

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791001
 研究課題名(和文) アルツハイマー病における細胞老化因子 E c r g 4 の解析—受容体同定から創薬に向けて
 研究課題名(英文) Role of cellular senescence factor Ecr g 4 -investigating its expression and identifying its receptor which may be a therapeutic target in Alzheimer' s Disease
 研究代表者
 久住 呂 友紀 (KUJURO YUKI)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：60398625

研究成果の概要（和文）：

ApoE4アルツハイマー病トランスジェニックマウスでは脳組織においてSA-β-gal活性の上昇やタンパクレベルでEcr g 4の発現が増加している可能性が示唆された。これらのことから、アルツハイマー病においては細胞老化のメカニズムが関与している可能性が高い。また、Ecr g 4の受容体同定に関してはEcr g 4に結合するタンパクを免疫沈降法を用いて検索した結果、候補になるバンドが得られており、今後さらに解析をすすめていく予定である。

研究成果の概要（英文）：

In the brains of ApoE4 Alzheimer' s Disease transgenic mice, SA-β-gal activity and expression of Ecr g 4 was elevated compared to non transgenic mice. Our data suggests that cellular senescence might be one of the causal mechanisms of Alzheimer' s Disease. By carrying out immunoprecipitation of Ecr g 4 binding protein, few bands were detected which might be candidates of Ecr g 4 receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：細胞老化、アルツハイマー病、受容体、分泌因子、認知症

1. 研究開始当初の背景
アルツハイマー病を中心とした神経変性疾

患の多くは、一部の遺伝性のもを除いて加齢が引き金となって発症する。その発症メカ

ニズムに関しては、ER stress、細胞周期の異常など様々な報告があるが、いまだ明らかではない。

報告者は留学先の理化学研究所において、生体の脳の老化の一因として、元来 *in vitro* の現象と考えられていた神経細胞の細胞老化 (cellular senescence) が関与していることを、新規の細胞老化誘導分泌因子 *EcrG4* (Esophageal cancer-related gene 4) を同定することにより明らかにした (PNAS, 107, 8259-8264, 2010)。一方、*EcrG4* は正常の脳の老化のみならず、アルツハイマー病患者の海馬の網羅的な遺伝子発現解析では著明な発現上昇 (正常老人と比較して 13.7 倍) を認めるとの報告がある (Mol. Cell. Neurosci., 36, 313-331, 2007)。本研究では“細胞老化”という新たな観点から神経変性疾患にアプローチし、さらに *EcrG4* は分泌因子であるという利点を生かして、疾患の治療への応用に向けて受容体を同定することを試みた。

2. 研究の目的

アルツハイマー病を中心とした神経変性疾患の発症メカニズムの一端を明らかにするべく、疾患モデルマウスにおいて細胞老化の状態が関与しているかを *EcrG4* の発現とともに検証することを目的とする。それと並行して、*EcrG4* は分泌因子であることから、その受容体を同定することにより *EcrG4* を用いた神経疾患の創薬の可能性に繋げる。

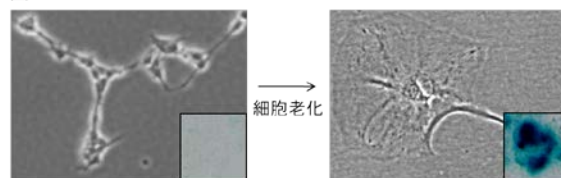
3. 研究の方法

(1) 疾患モデルマウスにおける細胞老化の関与

細胞老化とは、長期にわたって細胞を培養している際に認められる不可逆的な細胞分裂停止状態であるが、我々の研究により生体の老化との関係が明らかとなった。本研究では、神経変性疾患モデルマウスにおいて細胞老化が関与しているかを検討した。

細胞老化の評価の方法としては、細胞は老化に伴い、扁平・巨大化し、さらに細胞老化マーカーとされている senescence associated- β -galactosidase (SA- β -gal) 活性が上昇する (図 1) ため、これらを指標に用いると同時に、我々が細胞老化誘導因子として報告した *EcrG4* の発現、細胞周期マーカーなども検証した。

図1



左図は、通常のオリゴデンドロサイト前駆細胞であるが、*in vitro* で細胞老化を誘導すると、細胞は扁平・巨大化、さらに SA- β -gal 染色陽性となる (右図)。

疾患モデルマウスに関しては、共同研究先の理化学研究所 脳科学総合研究センターより入手した Tau transgenic mouse (CAMK II-4R) および ApoE4 transgenic mouse を用いた。

(2) *EcrG4* 受容体同定

① *EcrG4* 受容体を多量に発現している細胞の検索

① *EcrG4*-Fc、② *EcrG4* 2×FLAG を強制発現

させた細胞の培養液を回収し、多種類の細胞 (CG4 細胞 (OPC の cell line)、wt OPC、glioma 細胞 (06320)、胎児繊維芽細胞 (MEF)) に添加した。そして、①に関しては抗 Human-IgG (Fc specific) 抗体、②に関しては抗 FLAG 抗体を用いて免疫染色し、最も多量にレセプターを発現している細胞を同定した。

② 免疫沈降法および質量分析法を用いたレセプターの同定

上記にてレセプターを多量に発現していると思われた細胞に **EcrG4-Fc** あるいはコントロールとして **Human IgG Fc** を添加し、数時間培養の上、細胞を回収してタンパクを抽出。タンパク抽出液にプロテイン G を加え沈降させ、**SDS-PAGE**、銀染色を行い、受容体の候補となりえるバンドの切り出しを行った。今後は質量分析法によりレセプター同定を行い、ショウジョウバエの細胞に同定した受容体を強制発現させ、**EcrG4** が選択的に結合することを明らかにする。

4. 研究成果

(1)疾患モデルマウスにおける細胞老化の関与

まず初めにアルツハイマー病モデルマウスとしてもっともpopularに用いられているTau transgenic mouse (CAMK II-4R) を用いて、アルツハイマー病に“細胞老化”のメカニズムが関与しているかを検討した。Tau-Tg mouse (8.5、25-26カ月齢)、Non-Tg mouse (8.5、25-26カ月齢) に関して脳切片を作成し、細胞老化のマーカーとして確立されているSA-β-gal

染色、および我々が新規細胞老化誘導分泌因子として報告したEcrG4による染色、cyclin D1、D3による染色を行い、細胞老化と細胞周期との関係を検討した。

染色ではTgおよびNon-Tg間で差がはっきりしなかったため、さらに脳組織よりcDNAを作成しqPCRを行ったが、やはり差は明らかではなかった。

次に同様の研究をApoE4 transgenic mouseにおいても進めた。もともと、ApoE4型のアルツハイマー病患者の海馬の網羅的な遺伝子発現解析で、EcrG4の著明な発現上昇を認めるとの報告があるため、ApoE4とEcrG4が何らかの関係を持っている可能性が予想された。実験結果から、ApoE4 TgおよびNon-Tg間でRNAレベルでは違いは明らかではなかったが、TgマウスではNon-Tgマウスに比較してSA-β-gal活性の上昇や脳組織よりタンパク質を抽出して行ったウェスタンブロットでEcrG4の上昇を認めた。データに関しては個体差が大きいいためマウスの個体数を増やして再度実験結果の再現性を確認しているところである。

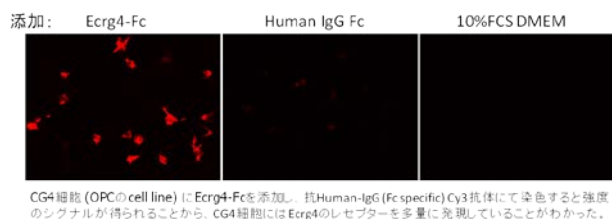
(2)EcrG4 受容体同定

EcrG4が分泌因子であり、疾患の薬剤としての応用が期待されることから、受容体検索を進めた。

具体的には、EcrG4-Fcを強制発現させた細胞の培養液を回収し、数種類の細胞に添加し、抗Human-IgG (Fc specific) 抗体を用いて免疫染色したところ、CG4細胞>wt OPC>06320>MEFの順に強いシグナル強度を認めており、CG4細胞 (OPC系の細胞) でレセプ

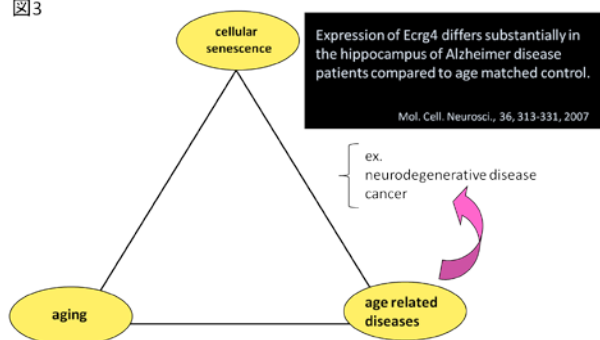
ターを多量に発現していると考えられた (図2)。

図2



次にCG4細胞を用いて、Ecrg4-FcあるいはコントロールとしてHuman IgG Fcを添加し、6-12時間培養の上、細胞を回収してタンパクを抽出。タンパク抽出液にプロテインGを加え沈降させ、SDS-PAGE、銀染色を行い、コントロールとのバンドの違いが綺麗に見える条件を検討した。塩濃度を変える、NP-40などのdetergentの濃度を変えるなど、lysis bufferの条件を検討することにより、Human IgG Fcを添加したコントロールのものと比較していくつか候補になりえるバンドが検出された。mass spectrometryに関してはいずれの機種を用いるかを検討しているところである。

図3



アルツハイマー病を始めとした神経変性疾患は、正常の老化の理解なくしては、解明は困難である。我々の以前の報告により、脳の老

化の一端に細胞老化が関与していることが明らかとなったが、今回の研究により神経変性疾患に関しては図3のような図式が予想される。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久住呂 友紀 (KUJURO YUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 60398625