

細胞内輸送障害とアルツハイマー病：神経活動の変化に着目した
アルツハイマー病の発症・進行メカニズム解明を目的とする研究（19-17）

主任研究者 木村 展之 国立長寿医療研究センター 病因遺伝子研究室長

研究要旨

これまでの研究成果により、エンドサイトーシスと呼ばれる細胞内輸送系の障害が老化に伴う β アミロイド蛋白質 ($A\beta$) の神経細胞内蓄積を引き起こす要因であることを明らかにしたが、細胞内に蓄積した $A\beta$ がどのようなメカニズムで細胞外へ出て老人斑を形成するのかは未だ不明である。また、 $A\beta$ 病理（老人斑）から Tau 病理（神経原線維変化）への移行プロセスや、それら病変の進行・拡大がどのように認知症の発症につながるのかについても不明な点が多く、認知症発症を予防・抑制する薬剤を開発するためには一刻も早い真相解明が望まれている。

近年、アルツハイマー病 (AD) 患者の脳内では認知症を発症する以前から神経活動に変化が見られることや、NMDA 受容体 (NMDAR) を介したシナプス抑制 (LTD) が Tau のリン酸化を促すことなどが次々と報告され、Tau 病理の形成や認知症の発症に神経活動の変化が関わっている可能性が示唆されている。エンドサイトーシスは神経伝達物質の放出や取込に必須の細胞機能であることから、老化に伴うエンドサイトーシスの障害は神経活動を変化させることで AD 病理の移行や認知症発症に関与している可能性が高い。

そこで本研究は、細胞内のみならず細胞外も含めた総合的な膜輸送系の変化に着目し、エンドサイトーシスの障害が AD 病変の形成や神経活動に及ぼす影響を明らかにすることで、AD の発症・進行メカニズムの解明につなげることを目指す。

主任研究者

木村 展之 国立長寿医療研究センター 病因遺伝子研究室長

分担研究者

木村 哲也 国立長寿医療研究センター 病態モデル動物解析室長

多田 敬典 国立長寿医療研究センター 神経内分泌研究室長

A. 研究目的

AD 患者の脳組織には老人斑 ($A\beta$ 病理) と神経原線維変化 (Tau 病理) という特徴的な

二大病変が形成され、病変の進行・拡大とともに認知症の発症に至ると考えられている。このため、 $A\beta$ やTauといった病変蛋白質の排除を目的とするAD治療・予防薬の開発が続けられているが、残念ながら現時点では好ましい結果は得られていない。一方、これらADの二大病変はヒト以外の動物の脳組織でも老年性に形成されるため、それら病変自体は脳の老化や機能障害の程度を示す指標とも考えられ、老化に伴う病変形成メカニズムを明らかにすることは、脳の老化を食い止めて認知症発症を予防する新しい薬剤ターゲットの同定につながる可能性が期待できる。

研究代表者・木村はこれまでの研究成果により、エンドサイトーシスと呼ばれる細胞内輸送系の障害が老化に伴う $A\beta$ の神経細胞内蓄積を引き起こす要因であることを明らかにしたが、細胞内に蓄積した $A\beta$ がどのようなメカニズムで細胞外病変である老人斑形成に至るのか、また、エンドサイトーシスの障害とTau病理形成との関係性については不明な点が多い。AD患者の脳では認知症発症以前から神経活動に変化が見られることが知られているが、近年の研究報告により、 $A\beta$ がNMDA受容体(NMDAR)に結合してその機能を障害することや、シナプス外NMDARの刺激によるシナプス長期抑制(LTD)がTauのリン酸化や蓄積を引き起こすことなどが相次いで明らかとなり、神経活動の変化はアルツハイマー病理の移行と認知症発症の双方に関わっている可能性が示唆されている。

そこで本研究は、細胞内のみならず細胞外も含めた総合的な膜輸送系の変化に着目し、エンドサイトーシスの障害がAD病変の形成や神経活動に及ぼす影響などを明らかにすることで、老化に伴うADの発症・進行メカニズムの解明につなげることを目指す。

B. 研究方法

(木村 (展))

現在までの先行研究により、AD病変の形成にはオートファジーの変化が関与するという報告が多数寄せられている。そこでまず、若齢(10歳以下)、中等齢(11歳以上25歳未満)、および老人斑の形成が認められる老齢(25歳以上)カニクイザルから採取した脳組織を用いて、オートファジー関連因子の蛋白質発現レベルを生化学的に検索した。

マウス神経芽細胞種Neuro2a細胞、および培養21日目の十分に成熟したラット初代培養神経細胞を用いて、カニクイザル脳組織で確認されたオートファジーの変化がAD病変蛋白質の動態に及ぼす影響を検証した。

(木村 (哲))

軸索輸送モーター蛋白質Dyneinの特異的阻害剤であるciliobrevin D (CbD)を処理した培養21日目のラット初代培養神経細胞を用いて、シナプスNMDAR、およびシナプス外NMDARを刺激した際のシグナル伝達アウトプットにDyneinの機能障害が及ぼす影響を検索した。

(多田)

培養 21 日目のラット初代培養神経細胞を用いて、CbD 処理による Dynein の機能抑制がシナプス活動にどのような影響を及ぼすのか、パッチクランプ法を用いて電気生理学的に検索した。

(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))

カニクイザル脳組織を用いた生化学的検索により、中等齢期を境として ATG5 や LC3 といったオートファゴソーム形成を制御する因子の蛋白質発現レベルが明らかに低下することが明らかとなった。中等齢期は細胞内 A β の蓄積が確認され始める時期であり、細胞外病変である老人斑はまだ形成されない。そこで、あらかじめ siRNA を用いて Dynein をノックダウンした Neuro2a 細胞にラパマイシンを用いてオートファゴソーム形成を誘導したところ、細胞内 A β の蓄積が有意に増悪し、細胞外への A β 排出が著しく減少することが明らかとなった。一方、逆に siRNA を用いてオートファゴソーム形成の制御因子である ATG5 をノックダウンしたところ、細胞外への A β 排出が有意に増加し、Dynein のノックダウンによる細胞内 A β の蓄積が顕著に改善されることが明らかとなった。

細胞外への A β 排出機構には諸説あるが、オートファゴソームは多胞体 (内部に微小胞を内包し、細胞膜と融合することで細胞外へ放出された微小胞はエクソソームと呼ばれる) と融合することが知られている。そこで、オートファゴソーム形成の促進および阻害がエクソソーム放出に及ぼす影響について Neuro2a 細胞を用いて検索したところ、オートファゴソームの形成はエクソソームの細胞外排出を著しく阻害することが明らかとなった。また、ラット初代培養神経細胞を用いた検証実験においても、オートファゴソーム形成の促進はエクソソームの細胞外排出を阻害して Dynein の機能障害に伴う細胞内 A β の蓄積を増悪化することが明らかとなった。一方、フィルターろ過法とショ糖濃度勾配法を組み合わせるカニクイザルの脳実質からエクソソームを抽出し、エクソソーム局在性蛋白質の生化学的検索を行った結果、老人斑形成期のカニクイザル脳から抽出したエクソソームには多量の A β が存在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を用いた検索により、シナプス NMDAR の刺激に伴う LTP 様シグナル伝達の結果として生じる核内転写因子 CREB のリン酸化 (活性化) は、Dynein に

よる逆行性軸索輸送が必須であることが判明した。また免疫細胞染色により、LTP シグナル伝達分子の1つである PKA は小胞輸送によって樹状突起から核近傍へ輸送されている可能性が示唆された。一方、シナプス外 NMDAR の刺激に伴う LTD 様の細胞応答には Dynein の輸送機能は必要ではないことが明らかとなった。

(多田)

ラット初代培養神経細胞を用いた電気生理学的検索により、Dynein の機能低下は amplitude (シナプス後細胞での伝達物質に対する感受性：一つのシナプス小胞から放出された伝達物質による応答) と frequency (シナプス前終末までの伝達物質放出確率の推定：シナプス活動の発生頻度) を減弱させることが明らかとなり、とりわけ後者は対照群の 50% 近くまで減弱させることが明らかとなった。

D. 考察と結論

カニクイザル脳組織および各種培養系を用いた検索により、老化に伴うオートファジーの低下は、エクソソームを介した細胞外への A β 排出を促進するための代償性機構である可能性が示唆された。また、老人斑はエクソソームのマーカー蛋白質に対する抗体を用いた免疫染色により陽性を示すことから、エンドサイトーシス障害によって細胞内に蓄積した A β はエクソソームを介して細胞外へ排出されることで老人斑形成に至るという病態メカニズムの存在が大いに示唆された。一方、これまでの先行研究により、オートファジーはリン酸化 Tau の分解機構として重要であることが指摘されていることから、細胞外への A β 排出を促進するためにオートファゴソームの形成が低下することは、結果的に Tau の病変形成を促進する諸刃の剣となる可能性が考えられ、A β 病理から Tau 病理への移行におけるオートファジーの新たな重要性が示された。

ラット初代培養神経細胞を用いた検索により、シナプス NMDAR を介した LTP 様シグナルの伝達に Dynein の輸送機能が必須であることが明らかとなったことから、老化に伴う Dynein の機能低下は神経活動の発生・維持にも直接的な影響を及ぼす可能性が示唆された。一方、LTD 様の細胞応答 (例：ERK や CREB のリン酸化低下など) に Dynein の機能阻害は影響を及ぼさなかったことから、LTD は逆行性細胞内輸送系を必要としない細胞応答であることが示唆された。今後は、Tau のリン酸化や不溶化に対するエンドサイトーシス障害の影響について引き続き検索を行う予定である。

ラット初代培養神経細胞を用いた電気生理学的検索により、Dynein の機能障害はポストシナプスの応答のみならずプレシナプスからのシナプス小胞分泌をも著しく減弱させることが明らかとなった。これまでの研究成果により、Dynein の機能障害は初期エンドソームの肥大化を引き起こし、細胞体から運ばれてきた神経伝達物質を含む輸送小胞とシナプス小胞がプレシナプスの細胞膜と融合して内包する神経伝達物質を分泌した後、局所の細胞膜はエンドサイトーシスによってプレシナプス側へ取り込まれ、細胞体から輸送されてき

た神経伝達物質を含む輸送小胞と融合することで再びシナプス小胞として機能する。このため、Dynein の機能低下に伴うエンドサイトーシス障害はプレシナプス細胞膜局所におけるエンドサイトーシスを障害することで、プレシナプスにおけるシナプス小胞の再利用を阻害した結果、シナプス小胞分泌を減弱させている可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hata S, Omori C, Kimura A, Saito H, Kimura N, Gupta V, Pedrini S, Hone E, Chatterjee P, Taddei K, Kasuga K, Ikeuchi T, Waragai M, Nishimura M, Hu A, Nakaya T, Meijer L, Maeda M, Yamamoto T, Masters CL, Rowe C, Ames D, Yamamoto K, Martins RN, Gandy S, Suzuki T.

Decrease in p3-Alc β 37 and p3-Alc β 40, products of Alcadin β generated by γ -secretase cleavages, in aged monkeys and Alzheimer's disease patients.

Alzheimer's & Dementia 5: 740-750 (2019)

- 2) 木村展之.

アルツハイマー病理の促進機序.

月刊糖尿病 2(11): 14-19 (2019)

- 3) Takeuchi S, Ueda N, Suzuki K, Shimozawa N, Yasutomi Y, Kimura N.

Elevated Membrane Cholesterol Disrupts Lysosomal Degradation to Induce β -Amyloid Accumulation: The Potential Mechanism Underlying Augmentation of β -Amyloid Pathology by Type 2 Diabetes Mellitus.

Am J Pathol 189(2):391-404 (2019)

2. 学会発表

- 1) 木村展之. 老化に伴うエンドサイトーシスの破綻とアルツハイマー病.

第 125 回日本解剖学会, 2020 年 3 月 26 日, 山口県宇部市

(備考: コロナウイルス感染症対策のため、誌上開催となった。)

- 2) 木村展之, 鯉沼真吾, 下澤律浩, 保富康弘.

オートファジーの促進はエンドサイトーシス障害を増悪して細胞内 A β の蓄積を増加する.

第 38 回日本認知症学会, 2019 年 11 月 7 日, 東京都新宿区

- 3) Kimura N, Koinuma S, Shimozawa N, Yasutomi Y.
Upregulation of autophagy interrupts exosome secretion to augment endocytic disturbance and enhance intracellular accumulation of abeta.
Society for Neuroscience 2019, 2019 年 10 月 20 日, Chicago (US)
- 4) 木村展之, 鯉沼真吾, 下澤律浩, 保富康弘.
エクソソームを介したオートファジーによる細胞内・外 A β レベルのコントロール.
第 92 回日本生化学会, 2019 年 9 月 19 日, 神奈川県横浜市
- 5) 多田敬典.
精神神経疾患における攻撃性制御の意義と分子機序の解明
第 31 回日本行動神経内分泌研究会 攻撃行動シンポジウム, 2019 年 9 月 3 日,
山梨県南都留郡
- 6) Kimura N.
Traffic Jam Hypothesis: Endocytic Disturbance & Alzheimer's Disease Pathology.
NEURO2019 (日本神経化学会、日本神経科学会 合同大会), 2019 年 7 月 28 日,
新潟県新潟市
- 7) Koinuma S, Shimozawa N, Yasutomi Y, Kimura N.
Autophagy Induction Augments Intracellular Accumulation of A β via Reduction
in Exosome Secretion.
NEURO2019 (第 62 回日本神経化学会、第 42 回日本神経科学会 合同大会),
2019 年 7 月 25~26 日, 新潟県新潟市
- 8) Tada H.
Chronic stress environment causes social cognitive impairment and excessive
aggression by altering synaptic plasticity in rat medial prefrontal cortex.
35th Spring International Conference of the Korean Society for Gerontology and
Korea-Japan Joint Symposium, 2019 年 6 月 27 日, South Korea
- 9) 木村展之.
Traffic Jam 仮説: 老化に伴う細胞内膜輸送系の変化とアルツハイマー病態.
第 31 回日本老年学会, 2019 年 6 月 6 日, 宮城県仙台市
- 10) Tada H, Takahashi T.
Chronic stress causes excessive aggression by altering synaptic actin dynamics
in the mPFC.
第 42 回日本基礎老化学会, 2019 年 6 月 6 日, 宮城県仙台市

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。