

アルツハイマー病におけるエンドサイトーシス障害の意義：
家族性アルツハイマー病病態解明への展開（25-20）

主任研究者 木村 展之 国立長寿医療研究センター 室長

研究要旨

アルツハイマー病（AD）患者の脳組織では、肥大化したエンドソームが細胞内に多数蓄積するなどのエンドサイトーシス障害病変が初期病態として確認される。また、木村らはエンドサイトーシス障害がAD原因蛋白である β アミロイド蛋白（ $A\beta$ ）が時間依存性に蓄積する要因となることを発見したことから（Kimura et al., JBC 2009）、エンドサイトーシス障害がAD発症メカニズムに深く関与している可能性が示唆された。

そこで本研究は、エンドサイトーシス障害という独自の新たな観点からADの病理学的変化を見つめ直し、ADの病態メカニズム解明と新規治療薬の開発を目指すものである。また、エンドサイトーシス障害は孤発性・家族性を問わずAD患者の脳組織において確認される病変であることから、未だ謎の多い変異型 Presenilin-1（PS1）に代表される家族性ADの病態解明に向けた取り組みも行う。

主任研究者

木村 展之 国立長寿医療研究センター 室長

分担研究者

保富 康宏 医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター センター長

松田 潤一郎 医薬基盤研究所 研究リーダー

高橋 一朗 医薬基盤研究所 主任研究員

A. 研究目的

これまでの研究成果により、神経細胞のエンドサイトーシス障害は $A\beta$ の細胞内蓄積やシナプス小胞の輸送障害を引き起こす要因となることを明らかにしたが、その詳細な分子メカニズムは不明な点が多く、同障害が認知機能障害に代表されるAD病態そのものに及ぼす直接的・間接的影響の全容も未だ不明である。

そこで本研究は、既に確立したエンドサイトーシス障害の細胞モデル、およびヒトに近縁な霊長類であるカニクイザル脳組織を用いて、エンドサイトーシス障害がアミロイド前駆体蛋白質（APP）の細胞内動態に関する影響を引き続き検索するとともに、家族性 AD の主要原因因子である Presenilin-1（PS1）とエンドサイトーシス障害との関係性に関する検索を行う（木村）。

昨年度の研究成果により、II型糖尿病は老年性エンドサイトーシス障害を増悪して A β の蓄積・重合を加速化させ、脳内での A β 病理を進行させることを明らかにした（Okabayashi et al., PLoS ONE 2015）。そこで本年度は、何故、II型糖尿病が老年性エンドサイトーシス障害を増悪するのかを明らかにするため、II型糖尿病を自然発症したカニクイザルの脳組織を用いた検索を引き続き行う。また、人為的にII型糖尿病を誘発することで AD 病理を加速化させる霊長類モデルの作出が可能か否かを検討するため、カニクイザルを用いた生体実験を行う（保富）。

エンドサイトーシス障害はシナプス小胞の輸送やシナプス膜との融合を阻害するなど、直接的に神経伝達機能を低下させる可能性が考えられる（Kimura et al., Am J Pathol 2012）。そこで、エンドサイトーシス障害が認知機能に及ぼす影響を *in vivo* で明らかにするため、前年度に引き続き人為的にエンドサイトーシス障害を誘発する動物モデルの開発を継続する（松田、高橋）。

B. 研究方法

（木村）

神経系株化細胞である Neuro2a 細胞とラット胎仔由来初代培養神経細胞を用いて、前者は軸索輸送モーター蛋白 dynein や各種エンドソームの輸送に必須の Rab GTPase に対する siRNA を導入、後者は dynein ATPase インヒビターである EHNA を処理してエンドサイトーシス障害を人為的に誘発し、APP および PS1 の細胞内動態に関する検索を行った。

若齢（10歳以下）およびアルツハイマー病変が確認される老齢（25歳前後）のカニクイザルの脳組織を用いて老年性エンドサイトーシス障害が PS1 の細胞内局在に及ぼす影響を明らかにするため、病理組織学的および各種生化学的検索を行った。

（保富）

エンドサイトーシス障害は様々な因子が複雑に絡み合って生じると考えられるが、その中でも①軸索輸送モーター蛋白の機能低下、②ライソゾームの代謝機能低下、③エンドソームの膜融合障害が代表的なものである。医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターには、II型糖尿病を発症して死亡したカニクイザルの脳組織サンプルが保存されている。

そこで、それらⅡ型糖尿病の自然発症モデルサル脳の脳組織サンプルを用いてエンドサイトーシス障害関連因子に関する検索を行う。また、カニクイザルに人為的にⅡ型糖尿病を誘発することが可能か否かを検討するため、特殊飼料の給餌実験を行う。

(松田)

人為的にエンドサイトーシス障害を誘発する遺伝子改変マウスを作成するため、後期エンドソーム輸送関連因子である Rab7 に特異的な shRNA 配列を組み込んだ遺伝子組換え体、および過剰活性化型 Rab7 を発現する遺伝子組換え体をマウス受精卵に導入して目的の遺伝子を持つ個体が得られるか否かを検討した。

(高橋)

人為的にエンドサイトーシス障害を誘発するため、後期エンドソーム輸送関連因子である Rab7 に特異的な shRNA、および過剰活性化型 Rab7 をテトラサイクリン応答性に発現させるための DNA コンストラクトを作成し、培養細胞を用いてその効果を検証する。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いた研究については、「動物の愛護及び管理に関する法律」に基づいた動物福祉規定に則り、実験動物の飼育・安楽殺・実験作業を遂行した。具体的には、動物を飼育する場所・ケージ・管理方法に配慮し、可能な限り動物の使用数減少と被る苦痛の減退に努め、所属機関の動物実験規定を遵守して研究を行った。

C. 研究結果

(木村)

各種エンドソームの輸送に関わる Rab GTPase をノックダウンしたところ、72 時間後の細胞においても顕著な APP の蓄積や β 切断の増加は認められなかった。このことから、APP や A β の蓄積にはある特定のエンドソーム輸送系における障害が関与しているというよりも、エンドサイトーシス系全体の障害が大きく関わっていることが明らかとなった。一方、エンドサイトーシス障害モデルや老齢カニクイザル脳組織を用いた検索の結果、PS1 はエンドサイトーシス障害の発生状況下においても APP や BACE1 等のようにエンドソームに蓄積することはなく、ほぼ一定の存在量でコントロールされていることが明らかとなった。

(保富)

Ⅱ型糖尿病カニクイザルの脳組織を用いた検索により、エンドソームの輸送に関わる dynein-dynactin 複合体の形成能は健常個体に比べてほとんど変化していないことが明らかとなった。一方、Ⅱ型糖尿病サルの脳組織ではライソソーム代謝酵素の 1 つであるカテ

プシン D と、オートファゴソームマーカーの 1 つである LC3II の蛋白レベルが著しく上昇しており、ライソゾーム代謝系に何らかの変化が生じていることが明らかとなった。一方、成熟齡カニクイザルに高炭水化物含有飼料を約 1 年間継続給餌したところ、体重の増加や血糖値および血中インシュリン値の上昇が確認されたが、残念ながら臨床的に明らかな II 型糖尿病を誘発することは出来なかった。

(松田)

過剰活性型 Rab7 を発現する遺伝子改変マウスの産仔が 1 匹得られたので、系統化を開始した。一方、Rab7 特異的 shRNA を発現する遺伝子改変マウスは産仔が得られなかったため、より厳密にノックダウンをコントロールする系統の作出に向けて検討を行っている。

(高橋)

Rab7 特異的 shRNA および過剰活性型 Rab7 を発現する遺伝子コンストラクトを作成し、Neuro2a 細胞においてその効果を確認することができた。

D. 考察と結論

培養細胞を用いた研究成果により、APP や A β の蓄積に繋がるエンドサイトーシス障害は、ある特定のエンドソーム輸送系における障害のみによって誘発されるものではなく、エンドサイトーシスという膜輸送系全体の障害・機能低下が背景に存在することが明らかとなった。これは、エンドサイトーシス障害という病態の複雑性を示唆するものであると同時に、エンドサイトーシスという生体システムそのものが脳内環境にとっていかに重要なものであるかを端的に表しているのではないかと考えられる。一方、家族性アルツハイマー病主要原因遺伝子である PS1 はエンドサイトーシス障害によってエンドソームに蓄積することなく、ある一定の存在量になるようコントロールされていることが明らかとなった。PS1 は APP の C 末端断片から A β を切り出す γ セクレターゼ複合体の主要構成因子であり、A β 産生の最終段階を左右する因子でもある。このことから、神経細胞は PS1 のエンドソーム内局在量を一定化することで、エンドサイトーシス障害を受けた状況においても不要に A β が産生されないようにコントロールしている可能性が示唆されるとともに、過去に明らかにしたエンドサイトーシス障害に伴う A β の細胞内蓄積 (Kimura et al., JBC 2009) は、A β 産生が増加したためではなく A β 代謝が低下したことに起因する可能性が大きいと考えられる。

II 型糖尿病サルを用いた検索により、II 型糖尿病は dynein を含む軸索輸送モーター蛋白の発現レベルや機能性に大きな変化を及ぼしていない可能性が示唆された。一方、ライソゾーム関連因子においては有意な差が認められたことから、II 型糖尿病に伴う老年性エン

ドサイトーシス障害の増悪化はライソゾームの代謝機能に何らかの変化・障害が生じたために誘発された可能性が高いことが明らかとなった。一方、約 1 年間にわたる高炭水化物の継続給餌によっても II 型糖尿病をカニクイザルに誘発することができなかったため、霊長類を用いた AD モデル（または AD 病理進行モデル）動物の開発には異なるアプローチの検討が必要であると考えられる。

エンドサイトーシス障害モデルマウス作成に向けた取り組みは困難を伴いながらも着実に前進しており、次年度以降は実際に得られたマウスを用いた実験作業に移行できるよう努力する所存である。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y, Yanagisawa K, Kimura N. Diabetes mellitus accelerates A β pathology in brain accompanied by enhanced GA β generation in nonhuman primates. *PLoS ONE*, 10(2): e0117362, 2015.
- 2) Yuyama K, Sun H, Usuki S, Sakai S, Hanamatsu H, Mioka T, Kimura N, Okada M, Tahara H, Furukawa J, Fujitani N, Shinohara Y, Igarashi Y. A potential function for neuronal exosomes: sequestering intracerebral amyloid- β peptide. *FEBS Lett*, 589(1): 84-88, 2015.

2. 学会発表

- 1) Kimura N, Okabayashi S, Ono F.
Dynein dysfunction disrupts synaptic vesicle transport and docking via endocytic disturbance.
第 37 回日本基礎老化学会, 2014 年 6 月 26~27 日, 愛知県大府市
- 2) Kimura N, Okabayashi S, Ono F.
DYNEIN DYSFUNCTION PERTURBS INTRACELLULAR VESICLE

TRAFFICKING AND SYNAPTIC VESICLE DOCKING VIA ENDOCYTTIC
DISTURBANCES: A POTENTIAL MECHANISM UNDERLYING
AGE-DEPENDENT COGNITIVE DYSFUNCTION.

FENS 2014, 2014年7月5日～9日, ミラノ (イタリア)

- 3) 木村展之, 岡林佐知, 下澤律浩, 保富康宏, 柳澤勝彦.
糖尿病は GM1 ガングリオシド結合型 A β の産生増加を介して A β 病理を加速する.
第 57 回日本神経化学会、2015 年 9 月 29 日～10 月 1 日、奈良県奈良市
- 4) 木村展之.
Traffic Jam 仮説：老年性エンドサイトーシス障害とアルツハイマー病態との関係.
第 36 回日本認知症学会、2014 年 11 月 29～31 日、神奈川県横浜市
- 5) 木村展之
アルツハイマー病におけるエンドサイトーシス障害：病態解明と創薬標的としての可能性
シンポジウム「アルツハイマー病先制治療薬の創出」, 2015 年 1 月 17 日, 名古屋
- 6) Ueda N, Yanagisawa K, Kimura N.
Effects of endocytic disturbance in PS1 localization and γ -secretase complex formation.
第 7 回 NAGOYA グローバルリトリート、2015 年 2 月 13～14、愛知県大府市
- 7) Kimura N, Okabayashi S, Ono F.
ENDOCYTTIC DISTURBANCE DISRUPTS ABETA CLEARANCE IN
ASTROCYTES WITHOUT AFFECTING ABETA UPTAKE.
ADPD 2015, 2015 年 3 月 18 日～22 日, ニース (フランス)
- 8) Ueda N, Yanagisawa K, Kimura N.
The relationship between age-dependent endocytic disturbance and Presenilin-1.
ADPD 2015, 2015 年 3 月 18 日～22 日, ニース (フランス)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

(4) 分担研究報告