

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500389

研究課題名(和文)モデル動物を用いたタウオパチーの病態解明と肝細胞増殖因子による治療効果の検討

研究課題名(英文) Study on the therapeutic effects of hepatocyte growth factor on tauopathies using transgenic mice overexpressing mutated human tau.

研究代表者

角山 圭一 (Keiichi, KADOYAMA)

姫路獨協大学・薬学部・准教授

研究者番号：70454767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：タウオパチーの1つである家族性前頭側頭葉認知症(FTDP-17)に注目し、FTDP-17の原因となる変異タウ蛋白を発現するFTDP-17モデルマウスを作製して、病態解明を行った。FTDP-17モデルマウス海馬と大脳皮質から試料を調製し、プロテオーム解析を実施した。その結果、野生型と比較し、数種類の蛋白質とリン酸化蛋白質の変動が認められ、これらがFTDP-17の学習記憶障害の病態に寄与していることが示唆された。さらに、FTDP-17モデルマウスに、肝細胞増殖因子(HGF)を発現するマウスを交配してダブル発現マウスを作製し、HGFがFTDP-17の治療薬となる可能性を検討中である。

研究成果の概要(英文)：We studied the pathophysiological mechanisms of familial frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) using transgenic mouse overexpressing mutated human tau at 5, 10, 15 and 20 months of age. We performed proteomic analysis of the hippocampus and cerebral cortex of wild type and FTDP-17 model mice using 2-dimensional gel electrophoresis followed by mass spectrometry to clarify proteins and phosphoproteins involved in impaired learning and memory. We identified some proteins and phosphoproteins to be significantly changed in the hippocampus and cortex of wild type and FTDP-17 model mice. These results suggested that identified proteins and phosphoproteins contribute to the pathophysiology of FTDP-17. Furthermore, we examined therapeutic potential of hepatocyte growth factor (HGF) using double transgenic mice overexpressing mutated human Tau and HGF. Currently, we are considering the possibility that HGF is an effective therapeutic agent against FTDP-17.

研究分野：神経薬理学

キーワード：タウオパチー タウ蛋白 学習記憶機能 肝細胞増殖因子

1. 研究開始当初の背景

タウ蛋白は神経軸索内の微小管結合蛋白質の1つで、細胞骨格と神経軸索内の軸索輸送など重要な役割を担っている。何らかの原因でタウ蛋白に異常(タウ蛋白の変異、過剰なリン酸化反応など)が生じると、神経細胞内でタウ蛋白が不溶化して凝集体(神経原線維変化)を形成・蓄積し、その結果、神経細胞死にともなう様々な臨床症状を呈する。この病態をタウオパチーといい、アルツハイマー病、進行性核上性麻痺、ピック病、前頭側頭葉変性症などが知られている。

申請者らは、タウオパチーの1つで、第17染色体遺伝子に連鎖し、前頭側頭型認知症、パーキンソン病を示す家族性前頭側頭葉認知症(FTDP-17)に注目し、FTDP-17の病態解明と治療薬開発を目的に研究を遂行するため、FTDP-17の原因となる変異タウ蛋白を神経特異的に過剰発現する2種類の変異タウ蛋白(N279KとG272V)過剰発現マウスを作製し、これらのマウスがFTDP-17の疾患モデルとしての有用性を報告した。

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、脾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., 2011)。さらに、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結果、HGFは学習記憶機能を亢進することを報告した(Kato et al., 2012)。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが作製した変異タウ蛋白を神経特異的に過剰発現するマウス(FTDP-17モデルマウス)を用いて、FTDP-17の病態機序を解明する。また、変異タウ蛋白過剰発現マウスにHGFを神経特異的に過剰発現するトランスジェニック(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、HGFがFTDP-17

に対する有効な治療薬となる可能性を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、FTDP-17モデルマウスおよびHGF-Tgマウスを用いて、以下の(1)~(2)の実験を遂行した。

(1) FTDP-17の学習記憶障害に関与する因子の網羅的解析による病態の解明

学習記憶機能に重要な役割をもつ海馬および大脳皮質を摘出し、細胞溶解液(7 M Urea, 5% CHAPS, 2% immobilized pH gradient (IPG) buffer, 50 mM β -mercaptoethanol, 2 M Thiourea, 2.5 μ g/ml DNase/RNase)中で、30秒間超音波処理し、溶解した溶液を15,000 rpm, 30 min遠心分離し、上清を蛋白質サンプルとした。この蛋白質サンプルをIPGゲルによる一次元電気泳動、および、一次元電気泳動後のIPGゲルをSDS-PAGEによる二次元電気泳動によって蛋白質を分離した。分離した蛋白質をリン酸化蛋白質染色試薬Pro-Q Diamondによって染色し、スキャナーによって画像を取り込んだ後、解析ソフトProdigy SameSpotsによって、野生型およびFTDP-17モデルマウス間で、リン酸化蛋白質発現量に有意差のあるスポットを解析し、有意差のあるスポット(ANOVA, $p < 0.05$, $n=3$)のゲルを採取した。Pro-Q Diamondを脱染した後、蛋白質染色試薬SYPRO Rubyによって染色し、スキャナーによって画像を取り込んだ後、蛋白質発現量に有意差のあるスポットを解析し、有意差のあるスポット(ANOVA, $p < 0.05$, $n=3$)のゲルを採取した。得られたゲル片をトリプシン処理し、抽出したペプチド断片をMALDI-TOF MS/MS (ABI, PLUS 4800)によって分析し、MASCOT Searchによって蛋白質を同定した。

(2) FTDP-17に対するHGFの治療効果の解析

FTDP-17モデルマウスに、学習記憶機能を亢進する肝細胞増殖因子(HGF)を神経特異的に過剰発現するマウスを交配してダブル過剰発現マウスを作製し、同様の解析を実施して、HGFがFTDP-17に対する有効な治療薬となる可能性を調べた。

・HGFの供給

FTDP-17モデルマウスの脳内への供給は、FTDP-17モデルマウスに、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)を交配して、ダブルトランスジェニックマウスを作製し、HGFを神経系に持続的かつ安定的に供給する方法を選択した。この際、同腹仔の野生型(Littermate)、HGF-Tgマウス、FTDP-17モデルマウス、HGFを神経特異的に過剰発現するFTDP-17モデルマウス(FTDP-17 x HGF)の4種のマウスを得た。実験にはこれらの4種のマウスの5、10、15、20カ月齢を使用し、種々(生化学的・組織学

的・行動学的解析)の解析により、FTDP-17の高次脳神経機能障害に対する HGF の改善(治療)効果を解析した。

・生化学的・組織学的解析

上記の4種のマウス海馬および大脳皮質において、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。

4. 研究成果

(1) FTDP-17 の学習記憶障害に関する因子の網羅的解析による病態の解明

「3. 研究の方法」で示した方法で、海馬および大脳皮質における蛋白質およびリン酸化蛋白質の発現量の変動を、二次元電気泳動および質量分析器を用いたプロテオーム解析により網羅的に調べた。その結果、発現レベルが変動した蛋白質が数種類同定された。また、リン酸化レベルが変動した蛋白質も同定された(投稿準備中)。従って、同定された蛋白質およびリン酸化蛋白質が FTDP-17 による学習記憶障害などの病態に寄与していることが示唆された。

(2) FTDP-17 に対する HGF の治療効果の解析

FTDP-17 モデルマウスに HGF-Tg マウスを交配して出生した4種類のマウス(littermate、HGF-Tg マウス、FTDP-17 モデルマウス、FTDP-17 x HGF マウス)の5、10、15、20カ月齢を用いて、種々(生化学的・組織学的・行動学的解析)の解析により、FTDP-17 の学習記憶障害に対する HGF の改善(治療)効果を解析した。ただ、使用するマウスは、交配により自家繁殖しているため、本申請前からマウスの準備を進めていたが、予想以上に産仔数が少なく、使用するマウスの月齢が5~20か月と長期間であったため、実験に必要なマウス数の確保が困難となり、当初の実験計画から遅延した。そのため、現在も解析は進行中であり、研究成果の発表はこれからである。これが明らかになれば、HGF が FTDP-17 をはじめとするタウオパチーの治療薬となる可能性を示唆することになる。

<引用文献>

Kadoyama K, Kadoyama K, Funakoshi H, Nakamura T, Sakaeda T Therapeutic potential of hepatocyte growth factor for treating neurological diseases. *Current Drug Therapy* 6: 197-206, 2011.

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10件)

Matsuura K, Otani M, Takano M, Kadoyama K, Matsuyama S. The influence of chronic nicotine treatment on proteins expressed in the mouse hippocampus and cortex. *European Journal of Pharmacology* 780:16-25, 2016 (査読有)

Kadoyama K, Matsuura K, Nakamura-Hirota T, Takano M, Otani M, Matsuyama S. Changes in the expression of collapsin response mediator protein-2 during synaptic plasticity in the mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience Research* 93:1684-1692, 2015 (査読有)

Takano M, Ohkusa M, Otani M, Min KS, Kadoyama K, Minami K, Sano K, Matsuyama S. Lipid A-activated inducible nitric oxide synthase expression via nuclear factor- κ B in mouse choroid plexus cells. *Immunology Letters* 167:57-62, 2015 (査読有)

Matsuura K, Otani M, Takano M, Kadoyama K, Matsuyama S. The influence of chronic ibuprofen treatment on proteins expressed in the mouse hippocampus. *European Journal of Pharmacology* 752:61-68, 2015 (査読有)

Matsuura K, Nakamura-Hirota T, Takano M, Otani M, Kadoyama K, Matsuyama S. Proteomic analysis of time-dependent changes in proteins expressed in mouse hippocampus during synaptic plasticity induced by GABA_A receptor blockade. *Neuroscience Letters* 555:18-23, 2013 (査読有)

Nakamura-Hirota T*, Kadoyama K*, Takano M, Otani M, Matsuyama S (*Co-first author). The expression changes of EphA3 receptor during synaptic plasticity in mouse hippocampus through activation of nicotinic acetylcholine receptors. *NeuroReport* 23:746-749, 2012 (査読有)

Chiba S, Takada E, Tadokoro M, Taniguchi T, Kadoyama K, Takenokuchi M, Kato S, Suzuki N. Loss of dopaminoreceptive neuron causes L-dopa resistant Parkinsonism in tauopathy. *Neurobiology of Aging* 33: 2491-2505, 2012 (査読有)

Kato T, Funakoshi H, Kadoyama K, Noma S, Kanai M, Ohya-Shimada W, Mizuno S, Doe N, Taniguchi T, Nakamura T. Hepatocyte growth factor overexpression in the nervous system enhances learning and memory performance in mice. Journal of Neuroscience Research 90:1743-1755, 2012 (査読有)

清水範彦、島田(大谷)若菜、角山圭一、早川寿行、千葉博信、Sun Woong、中村敏一、船越洋 神経特異的 HGF 遺伝子発現は ALS モデル Tg マウスの運動神経変性とグリオーシスを抑制し寿命を延長する、日本実験動物技術者協会北海道支部会誌、38:10-16、2014 (査読無)

松山正剛、角山圭一、松浦健二「細胞膜受容体 (EphA3 受容体とシナプス可塑性)」生体の科学、64:474-475、2013 (査読無)

[学会発表](計 8 件)

松浦健二、角山圭一、鷹野正興、尾谷美枝子、松山正剛 イブプロフェンを長期投与したマウス海馬のプロテオーム解析、第 89 回日本薬理学会年会、3月 9-11 日、横浜、2016 年

松浦健二、角山圭一、鷹野正興、尾谷美枝子、松山正剛 ニコチン投与によるマウス海馬における長期増強様作用発現下での prefoldin subunit 5 の経時的発現変化 第 88 回日本薬理学会年会、3月 18-20 日、名古屋、2015 年

Matsuura K, Otani M, Takano M, Kadoyama K, Matsuyama S. The influence of chronic nicotine treatment on proteins expressed in the mouse hippocampus and cortex. 25th Meeting of the International Society for Neuro-chemistry. Cairns, Australia, 23-27 August, 2015.

清水範彦、島田(大谷)若菜、角山圭一、Woong Sun、中村敏一、船越洋 神経特異的 HGF 遺伝子発現は ALS モデル Tg マウスの運動神経変性とグリオーシスを抑制し寿命を延長する、日本実験動物科学技術さっぽろ 2014 (第 61 回日本実験動物学会総会・第 48 回日本実験動物技術者協会総会・合同大会) 5月 15-17 日、札幌、2014 年

Taniguchi T, Chiba S, Takenokuchi M, Kadoyama K, Miyamoto K, Matsuyama S, Takano M, Otani M. SJLB; an animal model for Alzheimer disease and L-dopa resistant parkinsonism in tauopathy. ISN-ASN Biennial Meeting 2013, Cancun, Mexico, 20-24 April, 2013.

松浦健二、角山圭一、廣田徹、鷹野正興、尾谷三枝子、松山正剛 ニコチン受容体刺激による LTP 様作用発現下でのマウス海馬における CRMP2 経時的発現変化、第 86 回日本薬理学会年会、3月 21-23 日、福岡、2013 年

谷口泰造、吉田ルシア幸子、七里博章、渡邊愛未、炬口真理子、角山圭一、宮本和英、大室弘美 抗炎症及び抗酸化作用を有する生薬成分シコニンの神経変性疾患(アルツハイマー病及びパーキンソン病)治療への応用 - モデル動物を用いた検討、第 86 回日本薬理学会年会、3月 21-23 日、福岡、2013 年

船越洋、島田(大谷)若菜、角山圭一、加藤貴史、中村敏一、北村和也、中村雅也、戸山芳昭、岡野栄之、青木正志 再生因子 (HGF) の神経系における機能と神経再生医療への展開の可能性 第 19 回日本血液代替物学会年次大会、10月 25-26 日、旭川、2012 年

[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 2 件)

名称：非ヒトモデル動物を用いたパーキンソン症候群の検査方法
発明者：谷口泰造、角山圭一、炬口真理子、千葉俊明、澄田美保
権利者：谷口泰造
種類：特許
番号：第 5558049 号
取得年月日：2014.6.13
国内外の別：国内

名称：脳損傷の予後改善薬のスクリーニング方法
発明者：裏出良博、江口直美、有竹浩介、佐藤陽、角山圭一、谷池雅子
権利者：独立行政法人科学技術振興機構、財団法人大阪バイオサイエンス研究所、大鵬薬品工業株式会社
種類：特許
番号：第 4944173 号
取得年月日：2012.5.30
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

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・客員教授
(現、姫路獨協大学・薬学部・教授)
研究者番号：70346253

(3)連携研究者

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

船越 洋 (FUNAKOSHI HIROSHI)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：40273685