

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390059

研究課題名(和文) 神経細胞死抑制因子の動態に基づいたアルツハイマー病克服への試み

研究課題名(英文) Characterization and clinical application of endogenous Alzheimer's disease-suppressing factor

研究代表者

松岡 正明 (Matsuoka, Masaaki)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：70222297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)の防御因子ヒューマンン(HN)の研究を押し進め、1)EHは脳脊髄液中に1-5nMの濃度で存在すること、さらに、2)EHはAD類似の認知症動物モデルで有効であることを示した。これらの結果は、EHが内在性の抗AD因子としてHNより中心的な役割を果たしていることを示唆する。さらに、4)ADでは脳脊髄液中のEH濃度が減少する傾向にあることを見だし、EHの挙動がAD発症の一要因となっている可能性があることを推論した。また、5)EH阻害分子EHbetaは細胞内でEHの分泌を抑制し、EHsigmaは細胞外に分泌されEHと結合してEH阻害因子として機能することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：A new Alzheimer's disease (AD)-suppressive factor EH has been biologically examined. First, it was found that EH concentration in the cerebrospinal fluid is 1-5nM in humans. Second, intraperitoneal administration of EH ameliorates dementia of mice, caused by scopolamine, a muscarinic acetylcholine receptor blocker. Combined with foregoing findings, these results suggest that EH, rather than Humanin, plays a central role in vivo as an AD-suppressive factor. Furthermore, EH concentrations in the cerebrospinal fluids of AD patients appear to be lower than those of normal controls. Finally, it was found that EHbeta inhibits secretion of EH into extracellular space and EHsigma is secreted into the extracellular space and inhibits EH activity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学, 薬理学一般

キーワード：アルツハイマー病 神経細胞死 ヒューマンン

### 1. 研究開始当初の背景

『アルツハイマー病 (AD)』は、65 歳以上の人口の約 3%が罹患する非常に頻度の高い神経変性疾患であり、超高齢化社会では、その克服が医学上の最も大きな課題の一つである。しかし、数多くの AD 研究にもかかわらず、現在まで AD 発症のメカニズムは十分解明されていない。その結果、明瞭な脳神経細胞死の出現する前の AD を診断する早期診断法は存在せず、また予後を明瞭に改善する治療法は存在しない。特に、現在開発中の殆どの AD 治療新薬は脳内 A $\beta$ の量を減少させる治療薬であるが、臨床試験の初期段階の成績は芳しくなく、新たな戦略に基づいた診断治療方法の開発が緊急課題となっている。

研究代表者は現在まで『内在性 AD 防御因子ヒューマニン (HN) を応用する神経細胞死抑制療法』の重要性を世界で主導してきた。特に、ここ数年の前臨床研究により、HN 治療法が全ての種類の AD マウスモデルの認知症を改善することを示したことは HN 療法の価値を確立した。また、基礎研究では、特異的な HN 受容体を世界で最初に同定し、HN が AD 神経細胞死を抑制する生理的な内在性因子であることを示した。さらに、HN 作用をもつ新たな内在性 AD 防御因子 EH や特異的な HN 阻害因子及び EH 阻害因子等一連の分子を同定し、HN の臨床応用に更なる理論的な根拠を付け加えた。

### 2. 研究の目的

本研究課題は、1) HN/EH に関する未解決な問題に対する基礎研究を遂行し、また、上記で述べた臨床応用上の問題点を克服すべく、2) HN シグナル活性化療法の臨床応用を確実かつ効率的なものにする研究を行い、さらに、HN シグナル構成因子 (EH/HN、HN 受容体、EH/HN 阻害因子等) の AD における増減を検討して、3) 脳神経細胞死が出現する前の超早期 AD の生化学的早期診断法を確立する研究を行う。2) は EH を応用した新たなペプチド治療薬の開発と HN 様作用を持つ経口薬の開発研究からなる。

### 3. 研究の方法

第 1 に、これら HN シグナルを増強する AD 治療薬シーズを臨床応用するための基礎及び応用研究を展開する。組織発現の検討やノックアウトマウスの作成などの EH に関する基礎研究を行うとともに、EH の AD 治療薬としての前臨床試験を行う。また HN 作用を示すヒット化合物の構造改変を行い、活性の強い誘導体採取を目指す。第 2 に、臨床サンプルを用いて、HN/EH そのもの、それらの特異的な阻害因子、さらに HN 受容体構成サブユニット発現の増減と AD 発症と老化の因果関係を検討する。最終的に、AD の早期診断法を確立することを目標とする。

具体的には、

(1) AD 神経細胞死を直接抑制する新世代 AD 治療法の開発

<EH(一部 HN)の基礎研究>

EH および EH を制御する因子の組織発現と加齢による変動を組織染色や ELISA により検討する。

HN あるいは EH の最近発見した複数の阻害因子や分泌制御因子の機能を解析する。

EH(マウス EH1 と EH2)のノックアウトマウスを作成する。

EH のインスリン作用増強効果の検討。最近、HN が II 型糖尿病に有効性を示す可能性が示された (Muzumdar Plos One 2009)。EH に同様な作用があるか否か検討する。

EH の精巣に対する効果の検証。HN には精子の細胞死抑制効果があることを米国のグループが示した (Lue Endocrinology 2010)。EH に類似の作用があるか否か検討する。

<EH の前臨床研究>

マウス EH1 と EH2 とヒト EH のリコンビナント蛋白産生系を樹立する。これら遺伝子の stable transformant 培養細胞を樹立し、細胞外に分泌された EH を精製する。EH の体内動態の検討 (薬理試験)。脳内移行の証明末梢投与した EH が中枢移行することをヨードラベルした EH を用いて検証する。また ELISA を用いて非ラベル EH の髄液移行を示す。

AD モデル動物実験。EH1/EH2 の AD 動物モデルの認知症状に対する効果を検証する。

<HN 作用を有する経口剤の開発>

既に保持するリード化合物の構造展開作業を行う。既に確立した細胞死アッセイを行い、その活性情報をフィードバックするこのサイクルを繰り返し、AD 動物モデルで有効性を試験することが可能なレベル (EC50=1microM 以下)の活性を持つ化合物を得る事を目指す。

(2) AD 発症とヒューマニンシグナルの関係解明と早期診断法の確立

ヒトサンプル AD 罹患者 / 正常コントロール; 脳組織標本、髄液、血液)を用いて、AD では以下に掲げたどの分子レベルで HN シグナルが低下しているか検討する。組織染色手法を用いて脳組織標本における各分子の発現レベルの変動をおおよそ推定し、独自に開発した各分子の ELISA 法な

どの方法を用いて髄液及び血液中の各分子レベルの変動を計測する。

HN あるいは EH そのもの (組織染色、ELISA)、

HN/EH 受容体 (WSX-1, CNTFR) (組織染色)  
HN あるいは EH の内在性阻害因子 (組織染色, ELISA)

#### 4. 研究成果

(1) AD 神経細胞死を直接抑制する新世代 AD 治療法の開発

<EH(一部 HN)の基礎研究 / 前臨床研究>

EH(CLSP) の基礎的な機能の解明 (Hashimoto et al., 2013; Hayashi et al., 2014 in press)。すなわち、1) EH は HN より  $10^5$  以上強い活性 ( $EC_{50}=100\text{pM}$ ) を持ち、主に皮膚組織で産生され、血液中に分泌され、血液脳関門を通過して中枢神経系に移行すること、さらに、2) EH は脳脊髄液中に 1-5nM の濃度で存在すること、3) 腹腔内投与した EH はスコポラミン誘導性のマウス記憶障害を抑制した。

以上の成果は EH(CLSP) が生体内では HN 作用を担う中心分子であることを示唆した。

HN/EH の下流シグナル分子の同定 (Takeshita et al., 2013)。HN/EH シグナルで活性化される細胞内 mediator として JNK の活性を抑制する分子 SH3BP5 および Apollon を同定した。

EH 阻害物質の発見。阻害物質 EH $\beta$  は EH に結合して、その細胞外分泌を阻害し、阻害物質 EH $\sigma$  はそれ自身が分泌され、細胞外で EH と結合して、直接 EH の活性を抑制することを発見した (未発表)。

EH の精巣 germ cell 細胞死の抑制。EH は HN と同様に、精巣 germ cell の細胞死を抑制する活性を有することを発見した (未発表)。

EH transgenic mouse の作成。マウスに 2 つの EH1/EH2 という EH 遺伝子が存在することが明らかとなったため、ノックアウトマウス作成から transgenic マウス作成に変更して、EH1 transgenic マウスを作製した。

AD を抑制する APP 変異体は細胞死を引き起こしにくいことを示した (Hashimoto et al., 2014 in press)。

<HN 作用を有する経口剤の開発>

より活性の強い小分子は得られなかった。

(2) AD 発症とヒューマンシグナルの関係解明と早期診断法の確立

EH の体内挙動。

EH は血液内濃度は AD とコントロールで差がみられなかったが、髄液では AD 罹患者の方が低下傾向にあった (未発表)。

EH 阻害物質の検出アッセイ系の作成。EH $\sigma$  の好感度検出系を作製した。血液中並びに髄液中に EH $\sigma$  が存在することを確認した (未発表)。

#### 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 16 件)

- 1) Hashimoto Y, Matsuoka M\*. A mutation protective against Alzheimer's disease renders amyloid precursor protein incapable of mediating neurotoxicity. *J Neurochem.* 2014 Mar 19. doi: 10.1111/jnc.12717.
- 2) Nawa M, Matsuoka M\*. KCTD20, a relative of BTBD10, is a positive regulator of Akt. *BMC Biochem* 2013 in press (accepted for publication 10/23/2013)
- 3) 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 doi: 10.1074/jbc.M113.469692
- 4) Hayashi M, Tajima H, Hashimoto Y, Matsuoka M\*. Secreted calmodulin-like skin protein ameliorates scopolamine-induced memory impairment. *Neuroreport.* 2013 Jun 20. [Epub ahead of print]
- 5) Hashimoto Y, Nawa M, Kurita M, Tokizawa M, Iwamatsu A, Matsuoka M\*. Secreted calmodulin-like skin protein inhibits neuronal death in cell-based Alzheimer's disease models via the heterotrimeric Humanin receptor. *Cell Death Dis* Mar 21;4:e555. doi:10.1038/cddis.2013.80.
- 6) Furuta N, Makioka K, Fujita Y, Ikeda M, Takatama M, Matsuoka M, Okamoto K. Reduced expression of BTBD10 in anterior horn cells with Golgi fragmentation and pTDP-43-positive inclusions in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology.* 2013 33:397-404 doi: 10.1111/neup.12010. [Epub ahead of print]
- 7) Suzuki H, Matsuoka M\*. The JNK/c-jun signaling axis contributes to the TDP-43-induced cell death. *Mol Cell Biochem.* 2013 372:241-248
- 8) Sasabe J, Miyoshi Y, Suzuki M, Mita M, Konno R, Matsuoka M, Hamase K, Aiso S. D-amino acid oxidase controls motoneuron degeneration through D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA.*

- 2012 ;109:627-632
- 9) Nawa M, Kage-Nakadai E, Aiso S, Okamoto K, Mitani S, Matsuoka M\*. Reduced expression of BTBD10, an Akt activator, leads to motor neuron death. Cell Death Differ 2012;19:1398-1407
- 10) Tachi N, Hashimoto Y, Matsuoka M\*. MOCA is an integrator of the neuronal death signals that are activated by familial Alzheimer's disease-related mutants of amyloid beta precursor protein and presenilins. Biochem J 2012;442: 413-422
- 11) Suzuki H, Matsuoka M\*. TDP-43 toxicity is mediated by the unfolded protein response-unrelated induction of C/EBP homologous protein expression. J Neurosci Res. 2012 90:641-647
- 12) Lee K, Suzuki H, Aiso S, Matsuoka M\*. Overexpression of TDP-43 causes partially p53-dependent G2/M arrest and p53-independent cell death in HeLa cells. Neurosci Lett. 2012 506:271-276
- 13) Suzuki H, Matsuoka M\*. Amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant VAPB enhances TDP-43-induced motor neuronal toxicity. J Neurochem. 2011 119:1099-1107
- 14) Rossini L, Hashimoto Y, Suzuki H, Kurita M, Gianfriddo M, Scali C, Roncarati R, Franceschini D, Pollio G, Trabalzini L, Terstappen GC, Matsuoka M\*, Caricasole A. VSTM2L is a novel secreted antagonist of the neuroprotective peptide Humanin. FASEB J 2011 25:1983-2000
- 15) Suzuki H, Lee K, Matsuoka M\*. TDP-43-induced death is associated with altered regulation of BIM and Bcl-xL and attenuated by caspase-mediated TDP-43 cleavage. J Biol Chem. 2011 286:13171-13183
- 16) Matsuoka M\*. Humanin signal for Alzheimer's disease. A review. J Alzheimers Dis. 2011;24 Suppl 2:27-32

[学会発表](計 11件)省略

[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 松岡 正明  
(Matsuoka, Masaaki)  
東京医科大学 医学部 教授  
研究者番号：70222297

(2)研究分担者 岩本 俊彦  
(Iwamoto, Toshihiko)  
東京医科大学 医学部 兼任教授  
研究者番号：10246168  
(平成23年度から24年度で研究分担者)

研究分担者 馬原 孝彦  
(Umahara, takahiko)  
東京医科大学 医学部 准教授  
研究者番号：70266477

(3)連携研究者  
( )