

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590190

研究課題名(和文)アルツハイマー病治療戦略へ向けた新たな試み - AICDの転写制御機構の解明 -

研究課題名(英文)Analysis of AICD in neurogenesis

研究代表者

武田 泰生 (TAKEDA, YASUO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・教授

研究者番号：60245462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の原因遺伝子として知られているアミロイド前駆蛋白質(APP)の細胞内領域(AICD)59アミノ酸残基をクローニングし、AICD強制発現系を構築した。このAICDプラスミドを一過性に導入したマウス胚性腫細胞P19細胞株において、レチノイン酸誘導下におけるAICD領域の神経分化への影響を、神経分化マーカーとして知られているTuj1ならびにMAP2遺伝子の発現量の差を定量PCR法により検討したところ、AICD導入細胞においてTuj1, MAP2が減少することを明らかにし、その途中過程において、幹細胞マーカーであるOct4の発現上昇による可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease(AD) is a neurodegenerative disease and the most common form of dementia. Amyloid precursor protein(APP) plays a central role in the pathogenesis of AD. APP is type I transmembrane protein with a large extracellular domain and a short cytoplasmic domain(AICD59, AICD). AICD negatively modulates neurogenesis in neural precursor cells. However, the molecular mechanism of AICD has not been identified yet. In this study, we investigated the role of AICD in neuronal cell differentiation of P19 embryonic carcinoma cells. We have shown that P19 cells with induction Retinoic acid(RA) and transient overexpression of AICD could inhibit neural differentiation using quantitative RT-PCR. Oct4, pluripotency stem cell marker was upregulated during the RA aggregated stage of AICD overexpressing P19 cells. Our data suggest that AICD may be involved in inhibited effect of neural differentiation during developmental brain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：アミロイド前駆蛋白質 アルツハイマー病 神経分化 AICD

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー型認知症【アルツハイマー病: Alzheimer's disease, AD】は、急速な高齢化に伴い、現在国内および世界中に多くの患者がいる神経変性疾患の一つであり、増加傾向にある。その原因物質の一つとして、アミロイド前駆蛋白質 (amyloid precursor protein, APP) が知られている。APP は膜一回貫通型タンパク質であり、種々のセクレターゼによるプロセッシングを受ける。AD 患者の脳では、APP からセクレターゼによる過剰なプロセッシングにより産生されたベータアミロイド (A $\beta$ ) が遊離し、加齢とともに海馬や皮質領域に異常に蓄積して凝集体 (老人斑) を形成すると考えられており、現在、老人斑の形成抑制を治療上のターゲットとしてワクチン療法などの新規治療法の開発が進められている。これまで、老人斑の原因となる A $\beta$  の産生・蓄積機構の解明が AD 治療の鍵であると考えられてきた。そのためこれまでの AD 研究は A $\beta$  産生・蓄積機構の解明を主眼として展開されてきた。

2008 年 Ma らにより、免疫グロブリン様接着分子であるコンタクチンファミリーの一つである TAG-1 (GPI アンカー型の神経接着分子で、ミエリン形成に関与する分子) がアミロイド前駆体タンパク質 APP と相互作用し、切り出された APP 細胞内部分 (AICD) がマウス神経新生を負に調節していることが報告された (Ma 2008)。また 2009 年 Ghosal らにより、AD 患者脳での蓄積が報告され AICD も AD の病理的特徴を引き起こす可能性があることが示唆された (Ghosal 2009)。このような背景から、AICD を分子標的とした創薬を目指した研究を展開させていく過程において、まず初めに AICD の神経分化への影響ならびにメカニズムを検討することは非常に有益であると考えられた。

1. Ma, Q.H. Nature Cell Biol. 10: 283-294, 2008.

2. Ghosal, K. PNAS 106: 18367-18372, 2009.

## 2. 研究の目的

AICD は、APP が セクレターゼ及び セクレターゼという酵素のプロセッシングによ

り切り出されることにより A $\beta$  と共に産生される。

本研究では、これらの 2 つの酵素により切り出された AICD の生理的機能の解明を目指し、マウス胚性細胞腫である P19 細胞株を用いて、神経分化過程における各種分化関連遺伝子の発現との関連性を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト APP 遺伝子 (770 アミノ酸残基) から遊離される AICD (C 末端部 59 アミノ酸) 部分をコードする 177bp の領域を、ヒト APP 遺伝子を鋳型に増幅し、cDNA のクローニングを行い、pCDNA4 発現ベクターへサブクローニングする。構築したプラスミドを P19 細胞株に一過性に導入し、AICD 強制発現系を構築する (hAICD-pCDNA4)。

(2) P19 細胞株はマウス胚生腫瘍由来の未分化でマルチポテンシャルな分化能を持つ細胞種であり、レチノイン酸 (RA) などの薬剤により、神経やグリア細胞 (オリゴデンドロサイト、アストロサイト) に分化する特徴を持つ。まず初めに P19 細胞株を RA にて処理し、神経分化過程が再現できるかを確認するために RA 誘導培養方法を構築する。具体的には、RA 処理分化過程での神経細胞の遺伝子マーカーの発現変化を RT-PCR 法を用いて確認を行う。

(3) P19 細胞株に構築した hAICD-pCDNA4 を RA 存在下において一過性に導入し、AICD が RA 誘導による分化過程にどのような影響を及ぼすかを定量的 PCR 法および RT-PCR 法を用いて検討する。

(4) P19 細胞株を RA 存在下にて 4 日間培養し、sphere 様の細胞塊を作成する。この段階での細胞増殖にかかわる遺伝子 (Oct4, Sox2 等) の発現について real-time PCR 法および RT-PCR 法を用いて検討する。

(5) MTT アッセイ法を用いて、AICD の細胞増殖能への影響を検討する。

#### 4. 研究成果

(1) P19 細胞株における RA 誘導分化系の構築を行い, 神経分化マーカー遺伝子の一つである mash-1 の発現上昇を確認した(Fig.1)。

(2) AICD 遺伝子を導入した細胞とベクターのみを導入した細胞の神経分化における効果を real-time PCR 法により比較検討したところ, AICD 導入細胞において神経マーカーである Tuj1(neuron-specific  $\beta$ -III tubulin), MAP2 (microtubule-associated protein 2) mRNA が減少した。(Fig.2)

(3) 定量的 RT-PCR 法の結果, AICD 導入細胞およびコントロール細胞を RA 処理し, sphere 様の細胞塊を形成させたところ, AICD 導入細胞がコントロール細胞と比較して幹細胞マーカーである Oct4, Sox2 の mRNA が増加した。RT-PCR 法により同様の結果を得た。(Fig.3)

(4) MTT アッセイ法により細胞増殖能を検討した結果, AICD 導入細胞の方が, コントロール細胞より増殖能が高かった(Fig.4)。

これらの検討で, AICD の効果として, P19 細胞において神経分化を抑制する傾向にあり, その効果の原因として, AICD が神経幹細胞の維持に關与する Oct4 の発現調節を行うことで, 神経分化抑制に差が見られた可能性が考えられる。今回得られた結果を踏まえて今後, 他の手法を用いた詳細な検討が必要であり, AICD が關わる神経分化の細胞内シグナル伝達機構の全貌を明らかにしていきたいと考えている。

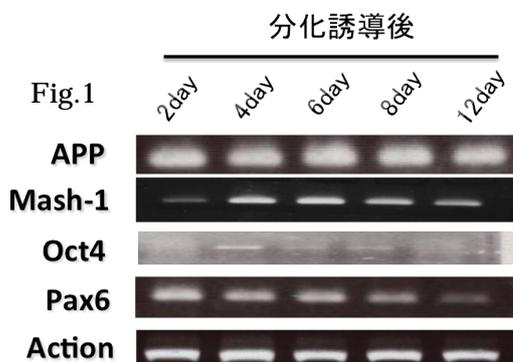


Fig.2

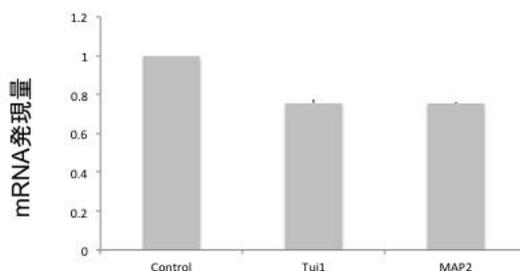


Fig.3

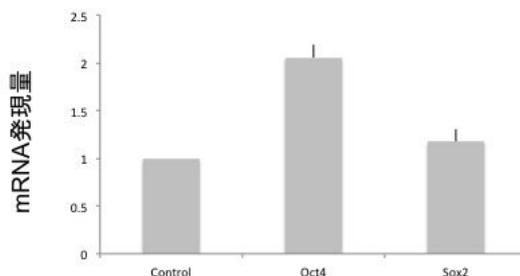
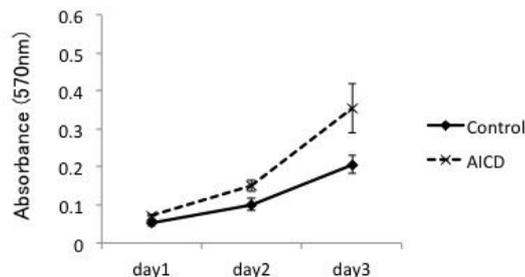


Fig.4



#### 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10件)

Oiso S, Takayama Y, Nakazaki R, Matsunaga N, Motooka C, Yamamura A, Ikeda R, Nakamura K, Takeda Y, Kariyazono H, Factors involved in the cisplatin resistance of KCP-4 human epidermoid carcinoma cells, Oncol Rep., 2014, 31(2): 719-726(査読有)

Ikeda R, Nishizawa Y, Tajitsu Y, Minami K, Mataka H, Masuda S, Furukawa T, Akiyama S, Yamada K, Takeda Y, Regulation of major vault protein

expression by upstream stimulating factor 1 in SW620 human colon cancer cells, *Oncol Rep.*, 2014, 31(1):197-201 (査読有)

Tajitsu Y, Ikeda R, Nishizawa Y, Mataka H, Che XF, Sumizawa T, Nitta M, Yamaguchi T, Yamamoto M, Tabata S, Akiyama S, Yamada K, Furukawa T, Takeda Y. Molecular basis for the expression of major vault protein induced by hyperosmotic stress in SW620 human colon cancer cells, *Int J Mol Med.*, 2013, 32(3):703-708(査読有)

Ikeda R, Tabata S, Tajitsu Y, Nishizawa Y, Minami K, Furukawa T, Yamamoto M, Shinsato Y, Akiyama S, Yamada K, Takeda Y, Molecular basis for the regulation of hypoxia-inducible factor-1 levels by 2-deoxy-D-ribose, *Oncol Rep.*, 2013, 30(3):1444-1448(査読有)

Kazuaki Matsumoto, Akari Shigemi, Keiko Yaji, Yoshihiro Shimodozono, Yasuo Takeda, Kazuro Ikawa, Norifumi Morikawa, Hiroaki Miyanojima, Hideki Kawamura, Michiyo Orita, Koichi Tokuda, Junichiro Nishi, Katsushi Yamada, Reduction in the incidence of MRSA with use of alcohol-based hand rub solutions and gloves, *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2012, 18:269-271(査読有)

Yuta Yokoyama, Kazuaki Matsumoto, Hiroyuki Yamamoto, Yoshifumi Iguro, Yutaka Imoto, Kazuro Ikawa, Norifumi Morikawa, Shiro Ishida, Yoshiro Okano, Erika Watanabe, Yoshihiro Shimodozono, Katsushi Yamada, Yasuo Takeda, Pharmacokinetics of ampicillin-sulbactam and the renal function-based optimization of dosing regimens for prophylaxis in patients undergoing cardiovascular surgery, *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2012, 18:878-882. (査読有)

Sho Tabata, Ryuji Ikeda, Masatatu Yamamoto, Tatsuhiko Furukawa, Takuya Kuramoto, Yasuo Takeda, Katsushi Yamada, Misako Haraguchi, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, Shin-Ichi Akiyama, *Oncol Rep.*, 2012, 28 : 895-902. (査読有)

Shigeto Matsushita, Ryuji Ikeda, Tomoko Fukushige, Yusuke Tajitsu, Kanayo Gunshina, Hiroshi Okumura, Mina Ushiyama, Shin-ichi Akiyama, Kazuhiro Kawai, Yasuo Takeda, Katsushi Yamada, Takuro Kanekura, p53R2 is a prognostic factor of melanoma and regulates proliferation and chemosensitivity of melanoma cells, *Journal of Dermatological Science*, 2012, 68:19-24. (査読有)

Naoko Kanazawa, Kazuaki Matsumoto, Kazuro Ikawa, Tomohide Fukamizu, Akari Shigemi, Keiko Yaji, Yoshihiro Shimodozono, Norifumi Morikawa, Yasuo Takeda, Katsushi Yamada, An initial dosing method for teicoplanin based on the area under the serum concentration-time curve (AUC) required for MRSA eradication, *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2011, 17:297-300. (査読有)

Yoshihiko Shibayama, Yoshitaka Iwashita, Yoshimi Yoshikawa, Tomoko Kondo, Ryuji Ikeda, Yasuo Takeda, Takayuki Osada, Mitsuru Sugawara, Katsushi Yamada, Ken Iseki, Effect of 5-Fluorouracil Treatment on SN-38 Absorption from Intestine in Rats, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2011, 34:1418-1425. (査読有)

[学会発表](計10件)

益田 将吾, 二川 俊隆, 山口 沙織, 山田 勝士, 池田 龍二, 武田 泰生, 神経接着関連分子 Caspr1 はグリオブラストーマ細胞の浸潤を調節する, 第26回 鹿児島ブレインサイエンスカンファランス(鹿

児島市) 2013年10月22日  
益田 将吾, 二川 俊隆, 山口 沙織, 山田 勝士, 池田 龍二, 武田 泰生, 神経接着関連分子 Caspr1 は MMP-9 の発現低下を介してグリオーマ細胞の浸潤を抑制する, 日本薬学会第133年会(横浜市)2013年3月27-30日

田實裕介, 池田龍二, 西澤由紀彦, 山口辰哉, 山本雅達, 田畑祥, 秋山伸一, 山田勝士, 古川龍彦, 武田泰生, 高浸透圧によって誘導される Major vault protein (MVP)の発現亢進機序, 第86回日本薬理学会年会(福岡市)2013年3月21-23日

Toshitaka Futagawa, Masuda Shogo, Katsushi Yamada, Ryuji Ikeda, Yasuo Takeda, A Caspr4/LNX2 signaling pathway promotes neurogenesis, 第86回日本薬理学会年会(福岡市)2013年3月21-23日

Ryuji Ikeda, Yusuke Tajitsu, Yukihiko Nishizawa, Nariaki Tomiyama, Hironori Mataka, Katsushi Yamada, Yasuo Takeda, Molecular basis for the induction of vaults by anti-cancer agents, and the role of vaults in resistance to anti-cancer agents, 第6回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム(京都市)2012年11月23-24日

益田 将吾, 二川 俊隆, 山口 沙織, 山田 勝士, 池田 龍二, 武田 泰生, グリオーマ細胞の移動・浸潤における Caspr1 の役割, 第65回日本薬理学会西南部会(熊本市)2012年11月23日

二川俊隆, 益田将吾, 鬼丸貴裕, 山田勝士, 池田龍二, 武田泰生, 神経接着関連分子 Caspr4 の脳形成過程における役割, 第65回日本薬理学会西南部会(熊本市)2012年11月23日

池田龍二, 武田泰生, 山田勝士, 抗がん剤耐性機序の解明に向けて, 第5回日本緩和医療薬学会年会(千葉市)2011年9月24-25日

益田 将吾, 二川 俊隆, 山口 沙織, 池田龍二, 山田 勝士, 武田 泰生, グリオー

マ細胞の浸潤・転移における Contactin associated protein(Caspr)1 の役割, 医療薬学フォーラム2012/第20回クリニカルファーマシーシンポジウム(福岡市), 2012年7月14-15日

Ryuji Ikeda, Yusuke Tajitsu, Yukihiko Nishizawa, Sho Tabata, Mina Ushiyama, Tatsuhiko Furukawa, Shin-ichi Akiyama, Katsushi Yamada, Yasuo Takeda, Hyperosmotic stress up-regulates the expression of major vault protein in SW620 human colon cancer cells, 第5回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム(名古屋市)2011年11月26-27日

〔図書〕(計2件)

池田 龍二, 武田泰生, 他, 月刊薬事 2012年8月号 (Vol. 54 No.8), 特集 薬剤耐性 Up-to-Date -感染症・がん領域を中心に- 抗がん剤耐性機序の解明に向けて  
近藤智子, 武田泰生, 他, 医薬ジャーナル 2012年12月号 (Vol. 48 No. 12), 特集 生活習慣病としての肝疾患~非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) /非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の現状と対応~  
11. 新規の生活習慣病治療薬~インクレチン関連薬の作用機序と NAFLD/NASH 治療への応用~

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

武田 泰生 (TAKEDA YASUO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・教授

研究者番号: 60245462

(2)研究分担者

池田 龍二 ( IKEDA RYUJI )

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・准教授

研究者番号： 50398278

(3)研究協力者

Xiao, Zhi-cheng ( シャオ チーチェン )

Monash 大学・医学部・教授・オーストラリア

二川 俊隆 ( FUTAGAWA TOSHITAKA )

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・薬剤師

高濱 和弘 ( TAKAHAMA KAZUHIRO )

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・薬剤師

益田 将吾 ( MASUDA SHOGO )

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・薬剤師