大豆などの食品のたん白質が成体脳における神経幹細胞の増殖・分化に及ぼす機能の解析と脳疾患の再生医療に関する研究

中野紀和男*

名古屋大学生物分子応答研究センター

A Study on the Functions of Dietary Protein on Growth and Differentiation of Neural Stem Cells

Kiwao NAKANO

Nagoya University Bioscience Center, Nagoya 464-8601

ABSTRACT

The effects of systemic administration of tryptophan and its metabolite, kynurenine, were evaluated on growth and differentiation of neural stem cells in the brain of mouse. Daily intraperitoneal injection of kynurenine significantly decreased the number of neural stem cells in the brain of epilepsy-prone EL mouse. In contrast, it had essentially no effect on C57BL/6, C3H/HeN, ddY nor BALB/c mouse. Addition of kynurenine caused a marked increase in the synthesis of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the culture of astrocytes. Together, these results suggest that tryptophan metabolites, especially kynurenine, stimulate the differentiation of neural stem cells to neurons and/or glial cells in the brain of EL mouse through induction of synthesis of neurotrophic factors. These reactions may be associated, in part, with epileptogenesis of EL mouse. *Soy Protein Research, Japan* **5**, 73-75, 2002.

Key words：neural stem cell, NGF, kynurenine, epilepsy, EL mouse

従来，アルツハイマー症やパーキンソン病，てんかん症などの脳疾患では特定の神経細胞がアポトーシスを起こすことが知られ，それらの発症メカニズムの解析，および治療方法の開発はもっぱら，「神経細胞死をいかにして防ぐか」に重点が置かれてきた．しかし近年，成人の脳にも「神経幹細胞」が存在する事が明らかにされると[1)]，上記の脳疾患は神経細胞死の面だけではなく，神経幹細胞の増殖や分化の調節による神経系の再構築の面からも論じる必要が出てきた．当研究室では従来，さまざまな脳疾患を食事によって制御する，新しい再生医療法の開発を進めてきた．本研究では神経幹細胞の増殖・分化に対する必須アミノ酸の一種，トリプトファンの関連化合物の機能について調べた．

*〒464-8601　名古屋市千種区不老町

方　　法

神経幹細胞の同定と計測

てんかんモデルELマウスは当研究室で系統維持・繁殖したもの，ddYマウスは静岡県実験動物協同組合(株)から購入したものを，それぞれ4週齢で用いた．ブロムデオキシウリジン（BrdU, Sigma）は50 mg/kg体重を腹腔内注射した．対照マウスにはPBS液0.1 mLを注射した．キヌレニン（Sigma, 100 mg/kg/day）は2～6日間，腹腔内投与した．対照マウスにはPBS液0.1 mLを投与した．24時間後に屠殺し，脳をPBS液で還流，パラホルムアルデヒド液で固定した．ついで10%～30%の蔗糖液にて段階置換した後，Tissue-Tek O.C.T. Compoundにて包埋した．−80℃にて凍結し，クリオスタットにて30 μm厚の連続切片を作製した．核に取り込まれたBrdUは一次抗体として抗BrdUマウス抗体（Roche），二次抗体として抗マウスIgG-biotin標識ウサギ抗体（Dako）にて染色し，streptoavidin-peroxidase（Dako）を反応させ，発色させた．

脳アストロサイトによる神経栄養因子（NGF）の発現に対するトリプトファン関連化合物の機能の解析

脳アストロサイトは文献2)および3)にしたがい，新生マウス脳から分離したものをMEM-5% FCSにて培養した．トリプトファン関連化合物は各1 μg/mL添加し，4時間後に細胞からmRNAを抽出し，全長NGFを^{32}Pでラベルしたものをプローブとしたノザン解析によりその量を調べた．

結果と考察

てんかんモデル動物脳における神経幹細胞の動態

当研究室ではてんかんモデルのELマウスを用いて，てんかん発症機構の解析を行っている．そこでまず，当マウスと対照のddYマウスについて，脳の神経幹細胞数を比較した．その結果，まず，ブロムデオキシウリジンの細胞核DNAへの取り込みをマーカーとして免疫組織学的方法により調べたところ，神経幹細胞の存在が海馬歯状回granule cell layerや大脳subventricular zoneにおいても確認された（Fig. 1）．次いでELマウスの脳では神経幹細胞数がddYマウスの2.5倍もあることが分かった（Fig. 2）．これは神経幹細胞がてんかんの発症と関連することを示す初めての証拠であり，まことに興味深い．われわれはさらにマウスの加齢による脳の神経幹細胞数の変化を追跡した．その結果，ことにてんかんマウスでは，加齢によって予想以上の早さで減少することが明らかになった．この事実も当マウスのてんかんの病態を解析する上で重要であると考えられる．

神経幹細胞の動態に及ぼすトリプトファン関連化合物の機能の解析

まず，さまざまな食品成分について神経幹細胞の増殖や分化を調節するものがないかどうか検討した．その結果，必須アミノ酸であるトリプトファン関連化合物，とくにキヌレニンをてんかんモデルのELマウスに投与すると，脳の神経幹細胞数を明らかに減少させることが分かった（Fig. 3）．これは神経幹細胞が神経

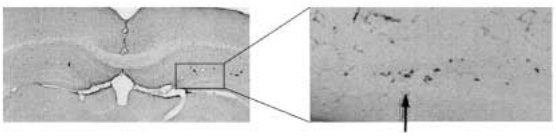

Fig. 1. Representative figure of neural stem cells in the hippocampus of mouse brain.

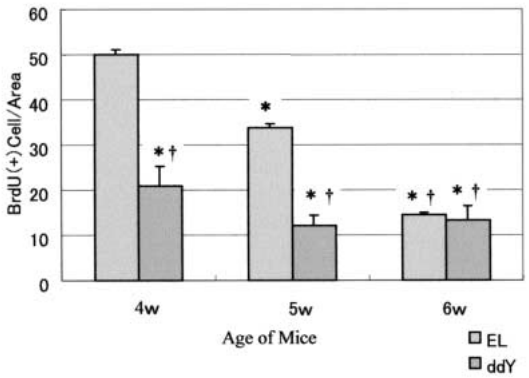

Fig. 2. Age-dependent change in the number of neural stem cells in the brains of EL and ddY mice.
*P < 0.05, †P < 0.05

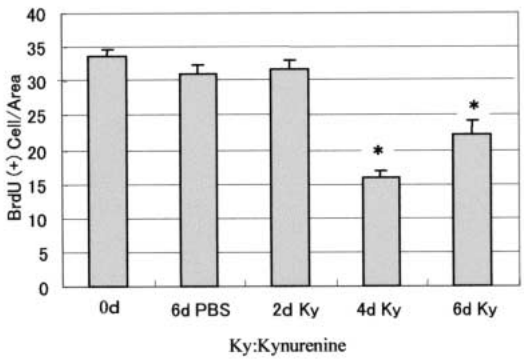

Fig. 3. Effects of kynurenine on the number of neural stem cells in the brains of epilepsy-prone EL mice.
*P < 0.05

細胞あるいはグリア細胞へと分化したためと考えられる．一方，ddY，C57BL/6J，C3H/HeJ，BALB/cなどの他系統のマウスに対してはキヌレニンの効果は見られなかった（データ省略）．

脳での神経栄養因子の合成に対するキヌレニンの効果の検討

ついで，キヌレニンの作用機構を解析するために，脳アストログリア細胞の培養系を用いて，神経栄養因子群（NGF，BDNF）の合成に対するキヌレニンの添加効果を調べた．その結果，トリプトファン関連化合物のうち，ことにキヌレニンには，脳でのNGFやBDNFの合成を強く促進する作用があることが明らかになった（Fig. 4，一部データ省略）．

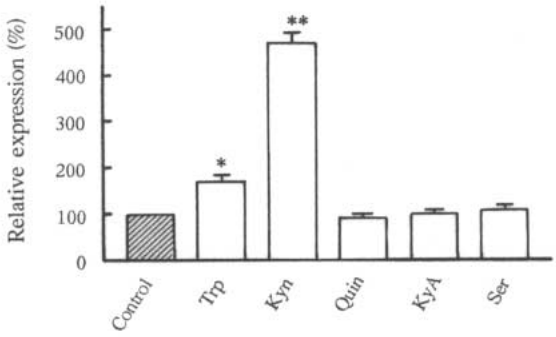

Fig. 4. Effects of tryptophan metabolites on expression of nerve growth factor in cultured astroglial cells. Trp, tryptophan; Kyn, kynurenine; Quin, quinolinic acid; KyA, kynurenic acid; Ser, serotonin
$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

要　　約

本研究の結果，必須アミノ酸の一種であるトリプトファンの代謝物，ことにキヌレニンには，てんかんモデルのELマウスの脳海馬での神経幹細胞数を明らかに減少させることがわかった．さらにキヌレニンは神経細胞の増殖や分化を促進するNGFやBDNFの脳での生成を上昇させることも明らかになった．これまでに，神経幹細胞の増殖はさまざまな成長因子によって促進されること，神経幹細胞培養系からこれらの因子を取り除くと，神経細胞やグリア細胞への分化が促進されることが知られていた．したがって，上記の研究から，キヌレニンは脳での神経栄養因子の合成の促進を通じて神経幹細胞の増殖や分化を制御しているものと判断された．

文　　献

1) Gage FH (2000)：Mammalian neural stem cells. *Science*, **287**, 1433-1438.
2) Lee D-R, Kondo H, Furukawa S and Nakano K (1998)：Stimulation of nerve growth factor (NGF) synthesis by tryptophan and its metabolites in cultured mouse astroglial cells. *Brain Research*, **777**, 228-230.
3) Lee D-R, Sawada M and Nakano K (1998)：Stimulation of gene expression of nerve growth factor by tryptophan and its metabolites in cultured mouse astroglial cells. *Neurosci Lett*, **244**, 17-20.