

令和 4 年 10 月 17 日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05342

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による中枢神経系における抗老化作用機構の解明

研究課題名（英文）The role of a cytoprotective peptide factor against Alzheimer's disease pathologies in anti-brain aging

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） 3,300,000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脳における生理的機能に着目して解析を進めた。マウスにヒューマニンを投与すると、記憶に関与する脳領域である海馬での神経伝達物質の量が一過性に増加した。また、同時に認知機能を促進させることがわかった。また、ヒューマニンが神経細胞に直接作用することで神経伝達物質の放出を促進させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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として注目されている。また、血液中には抗老化因子が含まれることが知られており、それらの因子を同定しその作用を解析することは、加齢をリスクとする疾患の予防や治療法の開発にも貢献する。本研究ではヒューマニンが神経細胞の正常な活動を制御し脳機能を維持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 is a peptide factor that ameliorates Alzheimer's disease-associated pathological events including cognitive dysfunction. We investigated physiological function of Humanin in the central nervous system. In normal young mice, Humanin increased the amounts of neurotransmitters in the hippocampus, the major brain region for memory formation, and improved cognitive activity. We also found that Humanin directly acted on neuronal cells and promoted neurotransmitter release. These findings suggest that Humanin regulates physiological activity of neurons, which help understand how Humanin maintains healthy cognitive function.

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 神経伝達物質 認知機能

## 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。ヒューマニンは分泌性ペプチドで、合成ペプチドとしても効果を示し、受容体を介して作用する。AD は高齢者の認知症の半数以上を占める疾患で、神経細胞への毒性を有するアミロイドベータを主としたタンパク質が凝集・蓄積した老人斑が脳に認められるほか、認知機能をつかさどるコリン作動性神経が特異的に変性する。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ヒューマニンが認知機能を改善し、脳内の老人斑の量を減少させたことから、ヒューマニンが細胞死抑制だけでなく、神経活動の改善や脳内の異物除去にも関与することが示唆された。また、血液中のヒューマニン量はげっ歯類とヒトで加齢とともに減少することから、血中ヒューマニン量の減少が加齢に伴う認知機能の低下や AD などの疾患の罹患率の上昇に関与すると推測されている。一方、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、AD の主要な病態機序とは異なる経路において認知機能に影響を与えることがわかってきていた。すなわち、ヒューマニンが神経細胞の生理的機能の調節や維持に関わる可能性が考えられた。また、ヒューマニンの遺伝子はミトコンドリアゲノムに存在し、ヒューマニンはミトコンドリアでの ATP 産生促進作用を有する。これらのことを考え合わせると、加齢によってミトコンドリア DNA に変異や欠失が蓄積することがヒューマニン量の減少をもたらす、細胞に様々な加齢性的変化が生じるのではないかと考えられた。つまり、脳においてはヒューマニン量の減少が神経細胞の活動低下をもたらす加齢性的認知機能の低下につながると推測された。

## 2. 研究の目的

若齢動物の血液を投与すると高齢マウスの認知機能の改善や筋肉量の増加などの若返りが起こるなどの研究成果から、血液中には抗老化因子が含まれることが知られている。それらの因子を同定しその作用を解析することは、加齢をリスクとする疾患の予防や治療法の開発にも貢献する。

また、近年、ミトコンドリア内で産生され筋肉や肝臓などの各組織の細胞にホルモン様の効果を持つミトコンドリア由来の新規ペプチドファミリーが提唱され、ヒューマニンはその代表的な分子として注目されている。(図 1)

本研究では、ヒューマニンが神経細胞の活動や脳内環境の変化に及ぼす生理的機能とその作用機序を明らかにし、ヒューマニンが脳の『抗老化因子』であることを検証することを目的とした。

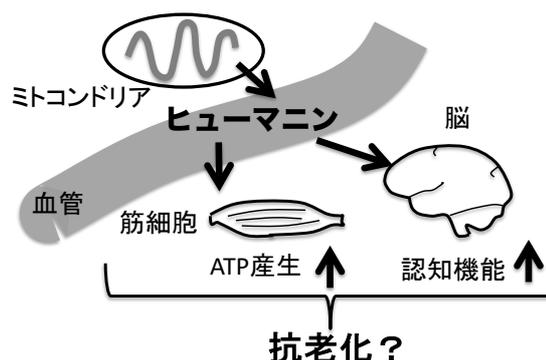


図 1 ヒューマニンの生体内での働き

## 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。また、第 7 セリン残基または第 8 システイン残基をアラニンに置換した誘導体 S7A-HN と C8A-HN はいずれも、アミロイドベータによる神経細胞死を抑制することができない不活性型誘導体である。ヒューマニンは細胞表面に存在する受容体を介して細胞内シグナル経路を活性化させることで細胞死抑制などの細胞保護作用を発揮する。S7A-HN は受容体への作用発揮に必要な 2 量体を形成せず、C8A-HN は受容体への結合能がないため、いずれも細胞保護活性がない。本研究では、これらのヒューマニン誘導体を用いることで、受容体を介したヒューマニンの作用を検討した。

ヒューマニンは、ムスカリン性のアセチルコリン受容体拮抗薬であるスコポラミンや、GABA 受容体の作動薬であるジアゼパムにより記憶障害を誘発したマウスにおいて、その記憶障害を改善させることがわかっている。スコポラミンやジアゼパムは神経伝達物質の作用を調節する薬物であることから、ヒューマニンが記憶に関する神経活動に関与することが考えられた。特に、スコポラミンやジアゼパムに対するヒューマニンの拮抗作用が短時間で認められることから、

ヒューマンイン投与後に短時間で現れる脳内の変化に着目した。そこでまず、野生型の若齢マウスを用いて新規物体認識試験を行った。マウスに2個の同一種類の物体を提示し記憶させ、一定時間後に片方を新規の物体に変えて提示した際の新規物体への探索行動を測定することで、物体記憶が維持されているかを評価する試験である。さらに、ヒューマンイン投与後の自由行動下のマウスから、マイクロダイアリシス法で記憶を担う海馬領域内の細胞外液を経時的に回収した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、そのサンプル内の神経伝達物質の量的変化を調べた。同時にマウスの行動量についても測定した。これらのマウスにおける実験結果を踏まえ、神経細胞に対するヒューマンインの直接的作用について、神経系細胞からの神経伝達物質放出をPC12細胞(ラット褐色細胞腫由来細胞株)とクロマフィン細胞(ウシ副腎髄質由来初代細胞)を用いて検討した。これらの細胞は神経系細胞モデルとして神経伝達物質の開口放出機構の解析に広く用いられている。PC12細胞の細胞集団を用いてヒューマンイン誘導体で処理した細胞からの神経伝達物質の放出量を調べた。さらに、クロマフィン細胞を用いて、アンペロメトリー法により単一細胞からの開口分泌の頻度や動態について詳細に解析した。

#### 4. 研究成果

高活性型誘導体 S14G-HN を投与した若齢マウスは、対照群と比較して、物体認識の記憶が促進されることがわかった。また、マイクロダイアリシス法で海馬から採取した試料におけるアセチルコリンの量は、S14G-HN 投与により一過性に増加することが明らかとなった(図2)。一方で細胞保護活性のない S7A-HN や C8A-HN ではそのような反応が認められなかった。また、アセチルコリン分解酵素阻害剤であるドネペジルが誘導する海馬内アセチルコリン量の変化は S14G-HN とは異なることから、S14G-HN はドネペジルとは違う作用機序で働く可能性が推測された。さらに、モノアミンとその代謝産物についても検討したところ、これらの量も S14G-HN の投与によって上昇する傾向があることがわかった(図3)。このことから、S14G-HN の作用はコリン作動神経特異的ではないことが推測された。

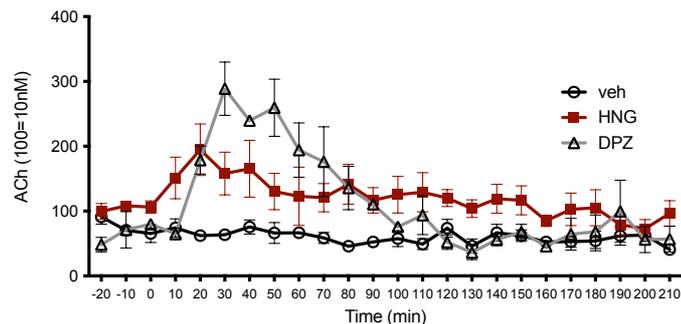


図2 海馬におけるアセチルコリン量の変化  
S14G-HN (HNG), 溶媒(veh), ドネペジル(DPN)を投与し、自由行動するマウスの海馬から採取した細胞外液内のアセチルコリン量を測定した。

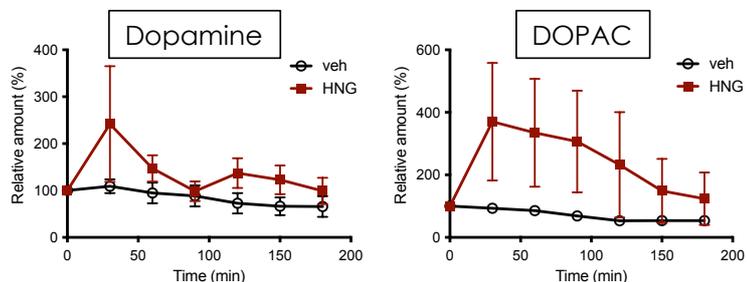


図3 海馬におけるモノアミン量の変化  
S14G-HN (HNG), 溶媒(veh)を投与し、自由行動するマウスの海馬から採取した細胞外液内のモノアミンとその代謝産物の量を測定した。

次に、S14G-HN が神経細胞に直接作用するかを確かめるため、PC12細胞を用いて調節性開口分泌の機能に対する影響を検討した。その結果、アセチルコリンの刺激によって誘導されるカテコラミン分泌が S14G-HN により促進されることがわかった。一方で細胞保護活性のない S7A-HN や C8A-HN ではそのような反応が認められなかった。また、JAK 阻害剤処理すると S14G-HN による促進作用は消失した。ヒューマンインは gp130 を含む三量体型受容体を介して JAK-STAT 系の細胞内シグナル伝達経路を活性化させて細胞保護作用を発揮することがわかっている。これらのことから、ヒューマンインによる調節性開口分泌の促進作用もこの受容体を介して機能する可能性が考えられた。

さらに、このような神経伝達物質放出に対するヒューマンインの作用機序を分子レベルで理解するため、アンペロメトリー法での分泌機構の解析を進めた(図4)。アンペロメトリーでは、個々の分泌小胞からのカテコラミン分泌を電極で検出することで個別のスパイクとして表すことができる。アセチルコリン刺激で起こる開口分泌によるスパイクの数は、S14G-HN 処理した細胞で対照群よりも増加した。さらに、個々のスパイクの形状を解析して開口動態を解析したところ、開口速度が速くなるとともに、分泌される神経伝達物質の量も多くなることがわかった。

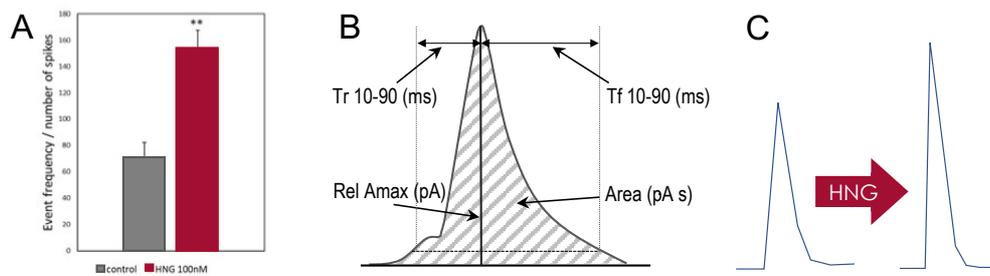


図4 アンペロメトリーによる開口分泌機構の解析

(A) S14G-HN (HNG), 溶媒(veh)処理した細胞のアセチルコリン刺激後の開口分泌頻度を測定した。

(B) 分泌小胞1個の開口分泌によるスパイクの模式図。RelAmaxとAreaは小胞からの分泌量、Tr 10-90とTf10-90は開口と分散の速さを示す。

(C) 個別の分泌小胞の開口動態の変化の模式図。

また、細胞レベルでの老化に対するヒューマニンの作用の検討では、培養細胞を用いた薬物誘導性の老化をヒューマニンが抑制することを確認した。さらに初代神経細胞の自然老化についてもその作用を検証した。

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。また、血液中には抗老化因子が含まれており、若齢ドナーの血漿はアルツハイマー病治療薬としても検討されている。抗老化因子の同定やその機能に関する知見は、加齢に伴う疾患だけでなく、健康寿命の維持にも応用が期待される。本研究では、ヒューマニンが神経細胞の正常な活動を制御し脳機能を維持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。今後は、分子レベルでのメカニズム解析とともに、老化との関連性の詳細についても解析を進める。

#### [文献]

Ikegawa N, Kozuka A, Morita N, Murakami M, Sasakawa N, Niikura T. Humanin derivative, HNG, enhances neurotransmitter release. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2022 Jul 16;1866(10):130204. doi: 10.1016/j.bbagen.2022.130204.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 -

1. 著者名 Ikegawa Natsumi, Kozuka Ayari, Morita Nozomi, Murakami Minetaka, Sasakawa Nobuyuki, Niikura Takako	4. 巻 1866
2. 論文標題 Humanin derivative, HNG, enhances neurotransmitter release	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 130204 ~ 130204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2022.130204	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 N Ikegawa, M Murakami, T Niikura
2. 発表標題 Humanin, a bioactive peptide, increases hippocampal acetylcholine level in normal mice.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 49th Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T Tanaka, Y Kita, T Niikura
2. 発表標題 Effect of Humanin on streptozotocin-induced cognitive deficit in mice
3. 学会等名 Society for Neuroscience 49th Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 N Ikegawa, M Murakami, T Niikura
2. 発表標題 Humanin increase amount of acetylcholine in the hippocampal region of mouse
3. 学会等名 第62回日本神経化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池川夏実, 村上峰宇, 新倉貴子
2. 発表標題 生理活性ペプチドヒューマニンの抗ストレス作用
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T Niikura, N Morita, A Kozuma, N Ikegawa, N Sasakawa
2. 発表標題 The effect of Humanin, a bioactive peptide, on neurotransmitter release.
3. 学会等名 第64回日本神経化学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 N. IKEGAWA, A. KOZUKA, N. MORITA, M. MURAKAMI, N. SASAKAWA, T. NIIKURA
2. 発表標題 Humanin, a bioactive peptide, enhances neurotransmitter release
3. 学会等名 Society for Neuroscience Annual Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------