

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590247

研究課題名（和文）アルツハイマー病関連神経細胞死を制御するシグナル伝達経路の  
解明と診断・治療法開発研究課題名（英文）Search for neuronal cell death-inhibiting drugs for Alzheimer's  
disease-relevant signal transduction

研究代表者

橋本 祐一（HASHIMOTO YUICHI）

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：00317330

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病発症に深く関わる神経細胞死機序の解明とその細胞死抑制因子ヒューマニン（HN）のアンタゴニストおよび抗体を用いた内在性 HN 様活性を有する分子の探索を行った。その結果、（1）V-set and transmembrane domain containing 2 like（VSTM2L）が強力な HN アンタゴニストであること、（2）プレセニリン結合分子として知られていた modifier of cell adhesion（MOCA）がアルツハイマー病に関わる細胞死シグナルの統合調節分子であること、（3）皮膚細胞で産生されている calmodulin-like skin protein（CLSP）が HN 様活性を有していること、が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this research program, we have examined the neuronal cell death mechanism underlying Alzheimer's disease (AD), and identified an antagonist of Humanin (HN) which inhibited AD-relevant neuronal cell death and an endogenous agonist of HN receptor complex composed of WSX-1, ciliary neurotrophic factor receptor/gp130. The results were: (1) MOCA is the key molecule that unifies APP-mediated death signal to PS-mediated death signal, (2) V-set transmembrane domain containing 2 like inhibited HN's activity via direct binding, and (3) A series of experiments also showed that calmodulin-like skin protein (CLSP), highly expressed in skin tissues, is transported across blood-brain barrier to the central nervous system. CLSP inhibited familial AD-linked V642I-APP-induced neuronal cell death via its binding to HN receptor following activation of JAK2/STAT3 axis. These results suggest that CLSP play a main role in inhibiting AD-related neuronal death and dysfunction in vivo as a physiological defense factor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：アルツハイマー病・神経細胞死・アミロイド前駆体蛋白質・プレセニリン・ヒューマニン

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(ア病)は全世界に1,000万人以上の有病率を誇るといわれる原因不明の神経変性疾患である。進行性の記憶認識障害と神経脱落を主徴とし、病理的特徴とされるアミロイド斑の病因的意義すら尚解明されておらず、その診断・治療法は未だ確立されていない。ア病の大部分は孤発性であるが、全体の約1%は優性遺伝する家族性ア病である。研究代表者が所属する研究グループでは、炎症性サイトカインの一つであるtransforming growth factor  $\beta$  2 (TGF  $\beta$  2)がアミロイド前駆体蛋白質(APP)の細胞外領域と直接結合しAPP細胞内領域から細胞死シグナルを出力させることの出来るリガンドであることを世界に先駆けて発表した。また、これらア病関連侵害刺激が惹起する神経細胞死の抑制するペプチド性因子ヒューマン(HN)を世界に先駆けて得た。更に、本年HN受容体がgp130/WSX-1/CNTFR複合体であることを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究では、HN受容体複合体によるシグナル伝達分子の理解とそれらを調節する事およびAPPを中心としたタンパク質複合体を調節する事でア病の直接的な原因である神経細胞死を抑制することを試みた。HN受容体複合体によるシグナル伝達分子の理解とそれらを調節する事およびAPPを中心としたタンパク質複合体を調節する事でア病の直接的な原因である神経細胞死を抑制することを試みようとする本研究課題はこれまでのア病の診断・治療法に関する研究と比べて極めて独創的であると考えられる。本研究の成果は、ア病に共通の基礎となる生体における神経脱落機構を明らかにする。世界一の高齢化社会を迎えた我国においては、ア病の病態解明と根治療法確立は、最も重要な医学研究課題に位置付けされる。本研究課題は、この目的に最も近い研究として期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子、リコンビナント蛋白質及びトランスフェクション

本研究に用いた遺伝子の詳細は発表論文に記載の通りである。神経細胞への遺伝子のトランスフェクションはLipofectAMINE試薬を用いた。詳細は発表論文に記載の通りである。

#### (2) 神経細胞の培養

不死化神経培養細胞F11細胞およびヒト神経芽腫不死化細胞SHSY5Yの培養は、それぞれウシ胎児血清を含むHam's F12及びDMEM/Ham's F12 mediumで行った。詳細は発表論文に記載の通りである。

(3) 酵母ツーハイブリッドスクリーニング  
ヒト胎児脳ライブラリーを用い、HNcDNAをbaitにスクリーニングを行った。詳細は発表論文に記載の通りである。

#### (4) その他

詳細は発表論文に記載の通りである。

### 4. 研究成果

#### (1) HNのアンタゴニスト分子の探索

これまでに複数の分子がHNに結合することが報告されている。しかしながら、HNの細胞死抑制活性を不活化させるアンタゴニストは不明であった。将来的な臨床応用の際HNの副作用を緩和するためにはこのような分子を探索する必要がある。酵母ツーハイブリッドスクリーニングの結果、V-set and transmembrane domain containing 2 like (VSTM2L)がHNと結合することが分かった。次にV642IAPPが誘導するア病関連細胞死のHNによる抑制がVSTM2L cDNAによって解除されることを見出し、さらにリコンビナント蛋白質を用いた検討から、VSTM2LはHNと直接結合し、HN受容体へのHNの結合を阻害することが判明した。

#### (2) APPおよびPSが誘導する神経細胞死に関与する分子の探索

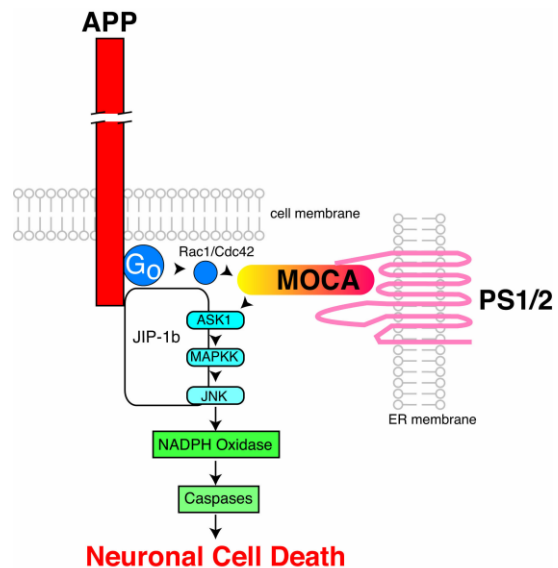


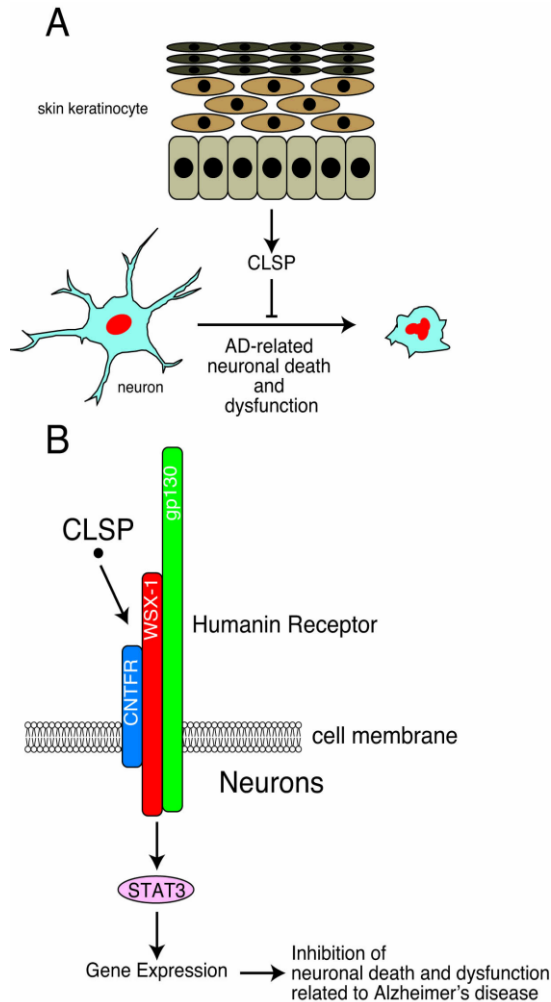
図1 MOCAによる神経細胞死の調節

これまで我々は、家族性ア病原因APPおよびPS変異遺伝子を神経細胞に過剰発現させると細胞死が誘導出来ることを報告している。加えて、サイトカインの一つであるTGFbeta2がアミロイド前駆体タンパク質(APP)の細胞死誘導リガンドであることをこれまでに報告している。そこで、これらア病に関わる神経細胞死シグナルに関与する分子の同定を試みた。その結果、プレセニリン(PS)の結合分子として知られていた modifier of cell

adhesion (MOCA)がAPP と PS の細胞死シグナルを統合する鍵分子であることを発見した。MOCAは図1の様に、small GTPaseであるRac 1の下流、かつMAPKKKであるASK 1の上流に位置し細胞死シグナルを調節しているものと考えられた。

(3) 内在性HN様分子の探索

図2 CLSPの産生(A)と作用機序(B)



アルツハイマー病関連神経細胞死を抑制するペプチド性因子ヒューマニンの抗体を用い、内在性のヒューマニン活性を有する分子の同定を試みた。種々の検討の結果、calmodulin-like skin protein (CLSP)が同定された。CLSPは主に皮膚細胞で産生され(A)、血液脳関門を通過し、神経細胞膜上のWSX-1/CNTFR/gp130の三量体からなるヒューマニン受容体に結合し、その下流であるSTAT3を介して神経細胞死を抑制する(B)ものと考えられた。

これらの成果は、現在までに進められているアルツハイマー病の創薬に新たな視点と戦略を示すものであると考えられる。

## 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3件)

(1) Hashimoto Y, Nawa M, Kurita M, Tokizawa M, Iwamatsu A, Matsuoka M  
Secreted calmodulin-like skin protein inhibits neuronal death in cell-based Alzheimer's disease models via the heterotrimeric Humanin receptor. Cell Death Dis. 2013; 4: e555 査読有 doi: 10.1038/cddis.2013.80.

(2) Tachi N, Hashimoto Y, Matsuoka M  
MOCA is an integrator of the neuronal death signals that are activated by familial Alzheimer's disease-related mutants of amyloid beta precursor protein and presenilin. Biochem. J. 2012; 442: 413-422 査読有 doi: 10.1042/BJ20100993

(3) Rossini L, Hashimoto Y, Suzuki H, Kurita M, Gianfriddo M, Scali C, Roncarati R, Franceschini D, Pollio G, Trabalzini L, Terstappen GC, Matsuoka M, Caricasole A  
VSTM2L is a novel secreted antagonist of the neuroprotective peptide Humanin FASEB J. 2011; 25: 1983-2000 査読有 doi:10.1096/fj.10-163535

〔学会発表〕(計3件)

① 竹下裕二、橋本祐一、内野博之、松岡正明  
SH3BP5 is essential for Humanin-mediated protection against Alzheimer's disease-relevant toxicity. 日本薬理学会第86回大会 2013年3月23日 福岡国際会議場

② Hashimoto Y, Tachi N, Matsuoka M.  
Involvement of MOCA in Alzheimer's disease-relevant neuronal cell death via APP and presenilins. Society for Neuroscience 2011 Annual Meeting 2011年11月12日米国 ワシントンD.C.

③ 橋本祐一、太知信之、名和幹朗、松岡正明  
Involvement of MOCA in neuronal cell death triggered by familial Alzheimer's disease-linked mutants of APP and presenilins. 日本薬理学会 第84回大会 2011年3月16日 横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tokyo-med.ac.jp/pharmacol/to p.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 祐一 (HASHIMOTO YUICHI)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00317330

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松岡 正明 (MATSUOKA MASAOKI)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70222297