

長寿医療研究開発費 平成29年度 総括研究報告

細胞内輸送障害とアルツハイマー病態：アルツハイマー病発症・進行の促進メカニズム
解明を目的とする研究（28-27）

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

近年の研究成果により、エンドサイトーシスと呼ばれる膜輸送系の機能障害（以下、エンドサイトーシス障害）がアルツハイマー病(AD)の原因蛋白である β アミロイド蛋白($A\beta$)の蓄積を引き起こす要因となることが明らかとなったが、エンドサイトーシス障害がADの発症そのものや病態進行に及ぼす影響については未だ不明な点が多い。特に、①なぜAD患者ではエンドサイトーシス障害が健常人より増悪化しているのか、また、② $A\beta$ 病理からTau病理への進行にエンドサイトーシス障害がどのように関与しているのかを明らかにすることは、新たな予防・治療薬の開発研究へと展開するためにも必要不可欠である。

そこで本研究は、上記①と②の二大項目に着目して解析を進め、細胞内輸送障害という独自の視点から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。

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

木村 哲也 国立長寿医療研究センター 室長

下田 修義 国立長寿医療研究センター 室長

A. 研究目的

AD患者の脳組織では、 β アミロイド蛋白($A\beta$)の凝集・沈着病変である老人斑と、微小管結合蛋白 Tau の重合・蓄積病変である神経原線維変化の形成が病理学的特徴として知られているが、実はこれらの病変はヒトのみならず動物の脳組織においても老化に伴い形成されることが知られている。このことから、AD患者の脳組織ではそれら二大病変の形成を過剰に促進する（増悪する）メカニズムが存在すると考えられ、その促進（増悪）メカニ

ズムこそが AD の発症・病態進行に大きな影響を及ぼしているのではないかという可能性が示唆される。

これまでの研究成果により、脳内では老化に伴い細胞内輸送機能が障害されることで A β が時間依存性に蓄積すること、そして AD の環境リスク因子である二型糖尿病は老化に伴う細胞内輸送障害を増悪することが明らかとなった。これらのことから、細胞内輸送機能の障害は少なくとも A β 病理の形成・進行に深く関与していると考えられるが、なぜ II 型糖尿病が細胞内輸送機能の障害を増悪するのかは不明のままである。一方、A β 病理から Tau 病理への移行については様々な研究報告が存在するが、未だ決定的なメカニズムが明らかになっていないこともまた事実である。近年、AD 患者を対象とした大規模なゲノムワイド関連解析によって細胞内輸送機能に関連する遺伝子が次々と発見されたことから、細胞内輸送機能の障害は A β 病理のみならず、Tau 病理も含めた AD 病態そのものに関係している可能性が示唆されている。

そこで本研究は、我々がこれまで積み重ねてきた細胞内輸送機能に関する研究成果をベースとして、A β 病理の増悪メカニズム、および A β 病理から Tau 病理への移行メカニズムを明らかにし、AD の発症および進行メカニズムの解明につなげることを目的とする。

B. 研究方法

(木村 (展))

II 型糖尿病を自然発症した中等齢 (15 歳以上 30 歳未満) のカニクイザルの脳組織を用いて、脂質代謝関連因子の遺伝子発現レベルを検索した。また、生体膜におけるコレステロール量の変化がエンドサイトーシス系に及ぼす影響を、神経系株化細胞である Neuro2a 細胞やラット初代培養神経細胞を用いて検索した。

各種エンドソームの輸送機能発現に必須の因子である Rab GTPase に着目し、エンドサイトーシス障害に伴う A β 蓄積への影響を、神経系株化細胞である Neuro2a 細胞やラット初代培養神経細胞を用いて検索した。

(木村 (哲))

近年の研究により、Tau は神経活動依存性に細胞外へと放出されることが明らかとなった。そこで、ラット初代培養神経細胞に様々な神経刺激を処理し、内因性 Tau の細胞内蓄積に及ぼす影響を検索した。

(下田)

II 型糖尿病を発症したカニクイザルの側頭葉皮質から mRNA を抽出し、主にコレステロール代謝に関わる因子について遺伝子および蛋白質レベルで発現解析を行った。

(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 (展))

II型糖尿病を発症したカニクイザルの脳組織では、*SREBF2* や *HMGCR* など、コレステロール合成を正に制御する因子の遺伝子発現亢進が確認され、westernblot による解析によっても *SREBP2* (*SREBF2* の翻訳蛋白) の蛋白レベル上昇が確認された。さらに、実際にカニクイザル脳組織から抽出した膜面分におけるコレステロール量を検索したところ、II型糖尿病カニクイザルではコントロール群に比べて、有意に生体膜におけるコレステロール量レベルが上昇していることが明らかとなった。そこで、神経系株化細胞である *Neuro2a* 細胞を用いて細胞膜へのコレステロール添加処理を行ったところ、エンドサイトーシス障害の顕著な増悪化が確認され、 $A\beta$ の細胞内蓄積も有意に亢進することが明らかとなった。また、細胞膜へのコレステロール添加処理単独でもライソゾームの代謝機能低下が確認され、 $A\beta$ の細胞内蓄積もまた誘導されることが明らかとなった。

AD 患者の脳組織やII型糖尿病患者の脳内では、初期エンドソームの輸送に関わる *Rab5* と、後期エンドソームの輸送ならびにライソゾームとの融合に必須の *Rab7* という2種類の *Rab* GTPase の蛋白レベル亢進が確認される。また、*Rab* GTPase の過剰な活性化はエンドサイトーシス障害の原因となることも明らかになっている。そこで、*Rab* GTPase の過剰な活性化を抑制することでエンドサイトーシス障害に伴う $A\beta$ の蓄積を改善することが可能な否か、神経系培養細胞である *Neuro2a* とラット初代培養神経細胞を用いて検索を行った。*Rab* が GTP と結合して活性化するためには、*Rab* 自体のイソプレニル化が必須である。そこで、*Rab* 指向性の高いイソプレニル化阻害薬を、エンドサイトーシス障害を誘導した *Neuro2a* や初代培養神経細胞に処理したところ、*Rab5* および *Rab7* の蛋白レベル亢進が抑制されるとともに、細胞内 $A\beta$ の蓄積もまた有意に減少することが明らかとなった。

(木村 (哲))

ラット初代培養神経細胞の培養液中に glycine や picrotoxin (いずれも LTP を誘導)、NMDA (LTD 誘導)、DHPG (代謝型グルタミン酸受容体を介した LTD) などを添加し、様々な神

経刺激を加えたところ、1時間以下の短時間においては内因性 Tau に大きな変化は確認されなかった。一方、上記刺激物質を加えて24時間培養したところ、NMDAR を介した LTD の長期誘導により、内因性 Tau のリン酸化亢進を伴う著しい蓄積が確認された。また、シナプス小胞の分泌を阻害する tetanus toxin を24時間処理した神経細胞においても若干の Tau 蓄積が確認されたことから、Tau の細胞内蓄積にはシナプス小胞分泌経路が関与している可能性も示唆された。

(下田)

II型糖尿病カニクイザルの脳組織でコレステロール合成関連因子の遺伝子発現亢進が確認されたことを受け、その他コレステロール代謝に関わる因子群の発現解析を行ったところ、遺伝子レベルでは大きな変化は確認されなかった。一方、westernblot を用いた生化学的解析では、コレステロールの輸送や取り込みに重要な ApoE、ABCA1、LRP1 の蛋白レベルがII型糖尿病カニクイザルにおいて上昇していることが明らかとなった。このことから、II型糖尿病カニクイザルの脳組織ではコレステロール代謝が大きく変化していることが示唆された。また、遺伝子発現レベルと蛋白レベルとの間に乖離が存在することも明らかとなり、蛋白レベルで解析することの重要性が再確認された。

D. 考察と結論

II型糖尿病発症カニクイザル、および培養細胞を用いた研究成果により、II型糖尿病によるエンドサイトーシス障害の増悪化は、コレステロール代謝系が変動して生体膜におけるコレステロール量が上昇し、その結果ライソゾームの代謝機能が低下することに起因する可能性が示唆された。コレステロールは脳内で最も重要な脂質の1つであり、孤発性 AD の最も強力なリスク遺伝子もまた、脳内でのコレステロール輸送に関わる ApoE である。このことから、II型糖尿病もまたコレステロール代謝系の異常を介して AD 発症を加速化させる環境性リスク因子となっている可能性が考えられ、コレステロール代謝系を正常に制御することの重要性が改めて示唆された。

Rab GTPase の活性化を抑制することで、エンドサイトーシス障害に伴う A β の蓄積が改善されたことから、同因子は老化に伴う A β 病理の進行を抑止する新たな薬剤ターゲットとなる可能性が示唆された。とりわけ、初期 AD 患者の脳内では健常人に比べて特定の Rab GTPase の発現が上昇していることから、早期介入・病態進行抑制を目的とする薬剤候補としての可能性は十分にあると考えられる。今後は、モデルマウス等を用いた in vivo 実験を展開し、エンドサイトーシス障害をターゲットとする新たな予防・治療薬の開発研究へとつなげたい。

NMDAR を介した LTD の持続が内因性 Tau のリン酸化亢進と細胞内蓄積を促進したこと

から、やはり神経活動の長期的な変化が Tau 病理を発生させる要因となる可能性が示唆された。これまでの研究成果により、エンドサイトーシス障害はシナプス小胞の輸送のみならず、神経伝達物質の放出や取り込みにも大きく影響を及ぼす可能性が示唆されている。また、LTP や LTD 発生時に生じる AMPAR の局在変化はエンドサイトーシスによってコントロールされていることから、エンドサイトーシス障害が神経活動そのものに影響を及ぼす可能性は十分に考えられる。今後は、エンドサイトーシス障害を誘導した初代培養神経細胞に様々な神経刺激を与え、神経活動パターンや Tau の蓄積に変化が見られるか否かを明らかにしたい。

II 型糖尿病カニクイザル脳組織では、コレステロール代謝系に関わる他の因子に大きな遺伝子変動は確認されなかったが、蛋白レベルにおいては ApoE や ABCA1、LRP1 など、コレステロールの輸送・取込みに関わる因子の上昇が確認された。このことから、やはり II 型糖尿病カニクイザルの脳組織ではコレステロール代謝系に何らかの異常が生じており、その結果としてコレステロール合成が促進され、生体膜のコレステロール量上昇につながっている可能性が示唆された。また、今回の検索により遺伝子発現レベルの変化と蛋白レベルの変化に乖離が存在することが明らかとなったことから、これまで遺伝子レベルでは変化がないとされている因子についても再検討する必要があることが示唆された。今後も、老化に伴い変動する因子や脂質代謝関連因子に着目して検索を進めていきたい。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kimura N.

Type II Diabetes mellitus accelerates age-dependent A β pathology in cynomolgus monkey brain. *Diabetes Mellitus: A risk factor for Alzheimer disease ? Springer (book)* In Press.

2) Kimura N, Yanagisawa K.

Traffic Jam Hypothesis: The Relationship Between Endocytic Dysfunction and Alzheimer's Disease. *Neurochem Int* S0197-0186(17): 30249-8 (2017).

3) 木村展之.

認知症研究におけるカニクイザルの有用性. 実験医学増刊 Vol.35 No.12 「認知症

発症前治療のために解明すべき分病態は何か？」

- 4) Kimura T, Suzuki M, Akagi T. Age-dependent changes in synaptic plasticity enhance tau oligomerization in the mouse hippocampus.
Acta Neuropathologica Communications 2017; 5:67
- 5) Maekawa M, Watanabe A, Iwayama Y, Kimura T, Hamazaki K, Balance S, Oba H, Hisano Y, Nozaki Y, Onishi T, Toyoshima M, Shimamoto C, Iwamoto K, Bundo M, Osumi N, Takahashi Y, Takashima A, Yoshikawa T. Polyunsaturated fatty acid deficiency during neurodevelopment in mice models the prodromal state of schizophrenia through epigenetic changes in nuclear receptor genes. *Translational Psychiatry* 2017; 7:e1229
- 6) Umeda T, Kimura T, Yoshida K, Matsuyama S, Takao K, Sakai A, Yamashita Y, Fujita Y, Suzuki M, Miyakawa T, Takashima A, Morita T, Mori H, Tomiyama T. Mutation-induced loss of APP function causes GABAergic depletion in recessive familial Alzheimer's disease: analysis of Osaka mutation-knockin mice. *Acta Neuropathologica Communications* 2017; 5:59
- 7) Suzuki M, Kimura T. Microtubule-associated tau contributes to intra-dendritic trafficking of AMPA receptors in multiple ways. *Neuroscience Letters* 2017; 653: 276–282

2. 学会発表

- 1) Kimura N, Suzuki K, Tsuchiya Y. Concomitant disruption of retrograde trafficking induces intracellular accumulation of A β .
ConBio2017 (第90回日本生化学会) 2017年12月6日 兵庫県神戸市
- 2) 竹内真吾, 下澤律浩, 保富康弘, 木村展之. 低グルコースに伴うオートファジーの亢進はエンドサイトーシス障害を増悪する。
Conbio2017 (第40回日本分子生物学会) 2017年12月6日 兵庫県神戸市
- 3) 石黒亮, 野間崇志, 木村展之, 昆隆英. グアニン四重鎖の酸化は TDP-43 による mRNA 輸送機能を阻害する。
ConBio2017 (第40回日本分子生物学会) 2017年12月8日 兵庫県神戸市
- 4) 木村展之, 鈴木恵子, 土屋由加子. 逆行性軸索輸送の包括的機能低下が A β の細胞内蓄積を誘導する。
第36回日本認知症学会 2017年11月24日 石川県金沢市
- 5) Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimosawa N, Yasutomi Y. Dynein dysfunction impedes retromer trafficking and concomitant disruption of retrograde trafficking is required for the alteration in APP metabolism.

- Society for Neuroscience 2017, 2017 年 11 月 11 日, Washington DC (USA)
- 6) Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y. Concomitant disruption of dynein-mediated retrograde endosome trafficking impedes APP metabolism.
第 60 回日本神経化学会 2017 年 9 月 8 日 宮城県仙台市
 - 7) Kimura N. Age-related endocytic dysfunction is involved in Alzheimer's disease pathology.
第 60 回日本神経化学会, 招待口演, 2017 年 9 月 9 日 宮城県仙台市
 - 8) 坂口和弥, 光森理紗, 新飯田俊平, 橋本有弘, 下田修義. DNA methylation analyses indicated changes in leukocyte composition in Alzheimer's disease patients
第 40 回基礎老化学会合同大会、2017 年 6 月 16 日、名古屋市
 - 8) Kimura N, Ueda N, Tomita T, Yanagisawa K. Retromer and Rab2-dependent trafficking mediate PS1 degradation by proteasomes in endocytic disturbance.
第 40 回日本基礎老化学会 2017 年 6 月 15 日 愛知県名古屋市
 - 9) 木村哲也. タウの生理学的・病態生理学的機能について
第 59 回日本老年医学会学術集会, 教育講演, 2017 年 6 月 14 日, 名古屋市
 - 9) Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y.
Dynein Dysfunction Reproduces Age-Dependent Retromer Deficiency: Concomitant Disruption of Retrograde Trafficking Alters APP Metabolism.
ADPD2017, 2017 年 4 月 1 日, Vienna (Austria)

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。