

平成 21年 6月 16日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790615

研究課題名（和文） アルツハイマー病における STAT3 分子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of STAT3 in Alzheimer ' s disease

研究代表者

千葉 知宏（CHIBA TOMOHIRO）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60398617

研究成果の概要：

アルツハイマー病（ア病）は認知症の最大の原因である。我々は、ア病患者後頭葉よりア病関連神経細胞死を制御するヒューマニン（Humanin, HN）を同定し、HN およびその誘導体であるコリベリン（Colivelin, CLN）の神経保護作用を検討したところ、JAK2/STAT3 経路の活性化によってア病関連神経細胞死を抑制することが判明した。本研究では、STAT3 の不活性化がア病発症に関与するかを検討した。この結果、年齢依存的に海馬神経において STAT3 が不活性化され、ア病患者では STAT3 不活性化が著明であることを見いだした。STAT3 不活性化の主な要因は脳内 アミロイド（A β ）の増加であり、STAT3 不活性化によりアセチルコリン作動性神経の機能が障害されることが明らかとなった。STAT3 を標的とする新しいア病診断・治療薬の開発が期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：アルツハイマー病、Humanin、Colivelin、アセチルコリン作動性神経、STAT3、記憶障害

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病（以下、ア病と略す）は最も頻度の高い神経変性疾患であり、認知症の最大の原因となっている（Mattson, 2004）。その病因は不明であり、治療薬としてはコリンエステラーゼ阻害剤の塩酸ドネペジル（ア

リセプト）が認可されているが、その効果は乏しく、超高齢化社会を迎える我が国において治療薬開発は急務とされている。ア病は病理学的に、老人斑、神経原線維変化、神経細胞死の3つを主徴とする。老人斑の主成分である アミロイド（A β ）は、長らくアルツハ

イマー病治療薬開発の重要な標的分子と考えられて来た。しかしながら、最近、認知機能に異常が認められなかった健常老人においても、その30%にはア病と診断される量の老人斑、神経原線維変化が存在することが報告された (Bennett et al., 2006)。これは、老人斑、神経原線維変化以外に、よりア病に特異的な病理学的変化が存在する可能性を強く示唆している。

我々は、家族性ア病患者において、生下時より遺伝子変異が存在するにも関わらず、50歳程度まで発症しないという事実に着目し、生体内にア病特異的神経保護因子が存在するとの仮説を立てた。この独自の発想からア病患者において特に萎縮の程度が弱い後頭葉よりア病関連神経細胞死を制御する24アミノ酸からなる因子、ヒューマニン (Humanin: HN) を同定した (Hashimoto et al., 2001)。HNの構造機能連関に関する詳細な検討から、我々はこれまでに100 fMという超低濃度で有効なHN誘導体、コリベリン (Colivelin) の創出に成功した (Chiba et al., 2005)。HNおよびColivelinの神経保護作用を検討したところ、*in vitro*において細胞内のJAK2およびSTAT3という分子の活性化を介することが判明した (Hashimoto et al., 2005; Chiba et al., 2005)。HN誘導体は、*in vivo*において、神経細胞死抑制効果以外にも、Aや抗コリン剤の誘導する機能的記憶障害を抑制する効果が我々を含む複数のグループより報告されている (Mamiya et al., 2001; Krejcová et al., 2004; Chiba et al., 2005)。我々は、HN誘導体コリベリンの機能的記憶障害抑制作用がどのような機構によるのかを検討し、これまでに*in vitro*における細胞死抑制作用と同様に、**JAK2/STAT3系を介して認知機能を向上させていることを明らかにした。**

STAT (signal transducer and activator of transcription) は、ショウジョウバエから哺乳類まで広く存在する分子で、発生、細胞増殖、細胞死を含むさまざまな細胞機能を担う分子である (Stephanou and Latchman, 2005)。現在までに7種のSTAT、すなわちSTAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5, STAT-5およびSTAT-6が同定されている。これらの分子はサイトカイン受容体によるシグナルを伝達する重要な分子である。STAT-3ノックアウトマウスが初期発生段階にて胎生致死の表現型を示す為、STAT3は個体において特に重要な機能を担っていることが想定されている (Takeda et al., 1997)。また、STAT3は我々がHNの作用として観察したように、さまざまな種類の細胞において細胞死抑制機能を担っていることが報告されている

(Chen et al., 1999; Grandis et al., 2000)。しかしながら、現在までにSTAT3が生体内において認知・記憶機能に関与するという報告は、我々のHN誘導体による治療効果にSTAT3が関与するという知見以外に存在しない。我々のそもそもの仮説は、生体内の神経保護因子が減少することによってア病が発症するというものであり、その第一の候補がHNである。HNの神経保護作用の本態がSTAT3であることを考えると、ア病脳もしくはア病モデル動物脳においてSTAT3が不活性化されている可能性が高く、またSTAT3不活性化がア病の新たな指標と成る可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、**STAT3分子による認知・記憶障害改善のメカニズムを解明し、またそのア病への関与を検討する。**第一に、STAT3活性低下のア病発症への関与を検討する為、種々のア病モデルマウスを用いて年齢依存的、遺伝系依存的なSTAT3活性状態の変化を検討する。また、この際に、実際のア病患者における関与も検討する為、孤発性ア病患者脳サンプルにおけるSTAT3の活性状態も検討する。第二に、HN誘導体が抗コリン剤誘導性記憶障害に対して強い拮抗作用を示すことに着目し、コリベリンのコリン作動性神経保護作用を検討する。第三にSTAT3を活性化する神経保護因子HNおよびコリベリンを用いて、ア病モデルマウスに対する治療効果を検討する。また、第四にSTAT3が認知・記憶機能に重要な役割を果たしているかを検討する。

具体的には以下の項目を実施する。

- (1) ア病発症におけるSTAT3関与の検討
- (2) コリベリンのコリン作動性神経保護作用の検討
- (3) STAT3活性化によるア病治療効果の検討
- (4) STAT3の認知・記憶機能への関与の検討

3. 研究の方法

本研究において掲げる4つの課題に関して以下のように初期段階の検討を実施する。

(1) ア病発症におけるSTAT3関与の検討

ア病モデルマウス脳におけるSTAT3活性状態の免疫組織学的検討

3系統のア病モデルマウス、Tg2576(家族性ア病原因遺伝子 amyloid precursor protein [APP] 変異体 [Sweden型] トランスジェニック [Tg] マウス)、V642I APP ノックインマウス (APP 変異体 ノックインマウス) および L286V PS1 Tg マウス (家族性ア病原因遺伝子 presenilin 1 変異体 Tg マウス) を用い、発症前、発症期、発症後の脳凍結切片を作製する。サンプルを抗リン酸化STAT3抗体を用いた免疫組織化学法によってSTAT3活性状態を検討する。

ア病患者脳における STAT3 活性状態の免疫組織学的検討

臨床的および病理学的にア病と診断された患者の脳切片を用いて、同様に抗リン酸化 STAT3 抗体による免疫組織化学法によって STAT3 活性状態を検討する。

ア病モデルマウス由来初代培養神経細胞における STAT3 活性状態の検討

ア病モデルマウス Tg2576 およびコントロール野生型動物の胎児脳より初代培養神経細胞を採取し、STAT3 活性状態を経時的に抗リン酸化 STAT3 抗体を用いた免疫プロット法により検出する。

ア病モデルマウスにおける STAT3 標的分子の免疫組織学的検討

ア病患者脳における STAT3 標的分子の免疫組織学的検討

STAT3 が記憶を改善する際の標的分子としては、現在までに ChAT および M1 ムスカリン型アセチルコリン受容体が想定されている。これらの分子がア病モデルマウスおよびア病患者脳においてどのように変化するかを免疫組織学的に検討する。

(2) コリペリンのコリン作動性神経保護作用の検討

コリペリンのコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 増加作用の検討

現在までの検討から、コリペリンが A による大脳中隔における ChAT 発現量低下を抑制することが明らかとなっている (Chiba et al., 2005)。この ChAT 発現量低下の抑制が、コリペリン自身の ChAT 発現増加作用であるかを確認する為、PC12 細胞(ラット褐色細胞腫由来)および F11 細胞(マウス神経芽細胞腫とラット後根神経説細胞の融合細胞)を用いて、RT-PCR 法によってコリペリンの ChAT 遺伝子発現に対する効果を検討する。

コリペリンのムスカリン型アセチルコリン受容体に対する作用の検討

HN 誘導体はムスカリン型アセチルコリン受容体阻害剤の誘導する記憶障害を改善する。この記憶改善作用がムスカリン型受容体の感受性変化によるものであるかを検討する為、PC12 細胞を用いて、ムスカリン様アゴニスト、カルバコール (CCh) が誘導する ERK(extracellular signal-regulated kinase)のリン酸化に対するコリペリンの効果を検討する。

コリペリンのコリンエステラーゼ活性に対する作用の検討

現在最も広く使用されているア病治療薬はコリンエステラーゼ阻害剤の塩酸ドネペジルである。コリペリンのコリン作動性神経保護作用が同様のコリンエステラーゼ阻害作用によるものであるかを検討する為、Ellman 法によってコリンエステラーゼ活性

を測定する。

(3) STAT3 活性化によるア病治療効果の検討

ア病モデルマウス Tg2576 に対するコリペリンの治療効果の検討

記憶障害が顕著になる 12 ヶ月齢以降のア病モデルマウス Tg2576 を用いて、コリペリンを経鼻的に投与する。投与量は 30 nmol/kg/投与で、連日 3 週間にわたって投与し、その効果を行動学的(Y 字型迷路、水探索試験、高架型十字迷路)および組織学的(抗 A 抗体、抗リン酸化タウ抗体、抗リン酸化 STAT3 抗体などによる免疫組織化学)に検討する。

ア病モデルマウス Tg2576 に対するコリペリンの治療効果における JAK2 の関与の検討

ア病モデル動物に対するコリペリンの治療効果において JAK2/STAT3 系が関与するかを JAK2 阻害剤を用いて検討する。

(4) STAT3 の認知・記憶機能への関与の検討

認知・記憶機能に対する JAK2 阻害剤の影響の検討

JAK2/STAT3 系の認知・記憶機能における役割を検討する為、JAK2 阻害剤 AG490 を CD-1 マウスに投与する。この際に大脳を中心とする中枢神経系への影響を観察する為に脳室内留置カニューラスシステム (Yamada et al., 2005)を利用して、JAK2 阻害剤を反復的に脳室内に投与する。2 週間の投与の後、行動学的(Y 字型迷路、水探索試験、高架型十字迷路)に記憶を評価する。

神経特異的 STAT3 抑制トランスジェニックマウスの行動学的解析

平成 19 年度に作製した神経特異的 STAT3 抑制トランスジェニックマウスを行動学的 (Open field 試験、Y 字型迷路、水探索試験、高架型十字迷路、放射状迷路)に解析する。

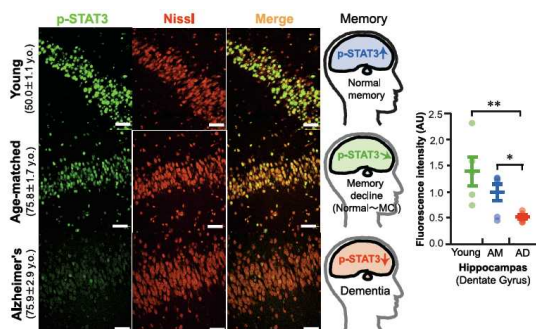
JAK2 阻害剤による記憶障害における STAT3 関与の検討

JAK2 阻害剤を用いた記憶障害誘導系において、STAT3 の不活性化が関与しているかを免疫組織学的に検討する。

4. 研究成果

本研究では、まず記憶障害を発症したア病モデルマウス (Tg2576) に対して CLN の鼻腔内投与を実施した。CLN 投与により Tg2576 の大脳海馬神経において不活性化されていた STAT3 分子が活性化され、記憶が正常マウスと同等まで回復した。この際に、脳内の A 量に変化はなかった。次に若年 (記憶正常) 高齡 (記憶正常) およびア病患者の死後脳標本を用いて STAT3 の活性状態を調べたところ、若年では STAT3 の活性が高く、高齡では STAT3

の活性がやや低下し、ア病患者では STAT3 が著しく不活性化されていた (図)。



図、抗リン酸化 STAT3 抗体を用いた免疫蛍光染色。

A の STAT3 に対する影響を検討すると、正常マウス脳室内に A を投与すると STAT3 が不活性化され記憶障害が引き起こされ、反対に Tg2576 マウスの脳室内に抗 A 抗体を投与すると (A 免疫療法) 脳内の A 量が減少し、STAT3 が再活性化された。また、STAT3 活性化は、ACh 合成酵素 (ChAT) の増加、ムスカリン型 ACh 受容体 (M1) の感受性増加という 2 つの作用で記憶を担うアセチルコリン (ACh) 作動性神経の機能を促進していることが明らかとなった。

以上の結果から、加齢に伴って A が増加し、また HN などの神経保護分子が減少することによって神経細胞の STAT3 不活性化が生じ、ACh 作動性神経の機能障害を中心とした記憶障害が発症することがア病発症のメカニズムであると考えられた。

本研究で明らかになったようにア病患者脳において STAT3 が不活性化しており、これを指標としてア病の進行度を推定できる可能性がある。これまで老人斑を指標としてア病の進行度推定が試みられてきたが、残念ながら老人斑と記憶障害との相関性は高くないと報告されている。STAT3 を指標することで記憶障害との相関性が高い診断法の開発が期待される。

現在、CLN やその他の HN 誘導体をア病治療に臨床応用するための研究・開発に力を注いでいるが、今回の研究から CLN の鼻腔内投与により神経細胞における STAT3 再活性化が促進され、記憶障害を改善する可能性が示された。このア病に対する STAT3 再活性化療法は、脳内 A の除去を必要とせず、神経細胞に直接作用する全く新しい治療法である。また、STAT3 活性化が ACh 作動性神経の機能を補助する作用を持つことから、現在使用されているア病治療薬アリセプトと相乗的な効果が期待される。

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4件)

全て査読あり

Chiba T*, Yamada M, Sasabe J, Terashita K, Shimoda M, Matsuoka M, Aiso S. Amyloid beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. *Mol Psychiatry* **14**: 206-222, 2009. (*Corresponding author, Fig.2 was accepted as the cover art of *Mol Psychiatry* Vol.14, Issue 2, Feb 2009, 下図を参照)



Yamada M, Chiba T*, Sasabe J, Terashita K, Aiso S, Matsuoka M. Nasal Colivelin Treatment Ameliorates Memory Impairment Related to Alzheimer's Disease. *Neuropsychopharmacology* **33**: 2020-2032, 2007. (*Corresponding author, Fig.1 was accepted as the cover art of *Neuropsychopharmacology* Vol.33, Issue 8, July 2008, 下図を参照)



Sasabe J, Chiba T, Yamada M, Okamoto K, Nishimoto I, Matsuoka M, Aiso S. D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic

lateral sclerosis. *EMBO J* 26: 4149-4159, 2007.

Chiba T*, Aiso S, Matsuoka M. Neuroprotection against neurodegenerative diseases: development of a novel hybrid neuroprotective peptide Colivelin. *Mol Neurobiol* 35: 55-84, 2007. Review. (*Corresponding author)

[学会発表](計5件)

Chiba T, Yamada M, Aiso S. Amyloid beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. ADPD2009, 466, Prague, Czech Republic, Mar.11-15, 2009. ポスター発表

千葉知宏、山田真吏奈、相磯貞和. アミロイドは海馬神経細胞における JAK2/STAT3 シグナルを攪乱することにより記憶障害を誘導する. 第82回日本薬理学会年会、01H-1-2、横浜、3月16日、2009年. 口頭発表.

Yamada M, **Chiba T**, Sasabe J, Terashita K, Aiso S, and Matsuoka M. Nasal Colivelin treatment for Alzheimer's disease-related memory impairment. *Neuroscience* 2007, 49.2/L14, San Diego, California, USA, Nov.3-7, 2007. ポスター発表.

Chiba T, Yamada M, Sasabe J, Terashita K, Aiso S, and Matsuoka M. The JAK2/STAT3 signaling axis regulates memory in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2007, 691.17/M17, San Diego, California, USA, Nov.3-7, 2007. ポスター発表.

Sasabe J, **Chiba T**, Yamada M, Okamoto K, Nishimoto I, Aiso S, and Matsuoka M. D-serine is a key determinant of glutamate excitotoxicity in ALS. *Neuroscience* 2007, 160.2/W9, San Diego, California, USA, Nov.3-7, 2007. ポスター発表.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/anatomy/index-jp.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

千葉 知宏 (CHIBA TOMOHIRO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 60398617

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

山田 真吏奈 (YAMADA MARINA)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 70508621