 2 mM L-glutamine)を添加して 30 分間インキュベートした。その後、室温 PBS で洗浄を行い、細胞を 4% PFA を含む PBS 中で 15 分間固定した。核の染色を含むその後の全ての検出操作はキット付属のプロトコルに従って行い、HPG 標識蛋白質は Delta Vision Elite で観察を行った。得られた画像のバックグラウンド補正(明暗およびコントラスト補正)は SoftWorx ソフトウェアを用いて行った。これらの画像処理操作は同一条件で全画像に反映させた。シグナルの定量には Image J ソフトウェアを用いた。

2-18 定量 RT-PCR

RNeasy Mini kit(QIAGEN)を用いて初代培養神経細胞から全 RNA の抽出を行った。オリゴ dT プライマー(Invitrogen)および AMV 逆転写酵素(Life Sciences)を用いて、それら全 RNA 由来の cDNA を調製した。RT-PCR 反応試薬には SYBER Green Master Mix(Applied Biosystems)を用いた。使用したプライマーのヌクレオチド配列は以下の通りである。

Cdkn2a (p16):

5'-GGGTCACCGACAGGCATAAC-3'
5'-CAGAAGTGAAGCCAAGGAGAAA-3';

Cdkn1a (p21):

5'-GACATCTCAGGGCCGAAAAC-3'
5'-GAATGAAGGCTAAGGCAGAAGA-3'

Lmnb1 (LaminB1):

5'-GAATTCTCAGGGAGAGGAGGTT-3'
5'-TATTGGATGCTCTTGGGGTTC-3'

Cxcl1:

5'-AAACCGAAGTCATAGCCACAC-3'
5'-GGGACACCCTTTAGCATCTTT-3'

Serpine1 (Pai-1):

5'-TCAGACAATGGAAGAGCAACA-3'
5'-GTCAGTCATGCCAGCTTCT-3';

Igfbp2:

5'-GCGGGTACCTGTGAAAAGAGA-3'

5'-TCCACATGGTTCTCCACCAG-3'

Igfbp4:

5'-GGTGTATGCACGGAGCTGTC-3'

5'-CTGTTGTTGGGATGCTCACTCT-3'

Igfbp7:

5'-CATCACCCAGGTCAGCAAAG-3'

5'-ACTTCGCAGCTCAAGTACACC-3'

Casp3:

5'-GACCTTACTCGTGAAGAAATTATGG-3'

5'-CTCCATGACTTAGAATCACACACAC-3'

Bbc3 (Puma):

5'-CACTGATGGAGATACGGACTTG-3'

5'-GCCTTTCCTGAGATGGTGGT-3'

Ppia (CypA):

5'-TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTC-3'

5'-CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC-3'.

第三章

結果

3-1 ラット胎児海馬神経細胞の長期初代培養系の構築

第1章で述べたように、細胞老化は、再生組織において、分裂細胞の非可逆的な細胞周期停止状態で定義される非致死性的ストレス応答である。非分裂性の神経組織では、20日間の初代ラット神経細胞培養、または老化マウスの大脳皮質および小脳に由来する脳切片の免疫染色による細胞老化様表現型の部分的な報告のみであったため(Geng YQ *et al.*, 2010; Jurk D *et al.*, 2012)、神経細胞の細胞老化をより詳細に検証するために有用な初代細胞培養系の構築を試みた。

はじめに、初代培養神経細胞を高純度で長期間培養する実験系を検討した。神経細胞初代培養系では、本研究で目的とする神経細胞のほか、少数の神経膠細胞や神経前駆細胞などの非神経細胞の混入が不可避である。それらの細胞は初代培養時には高い細胞分裂能を有するため、全細胞集団に対する非神経細胞の割合が培養日数の経過に伴い増加する。本研究ではそのような可能性を避け、高純度の神経細胞の初代培養を行うため、標準化された既存手法に従い、短期間のシタラビン/ シトシンアラビノシド(AraC)処理で非神経細胞の細胞増殖を阻害することとした(Beaudoin GM 3rd *et al.*, 2012)。実際には、ラット胎児(18日)の海馬より単離した初代培養神経系細胞を培養プレートに播種後(0日)、培養3日目から24時間、5 μM の濃度の AraC を含む培地で、それら細胞の培養を行った(図 3-1a)。

まず、調製した初代培養海馬神経細胞が非分裂細胞であることを検証するため、培養7日目に核酸アナログである EdU を 10 μM の濃度で含む培地で細胞を24時間インキュベートし、その後 EdU 標識された核の頻度を調べた。このとき、神経細胞および非神経細胞の判別は、神経細胞特異的マーカーである NeuN、神経膠細胞(アストロサイト)および休止期にある神経前駆細胞の特異的マーカーである GFAP に対する抗体を用いて蛍光免疫染色により行った。EdU 陽性細胞は全細胞集団のうち $2.7 \pm 0.7\%$ であり、それらは全て NeuN 陰性であった(図 3-1b 上)。また、GFAP 陽性の非神経細胞(全体の $9.2 \pm 1.6\%$) においては、 $22.1 \pm 8.6\%$ が EdU 陽性であった(図 3-1b 上段)。一方で、同様の実験を AraC 未処理の初代培養で行った場合(図 3-1b 下段)、NeuN 陽性細胞では EdU 標識された核は認められなかったが、GFAP 陽性細胞(全体の $14.6 \pm 3.3\%$) においては、 $44.1 \pm 13.9\%$ が EdU 陽性であった(図 3-1b 下)。以上の結果より、本実験系において、初代培養海馬神経細胞は培養7日目までに DNA 複製能を失っており、非分裂細胞の状態にあると結論した。また、5 μM の濃度の AraC を 24 時間処理することで分裂細胞の増殖が十分に阻害されることがわかった(図 3-1b)。

次に、高い純度での海馬神経細胞の初代培養がどの程度持続可能なのかを調べるため、上述で示した条件で AraC 処理を行い(5 μM の濃度で培養3日から24時間)、その後に培養7日目および培養28日目に細胞を固定して、NeuN に対する特異的抗体を用いた蛍光免疫染色により NeuN 陽性細胞の割合を測定した。培養7日目では、全細胞のうち $88.2 \pm 8\%$ の細

胞が NeuN 陽性であったのに対し、培養 28 日では NeuN 陽性細胞の割合は $76.2 \pm 11\%$ であった(図 3-1c、 $n=4$ (biological replicates))。したがって、培養 3 日目の細胞に $5 \mu\text{M}$ AraC を 24 時間処理することにより、少なくともおよそ一ヶ月程度まで、初代培養海馬神経細胞を比較的高純度で維持可能であることが示された。特に記述がない限り、以下の初代培養海馬神経細胞の長期培養ではこの条件を用いた。

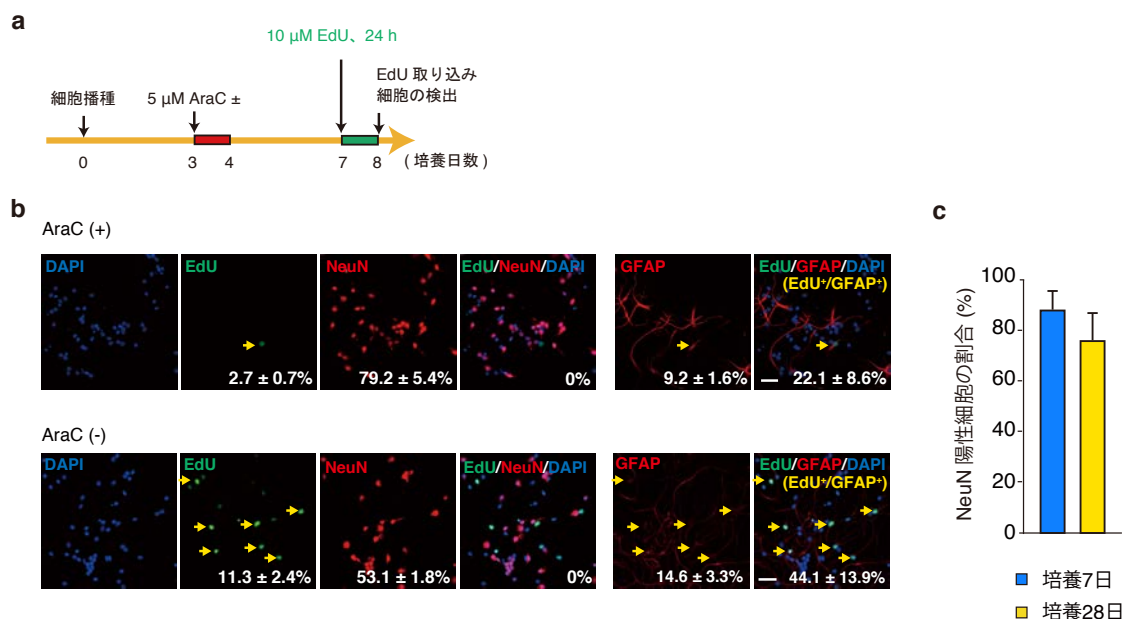


図 3-1. ラット胎児海馬に由来する初代神経細胞の長期細胞培養系の確立

- a) EdU 標識 ($10 \mu\text{M}$, 24 h) による新規合成 DNA の可視化した際のタイムテーブルを示す。
- b) 神経細胞および混在している増殖性細胞の DNA 複製能を EdU による標識により評価した結果を示す。EdU 標識細胞の検出は、神経細胞特異的のマーカ-蛋白質 NeuN の蛍光免疫染色法と組み合わせで行った。この時、細胞の核は DAPI 染色により可視化した。実験計画図 (a) の下に、代表的な蛍光顕微鏡写真を示す (青、DAPI で染色した核; 緑、EdU; 赤、NeuN 陽性神経細胞)。EdU 陽性細胞および NeuN 陽性細胞の割合はそれぞれの写真の右下に示した。また、EdU 陽性 NeuN 陽性細胞 (神経細胞) の割合は EdU/NeuN/DAPI 統合図の右下に記した。同様に、GFAP 陽性細胞 (アストロサイトまたは神経前駆細胞) の割合および EdU 陽性 GFAP 陽性細胞の割合を各対応図の右下に示した。黄色い矢印は EdU 陽性 NeuN 非陽性細胞 (非神経細胞) を指す。各細胞の割合として、独立した 3 回の実験で得られた結果の標準偏差を示した ($n = 123 \sim 247$ 細胞/実験)。スケールバー $40 \mu\text{m}$ 。
- c) NeuN に対する蛍光免疫染色法を用いた長期培養に伴う神経細胞の割合変化の評価。(a) で示すように、培養 3 日目の初代神経細胞に $5 \mu\text{M}$ AraC 処理を 24 時間行った。DAPI による核染色像から判定した全生存細胞に対する NeuN 陽性細胞の割合を棒グラフで示した ($n > 500$ 細胞/実験)。図中のエラーバーは独立した 4 回の実験で得られた結果の標準誤差を示す。培養 28 日の時点においても、集団のうち平均 75% 以上の細胞が神経細胞であった。

3-2 長期培養神経細胞における細胞老化の検討

正常ヒト分裂細胞は繰り返し継代培養を行うと、やがてテロメア長依存的または非依存的に細胞分裂を停止し (Harley CB *et al.*, 1990; Herbig U *et al.*, 2004; Kiyono T *et al.*, 1998; Ramirez RD *et al.*, 2011)、細胞老化に到達する。ここではまず、初代培養海馬神経細胞が長期培養の後にそれら古典的細胞老化で観察される特徴を呈するののかについて解析を行った。

3-2-1 長期培養神経細胞における古典的細胞老化表現型の検出

これまでに、古典的細胞老化表現型の一つである SA- β -gal 活性は長期培養神経細胞においても報告されている (Geng YQ *et al.*, 2010; Piechota M *et al.*, 2016)。そこでまず、上述 3-1 で確立した長期培養系を用いて、培養 7 日目と 28 日目における SA- β -gal 陽性神経細胞の頻度を測定した。培養 7 日目ではおよそ 5% ($4.0 \pm 1.3\%$) の海馬神経細胞が SA- β -gal 陽性を示したのに対し、28 日目ではおよそ 80% であった ($77.6 \pm 4.1\%$) (図 3-2a, n=4 (biological replicates))。また、培養 28 日目の海馬神経細胞は、培養 7 日目の細胞と比較して、細胞体の肥大化を示した (図 3-2a)。次に、長期培養海馬神経細胞が分裂細胞で報告されている多様な細胞老化表現型を包括的に示すのかについて検討を行った。まず培養 7 日目と 28 日目において、老化細胞の非可逆的な細胞周期停止に重要な CDK 阻害因子 *Cdkn1a* および *Cdkn2a* (以下、それぞれ p21 および p16 をコードする) の mRNA 量を定量 RT-PCR を用いて調べた。培養 28 日目の海馬神経細胞では、培養 7 日目と比較して、p21 の発現量に大きな差は認められなかったが、一方で、p16 の発現量がおよそ 4 倍に上昇していた (図 3-2b, n=3 (biological replicates))。さらに、抗 p16 抗体を用いた免疫染色により、p16 蛋白質が、その mRNA 量の変化と一致して、長期培養海馬神経細胞で増加していることを見出した (図 3-2c, n=2 (biological replicates))。ヒト線維芽細胞の複製老化では、細胞老化誘導の初期 (およそ 50 回細胞が分裂した後) に DDR 依存的に p21 の発現が上昇するが、さらに 20 回分裂を繰り返して安定的に細胞周期を停止した細胞では、p21 は減少しており、その一方で顕著な p16 の蓄積が認められる (Stein GH *et al.*, 1999)。

R. Haq 博士と当研究室に以前在籍していた岩佐博士は、ストレス MAPK であるリン酸化 p38 の亢進 (すなわち、活性化型 p38) がヒト線維芽細胞における細胞老化誘導に必須の役割を果たすことをすでに報告している (Haq R *et al.*, 2002; Iwasa H. *et al.*, 2003)。そこで長期培養神経細胞で同様に p38 リン酸化状態をウエスタンブロッティングによって調べたところ、培養 28 日目では培養 7 日目の細胞と比較して、リン酸化 p38 が顕著に増加していた (図 3-2d, n=5 (biological replicates))。

老化状態にあるヒト線維芽細胞では、lamin B1 が減少していることが知られている (Shimi T *et al.*, 2011; Freund A *et al.*, 2012)。そこで培養 7 日目と 28 日目の海馬神経細胞における lamin B の経日変化について、定量 RT-PCR、蛍光免疫染色およびウエスタンブロッティングによって検討した。その結果、mRNA および蛋白質両レベルで lamin B1 は培養日数依存的に減少しており、いずれの実験手法でも一貫した証拠を得た (図 3-2d-f, n=3 or 5

(biological replicates))。ヒト線維芽細胞において、lamin B1 の減少は核内クロマチンの空間的・立体的再編成を促し、老化細胞特有のトランスクリプトーム確立に寄与している (Sadaie M *et al.*, 2013; Shah PP *et al.*, 2013; Criscione S *et al.*, 2016; Parry AJ & Narita M, 2016)。そこで、そのようなクロマチン再編成が長期培養神経細胞で生じているかについて検討した。海馬神経細胞の核を DAPI 染色により可視化し、その染色領域の広さ(すなわち核面積)ならびにそのシグナル輝度値(DNA 含有量を反映)を培養 7 日目と培養 28 日目の細胞間で比較を行った。培養 28 日目の長期培養神経細胞では、培養 7 日目の細胞と比べ、核面積がおおよそ 1.25 倍増加していた(図 3-2g、n=4 (biological replicates))。しかし、この時、培養日数の違いによる DAPI シグナル輝度値の変化は観察されなかった(図 3-2g)。さらに、ヘテロクロマチンマーカーであるヒストン H3 リジン 9 番目のトリメチル化(H3K9me3)をウエスタンブロッティングで調べたところ、H3K9me3 レベルは長期培養海馬神経細胞で顕著に減少していた(図 3-2d)。これらの結果から、長期培養を行った神経細胞において、laminB1 減少に伴うクロマチン再編成が生じている可能性が示唆された。

老化したヒト線維芽細胞は、さまざまな炎症性サイトカインや細胞増殖因子を分泌して (SASP)、細胞自律的または非自律的に細胞老化誘導を促進することが報告されている (Coppé JP *et al.*, 2008; Acosta JC *et al.*, 2008, 2013)。また、SASP 関連因子は、クロマチン再編成によるそれら mRNA 転写の亢進、その後の mRNA 安定化といった多段階の制御を受けている (Aird KM *et al.*, 2016; Herranz N *et al.*, 2015)。本研究でも SASP を評価するため、培養 7 日目と培養 28 日目の初代培養海馬神経細胞において、ヒト線維芽細胞の細胞老化でこれまでに既に報告されている SASP 関連因子(Kortlever RM *et al.*, 2006; Coppé JP *et al.*, 2008)の mRNA 量を定量 RT-PCR により調べた。長期培養神経細胞では、培養 7 日目の細胞と比較して、*Cxcl1*(ヒト IL-8 ホモログをコードする)、*Pai1*、*Igfbp4*、および *Igfbp7* の顕著な mRNA 量増加が認められた(図 3-3a、n=3 (biological replicates))。また、*Igfbp2* mRNA においても、他 4 因子と比べて程度は低いですが、長期培養による発現増加傾向が観察された(図 3-3a、n=3 (biological replicates))。さらに、各培養日時点の海馬神経細胞を *Cxcl1* に特異的な抗体で染色したところ、時間依存的な *Cxcl1* 蛋白質量の上昇が認められた(図 3-3b、n=3 (biological replicates))。重要なことに、長期培養を行った細胞集団のうち、NeuN 陰性非神経細胞では *Cxcl1* 蛋白質の発現量が神経細胞と比較して相対的に低く、多く場合で検出範囲以下であった(図 3-3c)。次に、近年ヒト線維芽細胞において新規 SASP 制御因子として報告された転写因子 GATA4 (Kang C *et al.*, 2015)について蛍光免疫染色で検討すると、培養 7 日目と比較して、培養 28 日目の長期培養神経細胞でその蛋白質量が顕著に増大していた(図 3-3d、n=3 (biological replicates))。したがって、以上の結果から、非分裂性の神経細胞が長期間の初代培養によって SASP 様の現象を呈するようになることが示唆された。

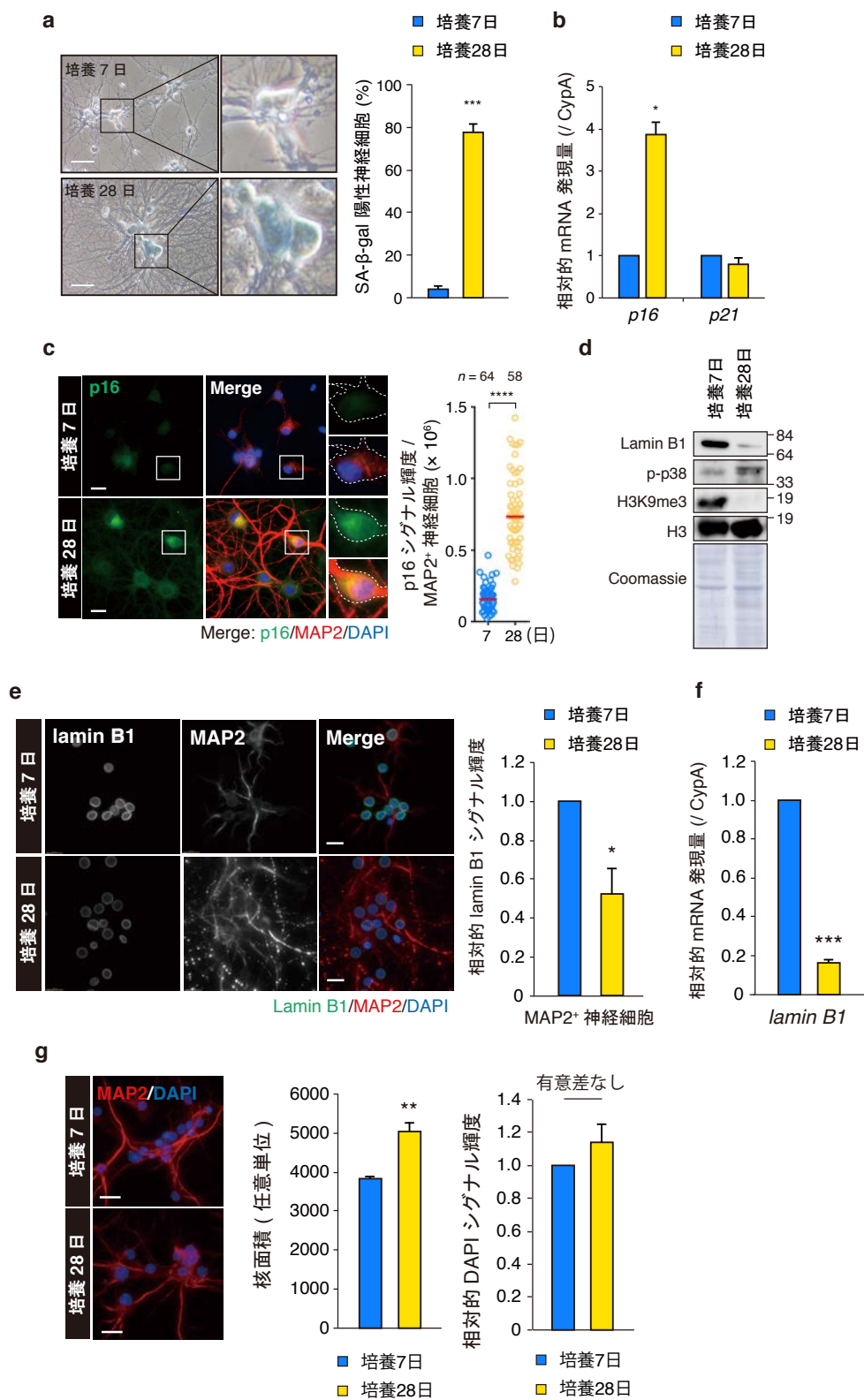


図 3-2. 長期培養を行った初代培養海馬神経細胞は広範の古典的細胞老化表現型を呈する

(図 3-2)

a) 培養 7 日および 28 日目のラット胎児海馬神経細胞を固定し、48 時間 SA- β -gal 染色を行った。それぞれの培養時点において、代表的な顕微鏡写真を示した。右図では、特徴的な形態から神経細胞と同定された細胞のうち、培養 28 日目の図中にあるような青色を呈する神経細胞の頻度を SA- β -gal 陽性神経細胞の割合として示した ($n \geq 200$ 神経細胞/ 実験)。4 回の独立した実験の標準偏差をエラーバーで示した。スケールバー、20 μ m。

b) 培養 7 日および 28 日目の海馬神経細胞から全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法を用いて *p16* および *p21* mRNA の発現量を定量した。それら mRNA 量は、ハウスキーピング遺伝子 *CypA* の mRNA 量を用いて標準化を行った。エラーバーは 3 回の独立した実験の標準偏差を示す。長期培養によって *p16* mRNA の発現上昇が認められたが、一方で *p21* mRNA はその発現量に変化を示さなかった。

c) (a) で述べた細胞において、*p16* 蛋白質に対する蛍光免疫染色を行った。MAP2 陽性 (赤) は神経細胞を示す。右端の拡大図中の破線内領域は、各培養日数での代表的な単一神経細胞の細胞体を示す。代表的な実験で得られた神経細胞あたりの *p16* シグナル輝度値 (任意単位) の定量結果をドットプロットで示した。長期培養した海馬神経細胞で *p16* 蛋白質量が顕著に増加していた。

d) 培養 7 日および 28 日目の海馬神経細胞において、それら細胞の全細胞抽出液を調製した。ウエスタンブロッティング法により図中に示される蛋白質における培養日数の経過に伴う量的変化を検討した。Actin および Coomassie 染色像はローディングコントロールとして検出した。長期培養海馬神経細胞では、lamin B1 蛋白質および H3K9me3 が減少しており、また、*p38* のリン酸化レベルが亢進していた。

e) 上述の (c) と同様に lamin B1 および MAP2 特異的な抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。代表的な蛍光顕微鏡画像を示す。右図に、MAP2 陽性神経細胞における lamin B1 シグナル輝度の平均の相対的変化率 (任意単位) を示した ($n = 47 \sim 74$ 神経細胞/ 実験)。エラーバーは 5 回の独立した実験の標準偏差を示す。

(d) のウエスタンブロッティング法の結果と一致して、培養日数依存的な lamin B1 蛋白質の減少を認めた。

f) 上述の (b) と同様の手法で *lamin B1* mRNA 発現量の定量を行った。発現量の標準化には *CypA* の mRNA 量を用いた。エラーバーは 3 回の独立した実験の標準偏差を示す。長期培養海馬神経細胞において、lamin B1 は mRNA レベルでも顕著に減少していた。

g) 培養 7 日および 28 日目における MAP2 (左図、赤) に対する蛍光免疫染色および DAPI 染色 (左図、青) の代表的な蛍光顕微鏡画像を示した (左図)。

MAP2 陽性神経細胞において DAPI シグナルが認められる領域を選択し、核面積 (中央図) およびそのシグナル輝度 (右図) を Image J を用いて計測した ($n = 46 \sim 68$ 神経細胞/ 実験)。それぞれエラーバーは 4 回の独立した実験の標準偏差を示す。

長期培養神経細胞では、培養 7 日目の細胞と比較して、各面積の増加を認めたが、一方で DNA 含有量には差を認めなかった。

統計処理にはマン・ホイットニー U 検定 (c) または両側独立 t 検定を用いた ($*p < 0.05$; $**p < 0.005$; $***p < 0.0005$; $****p < 0.0001$)。免疫染色像のスケールバーは 20 μ m。

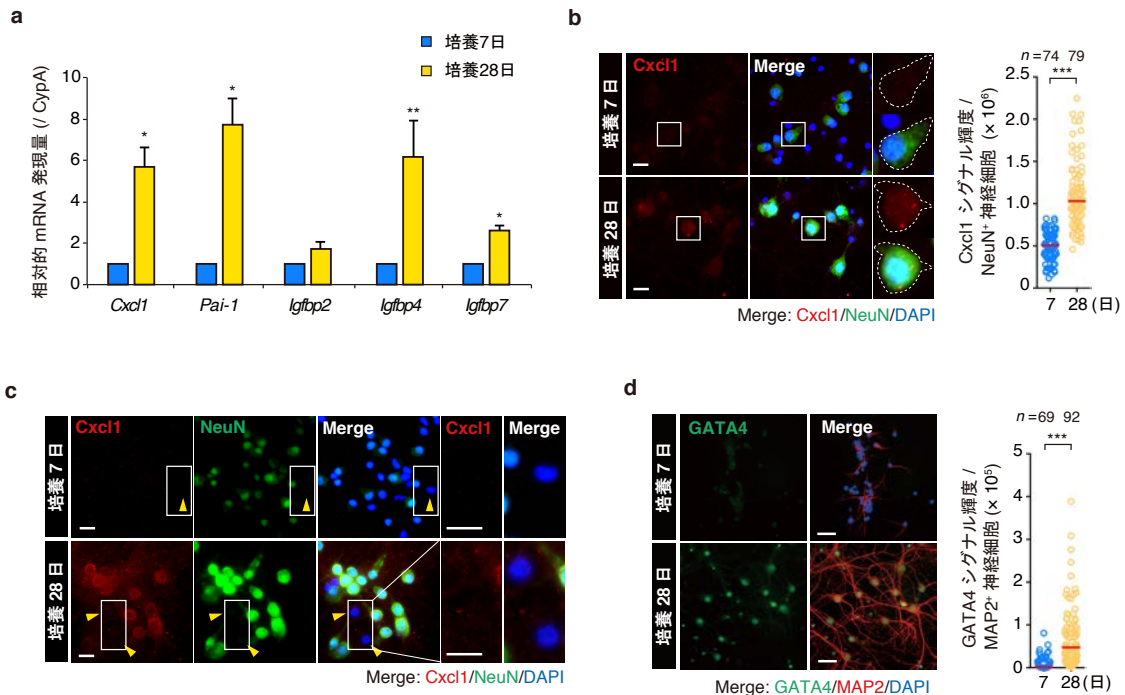


図 3-3. 長期培養海馬神経細胞は老化関連分泌形質 (SASP) を示す

a) 培養 7 日および 28 日目の初代培養海馬神経細胞から全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法を用いて SASP 関連遺伝子の発現量を定量した。図中に示す SASP 関連遺伝子 mRNA 量は、ハウスキーピング遺伝子 *CypA* の mRNA 量を用いて標準化を行った。エラーバーは 3 回以上の独立した実験の標準偏差を示す。検討を行った全ての SASP 遺伝子は培養日数依存的に発現上昇していた。

b) 培養 7 日および 28 日目の海馬神経細胞を抗 Cxcl1 抗体 (赤) および抗 NeuN 抗体 (緑) で染色した。核は DAPI 染色により検出した (青)。顕微鏡画像右端には、各培養時点における単一神経細胞の拡大図を示し、細胞体を破線で囲んだ。代表的な実験で得られた神経細胞あたりの Cxcl1 シグナル輝度値 (任意単位) の定量結果をドットプロットで示した。スケールバー 20 μm 。長期間培養した海馬神経細胞で Cxcl1 蛋白質量が顕著に増加していた。

c) (b) と同一の実験で得られた異なる視野における免疫染色像を示した。Cxcl1 陰性非神経細胞 (NeuN 陰性) を矢頭で示した。長期培養後に観察された Cxcl1 産生細胞は主に神経細胞であった。スケールバー 20 μm 。

d) (b) と同様に GATA4 (左図、緑) と MAP2 (左図、赤) それぞれに対する特異的抗体を用いて、蛍光免疫染色を行った。神経細胞あたりの GATA4 シグナル輝度値 (任意単位) の定量結果の一例をドットプロットで示した。スケールバー 30 μm 。初代培養神経細胞において、長期培養による GATA4 の蓄積が観察された。

統計処理にはマン・ホイットニー U 検定 (b), (d) または両側独立 t 検定 (a) を用いた (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0001$)。

3-2-2 長期培養神経細胞における加齢性変化

次に、ヒト生体脳組織で生じる加齢性変化が試験管内長期培養系で観察されるかについて検討を行った。転写共役因子である REST は神経幹・前駆細胞ならびに神経膠細胞において、神経細胞特異的遺伝子群を抑制する (Ballas N & Mandel G, 2005; Ooi L & Wood IC, 2007)。しかし近年、REST 蛋白質は生理的に老化したヒト脳海馬領域の神経細胞の核内で蓄積し、また一方で、病的に老化した状態にあるアルツハイマー病患者の同細胞では減少していることが見出された (Lu T *et al.*, 2014)。核内局在性の REST は、アルツハイマー病および神経細胞死に関連する遺伝子群の転写抑制を介して、生理的から病的脳老化への臨床的進展を抑制する (Lu T *et al.*, 2014)。したがって、初代培養海馬神経細胞の長期培養系を用いた本研究においても REST は有用な脳老化関連分子マーカーになりうると考えた (Piechota M *et al.*, 2016)。そこで、3-2-1 項に示した実験同様、培養 7 日および培養 28 日目の海馬神経細胞において、REST の局在およびその量的変化を調べる目的で蛍光免疫染色を行った。その結果、培養 28 日目の神経細胞では、培養 7 日目の細胞と比較して、核内に局在する REST 蛋白質量の顕著な増加が観察された (図 3-4)。これは、近年報告された培養 30 日目のマウス大脳皮質に由来する初代培養神経細胞における観察結果と一致する (Piechota M *et al.*, 2016)。

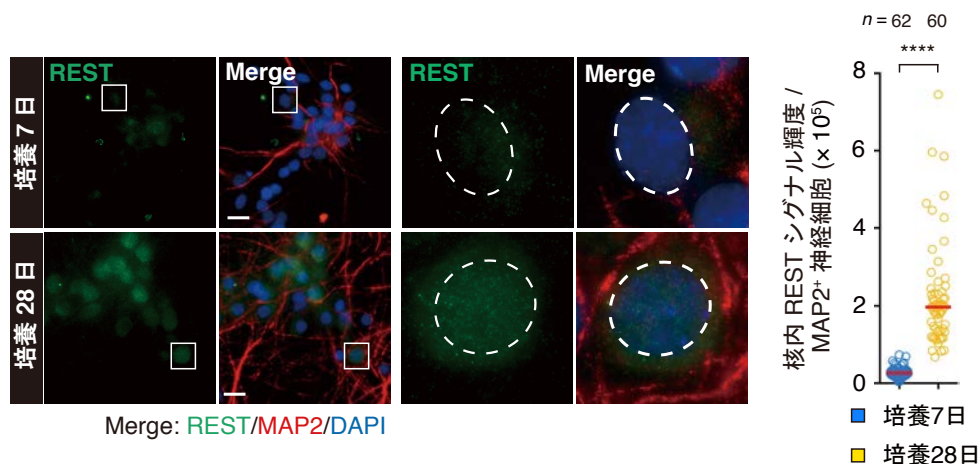


図 3-4. 長期培養馬神経細胞は脳老化で認める分子レベルの加齢性変化を示す

培養 7 日および 28 日目のラット海馬神経細胞を抗 REST 抗体 (緑) と抗 MAP2 抗体 (赤) を用いて染色した。核は DAPI 染色により検出した (青)。それぞれの培養時点において、代表的な MAP2 陽性神経細胞 (左図中、白い四角で包囲) の拡大図を中央に示し、点線は核の領域を表す。また、代表的な実験について、核内 REST 蛋白質の定量結果を中央値とともに右に示した。REST は長期培養神経細胞の核内に蓄積する。統計処理はマン・ホイットニー U 検定を用いて行った (**** $p < 0.0001$)。スケールバー 20 μm 。

長期増強 (long-term potentiation; LTP) は、化学シナプスの高頻度連続刺激 (テタヌス刺激) の後、シナプス結合強度が持続的に増加する現象であり、学習および記憶の分子的基盤である神経細胞間のシナプス伝達効率の可塑性を担う (Nicoll RA, 2017)。海馬領域における長期増

強は、後シナプス後膜上の N-methyl-D-aspartate(NMDA)型グルタミン酸受容体および電位開口型 Ca^{2+} イオンチャネル(voltage-dependent/gated calcium channels; VDCC)を介したカルシウムイオンの細胞内流入によってもたらされる(Morgan SL & Teyler TJ, 1999; Woodside BL *et al.*, 2004; Voglis G & Tavernarakis N, 2006)。これまでに、若齢ラットの海馬における長期増強誘導では、NMDA 型グルタミン酸受容体の寄与の割合が相対的に高く、一方で加齢個体の海馬では VDCC に依存して生じる LTP が亢進していることが報告されている(Foster TC *et al.*, 2012)。したがって、本研究で用いた長期培養系においても、それら海馬神経細胞の機能的加齢性変化、すなわち VDCC 依存的な細胞刺激応答性の亢進が、培養日数の経過につれ生じているかについて、以下に示すような実験手法で検討した。まず、VDCC を介した神経細胞活動を観察するため、培養 7 日目または 28 日目の海馬神経細胞に対して、NMDA 型グルタミン酸受容体のグルタミン酸結合領域に対する競合的阻害剤である D-2-amino-5-phosphonopentanoate(D-APV)で 24 時間前処理を行い、その後 50 mM の濃度で塩化カリウム溶液を培地中に添加することで神経細胞の発火を誘発した(KCl 刺激)。刺激前および刺激 12 時間後に固定した細胞において(それぞれ図 3-5, レーン 1-4; 図 3-5, レーン 5-8, n=4 (biological replicates))、蛍光免疫染色法により神経細胞発火マーカーである c-fos の蛋白質発現誘導を評価した(図 3-5)。その結果、培養 7 日目の海馬神経細胞と比較して、培養 28 日目の細胞では 12 時間の KCl 刺激による c-fos 蛋白質発現誘導が顕著に増強していた(図 3-5, レーン 5, 6)。また、同時点において KCl 刺激を施していない場合、いずれの培養日数の細胞においても、c-fos 蛋白質発現誘導が観察されなかった(図 3-5, レーン 7, 8)。また、培養 14 日目と 28 日目の海馬神経細胞を用いて同様の実験を行った場合においても、14 日目の神経細胞と比較して、28 日目の神経細胞では KCl 処理による c-fos 蛋白質発現が強く誘導された(図略)。したがって、初代培養海馬神経細胞の長期培養系においても、健全な老化脳で観察されるように、VDCC 依存的な細胞刺激応答性が NMDA 型グルタミン酸受容体のそれを補完している可能性が示唆された。以上の実験結果より、長期培養海馬神経細胞は、古典的細胞老化の特徴のみならず、ヒト生体脳で報告されている加齢性変化を呈することが明らかとなった。

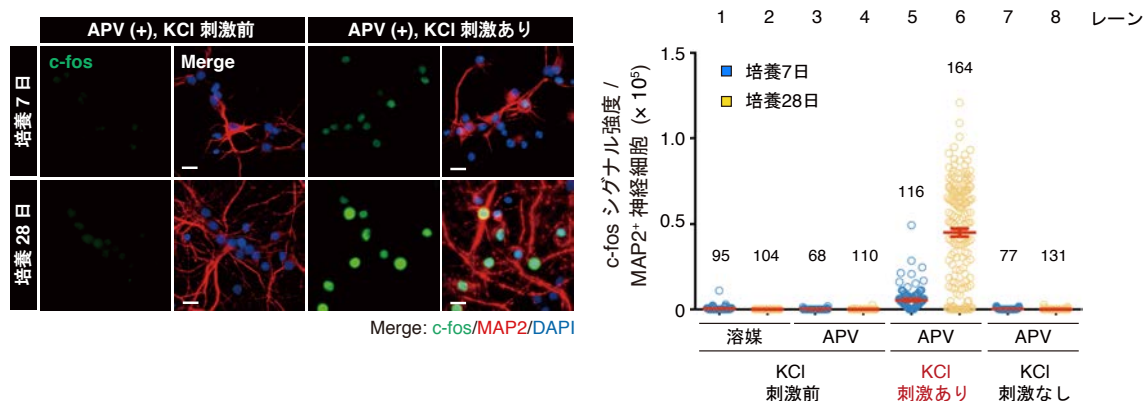


図 3-5. 長期培養海馬神経細胞は脳老化で認める機能レベルの加齢性変化を示す

(図 3-5)

培養 6 日または 27 日目に、NMDA 受容体阻害剤である D-APV (図中, APV) を終濃度 100 μ M で培地中に添加した。この時、対照群の細胞には溶媒として DMSO を用い、同様の操作を行った。24 時間細胞を培養した直後、培養 7 日および 28 日にある海馬神経細胞を刺激未処理の細胞群として、4% PFA で固定した (レーン 1~4: KCl 刺激前)。また、残りの細胞群は APV と 50 mM KCl を含む培地 (レーン 5, 6: KCl 刺激あり)、または APV のみを含む培地に置換し (レーン 7, 8: KCl 刺激なし)、さらに 12 時間培養を続けた。その後、それら細胞を刺激未処理の細胞同様の条件で固定し、c-fos (左図, 緑) と MAP2 (左図, 赤) それぞれに対する特異的抗体を用いて、蛍光免疫染色を行った。核は DAPI 染色により検出した (左図, 青)。培養 7 日および 28 日において、APV 前処理直後 (KCl 刺激前, レーン 3, 4) および 12 時間の KCl 刺激を施した細胞群で得られた代表的な蛍光顕微鏡画像を示す。スケールバー 40 μ m。右グラフには検証を行った全条件における MAP2 陽性神経細胞 ($n = 68 \sim 164$) あたりの c-fos シグナル輝度 (任意単位) を示す。長期培養神経細胞では VDCC 依存的な外的刺激応答性が亢進していた。また、培養 14 日目と培養 28 日目との比較においても、培養日数の経過による激応答性の増強を示す同様の結果を得た。

3-3 初代培養神経細胞における長期培養誘導性細胞老化の原因解明

ヒト正常線維芽細胞や正常上皮細胞の初代培養では、繰り返し継代培養を行う際、酸化ストレスをはじめとするさまざまなストレスが生じており (総称で培養ストレス)、細胞はやがてテロメア長依存的または非依存的に細胞老化に達する (Harley CB *et al.*, 1990; Kiyono T *et al.*, 1998; Herbig, U *et al.*, 2004; Ramirez RD *et al.*, 2011)。3-3 項では、初代培養神経細胞において細胞老化を誘導する培養ストレスについて検討を行った。

3-3-1 AraC 処理が長期培養誘導性の神経細胞老化にもたらす影響の検討

まず、初代培養神経細胞の長期間培養で観察された細胞老化表現型が、神経細胞の高純度培養を目的として培地中に一過的に添加した AraC の影響ではないことを確かめるため以下のような実験を行った。上述 3-1 項にある通り AraC を培養 3 日目から 24 時間処理した場合と、未処理の場合の海馬神経細胞を用意し、培養 7、14、21 日目の各時点においてそれぞれの細胞固定し、その後 SA- β -gal 活性陽性細胞の割合について比較を行った。その結果、培養 14 日目までは、AraC 処理の有無による SA- β -gal 陽性細胞数の差は認められなかった (図 3-6, $n=3$ (biological replicates))。また、培養 21 日目では、AraC 処理の神経細胞でや SA- β -gal 陽性細胞の数が減少していた (図 3-6, $n=3$ (biological replicates))。このことから、神経膠細胞などの分裂細胞が、SASP などを介して長期培養で誘導される神経細胞の細胞老化様現象に部分的に寄与している可能性が考えられた。しかし、本研究ではその内因的な原因解明に焦点を当てるため、神経膠細胞がもたらす影響を検証するための実験は行わないこととした。したがって、これまでに長期培養神経細胞で観察された細胞老化表現型は、AraC 処理以外の培養ストレスによって誘導されることが示唆された。

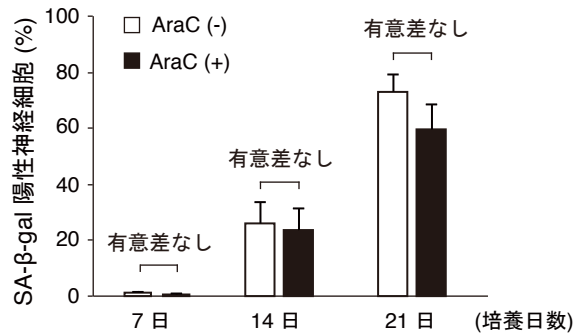


図 3-6. 長期培養で誘導される細胞老化表現型は AraC 処理の有無によらない

培養 3 日目から 24 時間 5 μ M AraC を処理または未処理の海馬神経細胞(それぞれ、黒および白の棒グラフで示す)において、SA- β -gal 陽性神経細胞数の測定を培養 7 日、14 日、ならびに 21 日目に行った。AraC 処理の有無によらず、SA- β -gal 陽性神経細胞は培養経過日数依存的に同程度に観察された。

3-3-2 活性酸素種が長期培養誘導性の神経細胞老化に及ぼす影響の検討

ミトコンドリア機能不全に付随して起こる ROS 産生亢進は、細胞老化および個体老化を引き起こす一因であると考えられている。これまでに、胎児(胎生 18 日)、成体(12 ヶ月齢)または老齢ラット(24 ヶ月齢)から単離直後の海馬神経細胞、または初代培養を行ったラット胎児海馬神経細胞において、時間依存的なミトコンドリア膜電位の減少と ROS 産生量の増加が観察されている(Parihar MS & Brewer GJ, 2007; Dong W *et al.*, 2011)。また、W. Dong らは海馬ラット神経細胞を長期間培養した際(~30 日)、それらミトコンドリア機能不全に特徴的な変化と SA- β -gal 活性陽性細胞の出現に相関があることを報告している(Dong W *et al.*, 2011)。したがって、以下の実験では、海馬神経細胞における長期培養誘導性細胞老化に対して、ミトコンドリア機能不全に伴う ROS 産生が寄与するかについて調べることを目的とした。

本研究ではミトコンドリア膜電位および ROS の検出時には、それぞれ適当な蛍光プローブ(JC-1 または CM-H₂-DCFDA)を用いた。また、JC-1 プローブを用いた膜電位測定時には、膜電位消失の陽性対照実験として、脱共役剤 CCCP を 50 μ M の濃度で 30 分間前処理した海馬神経細胞も用意した。本研究で確立した海馬神経細胞の長期培養系においても、W. Dong らの報告同様に、ミトコンドリア膜電位の消失ならびに ROS 産生量の増加が、培養経過日数依存的に観察された(図 3-7a, b, n=3 (biological replicates))。ヒト線維芽細胞において、抗酸化剤である NAC の処理によって OIS および DNA 損傷誘導性の細胞老化が抑制されることが知られている(Correia-Melo C *et al.*, 2016)。そこで、初代培養海馬神経細胞に NAC 処理を行うことで、ROS 産生が長期培養誘導性細胞老化に果たす役割を調べた。予備的実験では、500 μ M の濃度の NAC を含む培地で培養 7 日目の初代培養海馬神経細胞を 1 時間前処理した場合に、NAC による十分な ROS 抑止効果を発揮した(図 3-8a, n=3

(biological replicates))。したがって、500 μM NAC または陰性対照として PBS を含む培地で、初代培養海馬神経細胞を培養 4 日目から 21 日目まで維持し、その後、SA- β -gal 染色を行った。ここでは、3 または 4 日おきに半分量の培地を同濃度の試薬を含む新鮮な培地に置換した。その結果、持続的な NAC 処理は長期培養で誘導される SA- β -gal 陽性神経細胞の頻度に影響しないことがわかった(図 3-8b, n=3 (biological replicates))。さらに、非致死量の濃度(10 または 20 μM)の過酸化水素水で培養 4 日目の海馬神経細胞を処理した場合においても、少なくとも培養 10 日目(ストレス処理後 6 日目)までは、SA- β -gal 陽性神経細胞の早期出現が認められなかった(図 3-8c, n=3 (biological replicates))。これらの結果は、初代培養海馬神経細胞で観察された長期培養誘導性細胞老化はミトコンドリア機能不全を介した ROS 産生亢進に非依存的事であることを示唆する。

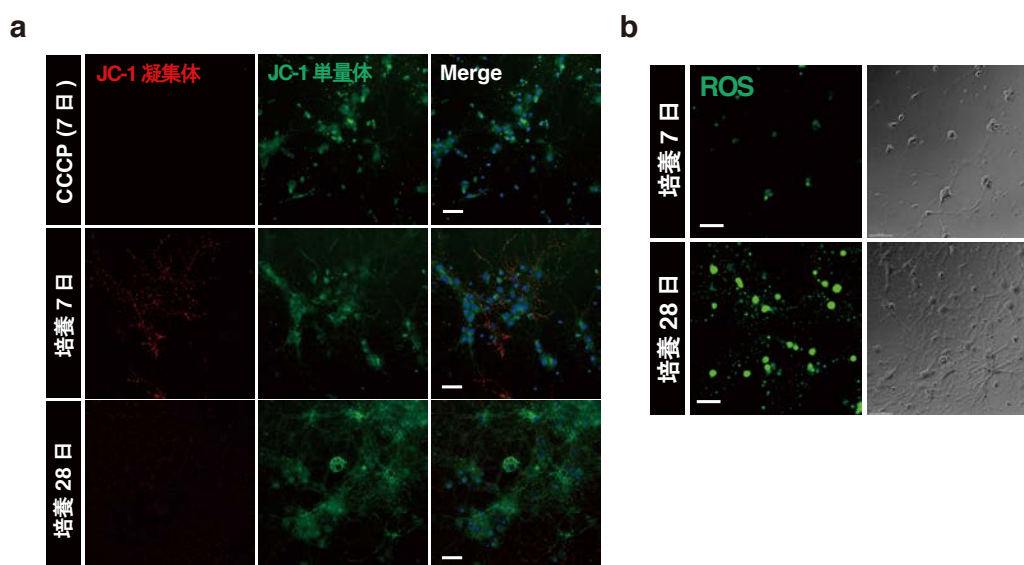


図 3-7. 長期培養ラット海馬神経細胞において、ミトコンドリア膜電位は消失し、ROS 産生が亢進する
a) ミトコンドリア膜電位依存的に凝集体となり赤色蛍光を発する JC-1 プローブを用いてミトコンドリア膜電位の変化(赤/緑)を検討した。また、陰性対照実験として、培養 7 日時点にて脱共役剤 CCCP を 50 μM の濃度で 30 分処理した海馬神経細胞を用意した。核は Hoechst 33342 により標識を行った。初代培養神経細胞は、時間依存的なミトコンドリア膜電位の低下または消失を示す。スケールバー=90 μm 。
b) 培養 7 日または 28 日目の初代培養海馬神経細胞に対し、ROS プローブ CM-H₂-DCFDA を処理した後(1 μM 、30 分間)、ROS(緑)の蛍光像および同位置における透過光像を得た。長期培養神経細胞は、培養 7 日目のそれと比較して、高い ROS レベルを示した。スケールバー=90 μm 。

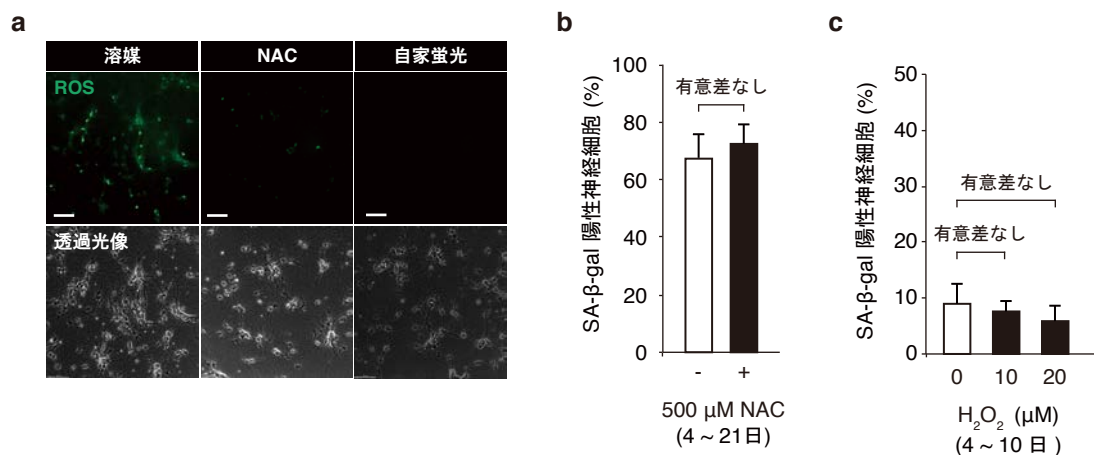


図 3-8. ROS 産生量は SA-β-gal 陽性神経細胞の出現頻度に影響を与えない

a) 培養 7 日目の海馬神経細胞において、500 μM NAC の 1 時間前処理することで ROS 産生量が顕著に減少した。1 μM CM-H2-DCFDA 存在下で細胞を 40 分間培養した後の代表的な蛍光画像 (ROS、緑) および透過光像を示す。スケールバー 90 μm

b) 培養 4 日目から 21 日まで、持続的に 500 μM NAC の存在下 (+) または非存在下 (-) で培養を行った海馬神経細胞において、SA-β-gal 陽性神経細胞数を計測した。NAC 処理 (+) と対照群 (-) 共に長期培養により誘導される SA-β-gal 陽性神経細胞の頻度は同程度であった。棒グラフは培養 21 日時点での SA-β-gal 陽性神経細胞の頻度を示し、エラーバーは 3 回の独立した実験の標準偏差を示す ($n \geq 200$ 神経細胞/ 実験)。

c) 10 または 20 μM 過酸化水素 (H_2O_2) 処理後 6 日 (培養 10 日目) における SA-β-gal 陽性神経細胞の頻度をグラフに示した。 H_2O_2 は SA-β-gal 陽性神経細胞を早期に誘導しなかった。エラーバーは 3 回の独立した実験の標準偏差を示す ($n \geq 200$ 神経細胞/ 実験)。(b) では両側独立 t 検定、(c) では両側一元配置分散分析をそれぞれ統計検定に用いた。

3-3-3 持続的 DDR 活性化が長期培養誘導性の神経細胞老化に与える影響の検討

放射線照射、ある種の抗がん剤処理、または活性化がん遺伝子 Ras の恒常的発現による複製フォークストレスは、全てヒト線維芽細胞において細胞老化を誘導する (Di Micco R *et al.*, 2006; Fumagalli M *et al.*, 2012; Hewitt G M *et al.*, 2012; Yosef R *et al.*, 2017)。それら細胞老化誘導ストレスの実体は DNA 損傷であり、それはとりわけ、生じた DNA 損傷の度合いが DNA 修復能を上回ることで生じる修復困難な DNA 損傷を指す。また、その下流で恒常的に活性化される DNA 損傷応答が細胞老化誘導に重要であることがわかっている。さらに近年、DNA 損傷が心筋細胞、骨細胞、大脳皮質神経細胞といった終末分化細胞で細胞老化様の現象を引き起こすことが示唆された (Farr JN *et al.*, 2016; Anderson R *et al.*, 2019)。そこで、ここでは、細胞種間で通底する細胞老化誘導ストレスとして理解される修復困難 DNA 傷害が神経細胞老化の原因である可能性について検討を行った。

まず、初代培養海馬神経細胞において、培養経過日数に伴う DNA 損傷頻度の変化を調べる目的で、神経細胞マーカー NeuN および DSB マーカーであるリン酸化 H2AX(以下、 γ H2AX)を蛍光免疫染色法で検出した。DSB 検出の陽性対照として、培養7日目の海馬神経細胞に 5 μ g/ml の濃度でブレオマイシン処理を 6 時間行なった(図 3-9a、n=3 (biological replicates))。この時、 γ H2AX フォーカスはほぼ全ての神経細胞(NeuN 陽性)の核内で観察された(99.5 \pm 0.9%, 図 3-9a)。培養7日目(ブレオマイシン未処理)および28日目について、二つ以上の γ H2AX フォーカスを核内に有する神経細胞の割合を測定した結果、それぞれ 17.3 \pm 6.9%と 21.2 \pm 6.2%であり、培養日数の経過に伴う DSB の蓄積は観察されなかった(図 3-9a、n=3 (biological replicates))。次に、DNA 損傷が初代培養神経細胞で細胞老化誘導ストレスとなり得るかについて検討するため、培養4日目から6日間(培養10日目まで)5 μ g/ml の濃度のブレオマイシンで人為的に DSB を生じさせ、その後 SA- β -gal 染色を行った。しかし、予想に反して、ブレオマイシン処理は SA- β -gal 陽性海馬神経細胞を早期に誘導することができなかった(図 3-9b)。そこで、ヒトテロメラーゼ触媒サブユニットである TERT の過剰発現により不死化させた正常ヒト線維芽細胞(WI38/hTERT)を用いて、同様のブレオマイシン処理を短期間(5 μ g/ml, 2日間)行った(図 3-10a)。ブレオマイシン処理を施した WI38/hTERT では、薬剤処理後5日目時点において、SA- β -gal 活性の亢進、lamin B1 蛋白質の減少、Rb 蛋白質リン酸化レベルの低下、ならびに p21 蛋白質の蓄積といった細胞老化表現型が確認された(図 3-10a-c、n=2 or 3 (biological replicates))。以上の結果より、DNA 損傷は終末分化した神経細胞において細胞老化表現型を誘導する主要なストレスではないと考えられた。

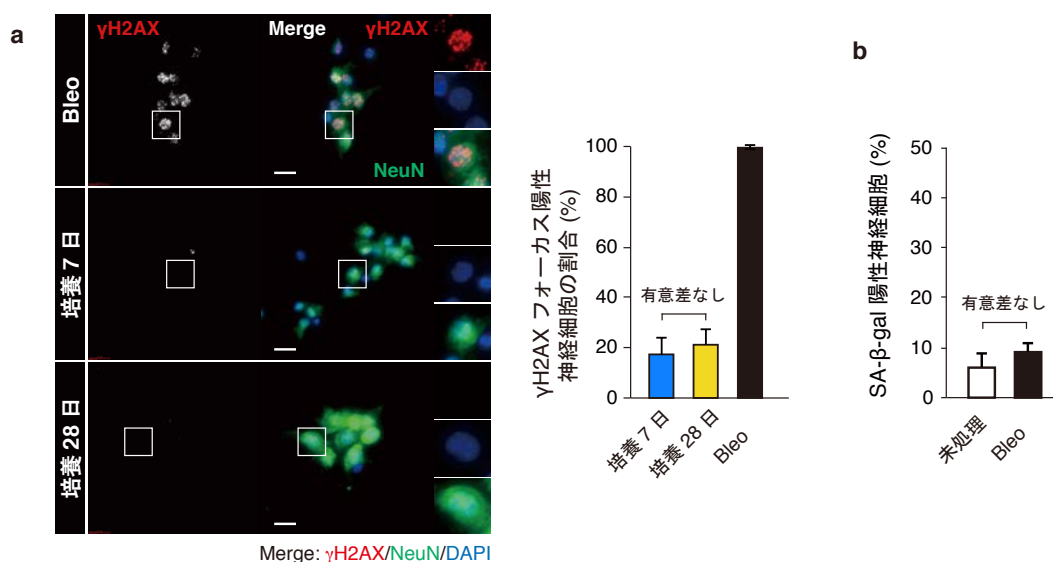


図 3-9. 長期培養ラット海馬神経細胞において DSB の蓄積は認められない

(図 3-9)

a) 7 日および 28 日間培養したラット海馬神経細胞における、 γ H2AX(左図, 赤)と NeuN(左図 Merge, 緑)それぞれに対する特異的抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。核は DAPI 染色により検出した(左図 Merge、青)。陽性対照として、5 μ g/mL ブレオマイシン(Bleo)を 6 時間処理した培養 7 日目の海馬神経細胞を用いた。顕微鏡画像の右に γ H2AX フォーカスを 2 つ以上有する神経細胞(NeuN 陽性細胞)の割合を右側に棒グラフで示した($n \geq 57$ 神経細胞/ 実験)。初代培養海馬神経細胞において、培養日数の経過に伴う DSB の蓄積は認められなかった。エラーバーは独立した 3 回の実験の標準誤差を示す。スケールバー 20 μ m。

b) 培養 4 日目から 5 μ g/mL Bleo を含む培地で海馬神経細胞の培養を行い、培養 10 日の時点における SA- β -gal 陽性細胞数を評価した。培地交換のみのストレス未処理の細胞を対照細胞として用意した。Bleo 処理による DNA 損傷誘導は SA- β -gal 陽性細胞の出現頻度に影響しなかった。エラーバーは独立した 3 回の実験の標準偏差を示す。(a) および(b)、いずれも両側独立 t 検定を統計検定に用いた。

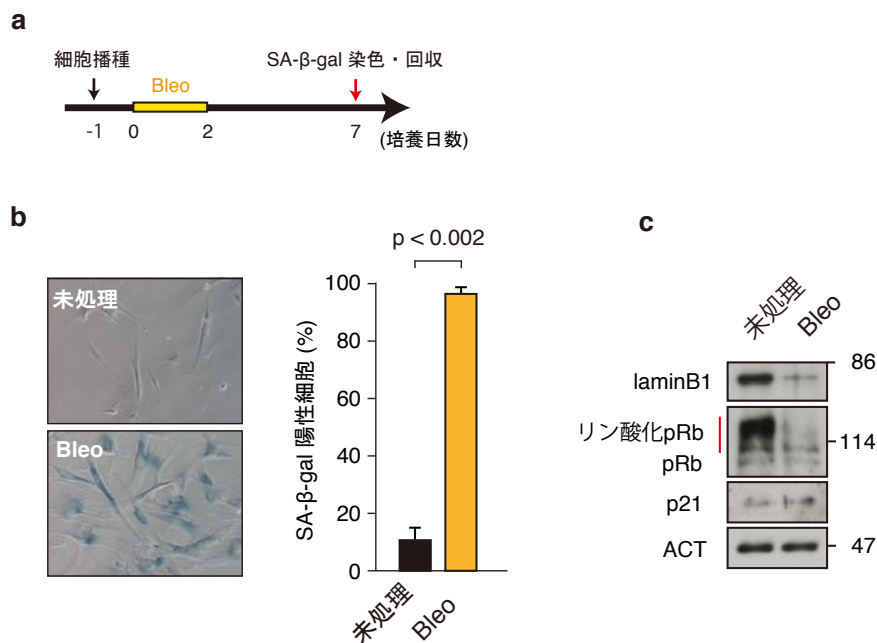


図 3-10. ブレオマイシンは不死化正常ヒト線維芽細胞において早期老化を誘導する

a) WI-38/hTERT 細胞にブレオマイシン(Bleo) (5 μ g/mL、48 時間)で処理して細胞老化を誘導した。対照細胞として Bleo 未処理の細胞を用意し、同様の実験操作を行った。また、対照細胞がサブコンフルエントに達した際には、Bleo 処理の細胞とともに継代培養を行った。ストレス処理 5 日後(7 日)に SA- β -gal 染色および全細胞抽出液を調製した。

b) 棒グラフは Bleo を培養液から除いて 5 日後の SA- β -gal 陽性細胞の割合を示す($n \geq 216$ 細胞/ 実験)。Bleo で処理した細胞は概ね SA- β -gal 陽性を示した。エラーバーは 3 回の独立した実験の標準偏差を示す。統計処理には両側独立 t 検定を用いた。

(図 3-10 続き)

c) ウエスタンブロッティングにより、Bleo 処理を行った WI-38/hTERT 細胞では、未処理の細胞と比較して、lamin B1 の減少、リン酸化 pRb の減少、および p21 の蓄積などの特徴的な細胞老化表現型が確認された。

しかし、近年、そのような無秩序な DNA 損傷ではなく、テロメア領域における修復困難な DNA 損傷 (telomere dysfunction-induced focus; TIF または telomere-associated focus; TAF)(Takai H *et al.*, 2003; Hewitt G *et al.*, 2012)が、終末分化細胞の細胞老化誘導に寄与している可能性が報告された(Farr JN *et al.*, 2016; Anderson R *et al.*, 2016)。そこで、修復困難な DNA 損傷と修復可能なそれらとを区別するため、抗 γ H2AX 抗体を用いた従来の免疫染色に引き続きテロメア fluorescent in situ hybridization(FISH)法を行うことで、TIF の検出を試みた。まず、培養 14 日目と培養 28 日目の海馬神経細胞でそれらの核に存在する γ H2AX フォーカスの数を計測したところ、それぞれ細胞あたり平均 2 個または 0 個であった(図 3-11a, b, n=1 (biological replicates))。これは培養日数の経過による DSB の蓄積は起こっていないことを示唆し、図 3-9a で得た結果と一貫していた。次に、テロメアシグナルと共局在を示す γ H2AX フォーカス (すなわち TIF) を有する細胞の頻度を検討したところ、培養 14 日目では 15.8%、また培養 28 日では 23.1%であった(図 3-11a, c, n=1 (biological replicates))。またそれら TIF 陽性神経細胞のうち、培養 14 日と 28 日の各細胞あたりの TIF の数はそれぞれ 2.2 個と 1.83 個であり、長期培養細胞で TIF の蓄積は観察されなかった(図 3-11a,d, n=1 (biological replicates))。同様の実験をさらに複数回行って再現性を確認する必要があるが、得られた結果から、長期培養誘導性の神経細胞老化は主として TIF の蓄積によるものではなく、他の何らかのストレスに起因している可能性が高いと考えられた。

図 3-11. 初代培養海馬神経細胞は低頻度に TIF 陽性を示す (次ページ)

a) 培養 14 日と培養 28 日目の海馬神経細胞において、 γ H2AX(緑)と NeuN(紫)に対する蛍光免疫染色とテロメア FISH(Telo、白)を同時に行い、それら細胞での TIF の発生頻度を評価した。TIF はテロメア FISH シグナルと共局在を示す γ H2AX フォーカスとして定義した (拡大図中の矢頭)。実験は一回のみ行った。スケールバー、15 μ m。

b)-d) (a) で得られた顕微鏡画像から、各図の縦軸に示す要素について定量解析を行った(14 日、n=57 神経細胞; 28 日、n=52 神経細胞)。図 3-9(a)、(b) で示した結果と一致して、長期培養による DSB の増加は認めなかった。長期培養神経細胞であっても、TIF 陽性細胞の頻度は 20%程度と低く、SA- β -gal 陽性細胞のそれと比較して、大きく乖離していた。TIF 陽性細胞あたりの TIF の平均数は、培養 14 日と 28 日、それぞれ 2.2 個と 1.83 個であった。ドットプロット(b)、(d)の水平線は中央値を示す。

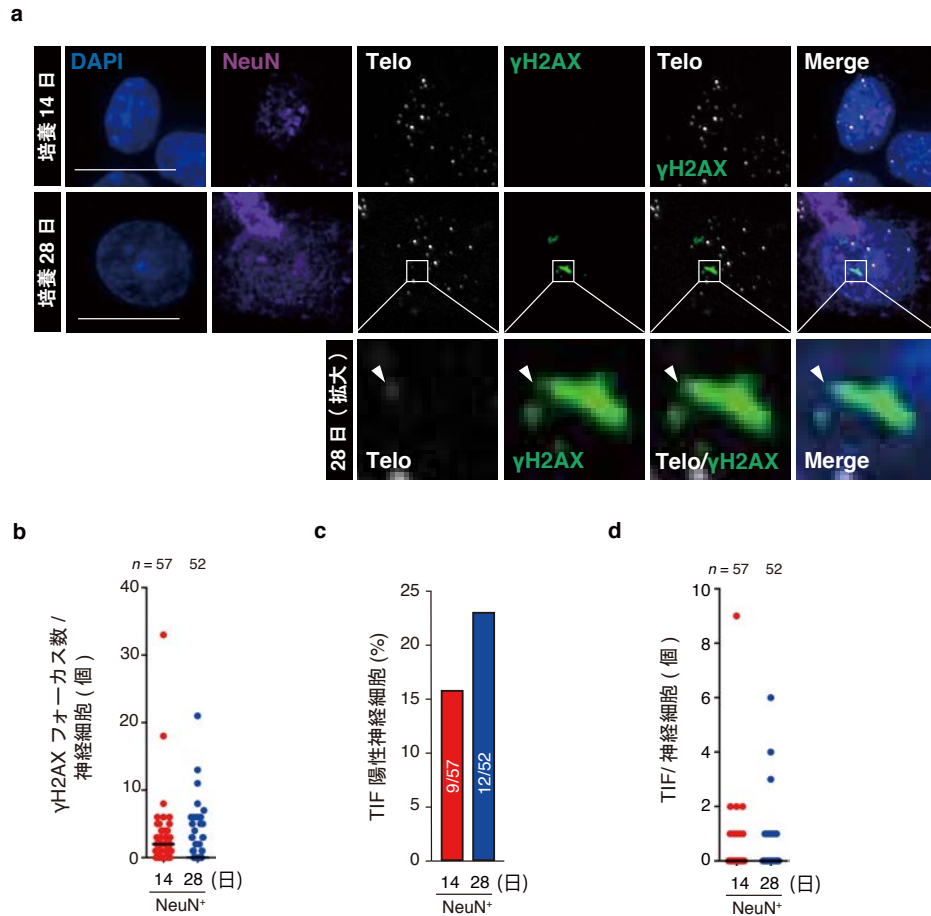


図 3-11. 初代培養海馬神経細胞は低頻度に TIF 陽性を示す

3-3-4 初代培養神経細胞における蛋白質恒常性の経日的観察

機能的なプロテオームを保持することは細胞機能に不可欠であり、その均衡性(または蛋白質恒常性)は蛋白質の合成、高次構造形成、分解といった全代謝段階で厳密に制御される (Hipp MS *et al.*, 2019)。加齢による蛋白質恒常性の破綻は、アミロイド沈着をはじめとする種々の病原性蛋白質の凝集体の蓄積を招き、生理的または病的な脳老化をきたすことが知られている (Vilchez D *et al.*, 2014; Baker JE *et al.*, 2016; Donohue MC *et al.*, 2017)。成熟した神経細胞は、細胞分裂を行って異常蛋白質を娘細胞に分配することができないため、蛋白質毒性ストレスに脆弱であるとされる (Hipp MS *et al.*, 2019)。このような背景から、以下では、蛋白質恒常性の破綻が神経細胞老化に寄与する可能性について検証するための実験を行った。

これまでに、本研究同様に初代培養ラット海馬神経細胞を長期間培養した際(~ 66 日)、培養上清中の分泌型 A β ₄₂ ペプチドが増加することが報告されている (Bertrand SJ *et al.*, 2011)。

そこで、初代培養海馬神経細胞の長期培養時における細胞内外 $A\beta_{42}$ の動態を調べた。まず、ELISA 法を用いて培養液中に分泌された $A\beta_{42}$ を経日的に測定したところ、過去の知見と一致して、細胞外 $A\beta_{42}$ は培養 21 日目まで時間依存的に増加したが、21 日目を以降ではその濃度は部分的に低下していた(図 3-12a, n=4 (biological replicates))。次に培養 7 日目と 28 日目の海馬神経細胞を $A\beta_{42}$ に対する特異的抗体を用いて蛍光免疫染色を行ったところ、培養 7 日目と比較して、培養 28 日目では細胞体内の $A\beta_{42}$ の増加が観察された(図 3-12b, n=4 (biological replicates))。さらに、それら細胞から調製した全細胞抽出液を用いたウエスタンブロッティングでも同様の時間依存的な細胞内 $A\beta_{42}$ の蓄積を示す結果を得た(図 3-12c, n=3 (biological replicates))。観察された泳動度の異なるバンドは、 $A\beta_{42}$ (4kDa) が重合して形成される多量体 (オリゴマー) に相当すると考えられ、培養 28 日目では、培養 7 日目と比べて、分子量 28 kDa 以上のオリゴマーがより多く蓄積していた(図 3-12c, n=3 (biological replicates))。これは培養日数経過に伴って細胞内 $A\beta_{42}$ が凝集している可能性を示唆する。そこで、培養 4 日目から培養 45 日目までの海馬神経細胞に対して、 β シート構造に富むアミロイド様凝集体の検出に汎用される化合物である Thioflavin-S(Thio-S)を用いた細胞染色を行った。その結果、培養日数依存的な Thio-S シグナルの増強が認められた(図 3-12d, n=3 (biological replicates))。以上より、初代培養神経細胞において、 $A\beta_{42}$ およびアミロイド様凝集体が培養日数の経過に伴って蓄積することが明らかになった。アミロイド様凝集体は、その構成因子として $A\beta_{42}$ のほか、ポリユビキチン鎖がしばしば付加された折りたたみ異常蛋白質を含んでおり、界面活性剤に不溶であることが知られている (Lim J & Yue Z, 2015)。そこで、ユビキチン化された異常蛋白質の蓄積を検証するため、まず抗ユビキチン鎖モノクローナル抗体 (FK2 クローン)を用いて蛍光免疫染色により評価を行った。培養 7 日目と比べ、培養 28 日目の海馬神経細胞でユビキチン化蛋白質の蓄積が認められ、また、それらは時折液胞中 (NeuN のシグナルが希薄である領域内) のフォーカスとして観察された(図 3-13a, n=6 (biological replicates))。さらに全細胞抽出液を用いたウエスタンブロッティングによっても、ユビキチン化蛋白質が培養日数依存的に増加していることを確認した (図 3-13b, n=3 (biological replicates))。次に、培養 7、14、21、および 28 日目の海馬神経細胞から調製した Triton-X 不溶性画分において、ユビキチン化(または、ポリユビキチン化)された蛋白質および不溶性全蛋白質量を調べた。その結果、ユビキチン化(ポリユビキチン化)蛋白質と不溶性全蛋白質いずれも培養日数依存的な増加が認められた(図 3-13c, d, n=6 or 2 (biological replicates))。以上の結果は、海馬神経細胞の長期間培養で、ヒト脳に特徴的な加齢性変化である蛋白質恒常性の破綻が生じることを強く示唆している。

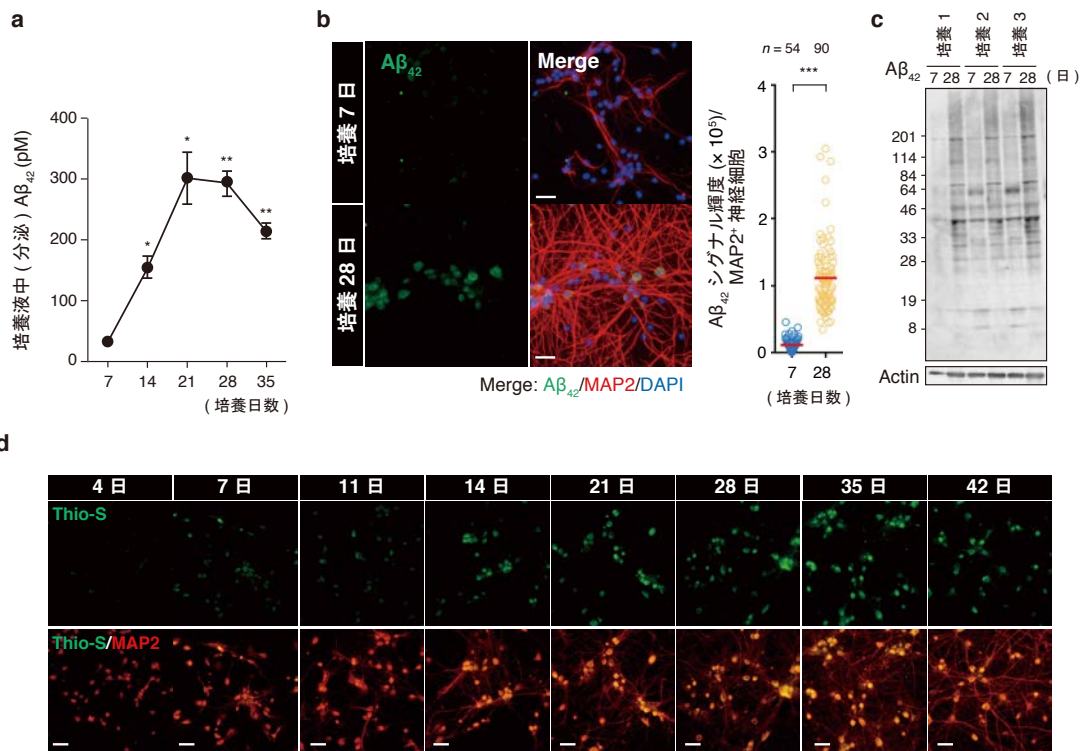


図 3-12. 初代培養海馬神経細胞では時間依存的に AD 関連蛋白質毒性が増加する

a) ELISA 法で初代培養海馬神経細胞の培養液中に含まれる分泌型 Aβ₄₂ 量の経日変化を評価した。分泌型 Aβ₄₂ は培養 21 日まで時間依存的に顕著に増加し、その後は増加を示さなかった。測定した培養液中 Aβ₄₂ の濃度は独立した 4 回実験の平均値と標準偏差でグラフに示した。

b) 7 日および 28 日間培養したラット海馬神経細胞における Aβ₄₂ の量について、Aβ₄₂ (緑) と MAP2 (Merge、赤) それぞれに対する特異的抗体を用いた蛍光免疫染色により検討した。核は DAPI 染色により検出した (左図 Merge、青)。右図は代表的な実験の MAP2 陽性神経細胞における Aβ₄₂ シグナルの輝度およびその中央値を示す。初代培養海馬神経細胞では、培養日数の経過に伴い細胞内 Aβ₄₂ 増加していた。スケールバー、40 μm。

c) 独立した 3 つの初代培養系より、培養 7 日目と 28 日目の時点で、調製した海馬神経細胞の全細胞抽出液を調整し、抗 Aβ₄₂ 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。初代培養海馬神経細胞における時間依存的な Aβ₄₂ の蓄積が再現性良く観察され、(b) の結果を支持した。

d) アミロイド凝集体に高い結合親和性を有するチオフラビン S (Thio-S) を用いて、海馬神経細胞の長期培養では、アミロイド凝集体が経日的に蓄積することを観察した。神経細胞は (a) 同様に MAP2 (赤) に対する蛍光免疫染色により検出した。スケールバー、40 μm。

(a) では両側一元配置分散分析、(b) ではマン・ホイットニー U 検定をそれぞれ統計検定に用いた (**p* < 0.03; ***p* < 0.006; ****p* < 0.0001)。

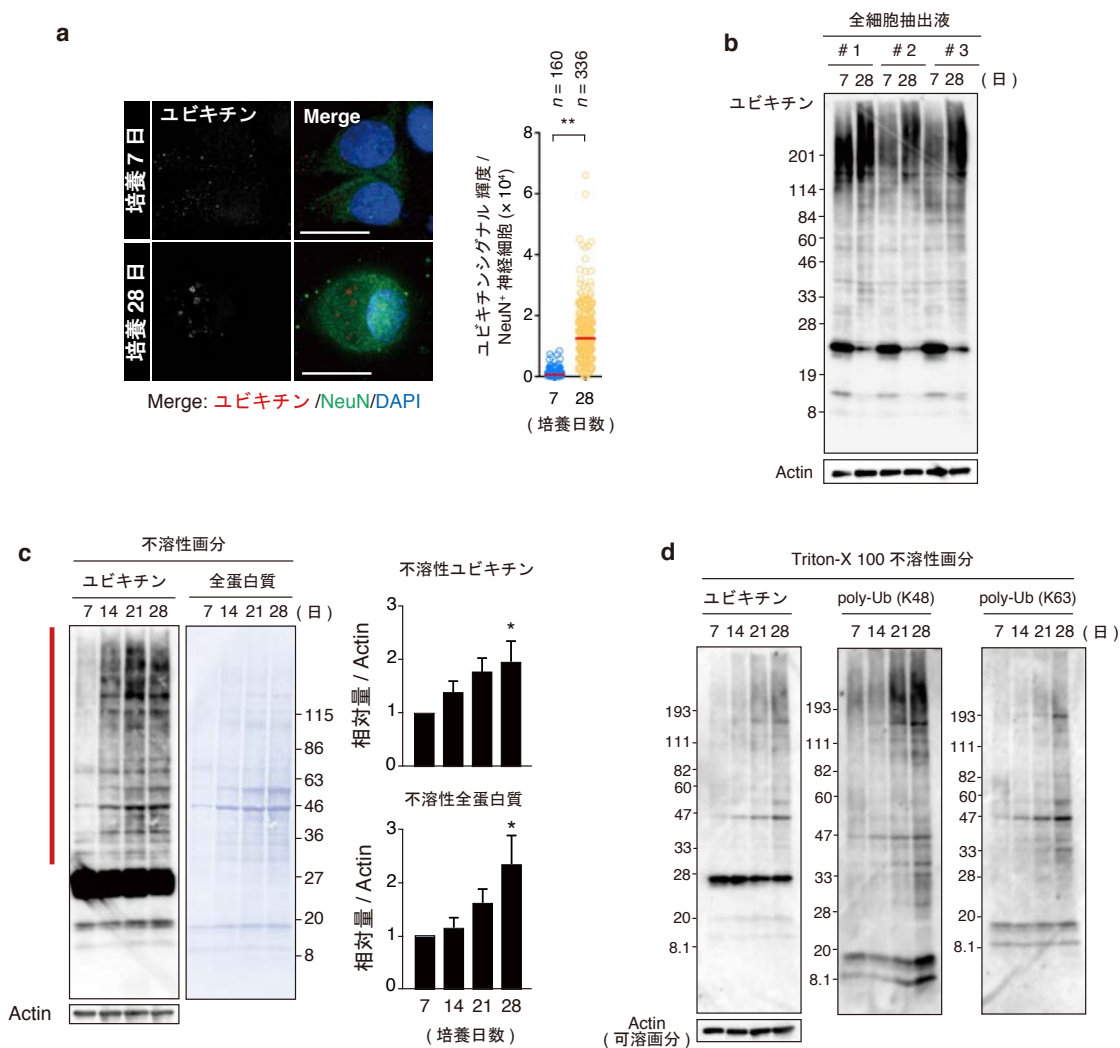


図 3-13. 初代培養海馬神経細胞では時間依存的に蛋白質恒常性が失われる

a), b) 7 日および 28 日間培養した海馬神経細胞において、抗ユビキチン化蛋白質抗体を用いて蛍光免疫染色 (a)、またはウエスタンブロッティング (b) を行った。免疫染色では、抗 NeuN 抗体で同時に染色し、神経細胞を標識した。顕微鏡像右に NeuN 陽性神経細胞あたりのユビキチンシグナル (任意単位) をそれらの中央値と共にプロットした。長期培養によって初代培養海馬神経細胞内でユビキチン化蛋白質が蓄積していた。スケールバー、15 μ m。(b) では独立した 3 つの初代培養系から調製した全蛋白質抽出液をサンプルとして用いた。Actin は内部標準として示した。

c) 培養 7、14、21 および 28 日各時点で細胞を回収して、Triton X による細胞抽出液の分画を行い、不溶性蛋白質量をウエスタンブロッティングにより調べた。右グラフでは、不溶性ユビキチン化蛋白質 (上) および不溶性全蛋白質 (下) それぞれの量について、可溶性画分の Actin 量で標準化した定量結果を示す。なお、定量は結果図中の赤線部領域に対応する分子サイズにあるそれぞれの蛋白質量に対して行った。エラーバーは 5 回または 6 回の独立した実験の標準偏差を示す。長期培養神経細胞では不溶性 (ユビキチン化) 蛋白質が増加した。

(図 3-13(c) 続き)

d) 上述の(c)と同様に、ウエスタンブロッティングにより不溶性ポリユビキチン化蛋白質の検出を行った。長期培養神経細胞では不溶性の K48 鎖型および K63 鎖型ユビキチン化蛋白質のどちらも経過培養日数に依存して蓄積していた。可溶性画分の Actin は蛋白質量が一定であることのコントロールとして示した。

(a) ではマン・ホイットニー-U 検定、(c) では両側一元配置分散分析をそれぞれ統計検定に用いた(* $p < 0.035$; ** $p < 0.0001$)。

加齢脳における蛋白質恒常性の崩壊は、細胞内の主要な蛋白質品質管理機構であるユビキチン・プロテアソーム経路およびオートファジーの機能低下によって引き起こされると考えられている(Cuervo AM, 2008; Yang F *et al.*, 2014; Vilchez D *et al.*, 2014; Lim J & Yie Z, 2015)。本研究でもその可能性を検討するため、まず、ポリユビキチン化蛋白質のユビキチン鎖を認識し、選択的オートファジーを介した標的基質の分解を促す p62(または、Sequestosome 1; SQSTM1)(Itakura E & Mizushima N *et al.*, 2011) について、その蛋白質量を蛍光免疫染色法により調べた。その結果、培養 28 日目の長期培養海馬神経細胞では、培養 7 日目の細胞と比較して、p62 の顕著な増加が確認された(図 3-14a, $n=3$ (biological replicates))。この結果は、標的となる(ポリ)ユビキチン化蛋白質の蓄積を示した上述の実験結果と一致する(図 3-13a-d)。続いて、観察された p62 蛋白質の蓄積が、オートファジー活性を促進するために積極的に誘導された結果であるのか、あるいは長期培養条件下でオートファジー活性が低下した結果であるのかを明らかにする目的で、オートファジーフラックス解析を行った(Mizushima N *et al.*, 2010; Garcia-Part L *et al.*, 2016)。ここでは、培養 7、14、21、および 28 日目の海馬神経細胞を、リソソーム H^+ -ATP アーゼ阻害剤 bafilomycin A1(BafA)を含む培地で 4 時間培養することでオートファジー後期進行を抑制した後、BafA 処理の有無での p62 蛋白質量の変化率(すなわち $\Delta p62$)を測定した(図 3-14b)。培養 7 日と 14 日目では、BafA 処理により 2.5 倍程度の p62 蛋白質の増加が認められた(図 3-14c, d, $n=3$ or 4 (biological replicates))。しかし、培養 21 日目の神経細胞では、BafA 処理による p62 誘導効率は 2 倍程度とやや減弱しており、さらに培養 28 日目では BafA 誘導性 p62 は確認できなかった(図 3-14c, d, $n=3$ or 4 (biological replicates))。この結果は、培養 14 日目以降の初代培養海馬神経細胞において、オートファジー活性が時間依存的に低下していることを示唆している。

これまでに試験管内反応、細胞株、アルツハイマー病モデルマウス脳において、 $A\beta_{42}$ オリゴマーがプロテアソーム活性を阻害することが報告されており(Tseng BM *et al.*, 2008)、本研究の長期培養神経細胞においてもプロテアソーム経路の機能不全が予想された。そこで、培養 7、14 および 21 日目の細胞で 20S と 26S プロテアソーム活性を調べるため、それら消化活性のうち、特にケモトリプシン様活性によって切断される蛍光基質 SUC-LLVY-AMC を利用した。基質を培地に添加して 24 時間後に、その分解産物である AMC の蛍光(吸収 360 nm/

蛍光 460 nm)を測定した結果、培養 14 日と 21 日目の神経細胞では、培養 7 日目と比較して、プロテアソーム活性が高いことが明らかとなった(図 3-15、n=4 (biological replicates))。したがって、これまでに観察した長期培養海馬神経細胞における蛋白質恒常性破綻は、ユビキチン・プロテアソーム経路ではなく、オートファジー経路の経日的な活性減衰に起因している可能性が示唆された。

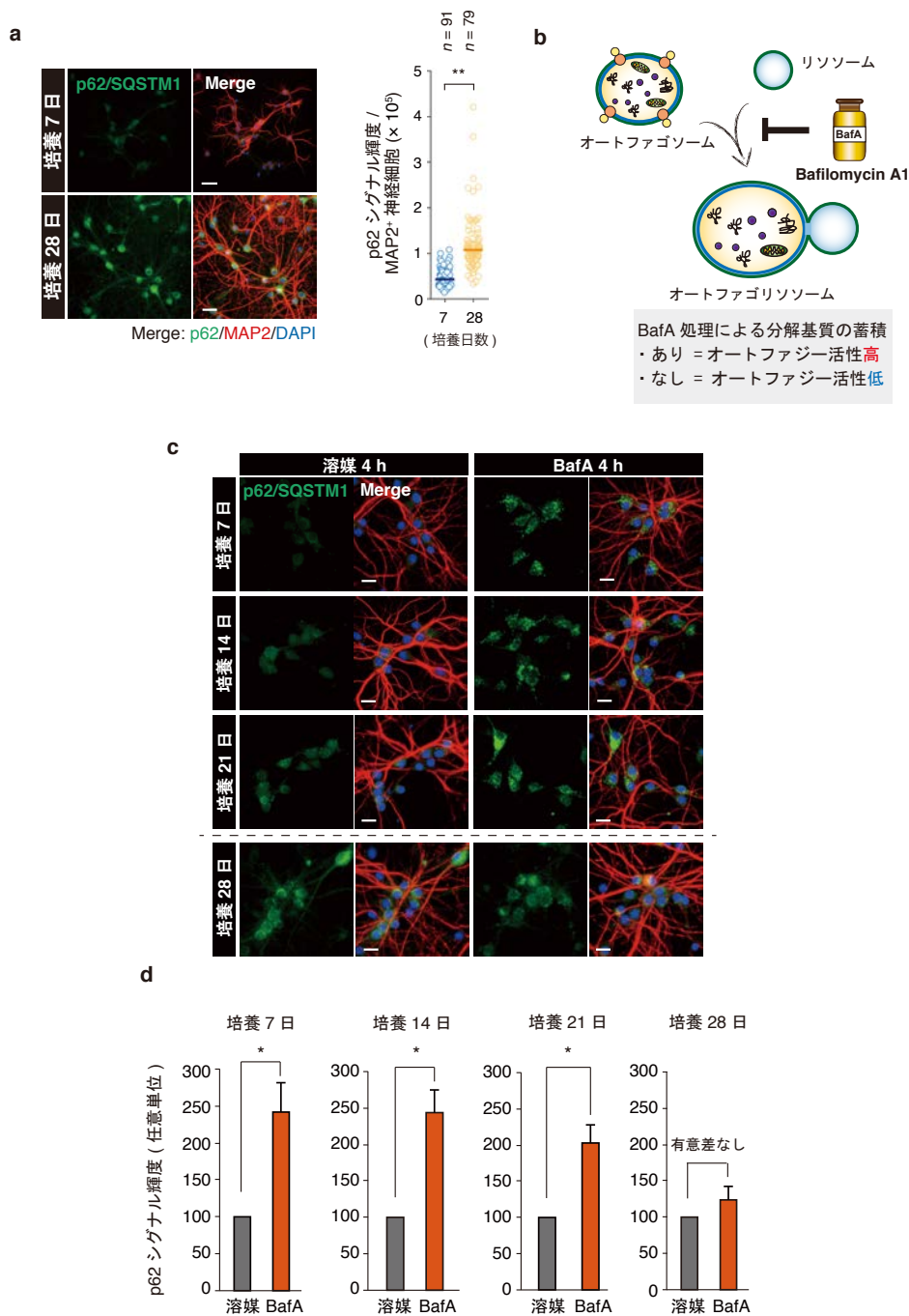


図 3-14. 初代培養海馬神経細胞の長期培養時、オートファジー活性が減弱する

(図 3-14)

- a) 培養 7 日または 28 日目の海馬神経細胞を、抗 p62/SQSTM1 抗体 (緑) と抗 MAP2 抗体 (赤) で染色した。DAPI 染色像は核を示す (Merge、青)。右図は代表的な実験の MAP2 陽性神経細胞における p62 シグナルの輝度およびその中央値を示す。培養 7 日目と比較して、培養 28 日目では p62 蛋白質量が顕著に増加していた。スケールバー、40 μm 。
- b) オートファジーフラックス解析の概説。
- c) 培養 7、14、21、28 日目の海馬神経細胞を溶媒または 10 nM bafilomycin A1 (BafA) を含む培地で 4 時間培養した後、細胞を固定して、(a) で示した方法で各条件での神経細胞あたりの p62 蛋白質量を評価した。BafA 処理により生ずる p62 フォーカスは培養日数が短いほど多く、培養日数の経過と共に減少した。スケールバー、20 μm 。
- d) (c) の実験で得た顕微鏡画像において、神経細胞あたりの p62 シグナル輝度を定量し、溶媒処理細胞と BafA 処理細胞のそれぞれにおけるシグナル輝度の相対値の平均を標準偏差と共に示した。独立した実験を 3 回または 4 回行い、各実験では 55 ~ 148 神経細胞を解析の対象とした。
- (a) ではマン・ホイットニー U 検定、(d) では両側独立 t 検定をそれぞれ統計検定に用いた ($*p < 0.05$; $**p < 0.0001$)。

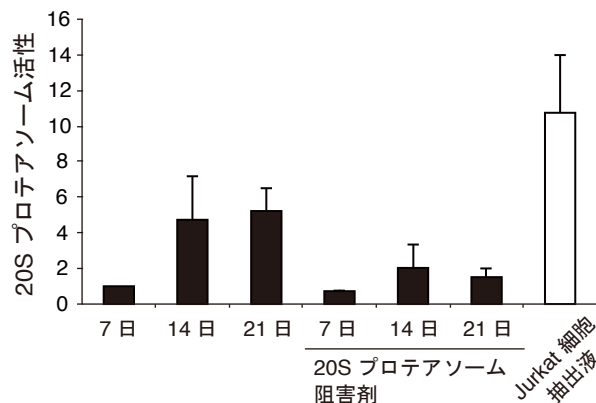


図 3-15. 初代培養海馬神経細胞で 20S プロテアソーム活性は時間依存的に亢進する

培養 7 日目、14 日目、21 日目の海馬神経細胞を 20S プロテアソームの認識配列を含む SUC-LLVY-AMC ペプチドで 24 時間処理した。その後、切断により生じた蛍光発光性 AMC が発する蛍光の強度を 20S プロテアソーム活性としてマルチプレートリーダーを用いて測定を行った。培養 7 日目の活性を 1 とした時の相対値を標準偏差と共にグラフに示した ($n = 4$)。また陽性対照実験として、Jurkat 細胞の細胞抽出液、また陰性対照実験として、没食子酸エピガロカテキン (20S プロテアソーム阻害剤) の存在下で基質を反応させる実験を同時に行った。培養 7 日目と比較して、培養 14 日および 21 日目では 20S プロテアソーム活性が上昇していた。

3-3-5 AD 関連蛋白質毒性が初代培養神経細胞の長期培養誘導性細胞老化に及ぼす影響

マウス海馬神経由来 HT-22 細胞株および AD 病モデルマウス (APP/PS1 トランスジェニックマウス) において、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinepropanesulphonic acid (EPPS) は A β 凝集体またはオリゴマーと直接結合して、モノマーへと転換することで、A β に起因する細胞毒性ならびに認知機能低下を軽減させることが知られている (Kim HY *et al.*, 2015)。そこで、EPPS 処理が 3-3-4 項で観察された培養経過日数とともに崩壊する蛋白質恒常性を改善しうることについて検討した。初代培養神経細胞に 50 mM の濃度で EPPS を培養 4 日目から培養 21 日目まで持続的に処理したところ、EPPS 処理細胞では時間依存的に増加する高分子 A β_{42} の量が顕著に減少した (図 3-16a, n=3 (biological replicates))。さらに、EPPS 処理はそれら神経細胞において、界面活性剤不溶性ユビキチン化蛋白質および不溶性全蛋白質の蓄積を抑制した (図 3-16b, n=7 (biological replicates))。これらの結果から、長期培養海馬神経細胞においても、EPPS 処理が蛋白質恒常性の破綻に対して抑止効果を有することが明らかとなった。興味深いことに、持続的な EPPS 処理は、長期間培養を行った海馬神経細胞で観察される SA- β -gal 活性の上昇、p16 mRNA 発現量の増加、lamin B1 蛋白質の減少を効率よく抑制した (図 3-17a-c, n=3 or 4 (biological replicates))。これらの結果から、培養期間中に日々増大する A β 細胞毒性が初代培養海馬神経細胞における細胞老化を引き起こす原因である可能性が考えられた。

それらの因果関係をさらに詳細に解析するため、EGFP 蛋白質の C 末端側に P2A 配列 (D(V/I)EXNPGP:ピコルナウイルスに由来する配列で、細胞内で G (グリシン) と P (プロリン) の間で切断される) を隔てて野生型ヒト APP (hAPP)、または家族性 AD 関連遺伝子変異を有するその変異体 (hAPP Swedish/Indiana 変異; hAPP Swe/Ind) (図 1-2b) 発現するコンストラクトを作製した。初代培養海馬神経細胞にそれらをレンチウイルス感染により導入し、目的蛋白質を安定的に過剰発現させ、細胞培養 7 日目以降、各種細胞を溶媒または 50 mM EPPS を含む培地で培養を行った (図 3-18a)。陰性対照として、ウイルス感染を行っていない細胞と EGFP のみ過剰発現させた細胞でも同様の実験操作を行った。培養 14 日目に SA- β -gal 染色を行ったところ、溶媒処理条件下では、変異型 hAPP 過剰発現細胞でのみ SA- β -gal 陽性神経細胞の出現頻度に上昇を認めた (図 3-18b, n=4 (biological replicates))。重要なことに、EPPS 処理によってそれは消失した (図 3-18b, n=4 (biological replicates))。また、培養 4 日目に組換えヒト A β_{42} を培養液中に添加し、その後細胞を培地交換せずに 7 日間維持した場合においても、溶媒対照と比べて、SA- β -gal 陽性神経細胞数が増加していた (図 3-18c, n=4 (biological replicates))。さらに、A β_{42} に曝した海馬神経細胞では p16 蛋白質量が亢進していることが蛍光免疫染色の結果より明らかになった (図 3-18d, n=2 (biological replicates))。したがって、長期培養で誘起される初代培養神経細胞の細胞老化は、AD 蛋白質毒性ストレスを伴う蛋白質恒常性の破綻によって引き起こされると考えられる。

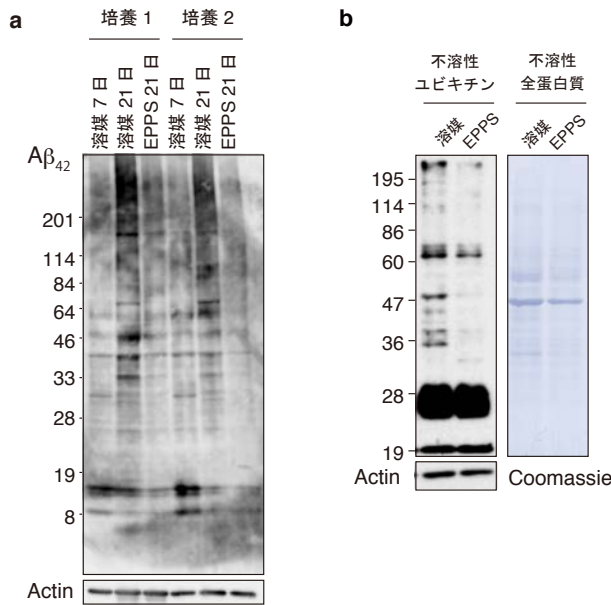


図 3-16. アミロイド結合化合物 EPPS は長期培養神経細胞で蛋白質恒常性を改善する

a) 培養 4 日目以降、溶媒または 50 mM の濃度の EPPS を含む培地で初代培養海馬神経細胞を維持した。培養 21 日目にそれら細胞の全細胞抽出液を調製し、Aβ₄₂ をウエスタンブロッティングにより検出した。試料は 2 回の独立した初代培養系から得た。Actin はサンプル間の蛋白質量が一定であることを示すコントロール。EPPS 処理は培養日数の経過に伴う高分子 Aβ₄₂ (> 33 kDa) の増加を抑制した。

b) 上述 (a) の細胞から Triton X 不溶性画分を調製し、不溶性のユビキチン化蛋白質および全蛋白質量を、それぞれウエスタンブロッティングと Coomassie 染色により調べた。可溶性 Actin は総蛋白質量が一定であることをコントロール。EPPS 処理では不溶性(ユビキチン化)蛋白質が減少した。

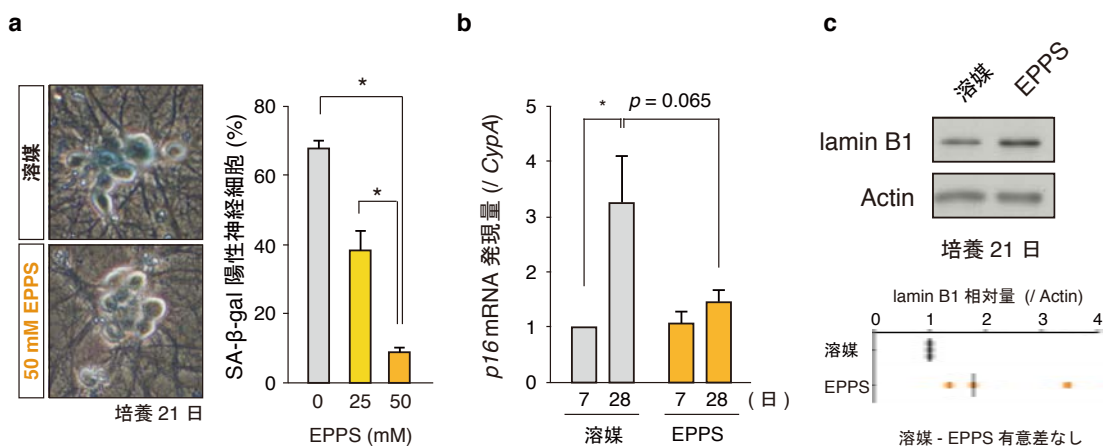


図 3-17. アミロイド結合低分子 EPPS は長期培養が誘導する細胞老化表現型を抑制する

(図 3-17)

- a) 初代培養海馬神経細胞を培養4日から21日目まで持続的に溶媒あるいはEPPS (25 または 50 mM) で処理した。培養21日目にSA-β-gal 染色を行った。エラーバーは3回の独立した実験の標準偏差を示す (n ≥ 200 神経細胞/ 実験)。SA-β-gal 陽性神経細胞数はEPPS 処理濃度依存的に減少した。
- b) 実験(a)に示す条件で、溶媒またはEPPS 存在下で維持した海馬神経細胞において、培養7日目および28日目のp16 mRNA 量を定量RT-PCRにより検出した。結果はCypA mRNA 量で補正した相対値で示した。エラーバーは独立した4回の実験の標準偏差を示す。EPPS 処理によって、長期培養で誘導されるp16 発現上昇は消失した。
- c) EPPS 処理のlamin B1 減少に対する影響を調べるため、溶媒またはEPPS を処理した培養7日目および21日目の細胞を回収し、それらの全細胞抽出液を用いてウエスタンブロッティングを行った。Actin は蛋白質量が一定であることのコントロール。下図には、三回の独立した実験のlaminB1 相対量とその中央値を示す。持続的にEPPS 処理をした長期培養神経細胞ではlamin B1 量が増加傾向にあった。(a) では両側一元配置分散分析、(b) では両側二元配置分散分析、(c) では両側独立 t 検定を統計検定に用いた (*p < 0.04)。

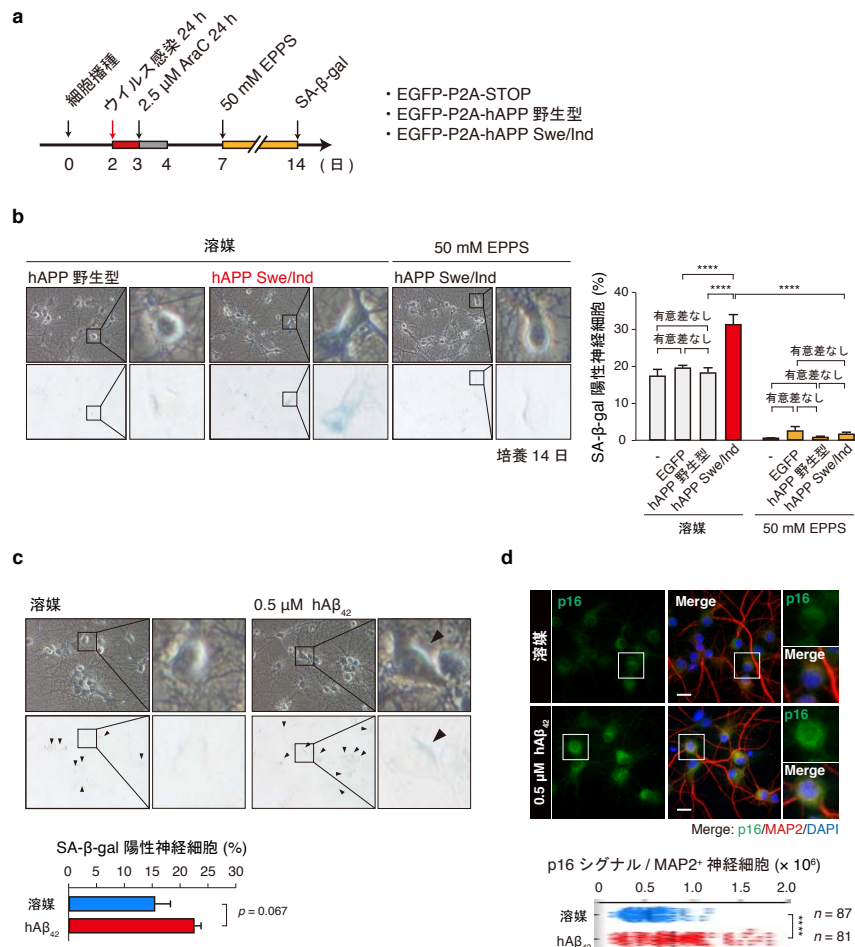


図 3-18. AD 関連蛋白質毒性は初代培養海馬神経細胞で早期老化を引き起こす

(図 3-18)

a) ウイルス感染による異所的 hAPP 遺伝子導入、溶媒または EPPS (50 mM) で処理後の SA- β -gal 染色のタイムテーブルを示した。

b) 培養 14 日目の各細胞について、SA- β -gal 染色を行い、老化神経細胞の出現頻度を検討した。右のグラフは独立した 4 回の実験における SA- β -gal 陽性神経細胞の割合の平均値と標準偏差を示す。変異型 hAPP (Swe/Ind) の安定的過剰発現でのみ、SA- β -gal 陽性細胞数が増加し、それは EPPS 処理で消失した。

c) 培養 7 日目から 14 日目まで溶媒または組換えヒト A β_{42} 蛋白質 (0.5 μ M) を含む培地で海馬神経細胞を培養した後、SA- β -gal 染色を行った。矢頭は SA- β -gal 陽性神経細胞を示す。独立した 4 回の実験における SA- β -gal 陽性神経細胞の割合を平均値と標準偏差で棒グラフに示した。組換えヒト A β_{42} 蛋白質処理は、SA- β -gal 陽性細胞数が増加する傾向が見られた。

(図 3-18 続き)

d) (c)と同じ条件で組換えヒト A β_{42} 蛋白質を処理した培養 14 日目の海馬神経細胞を、抗 p16 抗体(緑)と抗 MAP2 抗体(Merge、赤)で染色した。DAPI 染色像は核を示す(Merge、青)。顕微鏡画像下に、代表的な実験の MAP2 陽性神経細胞あたりの p16 シグナルの輝度およびその中央値をドットプロットで示した。組換えヒト A β_{42} による処理は p16 蛋白質量を増加させた。スケールバー、20 μ m。

(b)では両側二元配置分散分析、(c)では両側独立 t 検定、また(d)ではマン・ホイットニー-U 検定を統計検定に用いた(**** $p < 0.0001$)。

3-4 蛋白質恒常性の改善と長期培養神経細胞における細胞老化表現型

mTOR 経路は、mRNA 翻訳およびオートファジーの制御を介して蛋白質恒常性の維持に寄与しており、酵母からほ乳類に至るまで進化的に保存されている(Laplante M & Sabatini DM, 2012)。mTORC1 阻害剤であるラパマイシンの存在下にあるヒト線維芽細胞は、細胞老化誘導に必要な変異型がん遺伝子 *H-RAS*G12V や DNA 損傷に晒された場合にあって、SA- β -gal 活性および SASP のような細胞老化関連表現型を示さないことが知られている(Kolesnichenko M *et al.*, 2012; Herranz N *et al.*, 2015 ; Laberge RM *et al.*, 2015; Wang R *et al.*, 2017)。ここでは、初代培養海馬神経細胞の長期培養時に、mTOR 経路の抑制が細胞に及ぼす影響について調べた。

3-4-1 mTOR経路阻害が長期培養神経細胞与える効果の検討

mTOR 経路が終末分化した神経細胞の細胞老化に寄与するかを検討するため、ラパマイシン存在下でそれら細胞の培養を行った。培養 4 日目から 10 nM または 100 nM の濃度のラパマイシンで海馬神経細胞を 10 日間処理したところ、mTORC1 の標的蛋白質である 4E-BP1 の 36 番目および 45 番目のスレオニン残基(ヒトにおける 37 番目と 46 番目スレオニン残基に相当)のリン酸化が顕著に減弱したことから、ラパマイシン処理によって mTOR 経路が効率良く阻害されていることが示唆された(図 3-19a, n=2 (biological replicates))。興味深いこと

に、培養日数の経過に伴い増加する SA- β -gal 陽性神経細胞の出現頻度は、培養 14 日、21 日ならびに 28 日目の全時点で、持続的なラパマイシン処理によって顕著に低下した(図 3-19b、n=3 (biological replicates))。さらに、ラパマイシン存在下では、長期培養神経細胞で観察された p16 発現上昇、*Cxcl1* mRNA 発現上昇、lamin B1 蛋白質減少といった古典的細胞老化表現型が抑制されたのみならず(図 3-19c-f、n=3 or 6 (biological replicates))、老化脳で特徴的な核内局在性 REST の蓄積も軽減した(図 3-19g、n=3 (biological replicates))。これらの結果は、海馬神経細胞における長期培養誘導性細胞老化が、mTOR 経路の阻害によって遅延可能であることを示している。以上から、報告されているさまざまな実験モデル生物における個体の寿命延長効果と一致して(Johnson SC *et al.*, 2013)、ラパマイシンの抗細胞老化作用が終末分化した神経細胞においても強く示唆された。

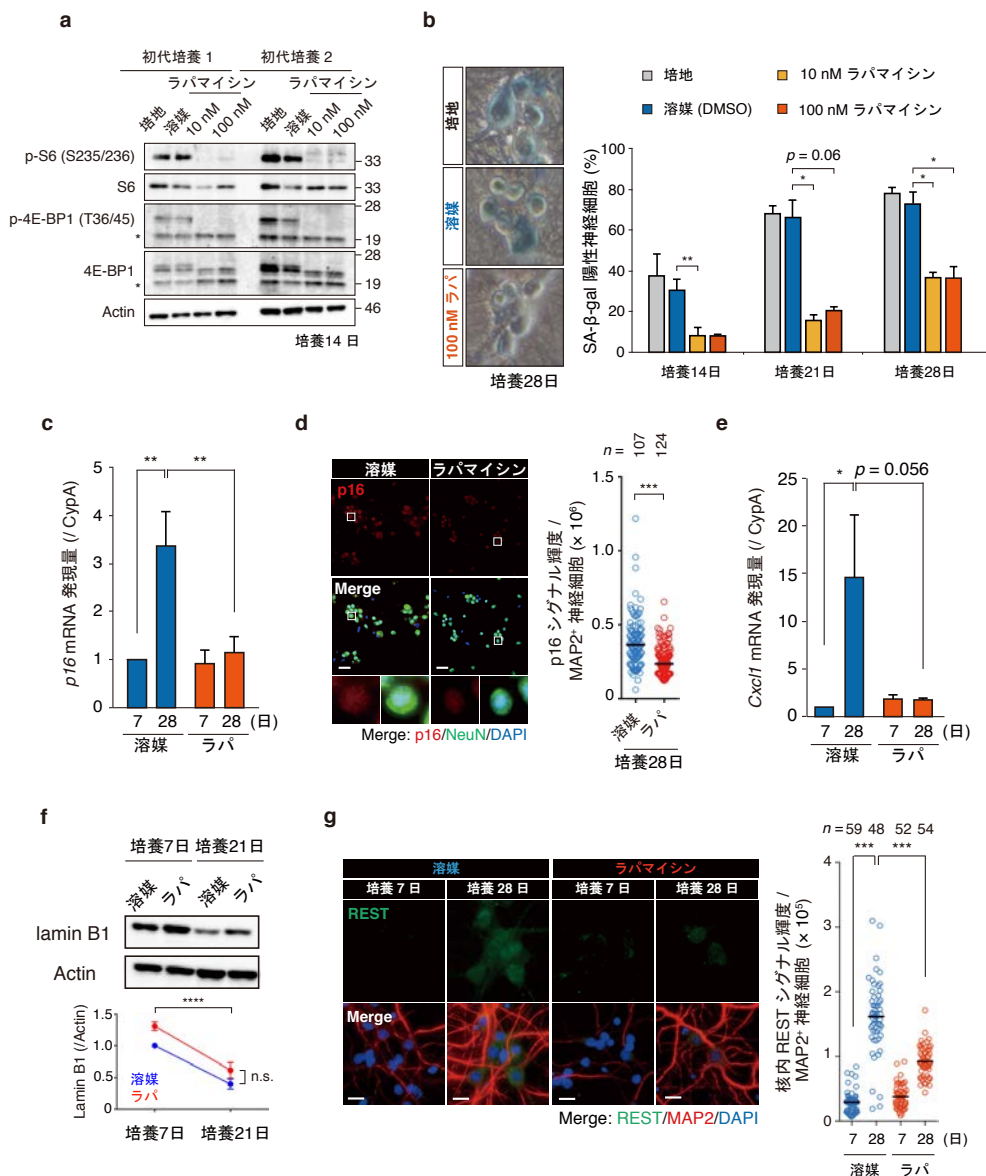


図 3-19. 持続的な mTOR 経路阻害は長期培養時に観察される神経細胞老化を抑制する

(図 3-19)

- a) 初代培養海馬神経細胞にラパマイシンを 10 nM または 100 nM の濃度で培養 4 日目から 14 日目まで持続的に処理した。対照実験として、培地交換のみ(培地)、または溶媒処理を同期間行った細胞を用意した。各条件の培養 14 日目の神経細胞を回収し、全細胞抽出液を調製し、S6 (S2235/236) とリン酸化 4E-BP1 (T36/45) の量をウエスタンブロッティングにて調べた。Actin と Coomassie 染色は蛋白質量が一定であることのコントロール。星印は非特異的シグナル。10 nM および 100 nM のラパマイシンは十分に mTOR 経路を阻害した。
- b) 培養 4 日から持続的にラパマイシン処理(100 nM)を行い、14、21 および 28 日の時点で SA-β-gal 染色を行った($n \geq 200$ 神経細胞/ 実験)。各時点において、SA-β-gal 陽性神経細胞数はラパマイシン処理により顕著に減少した。
- c) 上述 (b) の実験同様にラパマイシンで処理した初代培養海馬神経細胞において、*p16* の遺伝子発現量を定量 RT-PCR により調べ、*CypA* mRNA 量で補正した相対値で示した。持続的なラパマイシン処理は長期培養による *p16* 遺伝子発現上昇を抑制した。
- d) 溶媒または 100 nM ラパマイシン存在下で培養を行った培養 28 日目の海馬神経細胞において、p16 蛋白質(赤) および NeuN(緑) それぞれに対する特異的抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。顕微鏡画像下に、代表的な実験の NeuN 陽性神経細胞あたりの p16 シグナルの輝度およびその中央値をドットプロットで示した。p16 蛋白質量は持続的ラパマイシン処理により減少した。スケールバー、40 μm。
- e) 上述の (c) で示した実験と同様の条件で、*Cxcl1* mRNA 量を定量 RT-PCR により調べ、*CypA* mRNA 量で補正した相対値で示した。ラパマイシン処理により、長期培養で観察される *Cxcl1* の発現上昇は消失した。
- f) ラパマイシンの lamin B1 減少に対する影響を調べるため、溶媒または 100 nM ラパマイシンを処理した培養 7 日目および 21 日目の海馬神経細胞を回収し、ウエスタンブロッティングを行った。Actin は蛋白質量が一定であることのコントロール。持続的なラパマイシン処理は、検討を行ったいずれの時点においても lamin B1 蛋白質量を増加させた。
- g) 持続的にラパマイシンで処理した(100 nM、培養 4 日目 ~)海馬神経細胞を抗 REST 抗体(緑) および抗 MAP2 抗体(赤) で染色した。顕微鏡画像右には、代表的な実験の神経細胞あたりの核内 REST シグナルの輝度およびその中央値をドットプロットで示した。長期培養による核内局在 REST 蛋白質の増加は持続的ラパマイシン処理により減弱した。スケールバー、15 μm。
エラーバーは 3 回以上の独立した実験結果の標準偏差を示す。
- (b) では両側一元配置分散分析、(c)、(e)-(g) では両側二元配置分散分析、また (d) ではマン・ホイットニー-U 検定を統計検定に用いた(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$)。

3-4-2 mTOR経路阻害によるオートファジー活性化と蛋白質恒常性の解析

ラパマイシンはオートファジーを活性化することで、ヒトやマウス骨格筋幹細胞の細胞老化を抑制することが知られている(Garcia-Prat L *et al.*, 2016)。培養 21 日目にオートファジーフラックス解析を行ったところ、ラパマイシン処理した海馬神経細胞では、未処理の細胞と比較して、より顕著に BafA 誘導性 p62 および LC3 が認められる傾向にあった(図 3-20a, b, n=6, 3 (biological replicates))。また、定常状態の p62 蛋白質量がラパマイシン処理細胞で再現性良く減少していた(図 3-20a, BafA 未処理: 溶媒)。これは、ラパマイシン処理を介して増強されたオートファジーが基質となる標的蛋白質をより多く分解したためであると考えられる(Mizushima N *et al.*, 2010)。続いて、ラパマイシン処理が、培養日数依存的な蛋白質ストレスを軽減する可能性について、界面活性剤不溶性画分に含まれるユビキチン鎖に対するウエスタンブロッティング、または A β に対する蛍光免疫染色により検討した。継続的に 100 nM ラパマイシンに晒された長期培養海馬神経細胞では、不溶性ユビキチン化蛋白質ならびに A β 様凝集体の蓄積は著しく阻害された(図 3-21a, b, n=5, 4 (biological replicates))。これらの結果は、ラパマイシン処理がオートファジーの活性化を誘導して、初代培養海馬神経細胞における蛋白質恒常性の保持に部分的に貢献しており、長期培養で誘導される細胞老化の回避を促すという仮説を支持する。

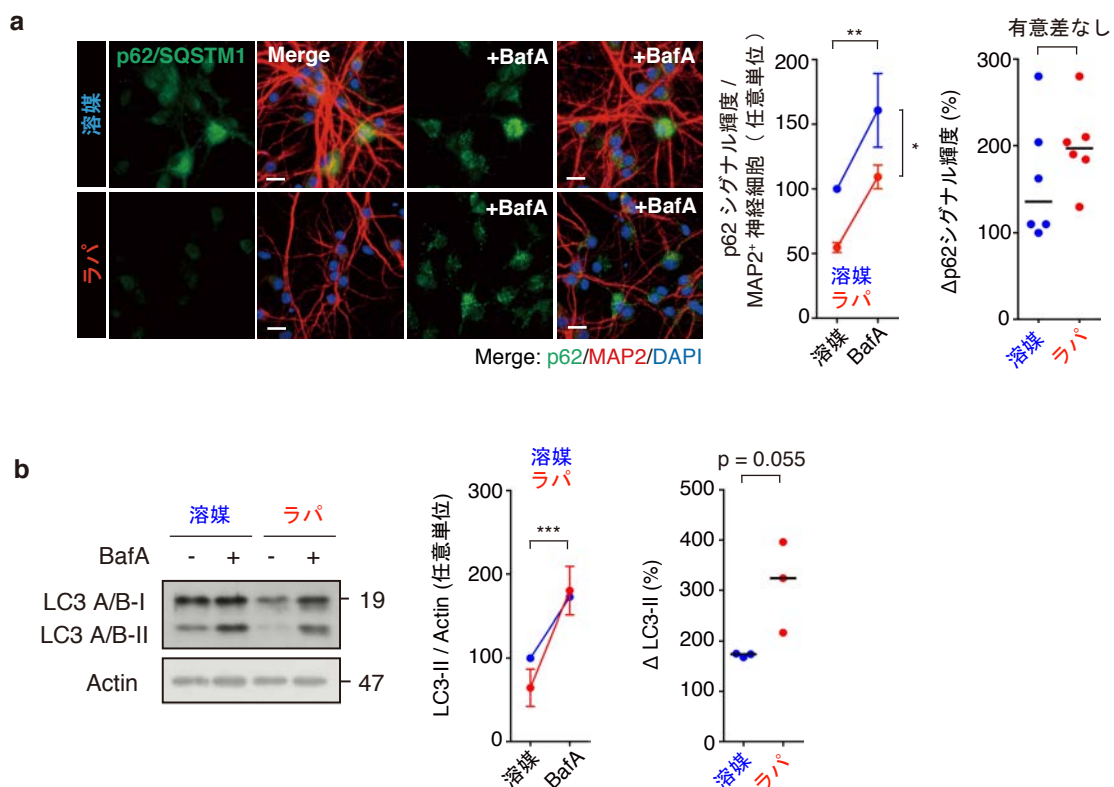


図 3-20. 持続的な mTOR 経路阻害は初代培養海馬神経細胞のオートファジーを増強する

(図 3-20)

a), b) 培養 4 日目から溶媒あるいはラパマイシン(ラパ, 100 nM) を含む培地で海馬神経細胞の培養を行った。培養 21 日目にさらに溶媒または BafA(10 nM, 4 h) で処理した。各細胞におけるオートファジーフラックスについて、p62(緑)および MAP2(赤)に対する特異的抗体を用いた染色(a)、または全細胞抽出液を用いたウェスタンブロッティングによる LC3 A/B の検出(b)によって検討を行った。各条件における p62 および LC3-II の蛋白質量の定量結果について、それぞれ 6 回(64 ~ 166 神経細胞/ 実験)と 3 回の独立した実験の平均値と標準偏差で中央のグラフで示した。BafA 処理・未処理細胞間の p62 および LC3 A/B-II 蛋白質の量的変化率(すなわち、 $\Delta p62$ および $\Delta LC3 A/B-II$)をオートファジーフラックスの指標とし、右側にそれぞれの対応するドットプロットを中央値と共に示した。持続的なラパマイシン処理は初代培養海馬神経細胞におけるオートファジーフラックスを増強する傾向にあった。スケールバー 20 μm 。両側二元配置分散分析(中央図)、または両側独立 t 検定(右図)を統計検定に用いた(* $p < 0.02$; ** $p < 0.006$; *** $p < 0.0005$)。

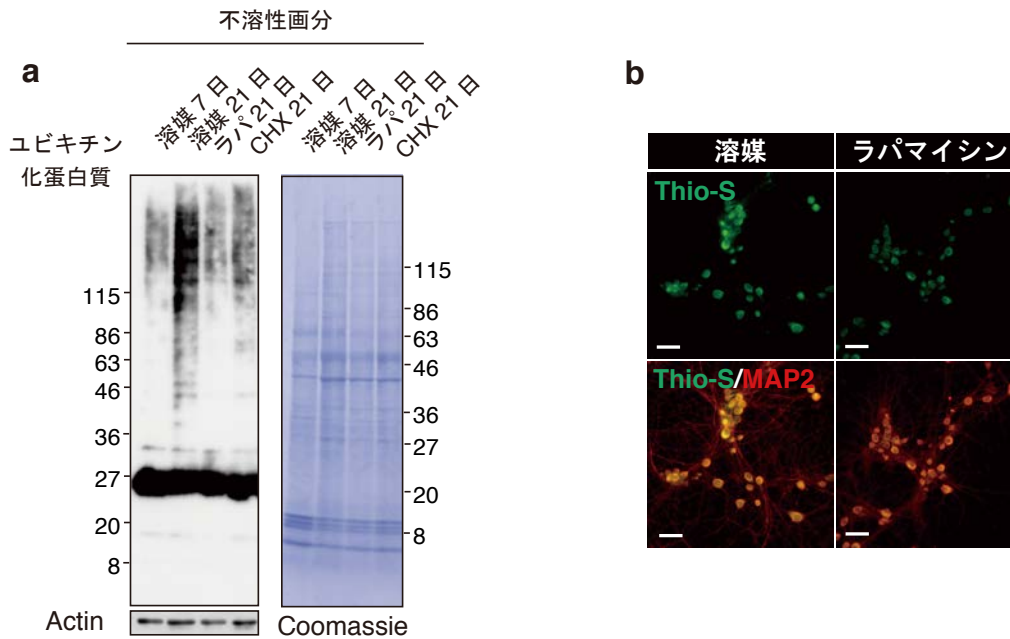


図 3-21. 海馬神経細胞の長期培養時、ラパマイシンまたは翻訳阻害剤はその蛋白質恒常性を向上させる

a) 培養 4 日目から持続的にラパマイシンまたは CHX を 100 nM の濃度で処理した初代培養海馬神経細胞を培養 7 日または 21 日各時点で回収して、Triton X による細胞抽出液の分画を行った後、不溶性ユビキチン化蛋白質と全不溶性蛋白質量について、それぞれウェスタンブロッティングおよび Coomassie 染色により検討を行った。ラパマイシンと CHX 処理では、対照群である溶媒処理と比較して、不溶性(ユビキチン化)蛋白質が減少した。

b) 上述(a)と同条件でラパマイシンを処理した海馬神経細胞では、長期培養時に観察されるチオフラビン S(Thio-S)結合性アミロイド凝集体蓄積が軽減された(緑)。神経細胞は抗 MAP2 抗体(赤)で染色して検出した。各実験において代表的な蛍光顕微鏡写真を示した。スケールバー、40 μm 。

3-4-3 蛋白質翻訳阻害が長期培養神経細胞にもたらす影響の解析

mTORC1 は、成長因子、栄養、酸化還元状態などの細胞内外環境を感知し、翻訳開始に関与する 4E-BP1 および p70S6 キナーゼのリン酸化を通じて、蛋白質合成の制御を行っている (Laplanche M & Sabatini DM, 2012)。ラパマイシン、またはそれら翻訳開始因子の遺伝子変異やノックアウトによる新規蛋白質合成の制約は、蛋白質凝集体の供給源となる蛋白質を減少させることで蛋白質ストレスを軽減し、個体の寿命延長に寄与すると考えられている (Sherman MY & Qian SB, 2013; Johnson SC *et al.*, 2013)。そこで、ラパマイシンの長期培養誘導性神経細胞老化に対する抑止効果と mRNA 翻訳の関係をより詳細に検討した。培養 14 日目において、メチオニンアナログである L-ホモプロパルギルグリシン (homopropargylglycine; HPG) の取り込みを指標に新規蛋白質合成について調べると、ラパマイシン処理は mRNA 翻訳をおよそ 80% 抑制することが明らかとなった (図 3-22a, n=3 (biological replicates))。重要なことに、翻訳伸長反応阻害剤であるシクロヘキシミド (cycloheximide; CHX) を用いて、海馬神経細胞の mRNA 翻訳を持続的かつラパマイシンと同程度に制限した場合に (図 3-22a, n=3 (biological replicates))、長期間培養に伴う不溶性ユビキチン化蛋白質ならびに A β 様凝集体の蓄積が顕著に抑えられた (図 3-21a, 22b, n=5, 11 (biological replicates))。以上の結果から、ラパマイシンで処理した海馬神経細胞において、新規蛋白質合成の抑制が長期培養誘導性の蛋白質ストレス軽減に寄与していることを示唆する。

次に、mRNA 翻訳阻害が海馬神経細胞の長期培養誘導性細胞老化にもたらす影響について検討した。50 nM または 100 nM のシクロヘキシミド存在下で培養を行った海馬神経細胞では、少なくとも培養 28 日目までは SA- β -gal 陽性神経細胞が観察されなかった (図 3-23a, n=3 (biological replicates))。ピューロマイシンはアミノアシル tRNA の 3' 末端部分と類似の構造を有するため、リボソームの P 部位に結合しているペプチジル tRNA に作用して、翻訳途中にあるペプチド鎖のリボソームからの遊離を引き起こす。100 ng/mL のピューロマイシン存在下で維持した海馬神経細胞で、培養 21 日目の SA- β -gal 陽性細胞数を評価すると、統計学的有意差は得られなかったが、その頻度が溶媒処理細胞に比べておよそ 30% 減少した (図 3-23b, n=4 (biological replicates))。さらに他の細胞老化表現型について、CHX 処理を継続的に施した海馬神経細胞では、長期培養に伴う p16 蛋白質増加、SASP (*Cxcl1* mRNA) および lamin B1 蛋白質減少が認められなかった (図 3-23c-e, n=3 or 5 (biological replicates))。また、培養日数依存的に核内局在を示す REST 蛋白質の増加も CHX 処理によって部分的に軽減した (図 3-23f, n=3 (biological replicates))。以上の結果から、海馬神経細胞の長期培養誘導性細胞老化は部分的な mRNA 翻訳阻害によって抑制可能であることが示された。したがって、ラパマイシンが長期培養海馬神経細胞に与える影響、すなわち蛋白質恒常性の向上および細胞老化様の現象の抑制には、オートファジーの活性化と翻訳阻害の両方が寄与している可能性が示唆された。

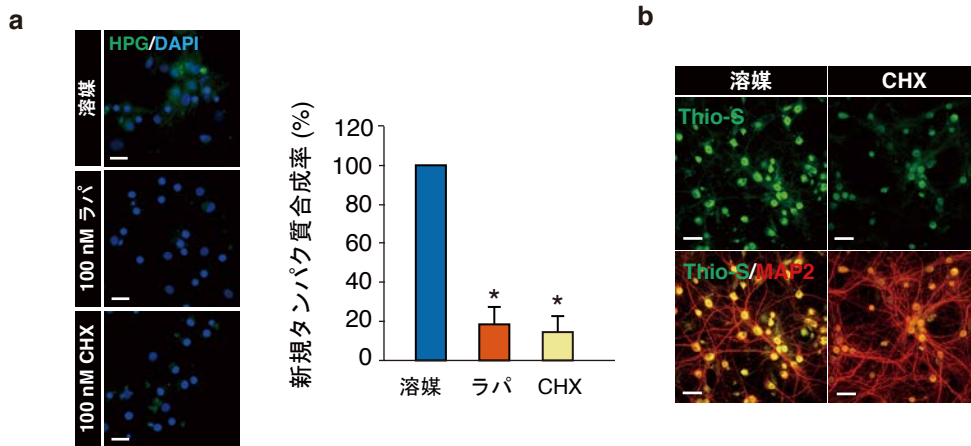


図 3-22. 持続的な mTOR 経路阻害は初代培養海馬神経細胞の全般的な翻訳を抑制する

a) 初代培養海馬神経細胞を培養 4 日目から 14 日目まで継続してラパマイシンで処理をした後、50 μ M の L-ホモプロパルギルグリシン (HPG) 存在下で新規合成蛋白質を 30 分間標識した (蛍光写真、緑)。翻訳阻害剤シクロヘキシミド (CHX) を処理した細胞と同様に、ラパマイシンで処理した細胞では一定時間内に新規に合成される蛋白質量が減少した。3 回の独立した実験結果の平均値と標準偏差を右グラフに示した。スケールバー、20 μ m。両側一元配置分散分析を統計検定に用いた (* $p < 0.02$)。

b) 持続的に溶媒または 100 nM CHX で処理した海馬神経細胞では、Thio-S で検出されるアミロイド凝集体が減少した (緑)。神経細胞は抗 MAP2 抗体 (赤) で染色して検出した。各実験において代表的な蛍光顕微鏡写真を示した。スケールバー、40 μ m。

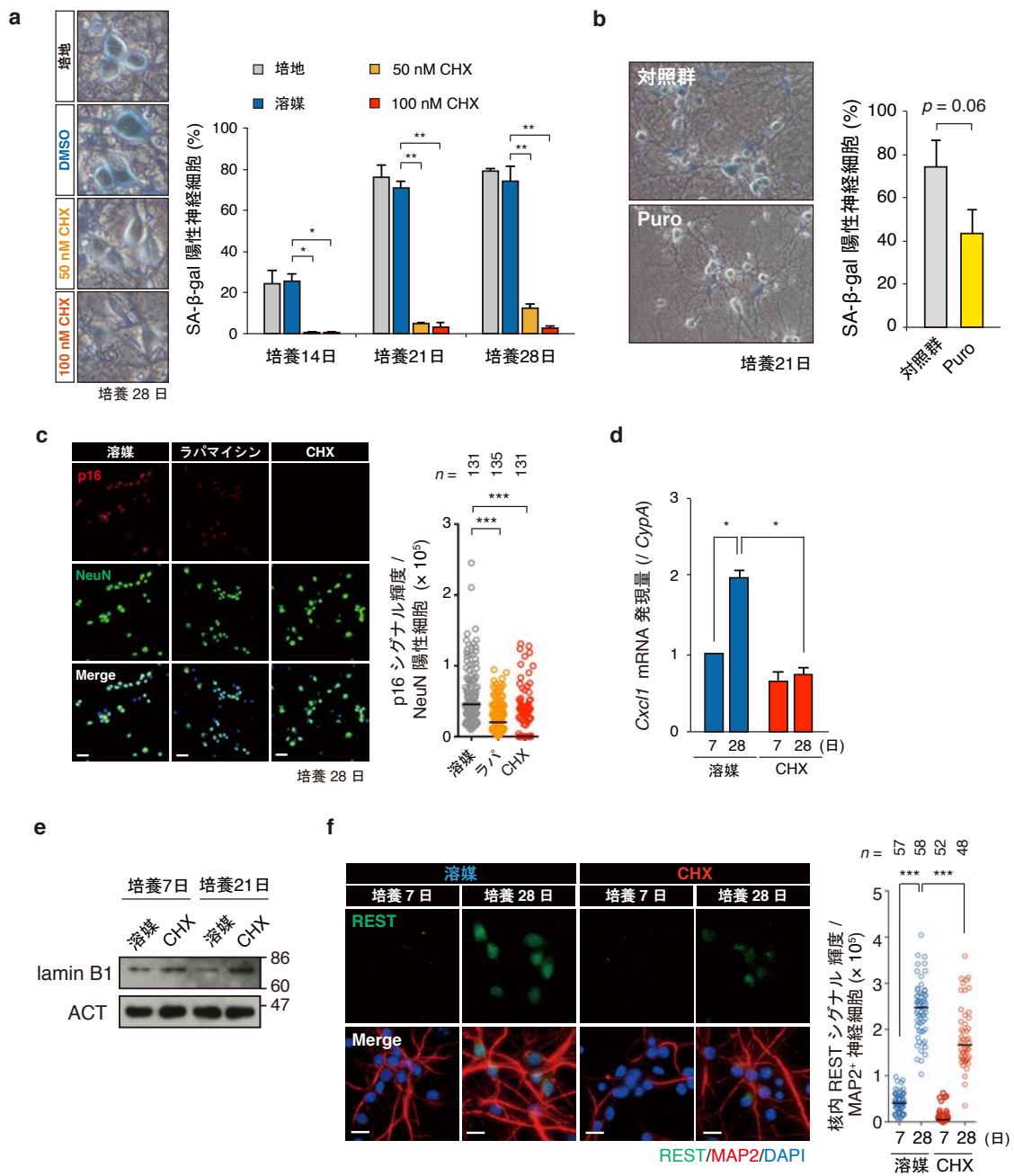


図 3-23. 持続的な翻訳抑制は長期培養が誘起する神経細胞老化を抑制する

a) 初代培養海馬神経細胞に対して、培養 4 日から持続的にシクロヘキシミド (CHX) 処理を行い、14、21 および 28 日の時点で SA-β-gal 染色を行った。右グラフは 3 回の独立した実験結果の平均値を標準偏差と共に示す ($n > 200$ 神経細胞/ 実験)。各時点において、SA-β-gal 陽性神経細胞数は CHX 処理により顕著に減少した。

(図 3-23 続き)

- b) 培養 4 日目から 21 日目まで、100 ng/mL の濃度でピューロマイシン (puromycin; Puro) を処理した海馬神経細胞における SA- β -gal 染色の結果を示した。CHX 処理と一致して、ピューロマイシン処理で SA- β -gal 陽性神経細胞の数が顕著に減少した。3 回の独立した実験の平均値と標準偏差を右グラフに示した ($n > 200$ 神経細胞/ 実験)。
- c) 培養 4 日目から海馬神経細胞に溶媒, 100 nM ラパマイシン (ラパ), あるいは 100 nM CHX で処理し、培養 28 日目で細胞を固定した後、p16 (赤) および NeuN (緑) に対する特異的抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。代表的な実験の各条件での神経細胞あたりの p16 シグナル輝度値を中央値と共にドットプロットで示した。スケールバー 40 μ m。
- d) (c) と同様に持続的に溶媒または CHX で処理した海馬神経細胞から全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR による *Cxcl1* 遺伝子の発現量の解析を行った。 *CypA* mRNA 量で補正した *Cxcl1* mRNA 量を相対値について、3 回の独立した実験の平均値と標準偏差で示した。CHX 処理によって培養日数依存的な *Cxcl1* 発現上昇が抑制された。
- e) (c) と同様に CHX 存在下で培養した初代培養海馬神経細胞で、ウエスタンブロッティングより lamin B1 の経日変化を検討した。Actin は蛋白質量が一定であることのコントロール。長期培養に伴う lamin B1 蛋白質の減少は、持続的な CHX 処理によって阻害された。
- f) 上述 (c) にあるように持続的に CHX で処理した海馬神経細胞を抗 REST 抗体 (緑) および抗 MAP2 抗体 (赤) で染色した。顕微鏡画像右には、代表的な実験の神経細胞あたりの核内局在を示す REST 蛋白質のシグナル輝度およびその中央値をドットプロットで示した。長期培養による核内局在 REST 蛋白質の増加は持続的 CHX 処理により減弱した。スケールバー、20 μ m。
- (a) と (c) では両側一元配置分散分析、(b) では両側独立 t 検定、また (d) と (f) では両側二元配置分散分析を統計検定に用いた (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$)。

3-5 長期培養ラット大脳皮質神経細胞における細胞老化の検討

ヒト線維芽細胞は、試験管内繰り返し培養によって、そのテロメアが閾値以下の長さまで達することで複製老化に至る。しかし、その細胞が由来する組織の部位によって、培養時に曝されるストレスに対する感受性に差異を認め、その違いがそれら細胞間における細胞応答の異質性に帰結することが古くから知られている。たとえば、ヒト包皮に由来する BJ 細胞の複製老化は、テロメア短小化に付随して起こる DDR と p53-p21 経路の活性化に完全に依存する。一方で、ヒト肺に由来する WI-38 細胞や IMR90 細胞は、BJ 細胞と比較して、酸化ストレスなどの培養ストレス感受性が高く、テロメア短小化で活性化される p53-p21 経路のほか、p16 の発現上昇に依存して老化することが分かっている (Itahana K *et al.*, 2004)。そこで以下では、これまでにラット胎児脳海馬神経細胞を長期間培養した際に観察された細胞老化関連表現型および加齢性変化が、長期培養後のラット胎児脳大脳皮質神経細胞において観察されるか検討を行った。

まず、3-2-1 項と同様に高純度の大脳皮質神経細胞を長期間培養する目的で、培養 2 日目から 2.5 μ M の濃度で AraC 処理を 36 時間施し、その後、AraC を含まない培地交換で培養 28 日まで細胞を維持した(図 3-24a, n=3 (biological replicates))。培養 14 日および 28 日目に細胞を固定し、神経細胞マーカー NeuN に対する特異的な抗体を用いて、初代培養細胞集団中に存在する大脳皮質神経細胞の割合を調べた。その結果、神経細胞(NeuN 陽性) の割合の平均はそれぞれ培養 7 日で平均 97.2%、培養 28 日で平均 90.1%であり(図 3-24b, n=3 (biological replicates))、少なくとも培養 28 日目までは比較的高純度の大脳皮質神経細胞が維持された。したがって、以降の大脳皮質神経細胞の長期間培養では、培養 2 日目から 36 時間、2.5 μ M の濃度で AraC 処理することとした。

次に、長期間培養した大脳皮質神経細胞が、上述の長期培養海馬神経細胞と同様に、細胞老化表現型および脳老化表現型を呈するかについて検討を行った。培養 10 日、14 日、21 日、28 日目の大脳皮質神経細胞において、SA- β -gal 活性陽性細胞数の経日変化を調べたところ、その出現頻度が時間依存的に顕著に増加した(図 3-24c, n=3 (biological replicates))。さらに、SA- β -gal 活性以外の古典的細胞老化マーカーについて、関連遺伝子群の mRNA 量を定量 RT-PCR により測定した。ここでは試料として、培養 14 日目と 28 日目の大脳皮質神経細胞から調製した全 RNA を鋳型に合成した cDNA を用いた。培養 28 日目の大脳皮質神経細胞では、培養 14 日目の細胞と比較して、p16 および一部の SASP 関連遺伝子(*Cxcl1*, *Igfbp2*, *Igfbp4*) の発現上昇傾向を認め、さらに *lamin B1* 遺伝子の発現が半分程度に減少していた(図 3-24d, n=4-6 (biological replicates))。この実験では、p16 および *LaminB1* の発現変化は統計学的有意差を得たが、SASP 関連遺伝子はいずれも有意差は得られなかった(図 3-24d)。また、それら細胞を *Cxcl1* 特異的な抗体で染色したところ、*Cxcl1* は長期培養により蛋白質レベルでも増加することが明らかとなった(図 3-24e, n=2 (biological replicates))。また、蛍光免疫染色法を用いて REST 蛋白質の細胞内局在を調べると、培養 28 日目にある大脳皮質神経細胞では、

14 日培養時点の同細胞と比較して、核内に局在する REST 蛋白質量が優位に増加していることがわかった(図 3-24f, n=2 (biological replicates))(Piechota M *et al.*, 2016)。培養 28 日では、培養 14 日と比較した際、界面活性剤不溶性(ユビキチン化)蛋白質量が顕著に増大していたことから、大脳皮質神経細胞においても長期培養による蛋白質恒常性の破綻が示唆された(図 3-25a, n=3 (biological replicates))。以上の結果より、初代培養神経細胞は、その由来に依らず、28 日間に及ぶ長期間培養を経て、蛋白質恒常性破綻および REST 蛋白質の局在変化という生体脳で実際に生じる加齢性変化に加え、古典的細胞老化表現型を呈することが判明した。

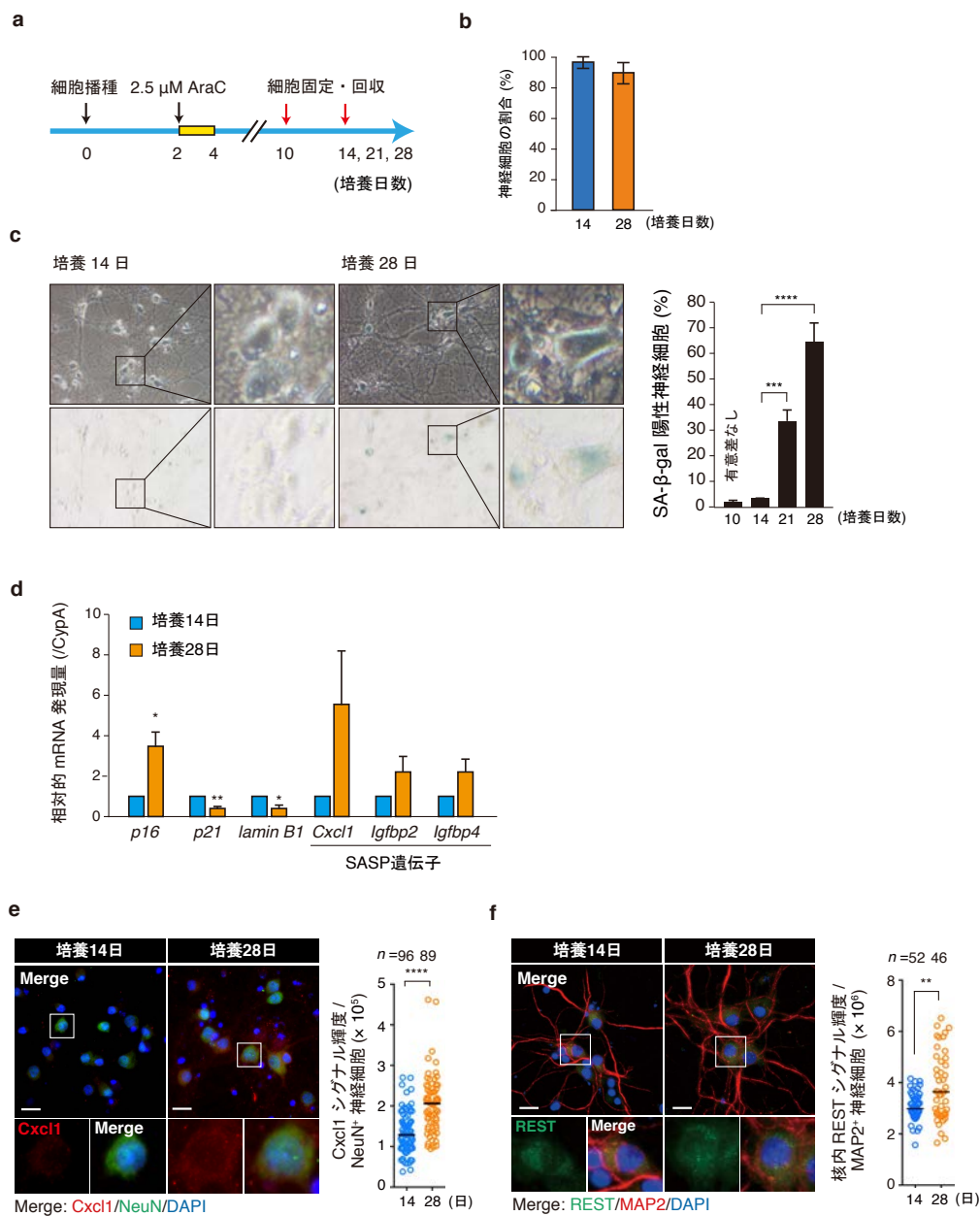


図 3-24. 長期培養を行った初代培養大脳皮質神経細胞は胞老化表現型ならびに老化脳様の加齢性変化を呈する

(図 3-24)

- a) 初代培養ラット胎児大脳皮質神経細胞の長期間培養スケジュール。
- b) 培養 14 および 28 日目における大脳皮質神経細胞を抗 NeuN 抗体で染色し、NeuN 陽性細胞 (神経細胞) の割合を調べた。独立した 3 回の実験結果の平均値を標準誤差と共に棒グラフに示した ($n = 209 \sim 684$ 細胞/ 実験)。培養 28 日目まで大脳皮質神経細胞は全細胞中の平均 90%以上の割合を占めた。
- c) 培養 10、14、21 および 28 日目の大脳皮質神経細胞を固定し、SA- β -gal 染色を行った。培養 14 日と 28 日目時点の代表的な顕微鏡写真を示した。3 回以上の独立した実験の平均値と標準偏差を示した ($n \geq 200$ 神経細胞/ 実験)。大脳皮質神経細胞の長期培養で、培養日数の経過に伴う SA- β -gal 陽性細胞の増加を観察した。
- d) 培養 14 日および 28 日目の大脳皮質神経細胞から全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法を用いて細胞老化マーカー遺伝子の発現量を定量した。各遺伝子の発現量は *CypA* の mRNA 量を用いて標準化を行った。3 回以上の独立した実験の平均値と標準偏差で棒グラフに示した。長期培養大脳皮質神経細胞は、海馬神経のそれと類似の細胞老化関連遺伝子の発現変化を示した。
- e), f) 培養 14 日および 28 日目の大脳皮質神経細胞について、Cxcl1 (赤) と NeuN (緑) (e) または、REST (緑) と MAP2 (赤) (f) それぞれに対する特異的抗体を用いて染色を行った。核は DAPI 染色により検出した (青)。それぞれの培養時点において、代表的な NeuN または MAP2 陽性神経細胞 (白い四角で囲圈) の拡大図をそれぞれの写真の下に示した。代表的な実験について、Cxcl1 または核内に局在する REST 蛋白質の定量結果を中央値とともにドットプロットで示した。スケールバー 20 μ m。Cxcl1 蛋白質の増加および核内 REST 蛋白質の蓄積が長期培養大脳皮質神経細胞で観察された。
- (c) では両側一元配置分散分析、(d) では両側独立 t 検定、(e)、(f) ではマン・ホイットニー U 検定を統計処理に用いた ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p \leq 0.002$; $****p < 0.0001$)。

さて、前述の海馬神経細胞を用いた実験では、持続的なラパマイシン処理が、長期間培養で誘発される蛋白質恒常性破綻ならびに細胞老化表現型を抑制した(図 3-19-21)。そこで、そのようなラパマイシン処理の効果が、大脳皮質神経細胞においても同様に得られるかについて検討した。まず、溶媒またはラパマイシンを処理したそれら細胞から全細胞抽出液を調製して、リン酸化 S6 およびリン酸化 4E-BP1 に対するウエスタンブロッティングによる mTOR 経路阻害効率の評価を行った。その結果、100 nM の濃度のラパマイシン処理で両蛋白質のリン酸化レベルが顕著に減少しており、mTOR 経路がラパマイシン処理によって十分に阻害されたことを確認した(図 3-25b、 $n=2$ (biological replicates))。予想通り、持続的にラパマイシンで処理した大脳皮質神経細胞では時間依存的な不溶性(ユビキチン化)蛋白質量の蓄積が抑えられており(図 3-25a、 $n=3$ (biological replicates))、また、それら細胞では溶媒対照と比べて、新規に合成される蛋白質量が減少していた(図 3-25c、 $n=3$ (biological replicates))。これらの結果は、ラパマイシン処理が mRNA 翻訳効率の低下を介して蛋白質恒常性の破綻を抑止するという、海馬神経細胞において観測された結果と一致する。さらに、ラパマイシン存在下で培養した大脳皮質神経細胞では、長期培養誘発性の細胞老化関連表現型、すな

わち SA- β -gal 活性や、*p16* および SASP 関連遺伝子 *Cxcl1* の発現上昇が認められず(図 3-26a-c、n=4-8 (biological replicates))、培養 28 目時点における核内局在性 REST 蛋白質量の明瞭な減少が観察された(図 3-26d、n=2 (biological replicates))。したがって、初代培養神経細胞が長期培養により細胞老化様の状態に至る共通分子基盤として、蛋白質恒常性の破綻が重要であると考えられ、また mTOR 経路を介したその制御が神経細胞の細胞運命決定に寄与する可能性が示唆された。

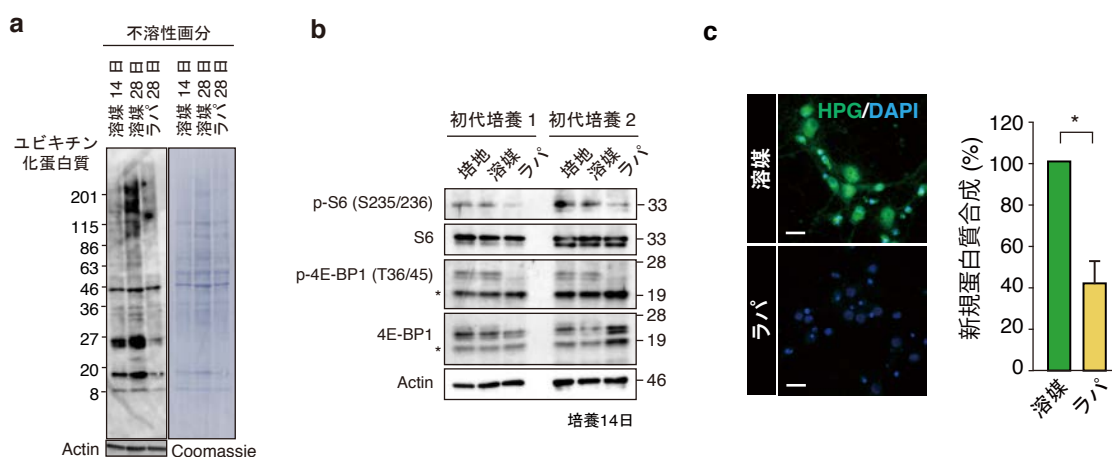


図 3-25. ラパマイシン処理は大脳皮質神経細胞における長期間培養誘発性の蛋白質恒常性破綻を抑制する

a) 培養 4 日目から溶媒または 100 nM の濃度のラパマイシン(ラパ)の存在下で、初代培養大脳皮質神経細胞を維持した。14 日および 28 日各時点における Triton X 不溶性ユビキチン化蛋白質と全不溶性蛋白質の量的変化をそれぞれウエスタンブロッティングと Coomassie 染色により検討した。可溶性画分の Actin を内部標準として示した。ラパマイシンで処理した細胞では、溶媒処理細胞と比較して、不溶性(ユビキチン化)蛋白質が減少した。

b) 初代培養大脳皮質神経細胞にラパマイシンを 100 nM の濃度で培養 4 日目から 14 日目まで持続的に処理した。対照実験として、培地交換のみ(培地)、または溶媒処理を同期間行った細胞を用意した。培養 14 日目に各細胞を回収し、全細胞抽出液を調製し、リン酸化 S6 (S2235/236) およびリン酸化 4E-BP1 (T36/45) の量をウエスタンブロッティングにて評価した。Actin と Coomassie 染色は蛋白質量が一定であることのコントロール。星印は非特異的シグナル。100 nM のラパマイシンは十分に mTOR 経路を阻害した。

c) 上述 a) 同様にラパマイシンを処理した大脳皮質神経細胞で、新規合成蛋白質をメチオニンアナログ HPG で 30 分間標識した(蛍光写真、緑)。3 回の独立した実験の平均値と標準偏差を棒グラフで示した (n = 82 ~ 127/ 実験)。スケールバー 20 μ m。持続的ラパマイシン処理が蛋白質翻訳を顕著に抑制することがわかった。統計検定は両側独立 t 検定を用いた (*p = 0.032)。

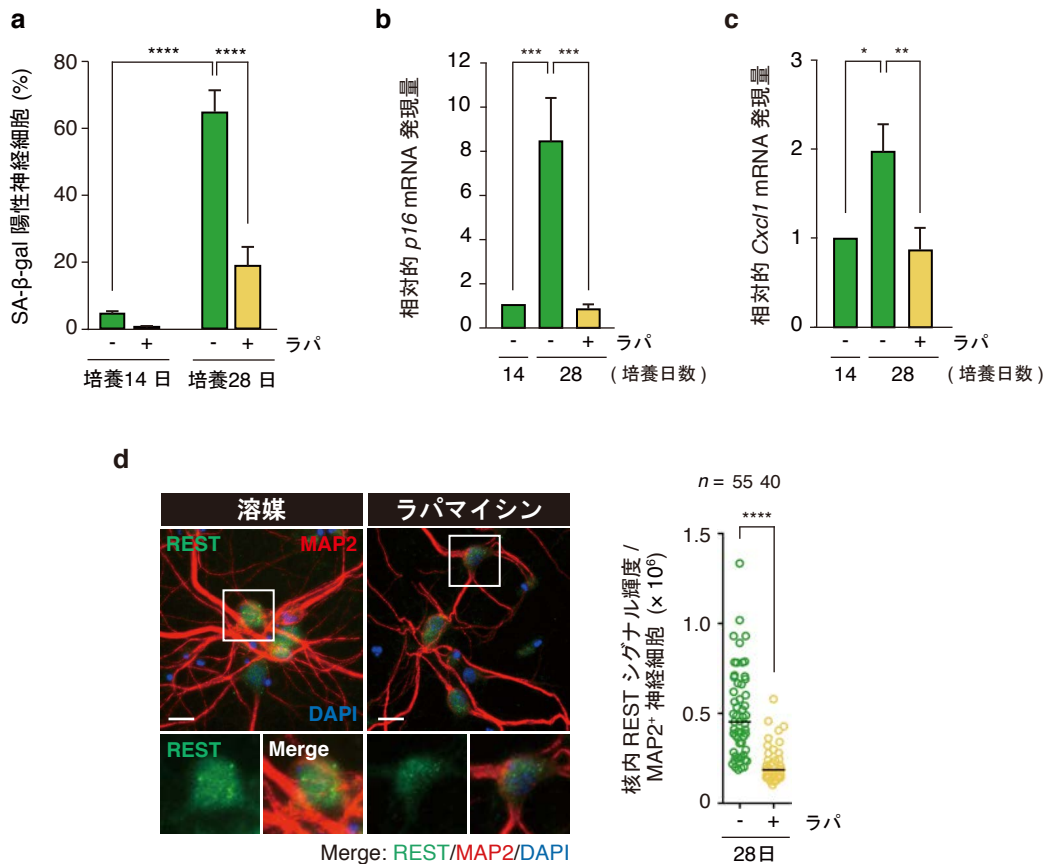


図 3-26. 持続的にラパマイシン処理は大脳皮質神経細胞における長期培養誘導性の細胞老化を抑制する

a) 培養 4 日から持続的にラパマイシン処理 (100 nM、ラパ+) を行った初代培養大脳皮質神経細胞を用いて、培養 14 日または 28 日の時点で SA-β-gal 染色を行った。対照実験として、溶媒 (ラパ-) で同期間処理した細胞を用意した。エラーバーは 4 回の独立した実験の標準偏差を示す ($n \geq 200$ 神経細胞/ 実験)。ラパマイシン処理は長期培養による SA-β-gal 陽性神経細胞の出現を抑制した。

b), c) 上述 (a) の実験同様にラパマイシンで処理した大脳皮質神経細胞において、*p16* (b) および *Cxcl1* (c) の遺伝子発現量を定量 RT-PCR により調べ、*CypA* mRNA 量で補正した相対値を示した。図はそれぞれ 8 回 (*p16*) または 6 回 (*Cxcl1*) の独立した実験の平均値と標準偏差で示した。ラパマイシン処理により、長期培養に伴う *p16* および *Cxcl1* の発現上昇は消失した。

d) 上述 (a) の実験同様に処理した培養 28 日目の大脳皮質神経細胞で、核内局在を示す REST 蛋白質量 (左図, 緑) について蛍光免疫染色により検討した。神経細胞は抗 MAP2 抗体で染色し (左図, 赤)、核は DAPI 染色で検出した (左図, 青)。2 回の独立した実験のうち、代表的な結果について、神経細胞あたりの核内 REST 蛋白質シグナル輝度 (任意単位) をドットプロットで中央値と示した。スケールバー 20 μm。ラパマイシン処理は、長期培養大脳皮質神経細胞で、核内に局在する REST 蛋白質の蓄積を抑制した。(a) では両側二元配置分散分析、(b) および (c) では両側一元配置分散分析、また (d) ではマン・ホイットニー-U 検定をそれぞれ統計検定に用いた (* $p < 0.05$; ** $p < 0.03$; *** $p < 0.002$; **** $p < 0.0001$)。

3-6 長期培養神経細胞が細胞老化に至る生理学的意義の検証

細胞老化はさまざまなストレスに抵抗性を獲得することが知られていることから(Childs BG *et al.*, 2014)、神経細胞の保護に寄与していることが予想された。ここでは、長期培養神経細胞とストレス感受性について検討した。

まず、培養7日目および培養28日目の海馬神経細胞を、DNA損傷(エトポシド、カンプトテシン、ならびに紫外線)、酸化ストレス(過酸化水素水)、または蛋白質毒性ストレス(プロテアソーム阻害剤MG132および小胞体カルシウム枯渇剤タプシガルギン)に24時間曝した後(紫外線は一定線量照射してから48時間後)、細胞生存率の測定を行った(図3-27a)。興味深いことに、用いた全てのストレス種において、培養28日目の海馬神経細胞は、培養7日目の細胞と比べて、ストレス処理後の細胞生存率が顕著に高く、ストレス抵抗性を示した(図3-27b-g, n=3 or 4 (biological replicates))。さらに、エトポシドあるいは過酸化水素水処理に関して、核の断片化および凝縮といったアポトーシスに特徴的な核の形態変化についてDAPI染色で調べたところ、培養7日目の細胞では、ストレス処理によってそれら核形態変化が非常に高頻度に観察されたが、培養28日目ではほとんど観察されなかった(図3-28a-c, n=3 (biological replicates))。これらの結果から、長期培養を行った神経細胞は、老化したヒト線維芽細胞と同様に、アポトーシス抵抗性を獲得していることが示唆された。

抗アポトーシス蛋白質であるBCL-2の発現亢進は、老化したヒト線維芽細胞の生存ならびにストレス抵抗性に重要であることが知られているため(Ryu SJ *et al.*, 2007; Sanders YY *et al.*, 2013; Childs BG *et al.*, 2014)、その可能性を検証した。Bcl-2に対する蛍光免疫染色を行ったところ、培養28日目の長期培養海馬神経細胞におけるBcl-2の蛋白質量は、培養7日目に比べて明らかに増加していた(図3-28d, n=3 (biological replicates))。また、アポトーシス実行因子であるエフェクターカスパーゼ、Casp3のmRNA発現量は、それら細胞の培養日数とは無関係にストレス処理後の時間依存的に増大したが、長期培養神経細胞におけるそれは、培養7日目のストレス未処理細胞(培養7日, 0h)のmRNA量を下回るか、またはそれと同程度であった(図3-28e, f, n=4 (biological replicates))。アポトーシス促進因子であるPuma(p53-upregulated modulator of apoptosis)についても、上述の実験結果と類似の結果が得られた(図3-29a,b)。生理的に老化した脳では、核内に蓄積したRESTがPumaの発現を転写レベルで抑制していることから(Lu T *et al.*, 2014)、初代培養神経細胞においても、経日的なRESTの細胞内局在変化がPuma発現制御に寄与していると考えられた。この可能性は、培養28日目の神経細胞では、他のREST標的因子であるアポトーシス促進因子BaxとBidの遺伝子発現レベルが、培養7日目に対しておよそ3割から5割減弱していた結果からも支持される(図3-29c-f, n=3 (biological replicates))。次に、本研究で評価したアポトーシス関連遺伝子のうち、ストレス処理でもたらされた発現増強が最も顕著であったPumaについて、ノックダウン実験を行い(図3-30a, b, n=3 (biological replicates))、培養7日目の海馬神経細胞におけるアポトーシスに果たす役割を検証した。Pumaノックダウンによって、確かにエト

ポシドまたは過酸化水素水処理によって誘発されるアポトーシスが完全に消失した(図 3-30c、n=4 (biological replicates))。最後に、これまでに観察された培養日数依存的なアポトーシス関連因子の挙動変化と、それに随伴して起こるストレス抵抗性の獲得について、それらの普遍性を検討した。培養 28 日目の大脳皮質神経細胞では、培養 14 日目と比較して Bcl-2 蛋白質が蓄積していること(図 3-31a、n=2 (biological replicates))、ならびにエトポシド処理に対する感受性の軽減が認められた(図 3-31b, c、n=4 (biological replicates))。したがって、初代培養神経細胞では、培養日数の経過と共にアポトーシス関連因子の発現がダイナミックに変化しており、長期間培養によって誘発される細胞老化様現象に付随してアポトーシス耐性が賦与されることが明らかとなった。その際、生理的に老化したヒト脳における報告同様に(Lu T *et al.*, 2014)、核内に蓄積した REST が老化様神経細胞のストレス抵抗性に寄与している可能性が高い(図 3-4, 図 3-24e)。

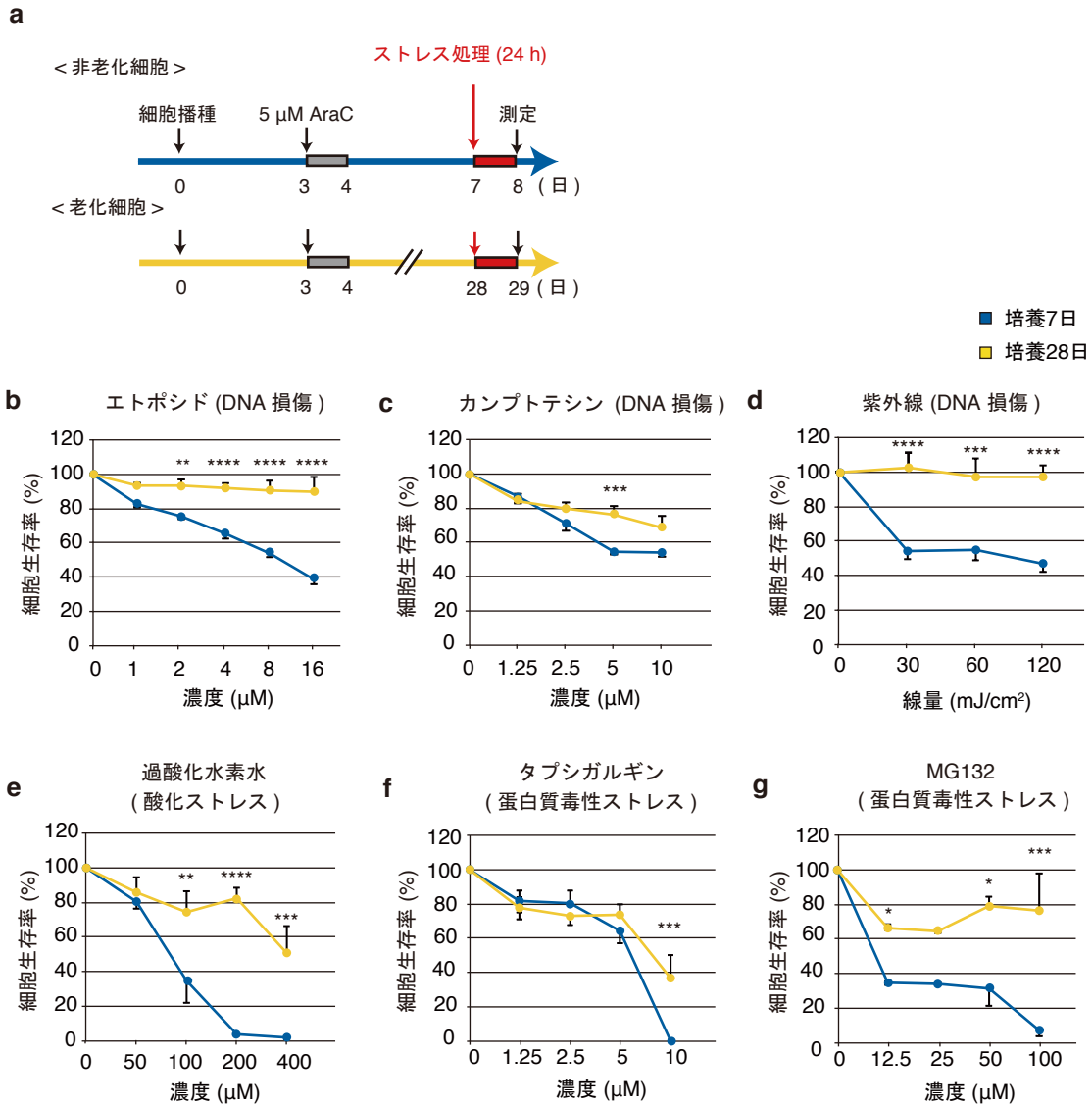


図 3-27. 長期培養による細胞老化は海馬神経細胞にストレス抵抗性を賦与する

a) ストレス感受性評価のタイムテーブルを示した (UV 感受性評価 (d) は、培養 7 日目および 28 日目にある海馬細胞に UV を照射して 48 時間後に細胞生存率を検討した)。それぞれの培養日時点において、ストレス未処理条件 (UV、0 mJ/cm^2 ; その他ストレス、0 μM) における細胞の生存率を 100%とした。

b)-g) 各種ストレスで培養 7 日目および 28 日目海馬神経細胞を 24 時間処理し、培養 8 日目および 29 日目で細胞生存率を CellTiterGlo-kit を用いて測定した。UV 照射では、細胞生存率は培養 9 日目と 30 日目に評価した。長期培養海馬神経細胞は、短期間の培養時と比較して、全てのストレス種に対して抵抗性示した。両側二元配置分散分析を統計処理に用いた (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0025$; **** $p < 0.0002$)。

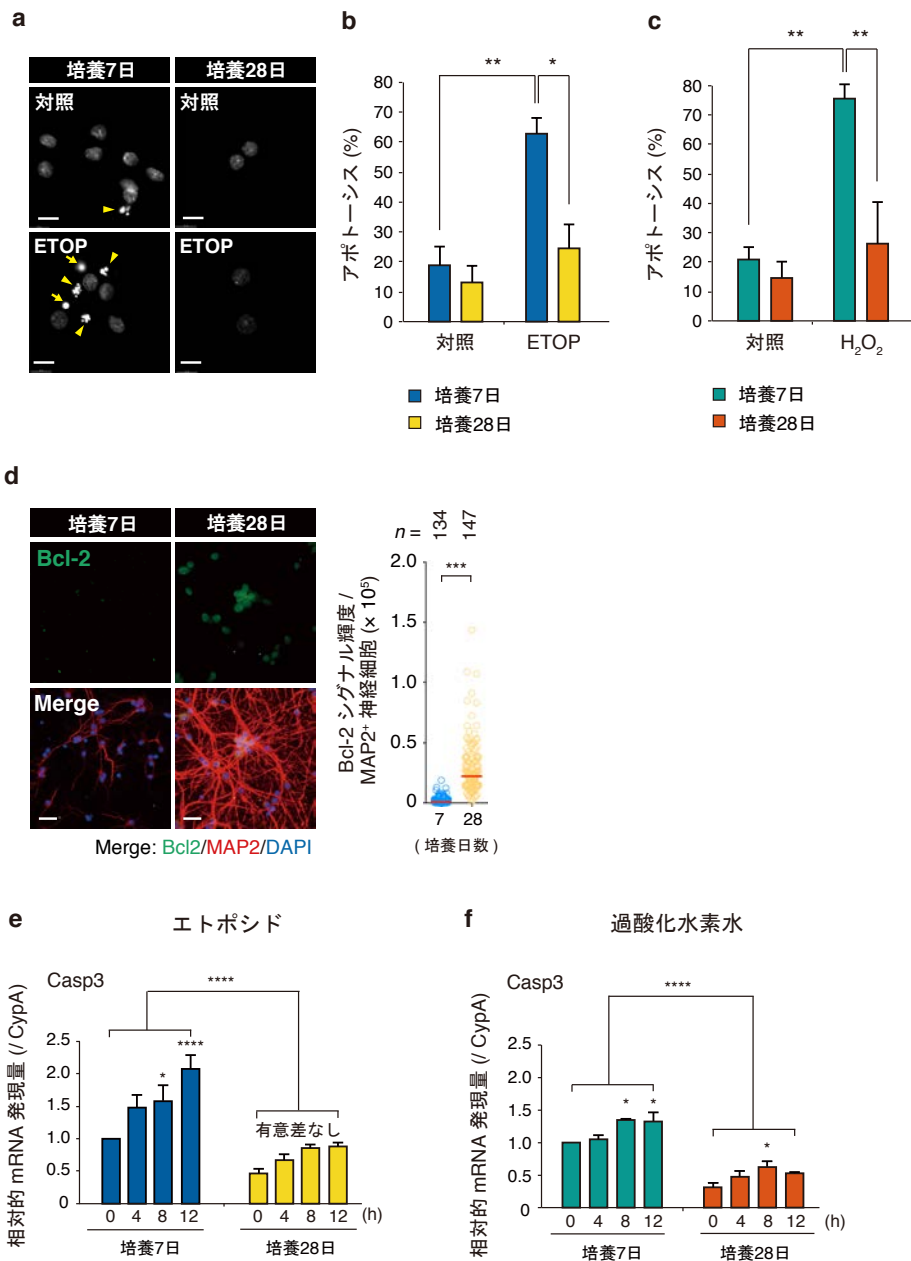


図 3-28. 長期培養海馬神経細胞はアポトーシス抵抗性を示す

a) 培養 7 日および 28 日目の海馬神経細胞をエトポシド (ETOP) で処理し (16 μ M、24 時間)、固定後の細胞の核を DAPI 染色により可視化し、アポトーシスの発生頻度を検討した。顕微鏡画像中、アポトーシス細胞で特徴的な核形態変化である凝縮クロマチンと断片化クロマチンをそれぞれ矢印と矢頭で示した。

b) (a) の実験を独立に 3 回行い、凝縮または断片化クロマチンのいずれかを呈する細胞核をアポトーシス細胞として、その割合を平均値と標準偏差を棒グラフに示した。

c) 過酸化水素 (H₂O₂) 処理後に (100 μ M、24 時間) (a) および (b) で示した実験を行った際の定量結果を示した。長期培養海馬神経細胞ではエトポシドまたは過酸化水素の処理後にアポトーシスが誘導されなかった。

(図 3-28 続き)

d) 培養 7 日および 28 日目海馬神経細胞を抗 Bcl-2 抗体 (緑) と抗 MAP 2 抗体 (赤) で染色を行った。顕微鏡画像右には、代表的な実験の神経細胞あたりの Bcl-2 蛋白質のシグナル輝度およびその中央値をドットプロットで示した。スケールバー、40 μm 。長期培養海馬神経細胞では Bcl-2 蛋白質の量が増加していた。

e)、f) 上記の (a) と (c) の実験同様にエトポシドまたは過酸化水素水処理した海馬神経細胞を 4 時間毎に回収した。各細胞の全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法を用いて *Casp3* 遺伝子の発現量を定量した。遺伝子の発現量は *CypA* の mRNA 量を用いて標準化を行った。4 回の独立した実験の平均値と標準偏差で棒グラフに示した。ストレス処理による *Casp3* 発現誘導は培養日数にかかわらず見られたが、相対的 *Casp3* 発現量は長期培養神経細胞で低かった。

(b)、(c)、(e) ならびに (f) では両側二元配置分散分析、(d) ではマン・ホイットニー U 検定を統計処理に用いた (* $p < 0.04$; ** $p < 0.008$; *** $p < 0.0025$; **** $p < 0.0001$)。

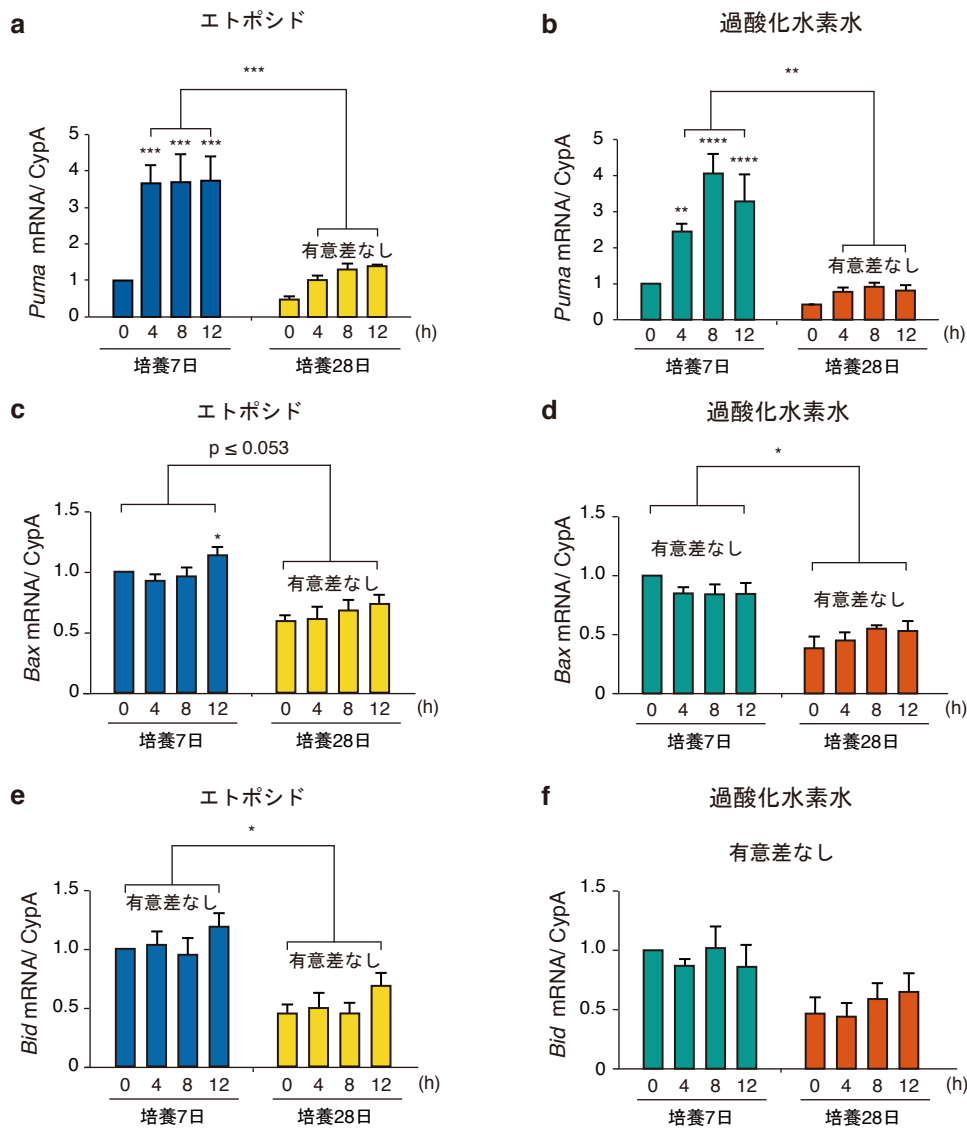


図 3-29. 長期培養海馬神経細胞では REST 標的アポトーシス関連遺伝子発現が抑制される

a), b) 培養 7 日目および 28 日目海馬神経細胞をエトポシド (16 μ M) または過酸化水素水 (100 μ M) で処理した後、0、4、8、12 時間の時点で細胞を回収した。各細胞の全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法を用いて *Puma* 遺伝子の発現量を定量した。遺伝子の発現量は *CypA* の mRNA 量を用いて標準化を行った。3 回の独立した実験の平均値と標準偏差で棒グラフに示した。長期培養海馬神経細胞ではストレス処理後に *Puma* mRNA 量が著しく上昇した。

c) - f) 上述の (a) または (b) で調製した全 RNA を用いて、定量 RT-PCR 法による *Bax* 遺伝子 (c)、(d) および *Bid* 遺伝子 (e)、(f) の発現量を定量した。それぞれの遺伝子の mRNA 量は *CypA* mRNA 量で標準化し、3 回の独立した実験の平均値と標準偏差で棒グラフに示した。長期培養海馬神経細胞では、培養 7 日目の細胞と比較して、*Bax* と *Bid* どちらもその発現が強く抑えられていた。

統計処理には両側二元配置分散分析を用いた (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0025$; **** $p < 0.0002$)。

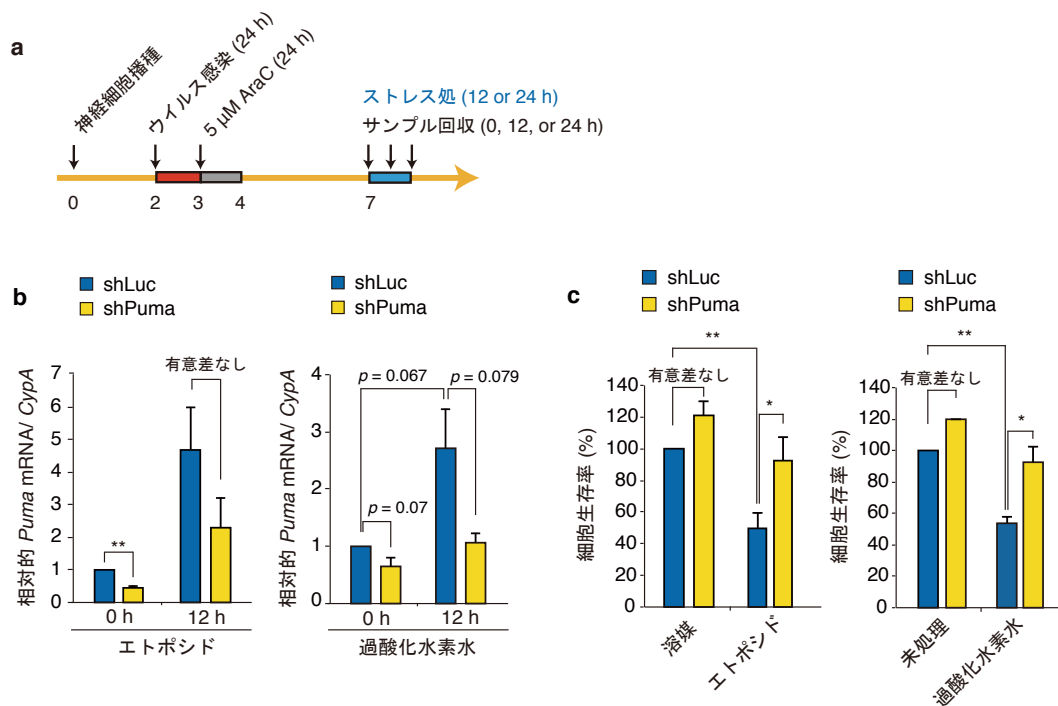


図 3-30. 培養 7 日目の海馬神経細胞でのアポトーシス誘導は Puma に依存する

a) *Puma* ノックダウンとストレス処理後の *Puma* ノックダウン効率評価と細胞生存率測定タイムテーブルを示した。

b) 培養 7 日目において、shLuciferase または shPuma を導入した海馬神経細胞エトポシド (16 μ M) または過酸化水素水 (100 μ M) で処理を 12 時間行った。ストレス処理前 (0 h) と処理後 (12 h) で回収した各細胞から全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法を用いて *Puma* 遺伝子の発現量を定量した。遺伝子の発現量は *CypA* の mRNA 量を用いて標準化を行った。3 回の独立した実験の平均値と標準偏差で棒グラフに示した。*Puma* ノックダウンによりストレス処理で誘導される *Puma* 発現亢進が効率よく阻害された。

c) (b) 同様の条件で、ストレス処理後 24 時間後の細胞生存率を CellTiterGlo-kit を用いて評価した。培養 7 日目の海馬神経細胞において、*Puma* ノックダウンはエトポシドおよび過酸化水素水処理で誘導されるアポトーシスを抑制した。

統計処理には両側二元配置分散分析を用いた (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)。

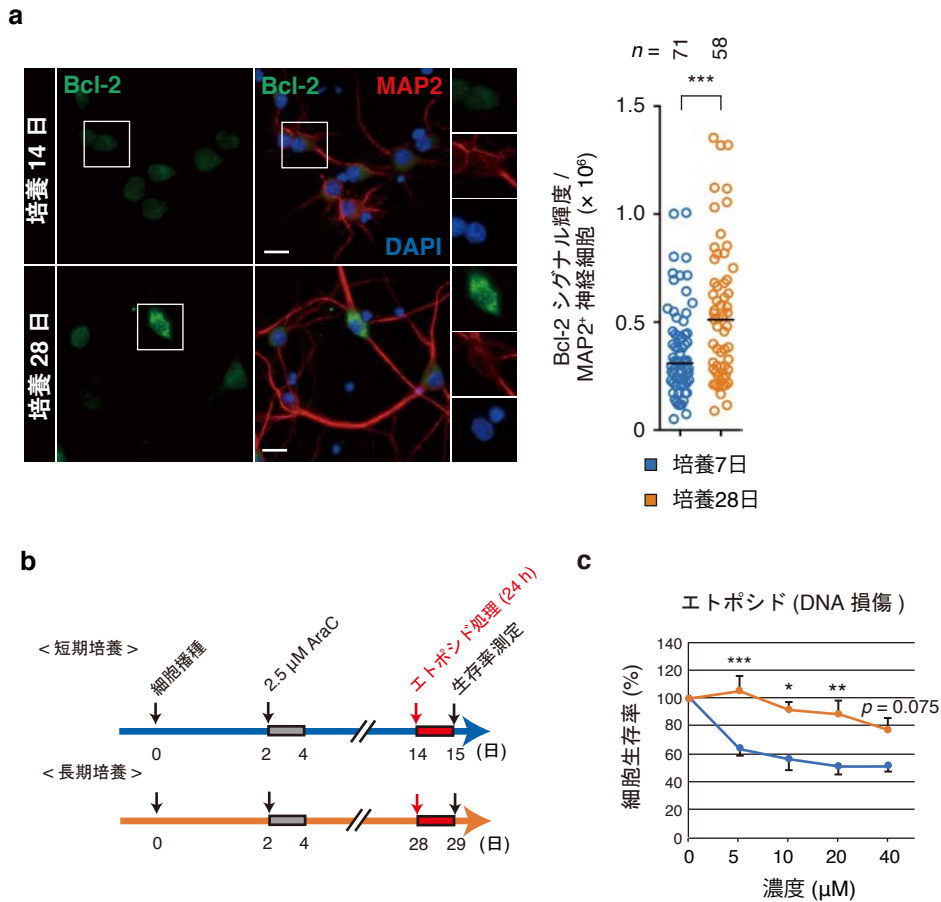


図 3-31. 長期培養した大皮質神経細胞はアポトーシス抵抗性を獲得する

a) 培養 14 日および 28 日目に大脳皮質神経細胞を抗 Bcl-2 抗体(緑)と抗 MAP2 抗体(赤)で染色を行った。顕微鏡画像右には、代表的な実験の神経細胞あたりの Bcl-2 蛋白質のシグナル輝度およびその中央値をドットプロットで示した。スケールバー、40 μm 。長期培養で大脳皮質神経細胞における Bcl-2 蛋白質の量が増加していた。

b) 培養 14 日目または 28 日目にある大脳皮質神経細胞でのエトポシド感受性のタイムテーブルを示した。

c) (b)にある通り、培養 14 日目と 28 日目の細胞でエトポシド処理後(16 μM 、24 時間)、培養 8 日および 29 日目で細胞生存率を CellTiterGlo-kit を用いて測定した($n = 4$)。それぞれの培養日時点において、ストレス未処理条件(0 μM / 溶媒)における細胞の生存率を 100%とした。長期間培養した大脳皮質神経細胞はアポトーシスに抵抗を示した。

(a)ではマン・ホイットニー-U 検定、(c)では両側二元配置分散分析を用いた(* $p < 0.0056$; ** $p < 0.0032$; *** $p = 0.0011$)。

第四章

考察

本研究では、初代培養ラット神経細胞の長期間培養を行い、それら終末分化細胞が分裂細胞で定義されてきた古典的細胞老化に極めて類似した状態に至ることを見出した(図4-1)。またその研究過程で、生理的・病的加齢に特徴的な所見が観察されることを示した。長期培養で誘導される神経細胞老化は、培養日数の経過とともに出現する蛋白質恒常性の破綻とそれに伴うA β 病変と関連することが明らかとなった。さらに、老化した神経細胞は、老化したヒト線維芽細胞と同様に、さまざまなストレスに対して抵抗性を獲得しており、細胞老化の神経細胞保護への関与が示唆された。以上の結果、細胞老化は神経細胞においても非致死性ストレスで誘導される適応応答であることが示唆された。本研究では、生体脳組織で老化神経細胞の存在を示すデータはまだ得られていないが、細胞老化はその老化関連ストレス抵抗性をもって、ADのような蛋白質毒性ストレス誘発性の神経細胞変性疾患の進展を防ぐ役割を果たしている可能性が考えられる。

4-1 蛋白質恒常性の破綻と細胞老化誘導

これまで、細胞老化とは、再生組織にあって、テロメア短小化や Ras がん遺伝子活性化など、非致死性ストレスに伴う持続性の DNA 傷害が引き起こす正常分裂細胞の非可逆的な細胞周期の停止として理解されている(Kuilman T *et al.*, 2010; Salama R *et al.*, 2014)。老化細胞を判定する際、その非可逆性の評価は困難であるため、細胞周期停止のほか、多岐にわたる特徴的な細胞形質の変化、すなわち細胞老化表現型を示すことが必要である。本研究では、細胞周期を静止期で停止した初代培養ラット神経細胞においても培養日数の経過に伴い、SA- β -gal 活性、p16 発現上昇、lamin B1 減少ならびに SASP といった細胞老化表現型の多くが検出されることを示した(図 3-1b, 2, 3)(Moreno-Blas D *et al.*, 2019)。しかし、予想に反して、長期培養海馬神経細胞は DNA 二本鎖切断の顕著な蓄積を示さないことが判明した(図 3-9a, 11a-d)。一方で、それら細胞は加齢脳に特徴的な蛋白質恒常性の破綻をきたし、初期 AD 病変を呈した(図 3-12, 13)。また、A β 結合低分子(EPPS)処理は、長期培養誘導性の蛋白質恒常性の破綻および神経細胞老化を抑制する一方で(図 3-17)、家族性 AD の原因となる点突然変異を有するヒト APP (hAPP Swe/Ind) の異所的過剰発現あるいは組換えヒト A β ₄₂ への曝露は、それら細胞老化の誘導を促すことが示唆された(図 3-18)。これまでに、ヒト気管支上皮細胞(Chong M *et al.*, 2018)、ヒト臍帯静脈内皮細胞(Donnini S *et al.*, 2010)、マウス神経膠細胞(Bussian TJ *et al.*, 2018)およびマウス神経幹細胞/前駆細胞(He N *et al.*, 2013; Zhang P *et al.*, 2019)において、AD 関連蛋白質毒性ストレスによる細胞老化の誘導が報告されている。したがって、本研究で見出した長期培養ラット神経細胞における細胞老化様の現象は、AD 関連蛋白質毒性ストレスを伴う蛋白質恒常性の破綻に起因する可能性がある。一般に、二量体や三量体などの可溶性 A β 重合体が、その単量体やアミロイド線維と比較して、特に高い細胞毒性を与えると考えられており(Palop JJ & Mucke L, 2010; Benilova I *et al.*, 2012; Sengupta U *et al.*, 2016)、それらの神経細胞老化への寄与を実験的に決定することは今後の課題である。また、孤発性 AD において、A β 病変は、神経細胞の活動制御やそれら細胞の保護を目

的とした生理的な APP 代謝の結果として、副次的に生じうる(図 1-2a) (Muller UC *et al.*, 2017)。これと一致して、長期培養神経細胞では KCl 応答性(神経細胞活動)の増強および A β 沈着が観察されたことから(図 3-5, 12)、たとえば神経保護作用を有する APPs α や AICD など (Muller UC *et al.*, 2017)、機能的な APP 代謝産物が神経細胞老化の誘導または維持に重要であるか検討することは興味深い。

さまざまなヒト正常分裂細胞(線維芽細胞、網膜上皮細胞ならびに口腔角化細胞)で、ラパマイシンによる mTOR 経路の遮断が細胞老化を回避することはすでに報告されており (Leontieva OV & Blagosklonny MV, 2010; Iglesias-Bartolome R *et al.*, 2012)、長期培養神経細胞においてもラパマイシン処理は同様の効果を示した(図 3-19, 25, 26)。それに加え、持続的な mTOR 経路阻害により、蛋白質恒常性が顕著に改善した(図 3-21, 25)。また、ヒトおよびマウス線維芽細胞において、mTORC1 の恒常的活性化は、DDR 非依存のかつ p53-p21 経路または p16 依存的に細胞老化を誘導することが知られている (Alimonti A *et al.*, 2010; Astle AW *et al.*, 2012; Barilari M *et al.*, 2017)。それらの研究では、4E-BP1/2 と S6K が p53-p21 経路と p16 発現上昇の誘導にそれぞれ選択的に寄与しているとされる (Petroulakis E *et al.*, 2009; Astle AW *et al.*, 2012; Barilari M *et al.*, 2017)。A β はその蛋白質毒性ストレスを mTOR 経路に影響しうることから (Caccamo A *et al.*, 2010; Baik SH *et al.*, 2019)、神経細胞老化が長期培養で誘導される際、mTOR/S6K 経路が蛋白質恒常性破綻に応答して p16 誘導に貢献している可能性が考えられる(図 3-2b, c, 17b, 18d)。以上の知見を踏まえ、本研究において、神経細胞の細胞老化様の現象が、細胞周期停止を除く、分裂細胞の細胞老化に特徴的な性質を示すこと、また、それらふたつの現象が共通の分子基盤(すなわち、mTOR 経路が中核をなす蛋白質恒常性維持機構)で制御されることが明らかとなった。このことは、古典的細胞老化の概念が終末分化細胞に拡張可能であることを強く示唆する。本研究で得られた全ての知見は、脳老化過程を模した試験管内培養系で得られた観察結果に依拠したものではあるが、蛋白質恒常性の変容・破綻は脳老化の最も重要な要因であることから、加齢脳においても、神経細胞老化が長期培養誘導性のそれと同様の分子機構を介して起こると予想される。

4-2 神経細胞老化と脳老化

近年、A β 病変およびタウ病変によって老化した非神経細胞(それぞれ、乏突起膠芽細胞と神経膠細胞)が、AD 前臨床段階から症候性段階への臨床的進展に寄与することが AD モデルマウスを用いた実験で明らかとなった (Zhang P *et al.*, 2019; Bussian TJ *et al.*, 2018)。いずれの報告も、低分子化合物の投与(細胞老化解除の標的としてこれらの研究では、Src チロシンキナーゼ阻害剤ダサチニブと Bcl-2/Bcl-xL などの阻害剤ケルセチンが用いられている)、あるいは INK-ATTAC システム(序論 1-3 参照)によって、p16 陽性老化細胞を AD マウス脳組織から排除した際、病理所見および認知機能の改善を認めることを実験的根拠とする。AD のほか、アテローム性硬化症 (Childs BG *et al.*, 2016)、I 型糖尿病 (Thompson PJ

et al., 2019)、骨粗鬆症 (Farr JN *et al.*, 2017) においても、同様の細胞老化の寄与が報告されており、今日、細胞老化は生理的か病的かによらず、個体老化の原因であると理解されている (Muñoz-Espín D & Serrano M, 2014; van Deursen JM, 2016)。

AD は緩徐進行性の神経変性疾患であり、その病的過程において、A β 病変およびタウ病変といった病理学的変化は、認知症発症の転帰を辿る神経細胞障害に数十年先立って起こる。つまり、それら AD 病変は必ずしも神経細胞脱落と相関を示さないことから、発症前段階にある加齢脳では、終末分化した神経細胞は何らかの適応応答により保護される必要がある。重要なことに、本研究において、A β 病変および蛋白質恒常性の破綻に対する適応応答として、初代培養神経細胞の細胞老化が誘導されるだけでなく (図 3-2, 3, 17-19)、細胞老化は、遺伝毒性、酸化ならびに蛋白質毒性ストレスに対する抵抗性を神経細胞に賦与することを見出した (図 3-27-29, 図 4-1)。したがって、本来、分裂細胞の細胞老化ががん抑制機構として適応的に機能するように、終末分化細胞のそれは、新たな細胞自律的な神経細胞保護機構として、無症候段階から MCI や AD 発症への進展を阻止していると期待される。長期培養神経細胞において核内に局在する REST が蓄積していた結果は、この仮説を支持する (図 3-4, 24f) (Lu T *et al.*, 2014)。また、それら細胞で Bcl-2 が高発現していることから (図 3-28, 31)、本研究で得られた結果は、今日老化細胞除去化合物として広く受容されている Bcl-2 阻害剤の投与による抗老化作用に対して警鐘をならすものである (Chang J *et al.*, 2016; Yosef R *et al.*, 2016; Zhu Y *et al.*, 2016; Wang L *et al.*, 2017; Thompson PJ *et al.*, 2019; Zhang P *et al.*, 2019; Ogrodnik M *et al.*, 2019)。

AD 脳では、静止期にあるはずの神経細胞で細胞周期の部分的活性化が認められ、それが病的神経細胞死の引き金となることが示唆されており (Greene L *et al.*, 2004; Herrup K *et al.*, 2004)、その機序解明は関心を持たれる。実際に、予備的な実験により、DNA 損傷で誘起されるアポトーシスの頻度が、S 期マーカーの PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 陽性を示す神経細胞の出現頻度と相関することを確認した (図 4-2)。興味深いことに、近年、一旦は老化したメラノサイトが、ヒストン脱ジメチル化酵素 LSD1 (Lysine-specific demethylase 1) および JMJD2C (jumonji C domain-containing oxygenase D2C) の後天的獲得による SAHF 消失を経て (序論 1-8 参照)、細胞周期停止を脱し、がん悪性化 (細胞周期の再活性化) に寄与することが報告された (Yu Y *et al.*, 2018)。したがって、今後の研究の進展が待たれるところであるが、脳老化スペクトラムは、可逆的な細胞周期停止 (静止期)、非可逆的な細胞周期停止 (細胞老化)、部分的な細胞周期活性化 (神経細胞死) という、連続した神経細胞の細胞周期の状態遷移として理解できるかもしれない (図 4-3)。p16 は細胞老化の非可逆性 (安定的な細胞周期の停止) に必須であることから (Beauséjour CM *et al.*, 2003)、その下流因子である CDK4/6 を標的とする分子標的薬、または既存の抗がん剤 (リボシクリブなど) は AD 治療薬として応用できる可能性がある。

AD 関連蛋白質毒性に付随して起こる炎症反応は、AD 病態悪化をきたす要因であるとされ、主に神経膠細胞や小膠細胞の寄与が大きいとされる。しかし、AD 患者の海馬神経細胞

で Cxcl1 が亢進していること、またそれがタウ病変を促進しうることがわかっている (Xia MQ *et al.*, 2002)。これと一致して、本研究において、長期培養で誘導される神経細胞老化は SASP(Cxcl1, Igfbps, Pai-1)を呈することが明らかとなり(図 3-3a-c, 24d)、そのうち Cxcl1 産生増強は老化神経細胞を特徴付ける有用な指標となる可能性が示唆された(図 3-3c)。これまでに、分裂細胞の細胞老化では、分泌された Cxcl1 はその受容体である CXCR2(CXC chemokine receptor 2)を介して、周囲にある細胞の細胞老化を引き起こすことが報告されている(Acosta J *et al.*, 2008; Yang G *et al.*, 2006)。このような細胞非自律的な細胞老化制御機構が老化神経細胞においても存在するかについて検証の余地があるが、神経細胞老化における SASP は、古典的細胞老化と同様に、その時間的空間的支配に依存して、組織恒常性に対する拮抗的な多面性、すなわち短期的保護作用(細胞老化誘導)ならびに長期的破壊作用(AD 病態進展)を発揮している可能性がある。したがって、Cxcl1 は前臨床段階における AD 治療の分子標的の候補になり得ると考えられる。

これまでこのような適応的側面を重視した終末分化細胞の細胞老化に関する研究はなく、本研究で明らかにした細胞老化関連ストレス抵抗性に資する細胞生存シグナルの解明は、老化神経細胞が維持される分子機構の理解を深め、さらには A β 病変やタウ病変を標的とする従来の治療とは一線を画する新規治療法の開発および AD の早期治療的介入に役立つ可能性がある。また、本研究で得られた知見は、海馬神経細胞や大脳皮質神経細胞ばかりでなく、他の領域にある神経細胞においても適用できる可能性があり (Riessland M *et al.*, 2019)、さらにはヒト老化脳でも観察しうることから (Xia MQ *et al.*, 2002; Lu T *et al.*, 2014; Kang C *et al.*, 2015)、AD 以外の神経変性疾患(パーキンソン病、ハンチントン病ならびに筋萎縮性側索硬化症)の治療法確立にも貢献するかもしれない。しかしながら、ここで議論したような細胞老化が神経細胞保護機構として実際に生体脳組織で起こりうるのかは現在のところ不明である。したがって、疾患モデル生物および病理検体において、加齢または AD 病変に伴う老化神経細胞の蓄積・脱落を検出することが刻下の課題である。

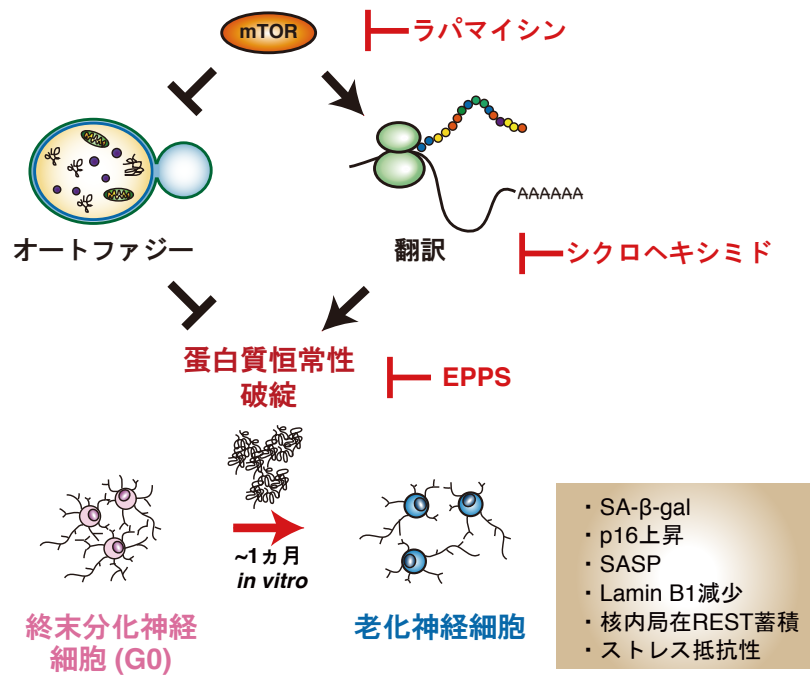


図 4-1. 蛋白質恒常性破綻は終末分化した神経細胞において細胞老化を誘導する

海馬または大脳皮質に由来する神経細胞は、長期間培養することで、生理的または病的老化脳で認める加齢性変化および古典的な細胞老化表現型を呈するようになる。培養日数の経過によるそれら細胞形質の変化は、AD 初期病変を伴う蛋白質恒常性の破綻に起因する。重要なことに、薬理的介入 (EPPS、ラパマイシンあるいはシクロヘキシミド処理) による蛋白質毒性ストレスの軽減は、長期培養で誘導される神経細胞の細胞老化様の現象を消失させる。また、老化した神経細胞は種々のストレスに抵抗性を示す。したがって、本研究で得られた結果から、終末分化細胞の細胞老化が、加齢依存的に増大するストレスに対する適応応答として、細胞自律的な神経細胞の保護に寄与している可能性が示唆された。また、細胞老化は、生理的な脳老化の過程において、神経細胞を生涯維持するための生存戦略の一つとしても期待される。

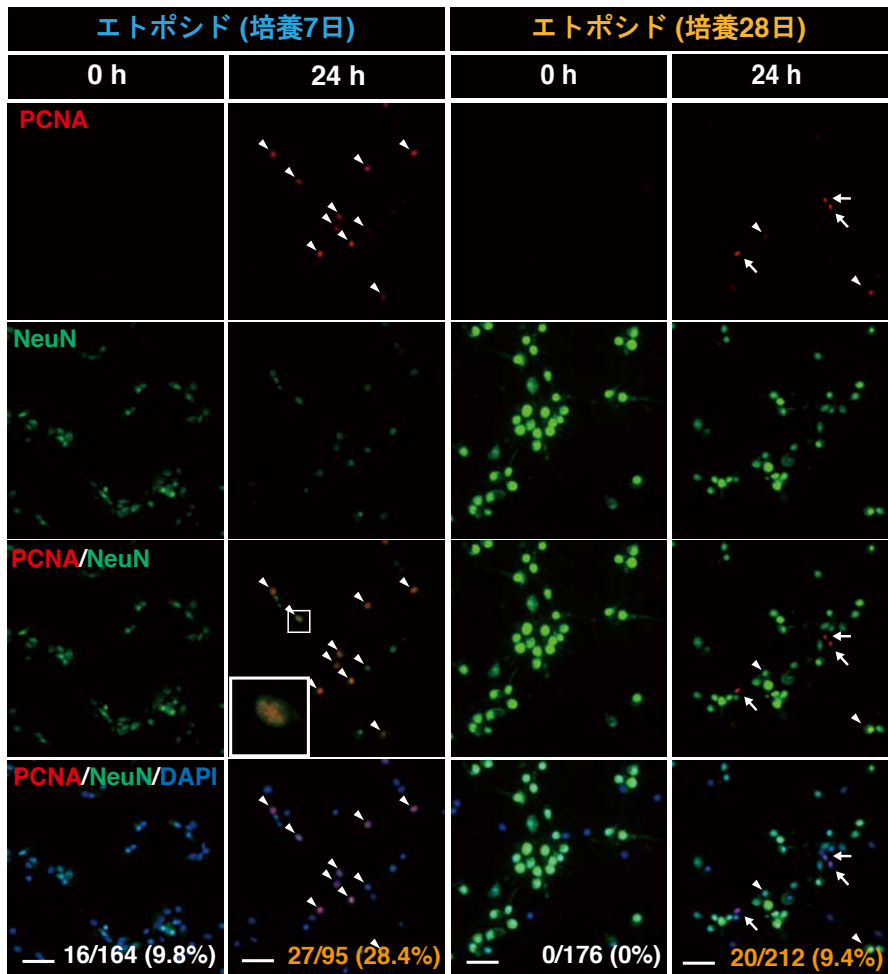


図 4-2. 短期培養神経細胞ではストレス処理により S 期マーカーの発現が亢進する
 培養 7 日および 28 日目の海馬神経細胞をエトポシドで処理 (16 μ M、24 時間) した後、細胞を固定した。各細胞を抗 PCNA 抗体 (赤) と抗 NeuN 抗体 (緑) で染色した。矢頭で PCNA 陽性神経細胞を示し、矢印では PCNA 陽性非神経細胞を示した。最下段図中に PCNA 陽性神経細胞の頻度 (PCNA⁺/NeuN⁺) を示した ($n = 95 \sim 212$)。培養 7 日目では、エトポシド処理後に PCNA 陽性神経細胞数が顕著に増加した。

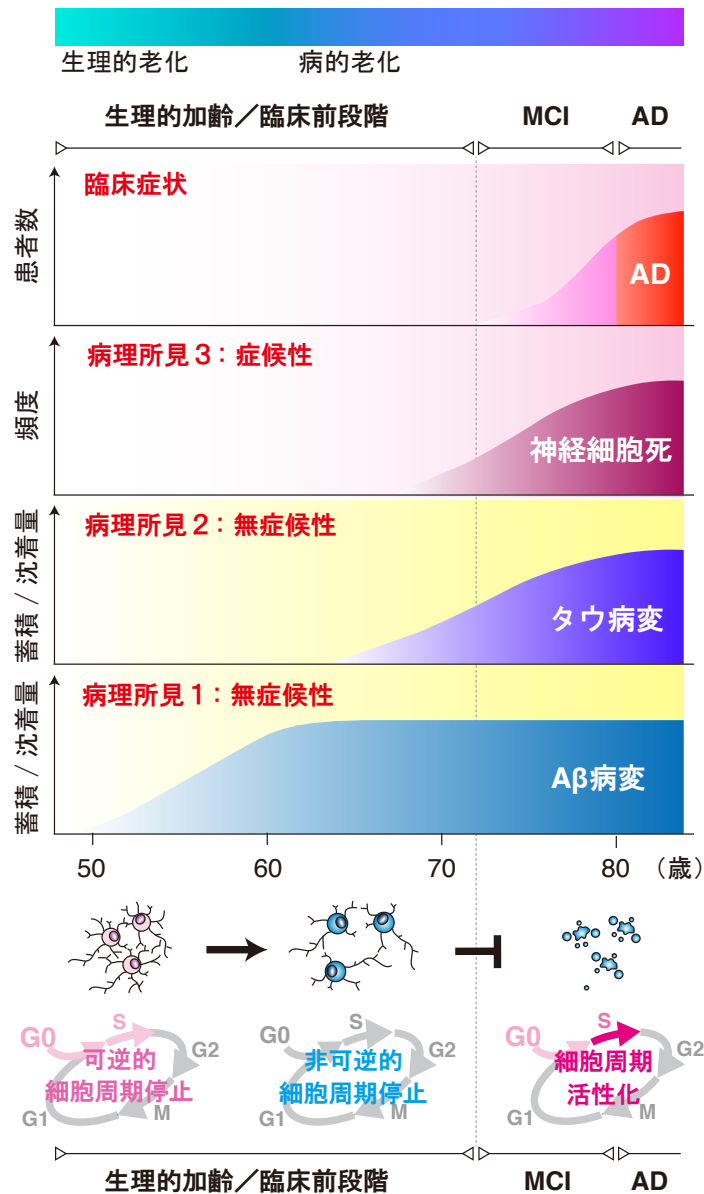


図 4-3 神経細胞における細胞周期の状態遷移と脳老化（モデル）

若齢または生理的に老化した脳組織（AD 病理三大所見（老人斑沈着、神経原線維変化と神経細胞死）陰性）では、神経細胞は細胞周期の休止期（G0 期）にある。無症候期である AD 前臨床段階では、Aβ およびタウ病変による病的蛋白質ストレスが亢進しており、このような AD 関連ストレス下では、神経細胞は細胞老化しており、非可逆的な細胞周期停止状態となる。また、それら老化神経細胞はストレス抵抗性を示すため、前臨床段階では嗅内野および海馬領域における神経細胞数は保持される。しかし、さらなる AD 蛋白質毒性ストレスの増加、炎症反応の亢進、またはこれまでに明らかになっていない後天的な獲得形質によって、それら老化神経細胞で細胞周期の部分的な活性化が生じると、それら細胞は臨床的進展をきたす細胞死に至ると予想される。

参考文献

- Acosta, J.C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J.P., Athineos, D., Kang, T.W., Lasitschka, F., Andrusis, M., et al. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature cell biology* 15, 978-990.
- Acosta, J.C., O'Loughlen, A., Banito, A., Guijarro, M.V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., et al. (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* 133, 1006-1018.
- Aird, K.M., Iwasaki, O., Kossenkov, A.V., Tanizawa, H., Fatkhutdinov, N., Bitler, B.G., Le, L., Alicea, G., Yang, T.L., Johnson, F.B., et al. (2016). HMGB2 orchestrates the chromatin landscape of senescence-associated secretory phenotype gene loci. *The Journal of cell biology* 215, 325-334.
- Alimonti, A., Nardella, C., Chen, Z., Clohessy, J.G., Carracedo, A., Trotman, L.C., Cheng, K., Varmeh, S., Kozma, S.C., Thomas, G., et al. (2010). A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation* 120, 681-693.
- Anderson, R., Lagnado, A., Maggiorani, D., Walaszczyk, A., Dookun, E., Chapman, J., Birch, J., Salmonowicz, H., Ogrodnik, M., Jurk, D., et al. (2019). Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence. *The EMBO journal* 38.
- Anisimov, V.N., Zabezhinski, M.A., Popovich, I.G., Piskunova, T.S., Semenchenko, A.V., Tyndyk, M.L., Yurova, M.N., Rosenfeld, S.V., and Blagosklonny, M.V. (2011). Rapamycin increases lifespan and inhibits spontaneous tumorigenesis in inbred female mice. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 10, 4230-4236.
- Astle, M.V., Hannan, K.M., Ng, P.Y., Lee, R.S., George, A.J., Hsu, A.K., Haupt, Y., Hannan, R.D., and Pearson, R.B. (2012). AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene* 31, 1949-1962.
- Baar, M.P., Brandt, R.M.C., Putavet, D.A., Klein, J.D.D., Derks, K.W.J., Bourgeois, B.R.M., Stryeck, S., Rijksen, Y., van Willigenburg, H., Feijtel, D.A., et al. (2017). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* 169, 132-147.e116.
- Baik, S.H., Kang, S., Lee, W., Choi, H., Chung, S., Kim, J.I., and Mook-Jung, I. (2019). A Breakdown in Metabolic Reprogramming Causes Microglia Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Cell metabolism* 30, 493-507.e496.
- Baker, D.J., Childs, B.G., Durik, M., Wijers, M.E., Sieben, C.J., Zhong, J., Saltness, R.A., Jeganathan, K.B., Verzosa, G.C., Pezeshki, A., et al. (2016). Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530, 184-189.
- Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland,

- J.L., and van Deursen, J.M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232-236.
- Baker, J.E., Lim, Y.Y., Pietrzak, R.H., Hassenstab, J., Snyder, P.J., Masters, C.L., and Maruff, P. (2017). Cognitive impairment and decline in cognitively normal older adults with high amyloid-beta: A meta-analysis. *Alzheimer's & dementia (Amsterdam, Netherlands)* 6, 108-121.
- Ballas, N., and Mandel, G. (2005). The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Current opinion in neurobiology* 15, 500-506.
- Barilari, M., Bonfils, G., Treins, C., Koka, V., De Villeneuve, D., Fabrega, S., and Pende, M. (2017). ZRF1 is a novel S6 kinase substrate that drives the senescence programme. *The EMBO journal* 36, 736-750.
- Bartlett, B.J., Isakson, P., Lewerenz, J., Sanchez, H., Kotzebue, R.W., Cumming, R.C., Harris, G.L., Nezis, I.P., Schubert, D.R., Simonsen, A., et al. (2011). p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects. *Autophagy* 7, 572-583.
- Beaudoin, G.M., 3rd, Lee, S.H., Singh, D., Yuan, Y., Ng, Y.G., Reichardt, L.F., and Arikath, J. (2012). Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nature protocols* 7, 1741-1754.
- Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO journal* 22, 4212-4222.
- Benilova, I., Karran, E., and De Strooper, B. (2012). The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nature neuroscience* 15, 349-357.
- Bennett, D.A., Schneider, J.A., Arvanitakis, Z., Kelly, J.F., Aggarwal, N.T., Shah, R.C., and Wilson, R.S. (2006). Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology* 66, 1837-1844.
- Bertrand, S.J., Aksenova, M.V., Aksenov, M.Y., Mactutus, C.F., and Booze, R.M. (2011). Endogenous amyloidogenesis in long-term rat hippocampal cell cultures. *BMC neuroscience* 12, 38.
- Bjedov, I., Toivonen, J.M., Kerr, F., Slack, C., Jacobson, J., Foley, A., and Partridge, L. (2010). Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell metabolism* 11, 35-46.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science (New York, NY)* 279, 349-352.
- Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S., and Schreiber, S.L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369, 756-758.

- Bussian, T.J., Aziz, A., Meyer, C.F., Swenson, B.L., van Deursen, J.M., and Baker, D.J. (2018). Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* 562, 578-582.
- Caccamo, A., Majumder, S., Richardson, A., Strong, R., and Oddo, S. (2010). Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *The Journal of biological chemistry* 285, 13107-13120.
- Cafferkey, R., Young, P.R., McLaughlin, M.M., Bergsma, D.J., Koltin, Y., Sathe, G.M., Faucette, L., Eng, W.K., Johnson, R.K., and Livi, G.P. (1993). Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Molecular and cellular biology* 13, 6012-6023.
- Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N.E., Ding, S., Feng, W., et al. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nature medicine* 22, 78-83.
- Chaturvedi, V., Qin, J.Z., Denning, M.F., Choubey, D., Diaz, M.O., and Nickoloff, B.J. (1999). Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* 274, 23358-23367.
- Chen, G., Chen, K.S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S.J., Justice, A., McConlogue, L., Games, D., Freedman, S.B., et al. (2000). A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 975-979.
- Chen, Q., and Ames, B.N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 4130-4134.
- Childs, B.G., Baker, D.J., Kirkland, J.L., Campisi, J., and van Deursen, J.M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO reports* 15, 1139-1153.
- Childs, B.G., Baker, D.J., Wijshake, T., Conover, C.A., Campisi, J., and van Deursen, J.M. (2016). Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science (New York, NY)* 354, 472-477.
- Childs, B.G., Durik, M., Baker, D.J., and van Deursen, J.M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature medicine* 21, 1424-1435.
- Chong, M., Yin, T., Chen, R., Xiang, H., Yuan, L., Ding, Y., Pan, C.C., Tang, Z., Alexander, P.B., Li, Q.J., et al. (2018). CD36 initiates the secretory phenotype during the establishment of cellular senescence. *EMBO reports* 19.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., et al. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.
- Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature*

- reviews *Cancer* 10, 51-57.
- Coppe, J.P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Munoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology* 6, 2853-2868.
- Correia-Melo, C., Marques, F.D., Anderson, R., Hewitt, G., Hewitt, R., Cole, J., Carroll, B.M., Miwa, S., Birch, J., Merz, A., et al. (2016). Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *The EMBO journal* 35, 724-742.
- Criscione, S.W., Teo, Y.V., and Neretti, N. (2016). The Chromatin Landscape of Cellular Senescence. *Trends in genetics : TIG* 32, 751-761.
- Cuervo, A.M. (2008). Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends in genetics : TIG* 24, 604-612.
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194-198.
- Dai, S., Tang, Z., Cao, J., Zhou, W., Li, H., Sampson, S., and Dai, C. (2015). Suppression of the HSF1-mediated proteotoxic stress response by the metabolic stress sensor AMPK. *The EMBO journal* 34, 275-293.
- de Keizer, P.L., Packer, L.M., Szypowska, A.A., Riedl-Polderman, P.E., van den Broek, N.J., de Bruin, A., Dansen, T.B., Marais, R., Brenkman, A.B., and Burgering, B.M. (2010). Activation of forkhead box O transcription factors by oncogenic BRAF promotes p21cip1-dependent senescence. *Cancer research* 70, 8526-8536.
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., Laberge, R.M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dolle, M.E., et al. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental cell* 31, 722-733.
- Demidenko, Z.N., Zubova, S.G., Bukreeva, E.I., Pospelov, V.A., Pospelova, T.V., and Blagosklonny, M.V. (2009). Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 8, 1888-1895.
- Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., and Wahl, G.M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & development* 8, 2540-2551.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-642.
- Di Mitri, D., and Alimonti, A. (2016). Non-Cell-Autonomous Regulation of Cellular Senescence in Cancer. *Trends in cell biology* 26, 215-226.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M.,

- Rubelj, I., Pereira-Smith, O., et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9363-9367.
- Dong, W., Cheng, S., Huang, F., Fan, W., Chen, Y., Shi, H., and He, H. (2011). Mitochondrial dysfunction in long-term neuronal cultures mimics changes with aging. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 17, Br91-96.
- Donnini, S., Solito, R., Cetti, E., Corti, F., Giachetti, A., Carra, S., Beltrame, M., Cotelli, F., and Ziche, M. (2010). Abeta peptides accelerate the senescence of endothelial cells in vitro and in vivo, impairing angiogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 2385-2395.
- Donohue, M.C., Sperling, R.A., Petersen, R., Sun, C.K., Weiner, M.W., and Aisen, P.S. (2017). Association Between Elevated Brain Amyloid and Subsequent Cognitive Decline Among Cognitively Normal Persons. *Jama* 317, 2305-2316.
- Evangelou, K., Lougiakis, N., Rizou, S.V., Kotsinas, A., Kletsas, D., Munoz-Espin, D., Kastrinakis, N.G., Pouli, N., Marakos, P., Townsend, P., et al. (2017). Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens. *Aging cell* 16, 192-197.
- Faget, D.V., Ren, Q., and Stewart, S.A. (2019). Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nature reviews Cancer* 19, 439-453.
- Farr, J.N., Fraser, D.G., Wang, H., Jaehn, K., Ogrodnik, M.B., Weivoda, M.M., Drake, M.T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N.K., Kirkland, J.L., et al. (2016). Identification of Senescent Cells in the Bone Microenvironment. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 31, 1920-1929.
- Farr, J.N., Xu, M., Weivoda, M.M., Monroe, D.G., Fraser, D.G., Onken, J.L., Negley, B.A., Sfeir, J.G., Ogrodnik, M.B., Hachfeld, C.M., et al. (2017). Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nature medicine* 23, 1072-1079.
- Fjell, A.M., McEvoy, L., Holland, D., Dale, A.M., and Walhovd, K.B. (2014). What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Progress in neurobiology* 117, 20-40.
- Foster, T.C. (2012). Dissecting the age-related decline on spatial learning and memory tasks in rodent models: N-methyl-D-aspartate receptors and voltage-dependent Ca²⁺ channels in senescent synaptic plasticity. *Progress in neurobiology* 96, 283-303.
- Freund, A., Laberge, R.M., Demaria, M., and Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Molecular biology of the cell* 23, 2066-2075.
- Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J.M., Bucci, G., Dobрева, M., Matti, V., Beausejour, C.M., et al. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature cell biology* 14, 355-365.

- Garcia-Prat, L., Martinez-Vicente, M., Perdiguerro, E., Ortet, L., Rodriguez-Ubreva, J., Rebollo, E., Ruiz-Bonilla, V., Gutarra, S., Ballestar, E., Serrano, A.L., et al. (2016). Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature* 529, 37-42.
- Gaubitz, C., Oliveira, T.M., Prouteau, M., Leitner, A., Karuppasamy, M., Konstantinidou, G., Rispal, D., Eltschinger, S., Robinson, G.C., Thore, S., et al. (2015). Molecular Basis of the Rapamycin Insensitivity of Target Of Rapamycin Complex 2. *Molecular cell* 58, 977-988.
- Geng, Y.Q., Guan, J.T., Xu, X.H., and Fu, Y.C. (2010). Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons. *Biochemical and biophysical research communications* 396, 866-869.
- Gorbunova, V., Seluanov, A., and Pereira-Smith, O.M. (2002). Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *The Journal of biological chemistry* 277, 38540-38549.
- Greene, L.A., Biswas, S.C., and Liu, D.X. (2004). Cell cycle molecules and vertebrate neuron death: E2F at the hub. *Cell death and differentiation* 11, 49-60.
- Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., and Barbacid, M. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer cell* 4, 111-120.
- Hansen, M., Taubert, S., Crawford, D., Libina, N., Lee, S.J., and Kenyon, C. (2007). Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging cell* 6, 95-110.
- Haq, R., Brenton, J.D., Takahashi, M., Finan, D., Finkielsztejn, A., Damaraju, S., Rottapel, R., and Zanke, B. (2002). Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence. *Cancer research* 62, 5076-5082.
- Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, NY)* 256, 184-185.
- Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
- Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S., et al. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460, 392-395.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* 25, 585-621.
- He, N., Jin, W.L., Lok, K.H., Wang, Y., Yin, M., and Wang, Z.J. (2013). Amyloid-beta(1-42) oligomer accelerates senescence in adult hippocampal neural stem/progenitor cells via formylpeptide receptor 2. *Cell death & disease* 4, e924.
- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening

- triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Molecular cell* 14, 501-513.
- Herranz, N., Gallage, S., Mellone, M., Wuestefeld, T., Klotz, S., Hanley, C.J., Raguz, S., Acosta, J.C., Innes, A.J., Banito, A., et al. (2015). mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nature cell biology* 17, 1205-1217.
- Herrup, K., Neve, R., Ackerman, S.L., and Copani, A. (2004). Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 9232-9239.
- Hewitt, G., Jurk, D., Marques, F.D., Correia-Melo, C., Hardy, T., Gackowska, A., Anderson, R., Taschuk, M., Mann, J., and Passos, J.F. (2012). Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nature communications* 3, 708.
- Hipp, M.S., Kasturi, P., and Hartl, F.U. (2019). The proteostasis network and its decline in ageing. *Nature reviews Molecular cell biology* 20, 421-435.
- Hoffmann, J., Haendeler, J., Aicher, A., Rossig, L., Vasa, M., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2001). Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circulation research* 89, 709-715.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular biology of the cell* 20, 1981-1991.
- Iglesias-Bartolome, R., Patel, V., Cotrim, A., Leelahavanichkul, K., Molinolo, A.A., Mitchell, J.B., and Gutkind, J.S. (2012). mTOR inhibition prevents epithelial stem cell senescence and protects from radiation-induced mucositis. *Cell stem cell* 11, 401-414.
- Itahana, K., Campisi, J., and Dimri, G.P. (2004). Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* 5, 1-10.
- Itakura, E., and Mizushima, N. (2011). p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *The Journal of cell biology* 192, 17-27.
- Itoh, S.G., Yagi-Utsumi, M., Kato, K., and Okumura, H. (2019). Effects of a Hydrophilic/Hydrophobic Interface on Amyloid-beta Peptides Studied by Molecular Dynamics Simulations and NMR Experiments. *The journal of physical chemistry B* 123, 160-169.
- Iwasa, H., Han, J., and Ishikawa, F. (2003). Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 8, 131-144.
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Chishti, M.A., Horne, P., Heslin, D., French, J., et al. (2000). A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 979-982.
- Johnson, S.C., Rabinovitch, P.S., and Kaerberlein, M. (2013). mTOR is a key modulator of ageing and

- age-related disease. *Nature* 493, 338-345.
- Jun, J.I., and Lau, L.F. (2010). The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nature cell biology* 12, 676-685.
- Jurk, D., Wang, C., Miwa, S., Maddick, M., Korolchuk, V., Tzolou, A., Gonos, E.S., Thrasivoulou, C., Saffrey, M.J., Cameron, K., et al. (2012). Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging cell* 11, 996-1004.
- Kaeberlein, M., Powers, R.W., 3rd, Steffen, K.K., Westman, E.A., Hu, D., Dang, N., Kerr, E.O., Kirkland, K.T., Fields, S., and Kennedy, B.K. (2005). Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science (New York, NY)* 310, 1193-1196.
- Kang, C., Xu, Q., Martin, T.D., Li, M.Z., Demaria, M., Aron, L., Lu, T., Yankner, B.A., Campisi, J., and Elledge, S.J. (2015). The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science (New York, NY)* 349, aaa5612.
- Kapahi, P., Zid, B.M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V., and Benzer, S. (2004). Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Current biology : CB* 14, 885-890.
- Karlseder, J., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science (New York, NY)* 295, 2446-2449.
- Kim, H.Y., Kim, H.V., Jo, S., Lee, C.J., Choi, S.Y., Kim, D.J., and Kim, Y. (2015). EPPS rescues hippocampus-dependent cognitive deficits in APP/PS1 mice by disaggregation of amyloid-beta oligomers and plaques. *Nature communications* 6, 8997.
- Kirkland, J.L., and Tchkonian, T. (2017). Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine* 21, 21-28.
- Kiyono, T., Foster, S.A., Koop, J.I., McDougall, J.K., Galloway, D.A., and Klingelutz, A.J. (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396, 84-88.
- Kolesnichenko, M., Hong, L., Liao, R., Vogt, P.K., and Sun, P. (2012). Attenuation of TORC1 signaling delays replicative and oncogenic RAS-induced senescence. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 11, 2391-2401.
- Kortlever, R.M., Higgins, P.J., and Bernards, R. (2006). Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nature cell biology* 8, 877-884.
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R.A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., and Lowe, S.W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 134, 657-667.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes & development* 24, 2463-2479.
- Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required

- for G1 progression. *Cell* 73, 585-596.
- Laberge, R.M., Sun, Y., Orjalo, A.V., Patil, C.K., Freund, A., Zhou, L., Curran, S.C., Davalos, A.R., Wilson-Edell, K.A., Liu, S., et al. (2015). mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nature cell biology* 17, 1049-1061.
- Lamming, D.W., Ye, L., Katajisto, P., Goncalves, M.D., Saitoh, M., Stevens, D.M., Davis, J.G., Salmon, A.B., Richardson, A., Ahima, R.S., et al. (2012). Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science (New York, NY)* 335, 1638-1643.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293.
- Leontieva, O.V., and Blagosklonny, M.V. (2010). DNA damaging agents and p53 do not cause senescence in quiescent cells, while consecutive re-activation of mTOR is associated with conversion to senescence. *Aging* 2, 924-935.
- Leontieva, O.V., Natarajan, V., Demidenko, Z.N., Burdelya, L.G., Gudkov, A.V., and Blagosklonny, M.V. (2012). Hypoxia suppresses conversion from proliferative arrest to cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 13314-13318.
- Lim, J., and Yue, Z. (2015). Neuronal aggregates: formation, clearance, and spreading. *Developmental cell* 32, 491-501.
- Long, J.M., and Holtzman, D.M. (2019). Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* 179, 312-339.
- Lu, T., Aron, L., Zullo, J., Pan, Y., Kim, H., Chen, Y., Yang, T.H., Kim, H.M., Drake, D., Liu, X.S., et al. (2014). REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature* 507, 448-454.
- Majumder, S., Caccamo, A., Medina, D.X., Benavides, A.D., Javors, M.A., Kraig, E., Strong, R., Richardson, A., and Oddo, S. (2012). Lifelong rapamycin administration ameliorates age-dependent cognitive deficits by reducing IL-1beta and enhancing NMDA signaling. *Aging cell* 11, 326-335.
- Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., and Kivipelto, M. (2010). Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *The Lancet Neurology* 9, 702-716.
- Marcotte, R., Lacelle, C., and Wang, E. (2004). Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mechanisms of ageing and development* 125, 777-783.
- Medvedik, O., Lamming, D.W., Kim, K.D., and Sinclair, D.A. (2007). MSN2 and MSN4 link calorie restriction and TOR to sirtuin-mediated lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS biology* 5, e261.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720-724.

- Miller, R.A., Harrison, D.E., Astle, C.M., Baur, J.A., Boyd, A.R., de Cabo, R., Fernandez, E., Flurkey, K., Javors, M.A., Nelson, J.F., et al. (2011). Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 66, 191-201.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140, 313-326.
- Moreno-Blas, D., Gorostieta-Salas, E., Pommer-Alba, A., Mucino-Hernandez, G., Geronimo-Olvera, C., Maciel-Baron, L.A., Konigsberg, M., Massieu, L., and Castro-Obregon, S. (2019). Cortical neurons develop a senescence-like phenotype promoted by dysfunctional autophagy. *Aging* 11, 6175-6198.
- Morgan, S.L., and Teyler, T.J. (1999). VDCCs and NMDARs underlie two forms of LTP in CA1 hippocampus in vivo. *Journal of neurophysiology* 82, 736-740.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., and Lannfelt, L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nature genetics* 1, 345-347.
- Muller, U.C., Deller, T., and Korte, M. (2017). Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature reviews Neuroscience* 18, 281-298.
- Munoz-Espin, D., Canamero, M., Maraver, A., Gomez-Lopez, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodriguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., et al. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155, 1104-1118.
- Munoz-Espin, D., and Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 482-496.
- Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B., and Benson, M.D. (1991). A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science (New York, NY)* 254, 97-99.
- Nakamura, A.J., Chiang, Y.J., Hathcock, K.S., Horikawa, I., Sedelnikova, O.A., Hodes, R.J., and Bonner, W.M. (2008). Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. *Epigenetics & chromatin* 1, 6.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.
- Narita, M., Young, A.R., Arakawa, S., Samarajiwa, S.A., Nakashima, T., Yoshida, S., Hong, S., Berry, L.S., Reichelt, S., Ferreira, M., et al. (2011). Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science (New York, NY)* 332, 966-970.
- Nicoll, R.A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron* 93, 281-290.
- Ogrodnik, M., Miwa, S., Tchkonina, T., Tiniakos, D., Wilson, C.L., Lahat, A., Day, C.P., Burt, A., Palmer, A., Anstee, Q.M., et al. (2017). Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis.

- Nature communications 8, 15691.
- Ogrodnik, M., Zhu, Y., Langhi, L.G.P., Tchkonina, T., Kruger, P., Fielder, E., Victorelli, S., Ruswhandi, R.A., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., et al. (2019). Obesity-Induced Cellular Senescence Drives Anxiety and Impairs Neurogenesis. *Cell metabolism* 29, 1233.
- Ooi, L., and Wood, I.C. (2007). Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST. *Nature reviews Genetics* 8, 544-554.
- Ovadya, Y., Landsberger, T., Leins, H., Vadai, E., Gal, H., Biran, A., Yosef, R., Sagiv, A., Agrawal, A., Shapira, A., et al. (2018). Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging. *Nature communications* 9, 5435.
- Palop, J.J., and Mucke, L. (2010). Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nature neuroscience* 13, 812-818.
- Parihar, M.S., and Brewer, G.J. (2007). Simultaneous age-related depolarization of mitochondrial membrane potential and increased mitochondrial reactive oxygen species production correlate with age-related glutamate excitotoxicity in rat hippocampal neurons. *Journal of neuroscience research* 85, 1018-1032.
- Parry, A.J., and Narita, M. (2016). Old cells, new tricks: chromatin structure in senescence. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 27, 320-331.
- Petersen, R.C. (2018). How early can we diagnose Alzheimer disease (and is it sufficient)? The 2017 Wartenberg lecture. *Neurology* 91, 395-402.
- Petroulakis, E., Parsyan, A., Dowling, R.J., LeBacquer, O., Martineau, Y., Bidinosti, M., Larsson, O., Alain, T., Rong, L., Mamane, Y., et al. (2009). p53-dependent translational control of senescence and transformation via 4E-BPs. *Cancer cell* 16, 439-446.
- Phung, T.L., Ziv, K., Dabydeen, D., Eyiah-Mensah, G., Riveros, M., Perruzzi, C., Sun, J., Monahan-Earley, R.A., Shiojima, I., Nagy, J.A., et al. (2006). Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. *Cancer cell* 10, 159-170.
- Piechota, M., Sunderland, P., Wysocka, A., Nalberczak, M., Sliwinska, M.A., Radwanska, K., and Sikora, E. (2016). Is senescence-associated beta-galactosidase a marker of neuronal senescence? *Oncotarget* 7, 81099-81109.
- Powers, R.W., 3rd, Kaeberlein, M., Caldwell, S.D., Kennedy, B.K., and Fields, S. (2006). Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes & development* 20, 174-184.
- Prata, L., Ovsyannikova, I.G., Tchkonina, T., and Kirkland, J.L. (2019). Senescent cell clearance by the immune system: Emerging therapeutic opportunities. *Seminars in immunology*, 101275.
- Price, J.L., Ko, A.I., Wade, M.J., Tsou, S.K., McKeel, D.W., and Morris, J.C. (2001). Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Archives of neurology* 58, 1395-

1402.

- Ramirez, R.D., Morales, C.P., Herbert, B.S., Rohde, J.M., Passons, C., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2001). Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes & development* 15, 398-403.
- Reichel, W. (1968). Lipofuscin pigment accumulation and distribution in five rat organs as a function of age. *Journal of gerontology* 23, 145-153.
- Reichel, W., Hollander, J., Clark, J.H., and Strehler, B.L. (1968). Lipofuscin pigment accumulation as a function of age and distribution in rodent brain. *Journal of gerontology* 23, 71-78.
- Riessland, M., Kolisnyk, B., Kim, T.W., Cheng, J., Ni, J., Pearson, J.A., Park, E.J., Dam, K., Acehan, D., Ramos-Espiritu, L.S., et al. (2019). Loss of SATB1 Induces p21-Dependent Cellular Senescence in Post-mitotic Dopaminergic Neurons. *Cell stem cell* 25, 514-530.e518.
- Robida-Stubbs, S., Glover-Cutter, K., Lamming, D.W., Mizunuma, M., Narasimhan, S.D., Neumann-Haefelin, E., Sabatini, D.M., and Blackwell, T.K. (2012). TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell metabolism* 15, 713-724.
- Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *The Journal of cell biology* 192, 547-556.
- Rodier, F., Coppe, J.P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A., Munoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology* 11, 973-979.
- Rodier, F., Munoz, D.P., Teachenor, R., Chu, V., Le, O., Bhaumik, D., Coppe, J.P., Campeau, E., Beausejour, C.M., Kim, S.H., et al. (2011). DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *Journal of cell science* 124, 68-81.
- Rossiello, F., Herbig, U., Longhese, M.P., Fumagalli, M., and d'Adda di Fagagna, F. (2014). Irreparable telomeric DNA damage and persistent DDR signalling as a shared causative mechanism of cellular senescence and ageing. *Current opinion in genetics & development* 26, 89-95.
- Ryu, S.J., Oh, Y.S., and Park, S.C. (2007). Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts. *Cell death and differentiation* 14, 1020-1028.
- Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., and Snyder, S.H. (1994). RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78, 35-43.
- Sabers, C.J., Martin, M.M., Brunn, G.J., Williams, J.M., Dumont, F.J., Wiederrecht, G., and Abraham, R.T. (1995). Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 270, 815-822.
- Sadaie, M., Salama, R., Carroll, T., Tomimatsu, K., Chandra, T., Young, A.R., Narita, M., Perez-

- Mancera, P.A., Bennett, D.C., Chong, H., et al. (2013). Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence. *Genes & development* 27, 1800-1808.
- Sagiv, A., Biran, A., Yon, M., Simon, J., Lowe, S.W., and Krizhanovsky, V. (2013). Granule exocytosis mediates immune surveillance of senescent cells. *Oncogene* 32, 1971-1977.
- Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., and Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes & development* 28, 99-114.
- Sanders, Y.Y., Liu, H., Zhang, X., Hecker, L., Bernard, K., Desai, L., Liu, G., and Thannickal, V.J. (2013). Histone modifications in senescence-associated resistance to apoptosis by oxidative stress. *Redox biology* 1, 8-16.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell* 22, 159-168.
- Sasaguri, H., Nilsson, P., Hashimoto, S., Nagata, K., Saito, T., De Strooper, B., Hardy, J., Vassar, R., Winblad, B., and Saido, T.C. (2017). APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *The EMBO journal* 36, 2473-2487.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., et al. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173-177.
- Schmitt, C.A. (2003). Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nature reviews Cancer* 3, 286-295.
- Seluanov, A., Gorbunova, V., Falcovitz, A., Sigal, A., Milyavsky, M., Zurer, I., Shohat, G., Goldfinger, N., and Rotter, V. (2001). Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Molecular and cellular biology* 21, 1552-1564.
- Sengupta, U., Nilson, A.N., and Kaye, R. (2016). The Role of Amyloid-beta Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine* 6, 42-49.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Shah, P.P., Donahue, G., Otte, G.L., Capell, B.C., Nelson, D.M., Cao, K., Aggarwala, V., Cruickshanks, H.A., Rai, T.S., McBryan, T., et al. (2013). Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape. *Genes & development* 27, 1787-1799.
- Shay, J.W., Pereira-Smith, O.M., and Wright, W.E. (1991). A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Experimental cell research* 196, 33-39.
- Sherman, M.Y., and Qian, S.B. (2013). Less is more: improving proteostasis by translation slow down.

- Trends in biochemical sciences 38, 585-591.
- Shimi, T., Butin-Israeli, V., Adam, S.A., Hamanaka, R.B., Goldman, A.E., Lucas, C.A., Shumaker, D.K., Kosak, S.T., Chandel, N.S., and Goldman, R.D. (2011). The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes & development* 25, 2579-2593.
- Sperling, R., Mormino, E., and Johnson, K. (2014). The evolution of preclinical Alzheimer's disease: implications for prevention trials. *Neuron* 84, 608-622.
- Spilman, P., Podluskaya, N., Hart, M.J., Debnath, J., Gorostiza, O., Bredesen, D., Richardson, A., Strong, R., and Galvan, V. (2010). Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PloS one* 5, e9979.
- Stein, G.H., Drullinger, L.F., Soulard, A., and Dulic, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Molecular and cellular biology* 19, 2109-2117.
- Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., et al. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155, 1119-1130.
- Strehler, B.L., Mark, D.D., and Mildvan, A.S. (1959). GEE MV: Rate and magnitude of age pigment accumulation in the human myocardium. *Journal of gerontology* 14, 430-439.
- Suram, A., Kaplunov, J., Patel, P.L., Ruan, H., Cerutti, A., Boccardi, V., Fumagalli, M., Di Micco, R., Mirani, N., Gurung, R.L., et al. (2012). Oncogene-induced telomere dysfunction enforces cellular senescence in human cancer precursor lesions. *The EMBO journal* 31, 2839-2851.
- Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Current biology : CB* 13, 1549-1556.
- Thompson, P.J., Shah, A., Ntranos, V., Van Gool, F., Atkinson, M., and Bhushan, A. (2019). Targeted Elimination of Senescent Beta Cells Prevents Type 1 Diabetes. *Cell metabolism* 29, 1045-1060.e1010.
- Tseng, B.P., Green, K.N., Chan, J.L., Blurton-Jones, M., and LaFerla, F.M. (2008). Aβ inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiology of aging* 29, 1607-1618.
- van Deursen, J.M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature* 509, 439-446.
- Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Y., Kovacs, A.L., Orosz, L., and Muller, F. (2003). Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* 426, 620.
- Vicorelli, S., and Passos, J.F. (2017). Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. *EBioMedicine* 21, 14-20.
- Vilchez, D., Saez, I., and Dillin, A. (2014). The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nature communications* 5, 5659.
- Voglis, G., and Tavernarakis, N. (2006). The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO reports* 7, 1104-1110.

- von Bartheld, C.S., Bahney, J., and Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *The Journal of comparative neurology* 524, 3865-3895.
- Wang, E. (1995). Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer research* 55, 2284-2292.
- Wang, L., Leite de Oliveira, R., Wang, C., Fernandes Neto, J.M., Mainardi, S., Evers, B., Lieftink, C., Morris, B., Jochems, F., Willemsen, L., et al. (2017). High-Throughput Functional Genetic and Compound Screens Identify Targets for Senescence Induction in Cancer. *Cell reports* 21, 773-783.
- Wang, R., Yu, Z., Sunchu, B., Shoaf, J., Dang, I., Zhao, S., Caples, K., Bradley, L., Beaver, L.M., Ho, E., et al. (2017). Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism. *Aging cell* 16, 564-574.
- Woodside, B.L., Borroni, A.M., Hammonds, M.D., and Teyler, T.J. (2004). NMDA receptors and voltage-dependent calcium channels mediate different aspects of acquisition and retention of a spatial memory task. *Neurobiology of learning and memory* 81, 105-114.
- Xia, M., and Hyman, B.T. (2002). GROalpha/KC, a chemokine receptor CXCR2 ligand, can be a potent trigger for neuronal ERK1/2 and PI-3 kinase pathways and for tau hyperphosphorylation—a role in Alzheimer's disease? *Journal of neuroimmunology* 122, 55-64.
- Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J.N., Weigand, B.M., Palmer, A.K., Weivoda, M.M., Inman, C.L., Ogrodnik, M.B., Hachfeld, C.M., Fraser, D.G., et al. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nature medicine* 24, 1246-1256.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656-660.
- Yang, F., Chu, X., Yin, M., Liu, X., Yuan, H., Niu, Y., and Fu, L. (2014). mTOR and autophagy in normal brain aging and caloric restriction ameliorating age-related cognition deficits. *Behavioural brain research* 264, 82-90.
- Yang, G., Rosen, D.G., Zhang, Z., Bast, R.C., Jr., Mills, G.B., Colacino, J.A., Mercado-Uribe, I., and Liu, J. (2006). The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 16472-16477.
- Yosef, R., Pilpel, N., Papisov, N., Gal, H., Ovadya, Y., Vadai, E., Miller, S., Porat, Z., Ben-Dor, S., and Krizhanovsky, V. (2017). p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling. *The EMBO journal* 36, 2280-2295.
- Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahr, E., Condiotti, R., et al. (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nature communications* 7, 11190.

- Young, A.R., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M., et al. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes & development* 23, 798-803.
- Young-Pearse, T.L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J.B., LoTurco, J.J., and Selkoe, D.J. (2007). A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 14459-14469.
- Yu, Y., Schleich, K., Yue, B., Ji, S., Lohneis, P., Kemper, K., Silvis, M.R., Qutob, N., van Rooijen, E., Werner-Klein, M., et al. (2018). Targeting the Senescence-Overriding Cooperative Activity of Structurally Unrelated H3K9 Demethylases in Melanoma. *Cancer cell* 33, 322-336.e328.
- Zhang, J., Patel, J.M., and Block, E.R. (2002). Enhanced apoptosis in prolonged cultures of senescent porcine pulmonary artery endothelial cells. *Mechanisms of ageing and development* 123, 613-625.
- Zhang, P., Kishimoto, Y., Grammatikakis, I., Gottimukkala, K., Cutler, R.G., Zhang, S., Abdelmohsen, K., Bohr, V.A., Misra Sen, J., Gorospe, M., et al. (2019). Senolytic therapy alleviates Aβ-associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nature neuroscience* 22, 719-728.
- Zhu, Y., Tchkonina, T., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Dai, H.M., Ling, Y.Y., Stout, M.B., Pirskhalava, T., Giorgadze, N., Johnson, K.O., Giles, C.B., et al. (2016). Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging cell* 15, 428-435.
- Zid, B.M., Rogers, A.N., Katewa, S.D., Vargas, M.A., Kolipinski, M.C., Lu, T.A., Benzer, S., and Kapahi, P. (2009). 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila*. *Cell* 139, 149-160.

謝辞

本研究を進めるにあたって、該博な知識による斬新なアイデアとご助言での確な研究指針を示してくださり、また、慈愛に満ちたご指導ご鞭撻をくださった指導教員の石川冬木教授には深く感謝申し上げます。神経細胞の実験技術を基礎から懇切丁寧にご指導いただいたと共に、論文作成に至るまで数多くの貴重なご助言と温かい激励を賜りました副指導教員の見学三根子博士（現、京都大学教授）に厚く感謝申し上げます。本研究を進めるにあたり、研究計画および実験手法に関して多くの議論を重ねてくださり、またさまざまなご助言をくださった副指導教員の杉田昌彦博士（現、京都大学教授）に心より感謝申し上げます。本研究に不可欠であった初代培養神経細胞実験系の確立に際して、技術指導いただいた齊藤耕一博士（現、富山化学工業株式会社）、藤島和人博士（現、京都大学助教）に心より感謝の意を表します。短期間の派遣を快く受け入れてくださり、新たな研究分野に触れる機会をくださったBjörn Schumacher博士（Cluster of Excellence - Cellular Stress Responses in Aging -Associated Diseases; CECAD, ケルン大学）およびSchumacher研究室の皆様には深く感謝致します。

研究が難渋した際に親身な支援と折々に激励をしてくださり、また意義深い議論をもって私の研究の進展に惜しめない御尽力をいただいた鍋谷彰博士（現、富山化学工業株式会社）、樽本雄介博士（現、京都大学助教）、定家真人博士（現、東京理科大学准教授）、林眞理博士（現、京都大学助教）、三好知一郎博士（現、京都大学准教授）に心より深く感謝致します。試薬作製等を引き受けてくださり、本研究を支えてくださった補佐員の田村美樹氏、技術職員の渡邊祐三氏に感謝致します。研究室の煩雑な事務処理を円滑に行ってくくださった秘書の片山亜希子氏、阪本真弓氏、白淵愛子氏、山崎恵莉子氏、津田貴子氏、平田陽子氏に感謝致します。実験操作の基礎から丁寧にご指導いただき、また公私共に親身に相談に乗ってくださった片山 雄一郎氏に心よりお礼申し上げます。修士課程の頃から、私の研究生生活を支えてくださった長垣良和氏、山本唯央氏、野間直十氏に感謝致します。また、さまざまな場面でお世話になりました石川研究室の皆様には厚くお礼申し上げます。

最後にいかなる時も私を信じ、多大な精神的・経済的援助をしてくださった両親、兄弟、そして一番近くで共に歩んでくれた妻に深く深く感謝致します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Shoma Ishikawa and Fuyuki Ishikawa

Proteostasis failure and cellular senescence in long-term cultured postmitotic rat neurons

Aging Cell, in press, 2019;00:e13071. <https://doi.org/10.1111/acel.13071>