

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07891

研究課題名(和文)新規アルツハイマー病創薬に向けたHCNP受容体単離

研究課題名(英文)Purification of HCNP receptor for new drug development

研究代表者

松川 則之(Matsukawa, Noriyuki)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：20305543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：中隔核－海馬コリン作動性神経調節因子(hippocampal cholinergic neurostimulating peptide; HCNP)を発見し、ノックアウトマウスではコリン作動性神経が障害され、HCNPを脳室内投与すると、その機能は改善することを報告した。本研究では、ヒト由来臍帯血細胞からアセチルコリン(Ach)産生細胞を作成し、質量分析装置によりfmolレベルのAch濃度測定系を確立した。HCNPに反応しAch産生する細胞を選別し、genechip解析からP2RY6およびBMPR2を候補として選別した。現在HEK細胞を用いて、受容体の妥当性を検証している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗アミロイド治療が現実味を帯びてきたが、機能改善における効果は限定的な可能性がある。パーキンソン病治療を鑑みても疾患修飾に加えて、機能改善薬開発を継続する意義は期待される。歴史的に使用されるコリンエステラーゼ阻害薬は、Ach分泌細胞死により機能がなくなる。Ach分泌を維持したり、更に細胞保護効果を有する薬剤開発は機能改善効果を持続する可能性が期待される。本研究は、機能改善期間を少しでも長くすることを期待した創薬に向けた研究である。

研究成果の概要(英文)：We previously reported hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) as a candidate of regulator gene for septo-hippocampal cholinergic network, and its knockout mice displayed cholinergic dysfunction in septo-hippocampal formation and the administration of HCNP into ventricle could rescue function. In this proposal, the aim of study is to purify the receptor of HCNP. We established the Ach-producing cell by HCNP stimulation from human umbilical cells, and measurement system of Ach at fmol level by LC-mass spectrometer. We identified two candidate of HCNP receptor, P2RY6 and BMPR2, by genechip analysis. In the future, we will verify if each candidate might be receptor of HCNP by using genetically modified cells.

研究分野：神経内科

キーワード：アルツハイマー病 HCNP 受容体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の原因はアミロイドβ蛋白の蓄積であるとするアミロイドカスケード仮説が支持され、これまでのアミロイドβを標的とするいくつかの臨床治験が行われたが、残念ながら脳内のアミロイドは減るものの認知症の進行は止まらないことが分かった。これらのことから、孤発性アルツハイマー病においては、アミロイドβ蛋白以外の何らかの因子が関与している可能性が否定できない。

明らかなアミロイドβ蛋白蓄積や神経原線維変化を認めても、物忘れなど認知症を発症しない症例が存在する (Cognitive reserve: CR)。これらの症例では、長い教育期間・知的職業の従事や余暇の活動的な過ごし方など、生活習慣との関連が指摘されている (Stern Y, 2012 Lancet Neurol)。

一方 Nun study では、アルツハイマー病理を有しない患者群に比較して、病理変化を有する患者群では脳梗塞が認知機能低下に大きな影響を与えることが示された。また、最近のコフォート研究では、有酸素運動、ダイエットや生活習慣病治療により認知症発症を減少することが明らかにされた (Ngandu T, 2015 Lancet)。

これらのことから、アルツハイマー病病理変化による海馬を中心とした神経活動を①維持する因子と②悪化させる因子が存在することが推測される。高齢者におけるアルツハイマー型認知症は、これらの複合的な因子に関わる病態である可能性がある。

海馬グルタミン酸神経活動の主たる調節系として、前脳基底野 (内側中隔核) から投射されるコリン作動性神経が知られる。確かに実臨床においても、ChoE 阻害剤は一時的にはあるが認知機能を改善する。このことはコリン活性が海馬神経活動維持をする因子、即ち CR 分子メカニズムの一つになっている可能性が考えられる。しかし、現状の ChoE 阻害剤の問題は、アセチルコリン分泌を前提としていることである。病状進行により、中隔核コリン作動性神経細胞死が進行し、アセチルコリンが分泌できなくなれば、その効果は減退する。中隔からのアセチルコリン分泌を維持できれば、認知機能を維持できる可能性が推測される。

2. 研究の目的

中隔核コリン作動性神経活動維持は新たな創薬標的になるか

—HCNP 受容体単離の試みとリード化合物スクリーニングの試み—

申請者の研究室では、ラット海馬組織可溶性成分から、前脳基底野 (内側中隔核) の ChAT 活性を誘導し、アセチルコリン産生を促進するペプチド (海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド; HCNP) を発見した。これまでに、この因子およびその前駆体蛋白について以下のことを明らかにしてきた (Ojika K, 2000 Prog Neurol, Uematsu N, 2009 Brain Res, Kato D, 2012 Brain Res, Sato T, 2017 Cell transplant)。

- ① 内側中隔核の ChAT 量を増加させる
- ② 186アミノ酸からなる前駆体蛋白 (HCNP-pp) が存在する
- ③ HCNP-pp は、海馬神経シナプスに存在する
- ④ NMDA 刺激により HCNP になり、海馬組織から分泌される
- ⑤ 海馬組織膜分画に HCNP 受容体の存在が支持される

- ⑥ HCNP過剰発現は、アミロイドによる海馬神経活動抑制を阻止できる
- ⑦ アルツハイマー病病理脳海馬神経において、極病初期よりHCNP-pp発現が低下する

最近、アミロイドオリゴマーによる海馬グルタミン酸神経活動抑制モデルを用いて、アセチルコリン投与がムスカリン受容体 (M1 受容体) を介して、その抑制を阻止することができることを明らかにした。また、HCNP 過剰発現も同様な効果を示すことが分かった (Sato T, 2017 Cell Transplant)。これまでの知見から、HCNP は NGF とは相補的な機能を有しており、神経栄養因子的な機能を有している可能性が否定できない。

HCNP 受容体の単離は、前脳基底核 (内側中隔核) のアセチルコリン産生維持に向けた創薬標的になる可能性が期待される。

3. 研究の方法

- ① 質量分析装置を用いたアセチルコリン量測定系の確立
 - ② HCNPに反応しアセチルコリン産生細胞の選別
 - ③ マイクロアレイ法による受容体候補スクリーニング
 - ④ 非反応細胞への受容体再構成による機能確認
 - ⑤ HCNP様反応を示す低分子化合物のスクリーニング
-
- ① 質量分析装置を用いたアセチルコリン量測定系の確立
細胞培養液(DMEM+2%FBS)100 μ l を遠心フィルターにてろ過後に、ネオスチグミン (0.015mM)添加し、アセトニトリル 400 μ l を添加する。再度遠心後に 100 μ l を LC-ESI/MS(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)にて定量する。内部標準には、Ach-d9-bromide を用いて定量化する。
 - ② HCNPに反応しアセチルコリン産生細胞の選別
 - ① の実験系を用いてHCNP添加により、Ach産生・培養液中に分泌する細胞株・培養条件のスクリーニングを行う。可能であれば、同一株が培養条件等によりHCNP非反応性細胞から反応性細胞に変化するものを選別する。神経由来細胞株、神経への分化細胞株もしくはHCNP反応性細胞と既報告されている細胞株を候補と考えている。現在Neuro2A, SHSY5Y, PC12, HeLa, NIH3T3, Human umbilical cord mesenchymal stem cell, MOLT-3細胞を候補とし、スクリーニング開始している。
 - ③ マイクロアレイ法による受容体候補のスクリーニング
マイクロアレイ専用スポッターにより DNA プローブをスライドガラス上にプロットし、アレイスライドを作成する(もしくはコマーシャル版購入)。HCNP 反応細胞と非反応細胞から抽出した mRNA から合成した蛍光標識したターゲット (cDNA) をハイブリダイズする。両群間の発現変化を明らかにし、候補遺伝子をスクリーニングする。既存の結果から、受容体候補を抽出する。(外部委託も考慮している)
 - ④ 非反応細胞への受容体再構成による機能確認
 - ① により非反応性が確認された細胞株 (培養条件) に候補遺伝子を導入する。導入細胞をクローニングした後に、HCNP反応性の確認を①の方法を用いて行う。
 - ⑤ HCNP様反応を示す低分子化合物のスクリーニング

HCNP 反応性を確認できた細胞（②および④にて用いた細胞株・培養条件）の細胞に低分子化合物を添加し、培養液中の Ach 量を誘導する低分子化合物をスクリーニングする。

4. 研究成果

まず Liquid Chromatography-Mass Spectrometry を用いて、培養液中のアセチルコリンを fmol レベルまで測定可能な測定系を確立した。本測定系により各種細胞を用いて、HCNP を添加し培養液中に Ach 分泌する細胞を選択したところ、ヒト由来の臍帯血細胞を BDNF にて分化誘導した細胞において、HCNP に反応し Ach 分泌が誘導されることを確認した。次に、HCNP による誘導細胞と非誘導細胞を用いた genechip 解析により、発現解析を行ったところ、受容体候補因子として P2RY6 および BMPR2 が選別された。現在、HEK 細胞に遺伝子導入を行い、HCNP 反応下における Ach 分泌誘導の有無を検証中である。

残念ながら、コロナ禍でもあり検証実験、リード化合物スクリーニングは期間内に終了することはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yuko Kondo-Takuma, Masayuki Mizuno, Yo Tsuda, Yuta Madokoro, Kengo Suzuki, Toyohiro Sato, Hiroshi Takase, Yuto Uchida, Ken-Ichi Adachi, Hideki Hida, Cesario V Borlongan, Noriyuki Matsukawa	4. 巻 11
2. 論文標題 Reduction of acetylcholine in the hippocampus of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein knockout mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01667-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Justin Y Cho, Noriyuki Matsukawa	4. 巻 7
2. 論文標題 The unsolved mystery of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide: A potent cholinergic regulator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Circ.	6. 最初と最後の頁 29-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/bc.bc_14_21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yuya Ohno, Toshimasa Ikeda, Keita Sakurai, Kentaro Yamada, Tatsuya Tomonari, Yasushi Iwasaki, Mari Yoshida, Noriyuki Matsukawa	4. 巻 80
2. 論文標題 Rapid Progression of White Matter Signal Changes and Frontotemporal Atrophy in Globular Glial Tauopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neuropathol Exp Neurol.	6. 最初と最後の頁 480-483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nlaa151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inoue H, Oomura M, Nishikawa Y, Mase M, Matsukawa N.	4. 巻 11
2. 論文標題 The Feasibility of Mechanical Thrombectomy on Single-Plane Angiosuite: An In-Depth Analysis of Procedure Time	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cerebrovasc Dis Extra.	6. 最初と最後の頁 112-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000519555	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Adachi K, Matsukawa N et al.	4. 巻 542
2. 論文標題 Possible correlated variation of GABA A receptor 3 expression with hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein in the hippocampus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun .	6. 最初と最後の頁 80-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohno Y, Matsukawa N et al.	4. 巻 80(5)
2. 論文標題 Rapid Progression of White Matter Signal Changes and Frontotemporal Atrophy in Globular Glial Tauopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neuropathol Exp Neurol .	6. 最初と最後の頁 480-483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nlaa151.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchida Y, Matsukawa N et al.	4. 巻 95(9)
2. 論文標題 Iron leakage owing to blood-brain barrier disruption in small vessel disease CADASIL	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 e1188-e1198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.0000000000010148.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uchida Y, Matsukawa N et al.	4. 巻 35(8)
2. 論文標題 Magnetic Susceptibility Associates With Dopaminergic Deficits and Cognition in Parkinson's Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mov Disord	6. 最初と最後の頁 1396-1405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mds.28077.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------