

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460343

研究課題名(和文)アルツハイマー病発症に関わる神経細胞死を抑制する分子基盤の解明と創薬への応用

研究課題名(英文) Identification of Alzheimer's disease-relevant neuronal death inhibiting molecular basis and its application for drug development

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアルツハイマー病(ア病)発症に関わる神経細胞死を制御する分子基盤の解明と創薬への展開を目的とし、ア病関連細胞死抑制因子ヒューマニン(HN)のシグナル分子探索と内在性HN様分子calmodulin-like skin protein (CLSP)のin vivoでの効果の検証、APPの新規変異体の役割について検討した。その結果、(1)HN誘導性遺伝子としてSH3BP5およびApollonを同定し、(2)新規A598T-APP変異体はAPP誘導性神経細胞死を抑制すること、(3)スコポラミン誘導性健忘症状をCLSPの腹腔内および脳室内投与で改善出来ることをin vivoで示した

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), identified of Humanin (HN), a secreted bioactive peptide factor against AD-relevant neurotoxicity, inducible signal molecules, and confirmed in vivo effect of calmodulin-like skin protein (CLSP) on scopolamine-induced amnesia. The results were: (1) A598T-APP inhibited TGFbeta2/wild-type APP-induced neuronal death, (2) By differential display, we identified SH3BP5 and Apollon is mediator of HN-neuroprotective signals, and (3) recombinant CLSP, administered intracerebroventricularly or intraperitoneally, ameliorates scopolamine-induced dementia in mice.

研究分野：薬理学

キーワード：アルツハイマー病 神経細胞死 ヒューマニン 創薬化学

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1つである transforming growth factor β 2 (TGF β 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ニン(HN)を世界に先駆けて得た。2009年HN受容体が gp130/WSX-1/CNTFR 複合体であることを見出した。これまでの検討結果からHNのEC50が1-10 μ Mと弱いこと、またその発現が中枢神経系では弱いことから、HNが中枢神経で活性を發揮するには十分量ではないのではない懸念があった。そこでHNに対する抗体を用いてより中心的役割を果たす生理的内在性分子の同定を試みたところ主に皮膚細胞から産生されている calmodulin-like skin protein (CLSP) を同定した。CLSPは主に皮膚細胞で産生され、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HN受容体に結合し、その下流である JAK2/STAT3 を介して神経細胞死を抑制するものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、(1)HN誘導性神経細胞死抑制活性に関わるシグナル分子の探索、(2)APPによる神経細胞死誘導機構の理解の深化、(3)HN様活性を有する内因性分子CLSPのin vivoへの応用、を主たる目的とした。

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の確立は、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下記文献

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。詳細は下記文献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。詳細は下記文献に記載の通りである。

(3) HN誘導性遺伝子のDifferential Displayによる探索

詳細は下記文献に記載の通りである

(4) In vitro JNK kinase アッセイ

詳細は下記文献に記載の通りである。

(5) Y-maze テスト

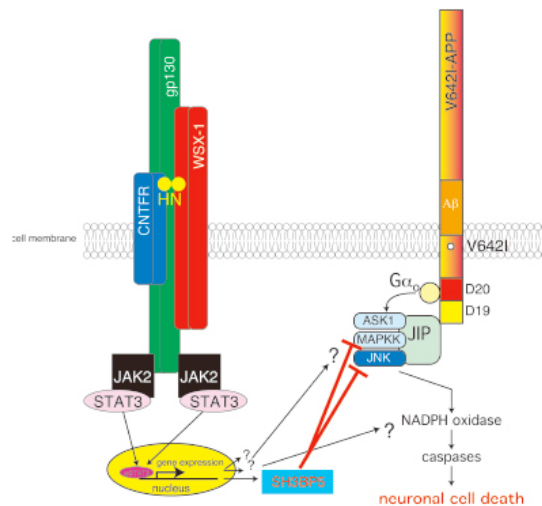
詳細は下記文献に記載の通りである。

4. 研究成果

(1) HN誘導性神経細胞死抑制シグナル分子の同定

SHSY5Y細胞をHNペプチドで刺激後total RNAを精製し、Differential Displayを行い、SH3BP5およびApollon遺伝子などを同定した。

家族性ア病原因遺伝子V642I-APP誘導性神経細胞死はSH3BP5遺伝子の共導入によって抑制された。SH3BP5のsiRNAによるノックダウン実験から、SH3BP5がHNの神経細胞死抑制活性に必須であることが明らかとなった。さらに、リコンビナントSH3BP5タンパク質を精製しV642I-APPによるc-Jun N-terminal kinase (JNK)のリン酸化に与える影響をIn vitro kinase アッセイにより検討した。その結果、SH3BP5が内在性のJNK活性化抑制分子

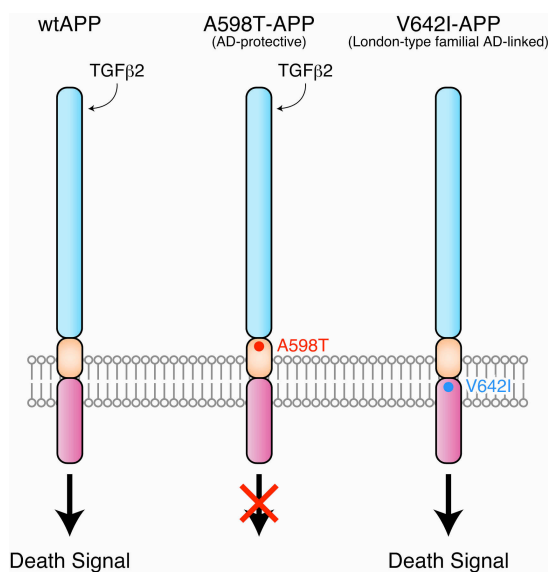


であることが分かった。

SH3BP5と同様にApollon遺伝子の共導入によってV642I-APPの神経細胞死は抑制されたが、残念ながらApollonのノックダウンによってHN活性は消失しなかった。

(2) A598T-APP変異体によるTGF β 2/野生型APP誘導性神経細胞死の抑制

A598TAPP 変異体は 2012 年 Johnson らによって見いだされた APP の変異である。この変異によって A β 42/40 の比が減少していることが示され、このことが AD 発症を抑制していると推測されていた。そこで、A598T-APP 変異体が TGF β 2/野生型 APP 誘導性神経細胞死を抑制するか否かを検討した。その結果、(a) A598T-APP 変異体および小脳出血性認知症原因遺伝子 E618Q-APP は神経細胞死を誘導しないこと、(b) TGF β 2/野生型 APP 誘導性神経細胞死は A β に非依存性であること、(c) A598T-APP 変異体が TGF β 2/野生型 APP 誘導性神経細胞死を抑制すること、を明らかにした。



(3) マウスへのスコポラミン投与による健忘症状の CLSP の腹腔内投与による改善

これまで申請者らの研究グループでは in vitro での CLSP のア病関連侵害刺激による神経細胞死抑制活性を検討してきた。そこで in vivo での CLSP の効果を試みた。

これまで、ア病の三主徴とされる老人斑の沈着、神経原線維変化、神経細胞死による脳萎縮の全てを満たすア病モデル動物は作出されていない。そのため本研究では、ムスカリン受容体拮抗薬であるスコポラミンの腹腔内投与による健忘モデルを用いた。

CLSP タンパク質を精製し、腹腔内投与では 500 pmol/body、脳室内投与では 50 pmol/body を投与した。スコポラミンは皮下に 1 mg/kg で投与した。行動試験は Y-maze 試験を行った。その結果、スコポラミン誘導性健忘症状を CLSP の腹腔内および脳室内投与で改善出来ることを in vivo で示した。

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 4 件)

1. Hayashi M, Tajima H, Hashimoto Y, Matsuoka M
Secreted calmodulin-like skin protein ameliorates scopolamine-induced memory impairment.
NeuroReport 2014; 25: 751-735.
(査読あり)

2. Hashimoto Y, Matsuoka M
A mutation protective against Alzheimer's disease renders amyloid β precursor protein incapable of mediating neurotoxicity
J Neurochem. 2014; 130: 291-300.
(査読あり)

3. Hashimoto Y, Takeshita Y, Naito M, Uchino H, Matsuoka M
Apollon/Bruce is upregulated by Humanin.
Mol Cell Biochem. 2014; 397: 147-155.
(査読あり)

4. Takeshita Y, Hashimoto Y, Nawa M, Uchino H, Matsuoka M
SH3-binding protein 5 mediates the neuroprotective effect of the secreted bioactive peptide Humanin by inhibiting c-Jun NH2-terminal kinase.
J Biol Chem. 2013; 288: 24691-24704.
(査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

1. 橋本祐一、外山由夏、松岡正明
An Alzheimer's disease-linked mutant T835M-UNC5C causes neuronal cell death by activating an intracellular death signal cascade
日本薬理学会 第 89 回大会
2016 年 3 月 11 日 横浜市 パシフィコ横浜

2. Hashimoto Y, Matsuoka M
An Alzheimer's disease-linked mutant T835M-UNC5C causes neuronal cell death by activating an intracellular death signal cascade
Society for Neuroscience 2015 Annual Meeting
2015 年 10 月 17 日 アメリカ合衆国シカゴ市 マコーミックプレイス

3. 橋本祐一、竹下裕二、内藤幹彦、内野博之、松岡正明
Apollon/Bruce is upregulated by Humanin
日本薬理学会関東部会 第 131 回
2014 年 10 月 11 日 横浜市 横浜市立大学

4. 橋本祐一、松岡正明
An anti-Alzheimer's disease mutation

makes amyloid precursor protein unable to mediate transforming growth factor β 2-induced neurotoxicity

日本薬理学会 第87回大会

2014年3月20日 仙台市 仙台国際センター

5. Hashimoto Y, Takeshita Y, Nawa M,

Uchino H, Matsuoka M

SH3BP5 is essential for Humanin-mediated the neuroprotective effect of Humanin by inhibiting c-Jun NH₂-terminal kinase
Society for Neuroscience 2013 Annual Meeting

2013年11月11日 アメリカ合衆国サンディエゴ市 サンディエゴコンベンションセンター

〔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

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