

機関番号：34521

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500295

研究課題名（和文）アルツハイマー病の学習記憶障害に対する肝細胞増殖因子の機能解析と疾患治療への適用

研究課題名（英文）Analysis for the therapeutic effect of hepatocyte factor on learning and memory dysfunction in the mouse model of Alzheimer's Disease.

研究代表者

角山 圭一 (KADUYAMA KEIICHI)

姫路獨協大学・薬学部・准教授

研究者番号：70454767

研究成果の概要（和文）：

肝細胞増殖因子（HGF）を神経特異的に過剰発現するマウスを用いて、高次脳機能に対するHGFの効果を行動的、病理学的、生化学的試験により解析した。その結果、HGFは学習記憶機能を亢進することが明らかになった。さらに、この結果をもとに、アルツハイマー病モデルマウスを用いて、アルツハイマー病の学習記憶障害に対するHGFの効果解析した。その結果、HGFは学習記憶障害を改善する傾向が認められ、治療薬になる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We examined the **therapeutic effect** of hepatocyte growth factor (HGF) on higher brain function, including learning, memory and cognition, using neuron-specific enolase promoter-driven HGF transgenic (HGF-Tg) mice by biochemical, behavioral and neuropathological analysis. In this study, we found that HGF enhances learning and memory function in HGF-Tg mice as compared with wild-type mice. Based on these results, we next examined the therapeutic effects of HGF on learning and memory dysfunction of Alzheimer's disease by using the model mouse of Alzheimer's disease (mutant human Tau^{N279K}-transgenic mouse). As a result, HGF ameliorates learning and memory dysfunction of Alzheimer's disease examined by behavioral analysis, providing a potential novel therapy for Alzheimer's disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経科学一般

キーワード：アルツハイマー病、肝細胞増殖因子、長期増強現象、タウ蛋白質

1. 研究開始当初の背景

肝細胞増殖因子（HGF）は、船越（連携研究者）の研究室で、成熟肝細胞に対する増殖促進因子として、発見・精製・

クローニングされた分子である。その後の多くの研究により、HGFは細胞増殖促進活性に加え、細胞運動促進、形態形成誘導、抗細胞死、血管新生促進など多彩

な生理活性をもつことが明らかになった。また、HGFの生理活性は肝臓のみならず、心臓、腎臓、肺、膵臓など広い臓器にわたることが明らかとなった。脳や脊髄といった神経系も例外ではなく、HGFは神経細胞の生存、運動および神経突起伸長を促進し、神経変性疾患の神経再生に大きく寄与する神経栄養因子であることが明らかになっている。実際、種々の神経疾患モデル動物において強力な神経細胞保護作用を示し、著名な治療効果を示すことが多数報告されている (Kadoyama *et al.*, in press)。しかし、多くの研究が行われていにもかかわらず、学習記憶、認知、思考など脳の高次神経機能に対するHGFの効果は、まだ、十分に解明されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、HGFを神経特異的に過剰発現するトランスジェニックマウス (HGF-Tg) を用いて、高次脳神経機能に対するHGFの効果、行動学的、電気生理学的、病理学的・生化学的解析により総合的に評価する。また、アルツハイマー病のモデルマウスにHGFを供給し、アルツハイマー病の学習記憶障害に対するHGFの治療効果を検討するとともに、海馬のコリン作動性神経細胞に対するHGFの神経保護効果も検討し、HGFのアルツハイマー病に対する機能解析と疾患治療への適用を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、HGFを神経特異的に発現するトランスジェニックマウス (HGF-Tg)、アルツハイマー病モデル動物を用いて、以下の(1)~(2)を遂行する。

(1) 高次神経機能である学習記憶機能に対するHGFの効果解析する。

・生化学的・組織学的解析

HGF-Tgマウス海馬において、HGFおよびその受容体であるc-Met/HGF受容体(c-Met)の発現および局在を生化学的・組織学的手法により解析した。HGF蛋白質の産生レベルは酵素免疫測定(ELISA)法によって定量し、c-Metの発現はウェスタンブロット法および免疫組織化学により解析した。また、c-Metのチロシンリン酸化(c-Metの活性化)をウェスタンブロット法および免疫組織化学により解析し、HGFが海馬神経細胞上のc-Metを介して、そのシグナルが神経細胞内に伝達されているか検討した。

・行動学的解析

個体レベルでの学習記憶に対するHGFの

効果を行動的解析により解析した。学習記憶の行動学的な評価は、スタンダードな方法であるモリスの水迷路(空間認識の学習記憶を測定する方法)で解析した。

(2) アルツハイマー病モデルマウスにHGFを供給し、アルツハイマー病の学習記憶障害に対するHGFの改善(治療)効果を解析した。

・HGFの供給

アルツハイマー病モデルマウスの脳内への供給は、アルツハイマー病モデルマウス(変異ヒトタウ蛋白質過剰発現マウス、SJLBマウス)に、前述したHGF-Tgマウスを交配して、ダブルトランスジェニックマウスを作製して、HGFを神経特異的に持続的、安定的に供給する方法を選択した。この際、Littermate, HGF-Tg, SJLB, SJLB x HGFの4種のマウスが得られる。実験にはこれらの4種のマウス(5、10、15、20カ月齢)を使用し、上記(1)の方法(生化学的・組織学的・行動学的解析)により解析し、アルツハイマー病の学習記憶障害に対するHGFの改善(治療)効果を解析した。

4. 研究成果

(1) 学習記憶機能に対するHGFの効果

HGF-Tgマウスの海馬におけるHGF蛋白質の産生レベルをELISA法により定量した。その結果、HGF蛋白質は海馬および大脳皮質で産生され、その産生レベルは、HGF-Tgマウスで野生型マウスよりも有意に増加していた。一方、HGFの受容体であるc-Met/HGF受容体(c-Met)は、ウェスタンブロット法および免疫組織化学により解析した結果、海馬で発現し、神経細胞に局在していた。また、c-Metのチロシンリン酸化(c-Metの活性化)をウェスタンブロット法により解析した結果、チロシンリン酸化c-Metのシグナルは、野生型に比べてHGF-Tgマウスの方が強く、HGFのシグナルがHGF濃度に依存して細胞内に伝達されることが示唆された。

個体レベルでの学習記憶機能に対するHGFの効果を行動的試験(モリスの水迷路)により解析した。その結果、HGFは、その受容体刺激を介して、学習記憶機能を亢進することが明らかになった。さらに、他の試験方法の解析も行い、HGFの学習記憶に対する効果を十な検討を継続中である。

(2) アルツハイマー病の学習記憶障害に対するHGFの治療効果の解析

上記(1)の結果から、HGFは、その受容体刺激を介して、学習記憶機能を亢進することが明らかになった。また、HGFは強力な神経細胞保護作用を示すことから、HGFは

アルツハイマー病に対して、病理学的（神経細胞死を抑制）だけでなく、機能的（学習記憶機能）にも改善する強力なアルツハイマー病の根本治療薬になる可能性が考えられる。従って、アルツハイマー病モデルマウス（変異ヒトタウ蛋白質過剰発現マウス、SJLB マウス）に HGF-Tg マウスを交配して、ダブルトランスジェニックマウスを作製し、アルツハイマー病の学習記憶障害に対する HGF の治療効果を行動学的試験により解析した結果、HGF はアルツハイマー病の学習記憶障害を改善効果を示唆する結果が得られた。現在、行動学的試験を継続して解析中である。さらに、アルツハイマー病の神経変性に対する HGF の神経保護作用・治療効果を確認するとともに、その分子作用メカニズム（アポトーシス、オートファジー、グリア細胞活性化、凝集体形成などに対する効果）を生化学的・組織学的手法により解析中である。また、プロモデオキシウリジンをを用いた細胞増殖活性を解析し、HGF は神経細胞死を抑制する神経保護作用だけでなく、神経新生を促す可能性を解析中である。

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 9 件）

- ① Kadoyama K, Kadoyama K, Funakoshi H, Nakamura T, Sakaeda T Therapeutic potential of hepatocyte growth factor for treating neurological diseases. *Cur. Drug Ther. in press.*, 2011. (査読有)
- ② Otani M, Taniguchi T, Sakai A, Seta J, Kadoyama K, Nakamura-Hirota T, Matsuyama S, Sano K, Takano M Phosphoproteome profiling using a fluorescent phosphosensor dye in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164: 804-18, 2011. (査読有)
- ③ Nishimoto T*, Kadoyama K*, Taniguchi T, Takano M, Otani M, Nakamura-Hirota T, Lu Y, Matsumoto A, Matsuyama S (*equally contribution). Synaptotagmin1 synthesis induced by synaptic plasticity in mouse hippocampus through activation of nicotinic acetylcholine receptors. *Neurosci. Lett.* 489: 25-29, 2011. (査読有)
- ④ Takenokuchi M, Kadoyama K*, Chiba S, Sumida M, Matsuyama S, Saigo K, Taniguchi T* (*corresponding author) SJLB mice develop tauopathy-induced parkinsonism. *Neurosci. Lett.* 473: 182-185, 2010. (査読有)
- ⑤ Kadoyama K, Funakoshi H, Ohya-Shimada W, Nakamura T, Matsumoto K, Matsuyama S, Nakamura T Disease-dependent reciprocal phosphorylation of serine and tyrosine residues of c-Met/HGF receptor contributes disease retardation of a transgenic mouse model of ALS. *Neurosci. Res.* 65: 194-200, 2009. (査読有)
- ⑥ Takano M, Otani M, Sakai A, Kadoyama K, Matsuyama S, Matsumoto A, Takenokuchi M, Sumida M, Taniguchi T Use of a phosphosensor dye in proteomic analysis of human mutant tau transgenic mice. *NeuroReport* 20: 1648-1653, 2009. (査読有)
- ⑦ Matsumoto A, Matsumoto R, Kadoyama K, Nishimoto T, Matsuyama S, Midorikawa O Quantitative analysis of β -amyloid peptides expressed in human cerebrospinal fluid by an improved method of antibody-assisted time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Pep. Res. Ther.* 15: 205-210, 2009. (査読有)
- ⑧ Matsuyama S, Taniguchi T, Kadoyama K, Matsumoto A Long-term potentiation-like facilitation through GABA_A receptor blockade in the mouse dentate gyrus in vivo. *NeuroReport* 19: 1809-1813, 2008. (査読有)
- ⑨ 松山正剛, 角山圭一, 谷口泰造 GABA_A 受容体アンタゴニストによる LTP 様疎通の誘発 発生体の科学 60: 392-393, 2009. (査読無)

〔学会発表〕（計 12 件）

- ① 鷹野正興, 大草真美, 松山正剛, 廣田徹, 角山圭一, 尾谷三枝子, 佐野圭二 脈絡叢上皮細胞 ECPC-4 細胞における炎症性タンパク発現と LPS によるその誘導 日本薬学会第 131 年会 開催中止 (静岡)
- ② 廣田徹, 鷹野正興, 尾谷三枝子, 角山圭一, 松山正剛 ニコチンによって誘導されるマウス海馬における in vivo LTP 様作用下での EphA3 受容体発現の経時的变化 第 84 回日本薬理学会年会 開催中止 (横浜)
- ③ 廣田徹, 鷹野正興, 尾谷三枝子, 角山圭一, 松山正剛 GABA_A 受容体阻害剤 bicuculline 投与によるマウス海馬のプロテオミクス解析 BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会) 2010. 12. 7-10 (神戸)
- ④ 角山圭一, 船越洋, 島田 (大谷) 若菜, 中村隆弘, 松本邦夫, 松山正剛, 中村敏一 ALS 依存的な HGF による c-Met/ HGF 受容体 (c-Met) の活性化とその制御機構

第 9 回日本再生医療学会総会
2010. 3. 18-19. (広島)

- ⑤千葉俊明、高田えりか、樋山梢、谷口泰造、角山圭一、田所衛、鈴木登 認知症モデル
マウスにおける移植治療への検討 第 9 回
日本再生医療学会総会 2010. 3. 18-19.
(広島)
- ⑥Takano M, Otani M, Sano K, Kadoyama K,
Matsuyama S, Taniguchi T
Phosphoproteome profiling of human tau
with N279K mutation transgenic mice.
The 22nd Biennial Meeting of the
ISN/APS Joint Meeting 2009. 8. 23-29.
(Busan, Korea)
- ⑦Taniguchi T, Kadoyama K, Takenokuchi M,
Chiba S, Suzuki N, Matsumoto A,
Matsuyama S Parkinsonism induced by
tauopathy: Analysis of SJLB mice. The
22nd Biennial Meeting of the ISN/APS
Joint Meeting 2009. 8. 23-29. (Busan,
Korea)
- ⑧谷口泰造、角山圭一、炬口真理子、西本高
明、千葉俊明、鈴木登、松本明、松山正剛
Tauopathy induced Parkinsonism:
analysis of SJLB mice. 第 52 回日本神
経化学会 2009. 6. 22-24. (群馬)
- ⑨谷口泰造、千葉俊明、角山圭一、永田大典、
田中昭二、川上知一、鈴木登、佐加良英治、
松山正剛 タウオパチーにおけるパーキ
ンソン症状: SJLB マウスを用いた検討
第 56 回日本実験動物学会総会 2009. 5.
14-16. (大宮)
- ⑩西本高明、角山圭一、谷口泰造、松本明、
松山正剛 マウス脳内 synaptotagmin1 の
発現に対するニコチンの影響 第 82 回日
本薬理学会年会 2009. 3. 16-18. (横浜)
- ⑪鷹野正興、尾谷三枝子、富山貴美、森啓、
谷口泰造、角山圭一、松山正剛 SJLB マウ
スと APP 変異マトランスジェニックマウス
におけるリン酸化プロテオーム解析 第
82 回日本薬理学会年会 2009. 3. 16-18.
(横浜)
- ⑫角山圭一、西本高明、谷口泰造、松本明、
松山正剛 マウス海馬におけるテタヌス
刺激で誘発される長期増強現象により変
動する遺伝子群の解析 第 114 回日本薬理
学会近畿部会 2008. 11. 14. (神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角山 圭一 (KADOYAMA KEIICHI)
姫路獨協大学・薬学部・准教授
研究者番号: 70454767

(2) 研究分担者

松山 正剛 (MATSUYAMA SHOGO)

姫路獨協大学・薬学部・教授
研究者番号: 80243319

谷口 泰造 (TANIGUCHI TAIZO)
姫路獨協大学・薬学部・教授
研究者番号: 70346253

(3) 連携研究者

松本 明 (MATSUMOTO AKIRA)
姫路獨協大学・薬学部・客員教授
研究者番号: 80181759

船越 洋 (FUNAKOSHI HIROSHI)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 40273685

鷹野 正興 (TAKANO MASAOKI)
神戸学院大学・薬学部・講師
研究者番号: 30258107

尾谷 三枝子 (OTANI MIEKO)
神戸学院大学・薬学部・助教
研究者番号: 40068284