

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461777

研究課題名(和文) 平野小体・顆粒空胞変性形成過程におけるHCNP前駆体蛋白の働き

研究課題名(英文) The involvement of HCNP precursor in formation of hirano body and granulo-vascular degeneration

研究代表者

松川 則之 (Matsukawa, Noriyuki)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20305543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：孤発アルツハイマー病解明には、加齢変化を念頭に入れた検討が重要である。海馬・海馬傍回の平野小体・顆粒空胞変性は加齢変化の一つで、認知症によって急激に増加する。本研究では、海馬神経機能調節因子である海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチドの前駆体タンパクが軽度酸性化された細胞内において平野小体形成に関与する可能性およびそのリン酸化体が顆粒空胞変性の形成過程にp62と共に関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of sporadic Alzheimer's disease pathogenesis, the consideration and research in accordance with age change may be of important. The number of both Hirano body and granulo-vascular degeneration, being age change in hippocampus and parahippocampal gyrus, are gradually increased in Alzheimer's disease when compared with non-demented individuals. In this study, our results suggested that the precursor of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP), one of regulating gene for hippocampal neuronal activity, may be involved in the formation of Hirano body under acidulous cellular cytoplasm, and HCNP-related components may be also related with p62 in formation process of granulo-vascular degeneration.

研究分野：神経内科

キーワード：HCNP 平野小体 顆粒空胞変性

## 1. 研究開始当初の背景

孤発例アルツハイマー病解明には、加齢変化を念頭に入れた検討が重要と考えられる。海馬・海馬傍回の平野小体や顆粒空胞変性は加齢変化の一つで、認知症によって急激に増加することが知られている。また最近、オートファジーに関連する顆粒空胞変性が、孤発性アルツハイマー病の神経細胞死に関連する可能性が指摘されてきている。

我々は、海馬神経活動を調節するコリン作動性神経に着目し、中隔核アセチルコリン産生を促進する海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド(HCNP)を発見した。また、アルツハイマー病海馬の平野小体にHCNP前駆体蛋白が特異的に沈着することを報告した。さらに最近、顆粒空胞変性にリン酸化HCNP前駆体が特異的に沈着していることが分かった。

## 2. 研究の目的

アルツハイマー病神経病理所見の平野小体と顆粒空胞変性の形成過程における HCNP 前駆体の働きおよびそのリン酸化の病的意義を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 生物物理学的相互作用解析 (biacore および microCal) を用いた HCNP 前駆体と tubulin の結合条件・結合数・種類を明らかにする。

(2) アルツハイマー病脳を用いて、顆粒空胞変性に認められるリン酸化 HCNP 前駆体とオートファジー関連因子と関連を推測する。その結果から、組織内で結合している可能性について免疫沈降法により明らかにする。

(3) 安定同位体ペプチドを指標とした LC/MS 質量分析法の測定系を確立する。免疫染色も合わせ、アルツハイマー病脳 (5 例) および対象脳 (5 例) の HCNP 前駆体およびリン酸化体の量とリン酸化 HCNP 前駆体蛋白陽性顆粒空胞変性数と認知症の程度の相関を検

討する。

## 4. 研究成果

pH 6.8-7(リン酸緩衝液)、低 Na (10-20mM) の条件下にて急速に結合が促進されることから、細胞内にて弱酸性状態になった場合に HCNP 前駆体蛋白が tubulin と結合する可能性が示された。複数の tubulin と結合する可能性があり、現在再確認中である。

また、免疫組織学的・生化学的検討にて、海馬および海馬傍回にみられる顆粒空胞変性内の p62 と特異的に結合・共存し、その他、CHMP2B, LAMP1, LC3, CSNK とは共存していなかった。この結果から、ユビキチン化選択性オートファゴソーム形成過程に関与している可能性が示された。

微量に存在することから、ELISA での定量化が困難であったために、まずは質量解析装置を用いた定量化法を開発した。本質量分析法および免疫染色法を用いて定量化を行ったところ、リン酸化体陽性顆粒空胞変性は進行期アルツハイマー病脳側頭葉において増加し、HCNP 前駆体は減少していることが明らかになった。p62 と特異的に結合し、p62 陰性ファゴソームにはほぼリン酸化 HCNP 前駆体は存在しないことから、p62 と関連する機能を有している可能性がある。HCNP 前駆体の視点からアルツハイマー病脳における顆粒空胞変性形成メカニズムの解明は、病態解明の一助になる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 28 件)

1. Uchida Y, Takada K, Tsugu Y, Ueda M, Yamashita T, Ando Y, Kobayashi S, Koike H, Watanabe T, Matsumoto T, Toyoda T, Yamada G, Matsukawa N. Two brothers

homozygous for the TTR V30M both presenting with a phenotype dominated by central nervous complications. Amyloid 2016; 22(4):261-2 査読有

2. Kametani F, Obi T, Shishido T, Akatsu H, Maruyama S, Saito Y, Yoshida M, Hasegawa M. Mass spectrometric analysis of accumulated TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis brains. Sci Rep. (in press) 査読有

3. Takayama T, Mochizuki T, Todoroki K, Min JZ, Mizuno H, Inoue K, Akatsu H, Noge I, Toyo'oka T. A novel approach for LC-MS/MS-based chiral metabolomics fingerprinting and chiral metabolomics extraction using a pair of enantiomers of chiral derivatization reagents. Anal Chim Acta. 2015; 898:73-84. 査読有

4. Inoue K, Hosaka D, Mochizuki N, Akatsu H, Tsutsumiuchi K, Hashizume Y, Matsukawa N, Yamamoto T, Toyo'oka T. Simultaneous determination of post-translational racemization and isomerization of N-terminal amyloid- $\beta$  in Alzheimer's brain tissues by covalent chiral derivatized ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Anal Chem. 2015; 86(1): 797-804. 査読有

5. Ohi Y, Kato D, Mizuno M, Sato T, Ueki Y, Borlongan CV, Ojika K, Haji A, Matsukawa N. Enhancement of long-term potentiation via muscarinic modulation in the hippocampus of HCNP precursor transgenic mice. Neurosci Lett 2015;

597:1-6. 査読有

6: Inoue K, Tsuchiya H, Takayama T, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto T, Matsukawa N, Toyo'oka T. Blood-based diagnosis of Alzheimer's disease using fingerprinting metabolomics based on hydrophilic interaction liquid chromatography with mass spectrometry and multivariate statistical analysis. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2015;974:24-34. 査読有

7: Katada E, Uematsu N, Takuma Y, Matsukawa N. Comparison of effects of valsartan and amlodipine on cognitive functions and auditory p300 event-related potentials in elderly hypertensive patients. Clin Neuropharmacol. 2014;37(5):129-32. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

1: 松川則之、赤津裕康、井之上浩一  
質量分析装置によるアルツハイマー病患者  
脳中におけるリン酸化 HCNP の微量解析  
認知症学会(2013年11月8-10日)松本市総  
合体育館、キッセイ文化ホール(長野県松本  
市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 無

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松川 則之 (MATSUKAWA Noriyuki)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：20305543

### (2) 研究分担者

赤津 裕康 (AKATSU Hiroyasu)  
医療法人さわらび会福祉村長寿医学研究  
所・その他部局等・研究員  
研究者番号：00399734

井之上 浩一 (INOUE Koichi)  
立命館大学・薬学部・准教授  
研究者番号：30339519