

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32621

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890236

研究課題名(和文)細胞生存因子によるアミロイド蓄積抑制の分子機序解析

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of amyloid beta metabolism by a cell survival factor

研究代表者

新倉 貴子(Niikura, Takako)

上智大学・理工学部・准教授

研究者番号：10301491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病は老人性認知症の約半数を占めるが、病気の原因を根本から除去する治療法はまだない。ヒューマニン(HN)は神経細胞死を抑制する因子で、アルツハイマー病モデルマウスの記憶学習能力の低下を抑制し、病態発生の原因とされるアミロイドベータの蓄積も抑制する。本研究課題では、HNによるアミロイドベータ蓄積抑制の分子機序を明らかにすることを目的とし、アミロイドベータ分解酵素やアミロイドベータを除去する細胞の活性化に対するHNの作用を中心に検討した。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia. Humanin (HN) is a novel neuroprotective factor and suppresses the neuronal death caused by AD-related insults in test tubes. A highly potent HN derivative ameliorated cognitive deficits and sustained the increase of amyloid burden in an AD mouse model, which exhibits complex AD-relevant pathology. In this study, we investigated the molecular mechanisms how HN suppresses amyloid accumulation, particularly focusing on an amyloid degradation enzyme and amyloid clearance by glial cells.

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 アミロイドベータ

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (Alzheimer's Disease: AD) は老人性認知症の約半数を占める神経変性疾患で、高齢化社会が進む現代においては、その早期診断と治療法の確立は急務である。現在広く使用されている AD 治療薬アセチルコリン分解酵素阻害剤は、効果が認められているものの対症療法であるため、病態発生源要因に対して直接作用して病態の成立もしくは進行を阻止する Disease-modifying therapy の確立を目指した研究が多く進められている。その中で、AD 病態の本質が脳の萎縮をもたらす進行性の神経細胞の変性脱落と密接に関連することから、神経細胞死の阻止は AD の根治的治療に必須の治療戦略のひとつと考えられる。

新規ペプチド因子ヒューマニン (Humanin : HN) は特定の神経細胞死機序に捕らわれない細胞死抑制因子を探索する機能的スクリーニングで申請者のグループが発見した (PNAS2001)。HN は分泌性ペプチドで、その合成ペプチドを培養神経細胞の培地に加えるだけで細胞死抑制効果を発揮する。HN は特定のアミノ酸置換によって活性が上昇し、第 14 セリンをグリシンに置換すると活性が 1000 倍上昇して 1-10 nM で完全な細胞死抑制効果を示す (PNAS2001, JNS2001)。この高活性型誘導体は、アミロイドベータペプチドを脳室内に注入した AD モデルマウスの記憶障害を対照群と同等にまで改善し、in vivo での有効性も確認された (JNR 2005)。

AD 特有の病理的变化に対する HN の効果を確認するため、AD モデルのトランスジェニックマウスでの検討を実施した。トリプルトランスジェニック AD (3xTg-AD) マウスは、AD に特徴的な病理学的変化である老人斑と神経原繊維変化が加齢に伴い進行することから、ヒトの AD の病態に最も近いマウスモデルのひとつと考えられている。病態初期に相当する高齢の 3xTg-AD マウスに高活性型 HN 誘導体を 3 ヶ月間鼻腔内投与したところ、記憶障害の改善が見られた。併せて、脳内での老人斑及びその主要構成要素であるアミロイドベータ量の減少が認められ (図 1)、HN が生体内におけるアミロイドベータ量の調整という新たな機能を持つことが明らかとなった (PLoS One2011)。さらに、脳の免疫組織学的解析により HN 投与したマウスでは部位特異的にアミロイドベータ分解酵素ネプリライシン (NEP) の発現量が対照群より高いこと、in vitro の株化神経細胞で HN が NEP の活性を上昇させることを見だし、HN による NEP の発現と活性調節の可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究課題では、HN によるアミロイドベータ蓄積抑制の分子機序を明らかにすることを目的とし、ふたつの観点から検討すること

とした。すなわち、(1) アミロイドベータ分解酵素の発現調節の検討、および、(2) グリア細胞の活性化によるアミロイドの除去と HN 受容体シグナルとの関連性についての検討である。

3. 研究の方法

(1) アミロイドベータ分解酵素 (NEP) の発現調節の検討

NEP は代表的なアミロイドベータ分解酵素で、特に毒性の高いアミロイドベータ 42 やオリゴマー型アミロイドベータを分解する。海馬などの脳の特定部位での NEP 発現量が AD のみならず加齢でも減少することから、その発現量と AD 病態との関連性が注目されている。NEP 活性はソマトスタチンで上昇すること (JNR2002)、NEP の発現がアミロイド前駆体蛋白質の分解産物である AICD で調節されること (Neuron2005) が報告されている。AD モデルマウス 3xTg-AD に 3 ヶ月間、高活性型の S14G-HN を投与した結果、脳における老人斑とアミロイドベータ量の増加抑制とともに、海馬領域における NEP の発現量保持が観察された (PLoSOne2011)。脳全体のホモジネートを材料としたウエスタンブロット法による解析では、NEP の発現量には S14G-HN 投与群と対照群に差は認められなかった。そこで、他のアッセイの系を検討することにした。

(2) グリア細胞の活性化によるアミロイドの除去と HN 受容体シグナルとの関連性についての検討

① グリア細胞によるアミロイドベータ除去に対する HN の影響

グリアによるアミロイドベータの除去は脳内のアミロイド量の調節に重要な役割を持っている。HN 受容体のひとつである FPRL1 はグリア細胞に発現している。予備的検討において、HN でマウスミクログリア株化細胞 BV2 細胞を刺激すると FPRL1 の下流分子が活性化されることが分かっている。そこで、FPRL1 を介した HN の刺激によるグリア細胞のアミロイドベータ除去に対する影響について検討した。HN 処理した BV2 細胞の培養液にアミロイドベータ 1-42 を添加し、1-2 4 時間後の細胞内及び培養液中のアミロイドベータ 1-42 量を測定することで S14G-HN 存在下でのアミロイドベータの取り込みと除去を検出した。

② HN 受容体とそのシグナル伝達経路の同定

培養神経細胞の F11 細胞において HN は NEP 活性を上昇させる。また、HN は F11 細胞において細胞死抑制作用を示し (PNAS2001)、この作用にはサイトカインと類似した受容体を介した JAK2-STAT3 経路

が中心的役割を果たしていることがわかっている(LifeSci2005)。加えて、G 蛋白質共役型受容体である FPRL1 (formylpeptide receptor like-1)を介した独立したシグナル経路がHNにより活性化されることが分かっている(BBRC2004, J.Immunol2004)。

これらの受容体によるシグナル伝達経路について各種薬理的阻害剤を用いて検討した。さらに、FPRL1 は三量体 G 蛋白質の Gi/o に共役しているため、Gi/o 阻害剤である百日咳毒素を用いた。

細胞として、グリア株化細胞と受容体を過剰発現させた CHO(Chinese Hamster Ovary)細胞や HEK(Human Embryonic Kidney)細胞を、各種阻害剤と HN およびその類縁分子で処理し、一定時間後に細胞を回収した。そこから細胞調製液を作製し、シグナル分子の活性型(リン酸化型)および非活性型に特異的な抗体を用いてイムノブロット法を行い、シグナル分子の活性化状態を検討した。

4. 研究成果

(1) アミロイドベータ分解酵素(NEP)の発現調節の検討

NEP の発現量を調べるため、mRNA を定量的に測定する定量PCRを検討した。さらに、より感度の高い方法で NEP の発現量を測定する方法として、ルシフェラーゼを用いたデュアルレポーターアッセイを採用することとした。

(2) グリア細胞の活性化によるアミロイドの除去とHN受容体シグナルとの関連性についての検討

① グリア細胞によるアミロイドベータ除去に対するHNの影響

株化ミクログリア細胞 BV2 細胞を用いて HN とその類縁分子によるアミロイドベータ取り込みの違いについて経時的な検討を行った。グリア細胞へのアミロイドベータの取り込みは、蛍光分子標識により観察する系を用いた。その結果、高活性型の S14G-HN と HN 受容体である FPRL1 のアゴニストの作用を比較すると顕著な違いが認められなかった。このことから、アミロイドベータ取り込みに関しては細胞死に関連した受容体ではなく G タンパク質共役型の FPRL1 の関与が考えられた。

以上の検討に加え、グリア細胞の初代細胞培養系を確立した。まずは、アストロサイトの初代培養細胞において、免疫細胞染色法により FPRL1 の発現を確認した。さらに、アミロイドベータの取り込みについて上記と同様の検討を行い、予備の結果を得た。

② HN 受容体とそのシグナル伝達経路の同定

FPRL1 の下流の細胞内シグナル分子の活性化について経時的な検討を行った。FPRL1

はグリア細胞に発現していることから、株化ミクログリア細胞 BV2 細胞と株化アストロサイト細胞 KINGS 細胞を用いた。

また、FPRL1 のシグナルをより明確に検出するため、FPRL1 を過剰発現させた CHO 細胞や HEK 細胞も用いた。シグナル分子の関与については、MAPK inhibitor, PI3 kinase inhibitor, protein kinase C inhibitor などの薬理的阻害剤と、Gi/o 阻害剤である百日咳毒素を用いた。シグナル分子の活性化は、それぞれの分子のリン酸化型(活性化型)を検出することで確認した。

FPRL1 のより下流のシグナル分子である ERK の活性化については、百日咳毒素で完全に抑制された。図1に示すように、FPRL1 はHN以外にも W peptide などによっても活性化されることがわかっている。そこで、FPRL1 の下流シグナル分子について、これらのリガンドとHNによる活性化の違いを検討した。その結果、株化グリア細胞においても FPRL1 過剰発現細胞と同様に、HN は W peptide と同程度に FPRL1 の下流シグナル分子を活性化させることがわかった。

さらに、受容体とより下流のシグナル分子である ERK との間にはどのような分子が関与するかをシグナル分子の薬理的阻害剤を用いて検討した。FPRL1 を過剰発現させた細胞を用いた実験では、HN と W peptide において、阻害剤によるシグナル分子の活性化の抑制の程度に違いが認められた。株化グリア細胞を用いてその再現性を検討した結果、少なくとも一部のシグナル分子については HN と W peptide によって阻害剤の影響が異なることが確認された。これらについては、さらに詳細な検討が必要である。

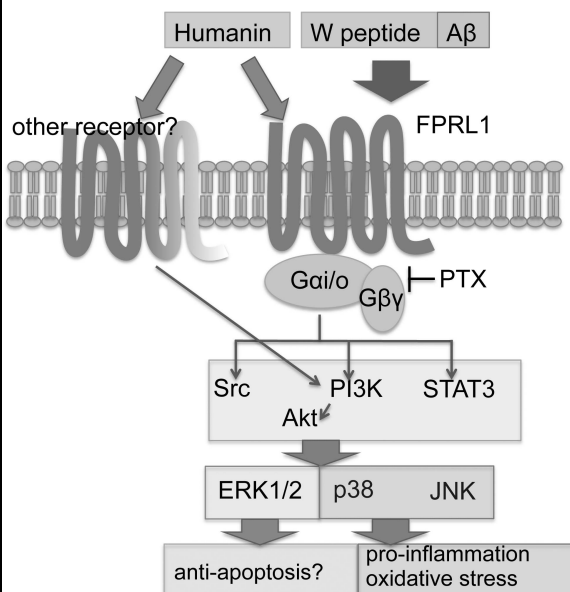


図1. ヒューマニンと関連分子によって FPRL1 を介して活性化されるシグナル経路

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 3 件）

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① Y Kita, T Arakawa, T Niikura. Signaling cascades of Humanin and the derivatives through Formyl peptide receptor like-1 (FPRL-1). Society for Neuroscience 42nd Annual Meeting 2013, 2013年11月9-13日, San Diego CA, USA
- ② T Niikura, T Arakawa, Y Kita. Humanin and its derivatives activate ERK via FPRL-1 similarly despite the quite difference neuroprotective-potency between the derivatives. The 11th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases, 2013年3月6-10日, Florence, Italy
- ③ Y Kita, T Arakawa, T Niikura. Is the difference in neuro-protective activity between Humanin analogs conserved in FPRL-1 mediated activation? Society for Neuroscience 42nd Annual Meeting 2012, 2012年10月13-17日, New Orleans LA, USA

〔その他〕

ホームページ等

http://www.sophia.ac.jp/ezpublish/index.php/jpn/research/sangaku-chizai/ROR/RO Rc01_12

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新倉 貴子 (NIIKURA, Takako)

上智大学・理工学部・准教授

研究者番号：10301491