

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05296

研究課題名(和文)アルツハイマー病病態改善ペプチド因子の産生制御と抗老化因子としての役割

研究課題名(英文)Anti-aging effects of a peptide factor that modifies Alzheimer's disease pathologies

研究代表者

新倉 貴子(Niikura, Takako)

上智大学・理工学部・教授

研究者番号：10301491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の病態改善作用を持つペプチド因子ヒューマニンの老化に対する作用に着目して解析を進めた。神経細胞に薬剤で細胞老化を誘導したモデルでは、ヒューマニンは細胞老化を抑制したものの、細胞機能である開口分泌能力には影響せず、その効果は限定的であった。老化モデルマウスでは、老化による運動能力や認知機能などの低下を行動試験で評価し、ヒューマニンの効果を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液中に含まれる抗老化因子の同定やその作用の解析は、老化の仕組みの理解を深めるとともに、健康寿命の延伸の方策を探る一助となる。ヒューマニンは、ミトコンドリアに由来しホルモン様の作用を持つ新規ペプチド群のひとつで、その機能解析は生理活性分子の新たな作用の理解にも貢献する。本研究では、ヒューマニンが神経細胞の細胞レベルでの老化を抑制することで抗老化因子のひとつとして働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Humanin, a peptide factor, has shown promise in modifying Alzheimer's disease-associated changes, including cognitive dysfunction. Our recent discovery that HN directly enhances exocytosis in neuronal cells is a significant step forward. Cellular senescence is a process that contributes to tissue aging and age-associated diseases such as Alzheimer's disease. We evaluated the potential of S14G-HN, a highly potent HN derivative, to suppress cellular senescence in neurons. Encouragingly, our findings revealed that S14G-HN effectively suppresses chemical-induced cellular senescence but did not reverse the functional deficit in exocytosis. Further, S14G-HN ameliorated physical and cognitive deficits in senescence-accelerated mice.

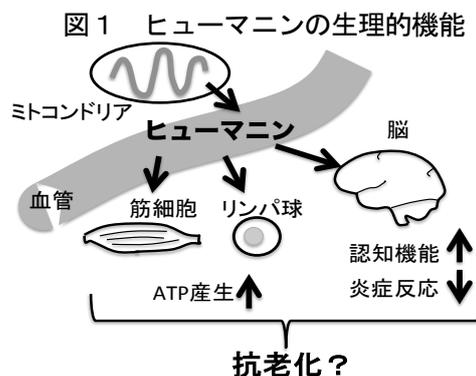
研究分野：神経科学 分子細胞生物学

キーワード：ペプチド 生理活性分子 細胞老化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ヒューマニン (Humanin) は 24 残基の内因性ペプチド因子 (配列 MAPRGFSCLLLLTSEIDLPKRRA) で、アルツハイマー病 (AD) における神経細胞死を抑制する分子として発見された。ヒューマニンは受容体を介して作用し、神経細胞死を抑制する (Hashimoto, Niikura et al. J. Neurosci. 2001)。ヒューマニンは、神経細胞への毒性を有するアミロイドベータを過剰産生する AD モデルマウスにおいて認知機能を改善し、脳内の老人斑の量を減少させることから (Niikura et al. PLoS One 2011)、ヒューマニンは細胞死抑制に加え、神経活動の改善や脳内の異物除去にも関与する。さらに代表者らは、ヒューマニンは神経伝達物質受容体に作用する薬物による認知障害を改善するなど (Tajima et al. 2005, Murakami et al. 2017a)、ヒューマニンが AD とは異なる機序による認知障害を改善することを示した。加えて、ヒューマニンは糖尿病モデル動物の血糖値を改善させるなど、神経系以外の組織にも作用することがわかっている。血液中のヒューマニン量は加齢とともに減少することがヒトとげっ歯類で確認され、ヒューマニンを過剰発現した線虫は寿命が延びることも報告されており、老化とヒューマニンの生理的作用の関連性が注目されている (図 1)。



2. 研究の目的

近年、ミトコンドリア由来の新規ペプチド群 (mitochondria-derived peptide: MDP) が筋肉や肝臓などの各組織における代謝活性を調節することが提唱されている。現在、ヒューマニンは MDP の代表的な分子とされている。本研究では、『抗老化因子』としてのヒューマニンの役割を検証することで、MDP の生理的意義の理解を深めることを目指した。具体的には、加齢による身体的機能や細胞レベルでの老化に対するヒューマニンの効果を検証することで、ヒューマニンの保護的効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒューマニンは AD の病態発生の主要因とされるアミロイドベータによる神経細胞死を抑制する。その活性は、ヒューマニンの第 14 番セリン残基をグリシンに置換すると 1000 倍上昇することから、この高活性型誘導体 S14G-HN は *in vitro* と *in vivo* の両方の実験系で広く用いられている。本研究においても、S14G-HN を用いて細胞老化モデルと老化モデルマウスの実験系での検討を行った。

細胞老化モデルとして、ラット副腎髄質褐色細胞腫から単離された PC12 細胞を用いた。PC12 細胞は神経成長因子で処理すると分化して神経細胞の特徴を示す。神経分化させた PC12 細胞をグルタミン酸で処理することで細胞老化を誘導した。また、初代クロマフィン細胞をウシ副腎髄質から調整し、コラーゲンコートしたプレートで長期培養して細胞老化を誘導した。細胞老化の指標として、SA- β gal の発現を細胞染色により検出した。

マウスモデルとしては、老化が速く進行し、特徴的な老化の表現型を有する老化促進マウス (Senescence Accelerated Mouse : SAM) を用いた。SAM は 1981 年に京都大学で作製された寿命の短いマウスであり、通常マウスの約半分の 1 年程度の寿命で、加齢に伴う学習・記憶障害や老化アミロイドシスが観察される。このマウスと対照となる正常老化マウスを用いて、S14G-HN の反復投与による変化を検討した。

4. 研究成果

薬剤誘導性細胞老化モデルとしてグルタミン酸処理を用いた。神経成長因子で神経分化させた PC12 細胞をグルタミン酸処理すると、細胞老化のマーカーである SA - β gal 陽性細胞の数が増加した。細胞老化の過程において S14G-HN の処理を行うと、SA - β gal 陽性細胞の数は減少した (図 1)。さらに、初代細胞は長期培養することで細胞老化が誘導されることがわかっているため、初代クロマフィン細胞に対する S14G-HN の効果を調べた。その結果、培養 10 日目に対照群では顕著な細胞老化が検出されたのに対し、S14G-HN 処理細胞では有意に少なかった (図 2)。これらのことから、ヒューマニンが細胞老化を抑制する効果を持つことが示された。

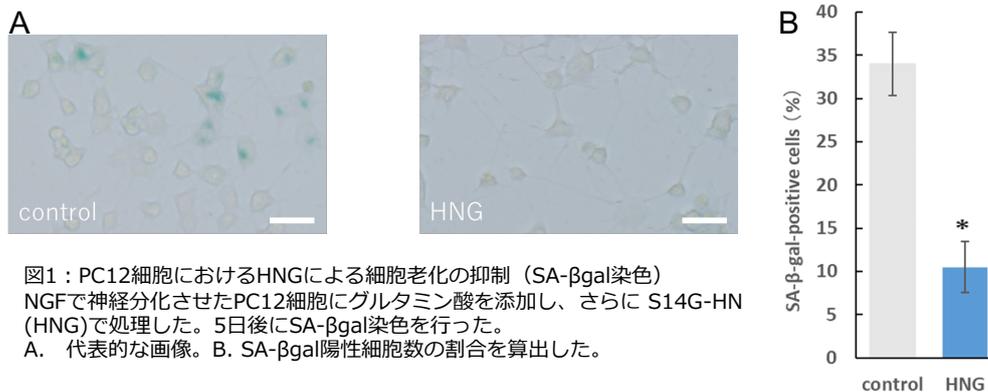


図1：PC12細胞におけるHNGによる細胞老化の抑制（SA-βgal染色）
 NGFで神経分化させたPC12細胞にグルタミン酸を添加し、さらに S14G-HN (HNG)で処理した。5日後にSA-βgal染色を行った。
 A. 代表的な画像。B. SA-βgal陽性細胞数の割合を算出した。

PC12 細胞の神経細胞様の特徴として、神経伝達物質放出と同様の調節性開口分泌がある。PC12 細胞をアセチルコリンで刺激すると開口分泌によるカテコラミンの放出が起こる。これまでの研究で、PC12 細胞を S14G-HN で短時間処理すると、アセチルコリン刺激によるカテコラミンの分泌が促進されることがわかっている (Ikegawa et al. BBA Gen2022)。そこで、グルタミン酸で細胞老化を誘導した PC12 細胞でアセチルコリン刺激によるカテコラミン量を測定した。その結果、まず神経分化した PC12 細胞でもグルタミン酸未処理の場合は、未分化の細胞と同様に S14G-HN の短時間処理によるカテコラミン分泌量の増加が認められた。しかし、老化細胞においては S14G-HN による変化は起こらなかった (図3)。このことから、S14G-HN は老化細胞の調節性開口分泌に影響を与えないことが分かった。また、細胞老化誘導中に S14G-HN での長期処理を行った場合は、アセチルコリン刺激によるカテコラミン分泌促進作用が回復する傾向が認められたものの、その効果は限定的であった (結果未掲載)。つまり、ヒューマニンの神経細胞に対する細胞老化抑制効果は、部分的であることがわかった。今後、ヒューマニンが細胞老化のどのメカニズムに作用するのか、などの詳細についての検討を行う予定である。

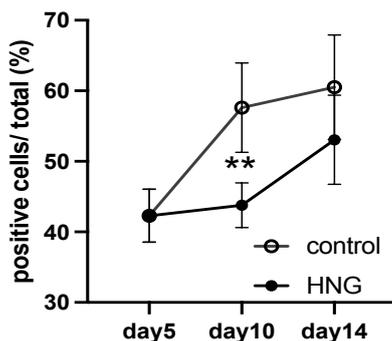


図2：初代クロマフィン細胞の老化に対するHNG処理の影響
 初代クロマフィン細胞をS14G-HN (HNG)存在/非存在下で培養し、長期培養による細胞老化を誘導した。培養開始から5, 10, 14日の細胞にSA-βgal染色を行い、陽性細胞の割合を算出した。

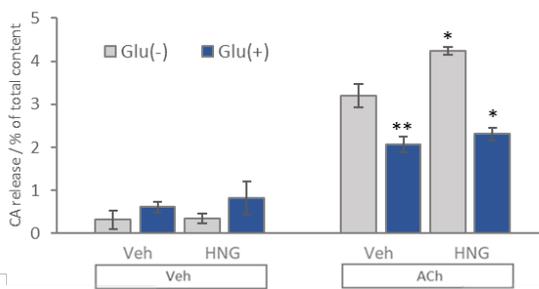


図3：グルタミン酸誘導性老化細胞における開口分泌に対するHNG短期処理の影響
 NGFで神経分化させたPC12細胞にグルタミン酸(Glu)で細胞老化を誘導した。5日後にアセチルコリン(ACh)刺激によるカテコラミン(CA)分泌量を測定した。Veh:溶媒, HNG:S14G-HN

老化モデルマウスにおけるヒューマニンの作用の検討では、S14G-HN または溶媒を週 2 回反復投与し、その後に運動能力や認知機能などを評価する行動試験を行なった。老化に伴う変化として老化促進 SAMP マウスでは通常老化 SAMR1 マウスに比べて低体重を示すことが観察されたが、S14G-HN による改善は認められなかった。また、SAMP マウスでは運動能力や記憶能力の低下も観察され、S14G-HN 投与によりそれらの抑制が認められた。本研究では、投与期間などの条件を決めるための実験を 2 回行い、適切な条件の情報を得ることができた。しかし、使用動物数が限られたことで、脳の組織および遺伝子発現などの分子生物学的解析のために必要な十分な数の試料を得ることができなかったため、今後も継続して検討を続ける予定である。

ヒューマニンはミトコンドリア由来の新規ペプチド群のひとつとして注目されている。この作用は、アルツハイマー病や糖尿病モデルで検証されており、これらの加齢に伴って罹患率が上昇する疾患の制御効果が期待されている。さらに、ヒューマニンは正常な神経細胞の活動を促進させる作用があることが、培養細胞と動物の両方で確認されており、脳機能の維持に関わることが考えられることから、加齢に伴う正常老化を抑制できる可能性も示唆される。つまり、ヒューマニンは、老化に伴う疾患と健康寿命の両方に対して関与することが考えられ、ヒューマニンの機能を理解することはそれらの予防法などの開発に貢献する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Niikura Takako	4. 巻 1866
2. 論文標題 Humanin and Alzheimer's disease: The beginning of a new field	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 130024 ~ 130024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2021.130024	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 A Kozuka, D Suzuki, T Niikura
2. 発表標題 The effect of Humanin, a bioactive peptide, on cellular senescence in neurons.
3. 学会等名 第65回日本神経化学学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 A Kozuka, T Niikura
2. 発表標題 Humanin, a bioactive peptide, suppresses cellular senescence in neurons.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 52nd Annual Meeting 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------