

糖尿病および加齢による認知症促進機構に着目した
次世代の認知症創薬を目指す標的分子の探索 II (19-9)

主任研究者 里 直行
国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (部長)

研究要旨

前年度までの「糖尿病および加齢による認知症促進機構に着目した次世代の認知症創薬を目指す標的分子の探索」を継続・発展させる形で研究を行う。

① 糖尿病による認知症促進の因子の解明

前年度までの研究において、糖尿病合併アルツハイマー病モデルマウスにおいて寿命が短くなること、アストロサイトの *dysregulation* を伴うことを見出した。さらに糖尿病マウスではミクログリアの性質が野生型と異なることを見出した。また引き続き、モデルマウスにおいて、糖尿病とアルツハイマー病が合併することで初めて増加する遺伝子のノックアウトの解析を進めており、興味深い知見が集積しつつある。単一細胞解析など新しい手法を取り入れて病態解明を行う。

- ◆糖尿病合併アルツハイマー病モデルのトランスクリプトーム解析により、糖尿病とアルツハイマー病が合併することによって初めて発現増加する *Btg2* (*B cell translocation gene 2*), *Cyr61* (*Cysteine-rich angiogenic inducer 61*), *LSS* (*Lanosterol synthase*), *Duspl* (*Dual specificity phosphatase 1*)などの遺伝子群のノックアウトマウス作製と解析
- ◆糖尿病とアルツハイマー病の合併による寿命の短縮化のメカニズムの解明
- ◆糖尿病におけるミクログリアの性質を明らかにする
- ◆糖尿病とアルツハイマー病合併におけるアストロサイトの性質を明らかにする

② 加齢による認知症促進機構の解明

さらに時間・空間的 β アミロイド発現マウスの系が機能することを確認しつつある。また東京都総合医学研究所の長谷川成人先生との共同研究でヒト脳から抽出したタウを用いた神経原線維変化進展モデルを用いて加齢の影響を調べる。エイジング・ファームの加齢マウスに加え、加齢促進マウス (*CD9;CD81 DKO* マウス) を導入する。

- ◆ヒト脳から抽出したタウを用いた神経原線維変化進展モデル
若年マウスと老齢マウスの比較 (エイジング・ファーム)
加齢促進マウス (*CD9;CD81 DKO* マウス) と野生型の比較
- ◆時間・空間的 β アミロイド発現マウスを用いた若年期と老齢期における β アミロイドに対する生体防御反応の変化の検討

◆アルツハイマー病における細胞老化の役割の検討

主任研究者

里 直行 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (部長)

分担研究者

福森 亮雄 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部認知症病態解析室 (室長)

篠原 充 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部標的治療薬開発室 (室長)

田代 善崇 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (流動研究員)

鈴木 香 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (流動研究員)

A. 研究目的

●研究の目的、必要性

糖尿病および加齢は認知症の促進因子であるが、そのメカニズムは十分に解明されていない(1. Shinohara, Sato. *Neurochem. Int.* 2017)ので、解明することを目的とする。これらの解明は認知症の創薬およびバイオマーカーの開発に必要である。

●特色・独創的な点

糖尿病とアルツハイマー病の掛け合わせモデルの脳における遺伝子発現の検討から、糖尿病とアルツハイマー病が合併して初めて発現増加する遺伝子群を見出した (2. Shinohara, Sato et al. 投稿中)。その中から、遺伝子発現の高い順から遺伝子欠損マウスの作成を行い、解析を行っている所が独創的である。また、これまではCRISPR/Cas9による遺伝子欠損マウスの作製を大阪大学医学部附属動物実験施設に依頼して行っていたが、この手法を当研究部で行くべく準備しているところが特色である。

またAPPノックインマウスとob/obマウスの掛け合わせマウスの解析により、糖尿病とアルツハイマー病の寿命に対する効果が確認され、そのメカニズムとしてミクログリアとアストロサイトの不均衡が示唆された (3. Shinohara, Sato et al. *The FASEB Journal*, 2020)。APPノックインマウスとob/obマウスの掛け合わせマウスにおけるミクログリアとアストロサイトそれぞれの一細胞解析を行うなど、これまでの研究成果をもとに独自に開発する動物モデル・細胞に基づき多角的に分子機序の解明を目指す点が独創的である。また米国のデータベースを用いて糖尿病と認知症の相互関係について認知機能 (4. Shinohara, Sato et al. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, 2020) および寿命 (5. Shinohara, Sato et al. *In preparation.*) につき、報告の予定であるところが特色である。

また、加齢が認知症を促進するメカニズムは明らかでない。加齢は老人斑より神経原線維変化との相関が強い。東京都医学総合研究所の長谷川成人博士との共同研究において、アルツハイマー病患者脳から抽出したタウを用いて神経原線維変化の進展に対する加齢の影響を当センターにおけるエイジング・ファームの高齢マウスおよび老化促進マ

ウスを用いて検討するところが特色である。

さらに独自に作成を行った時間・空間的 β アミロイド発現マウスを用いてタウ進展における β アミロイドの役割の検討できるところが独創的である。

1. Shinohara M., Sato N.*, Bidirectional interactions between diabetes and Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 108, 296-302, 2017.
2. Shinohara M., Masataka K., Sato N.* et al. Subset of genes are upregulated in APP; ob/ob mice, but in neither APP mice nor ob/ob mice: An implication for the interaction between Alzheimer's disease and diabetes. In submission.
3. Shinohara M., Tashiro Y., Shinohara M., Hirokawa J., Suzuki K., Onishi-Takeya M., Mukouzono M., Takeda S., Saito T., Fukumori A., Saido T.C., Morishita R., Sato N. Increased levels of A β 42 decrease the lifespan of ob/ob mice with dysregulation of microglia and astrocytes. *The FASEB Journal.* 2020 Feb;34(2):2425-2435.
4. Shinohara M., Tashiro Y., Suzuki K., Fukumori A., Guojun Bu, Sato N. Interaction between APOE genotype and diabetes in cognitive decline., *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring.* 2020 Feb 6;12(1):e12006.
5. Shinohara M.*, Sato N.* et al. Diabetes is more strongly associated with shorter life expectancy in APOE ϵ 2 carriers and APOE ϵ 3 carriers than APOE ϵ 4 carriers: an analysis of NACC database. In preparation.

B. 研究方法

前年度までの「糖尿病および加齢による認知症促進機構に着目した次世代の認知症創薬を目指す標的分子の探索」を継続・発展させる形で研究を行う。

③ 糖尿病による認知症促進の因子の解明

前年度までの研究において、糖尿病合併アルツハイマー病モデルマウスにおいて寿命が短くなること、アストロサイトの dysregulation を伴うことを見出した。さらに糖尿病マウスではミクログリアの性質が野生型と異なることを見出した。また引き続き、モデルマウスにおいて、糖尿病とアルツハイマー病が合併することで初めて増加する遺伝子のノックアウトの解析を進めており、興味深い知見が集積しつつある。単一細胞解析など新しい手法を取り入れて病態解明を行う。

- ◆糖尿病合併アルツハイマー病モデルのトランスクリプトーム解析により、糖尿病とアルツハイマー病が合併することによって初めて発現増加する Btg2 (B cell translocation gene 2), Cyr61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61), LSS (Lanosterol synthase), Dusp1 (Dual specificity phosphatase 1)などの遺伝子群のノックアウトマウス作製と解析
- ◆糖尿病とアルツハイマー病の合併による寿命の短縮化のメカニズムの解明
- ◆糖尿病におけるミクログリアの性質を明らかにする
- ◆糖尿病とアルツハイマー病合併におけるアストロサイトの性質を明らかにする

④ 加齢による認知症促進機構の解明

さらに時間・空間的 β アミロイド発現マウスの系が機能することを確認しつつある。また東京都総合医学研究所の長谷川成人先生との共同研究でヒト脳から抽出したタウを用いた神経原線維変化進展モデルを用いて加齢の影響を調べる。エイジング・ファームの加齢マウスに加え、加齢促進マウス (CD9;CD81 DKO マウス) を導入する。

- ◆ヒト脳から抽出したタウを用いた神経原線維変化進展モデル
 - 若年マウスと老齢マウスの比較 (エイジング・ファーム)
 - 加齢促進マウス (CD9;CD81 DKO マウス) と野生型の比較
- ◆時間・空間的 β アミロイド発現マウスを用いた若年期と老齢期における β アミロイドに対する生体防御反応の変化の検討
- ◆アルツハイマー病における細胞老化の役割の検討

(倫理面への配慮)

本研究のすべての動物実験は下記の国のガイドライン・法律などを遵守し、実施する。

「動物の愛護および管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)

「研究機関などにおける動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年度厚生労働省告示第 71 号)

また、剖検脳を用いた研究に関しては、研究に関する倫理指針 (人を対象とする医学系研究に関する倫理指針およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針) を遵守しながら、国立長寿医療研究センターでの倫理委員会に本研究での解析の申請を行い、承認されたあと、実験を行う。高齢者ブレインバンクにて設定された匿名化番号を付けた書類、サンプルが国立長寿医療研究センターに送付される。

C. 研究結果

- **Btg2** ノックアウトマウスをゲノム編集技術により大阪大学真下知士博士らとの協力のもとに作製し、当センターに導入、非特異的影響を排除するためバッククロスを 6 回行い CRISPR/Cas9 のオフターゲット効果を排除した。また **Btg2** ノックアウトマウスのグリア細胞と老人斑の相互作用を解析するため APP 過剰発現系マウスと交配を開始した。
- **Btg2** は糖尿病で併発する白質病変で遺伝子発現が上昇するため **Btg2** ノックアウトマウスに慢性脳低灌流 (Bilateral common carotid artery stenosis :BCAS) を施し、白質病変の誘発を行った。偽手術および BCAS 施術マウスを行動解析であるオープンフィールド試験において比較したところ、BCAS 施術 **Btg2** ノックアウトマウスにおいて活動量の増加傾向が見られた。
- **Btg2** が細胞分裂増殖抑制機能を有することからレンチウイルスを用いた遺伝子導入を試みた。導入遺伝子 CSII-CMV-Btg2, CSII-CMV-MCS(ネガティブコントロール)、CSII-CMV-MCS-IRES2-Venus (ポジティブコントロール) およびパッケージングプラスミド pCMV-VSV-G RSV-Rev, pCAG-HIV-gp を 293T 細胞へトランスフェクションし 4 日後に

回収した培養液をマウス初代培養グリア細胞へ添加、感染を行った。ウイルス培地添加 72hr 後培地交換したグリア細胞で Venus の蛍光が観察された。以上よりレンチウイルスによる初代培養グリア細胞への遺伝子導入系が確立した。今後マウス初代培養グリア細胞からミクログリアへ Btg2 遺伝子を導入するため、マウス初代培養グリア細胞からミクログリアの単離を行った。コンフルエントの総グリア細胞を 37°C、200rpm で振盪し上清の細胞を回収することでミクログリアの単離に成功した。今後はこれらミクログリアへレンチウイルスで Btg2 遺伝子を導入予定である。

- 前年度までの研究により Cyr61 のゲノム編集ノックアウトマウス及びコンディショナルノックアウトマウス (Cyr61-flox) を大阪大学 真下知士博士らとの協力のもとに作製した。得られた F1 マウスのバッククロスを行い、これまでに F3 を取得していた。今回、さらにバッククロスを進め F5 を取得した。また、Cre 発現マウスと掛け合わせることで、flox 部位が実際に切り出されることを確認した。Cyr61-flox のホモマウスを取得し、ホモ交配が可能であることを確認した。さらに、アミロイド病理への影響を個体内で観察するため、Cyr61-flox マウスを APP23 マウスと交配を開始した。一方、培養細胞での Cyr61 の効果を観察するため、HEK293 細胞に Cyr61 を発現させ A β への効果を検証している。Cyr61 安定過剰発現細胞で A β の増加がみられており、Cyr61 のドメイン欠損変異体コンストラクト、その安定発現株とリコンビナント蛋白を作成している。現在までに大腸菌でリコンビナント蛋白を取得した。また欠失変異体安定発現細胞を得ており、どのドメインが A β 増加効果を出すのか検討する予定である。
- LSS コンディショナルノックアウトマウスをゲノム編集技術により大阪大学 真下知士博士らとの協力のもと開発し、当センターに導入した。非特異的影響を排除するために、バッククロスを進めた。現在 F4 世代が誕生しており、F6 世代までバッククロスを進める予定である。
- DUSP1 のコンディショナルノックアウトマウス (DUSP1-flox) をセンター内で作製するために福井大学 徳永暁憲先生、当センター小木曾室長らとの協力のもとに CRISPR-Cas9 システムを用いて、DUSP1-flox マウスを作製中である。得られた産仔よりゲノム編集を受けた個体の確認を行っており、ゲノム編集で得られた個体に DUSP1-flox が存在していた場合は、系の確立およびバッククロスを進める。
- 関連する糖尿病合併アルツハイマー病モデルの寿命に関する論文「Increased levels of A β 42 decrease the lifespan of ob/ob mice with dysregulation of microglia and astrocytes」を FASEB J に投稿し、リバイスを行い、採択された。また本論文は APP ノックインのヘテロマウスを用いていたため、老人斑の蓄積が 18 か月齢においても認められなかった。老人斑の形成の影響を評価するために、APP ノックインホモマウスを用いて糖尿病マウスである ob/ob マウスと掛け合わせ、表現型の評価を進めている。
- 糖尿病合併アルツハイマー病モデルにおける遺伝子発現の論文「Upregulation of a subset of gene expressions in APP; ob/ob mice implicates the interaction between obesity linked to

diabetes and Alzheimer' s disease」を投稿中である。

- 米国臨床データベースを用いて APOE 多型と糖尿病の認知機能低下に与える影響を明らかにし、論文「Interaction between APOE genotype and diabetes in cognitive decline: an analysis of NACC database」を Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring 誌に投稿し、採択された。
- ヒト脳から抽出したタウを用いた神経原線維変化進展モデルに関しては、当センターでの倫理申請が承認された。長谷川先生との相談のもと、モデルの導入を進めていく。
- 加齢促進マウス (CD9;CD81 DKO マウス) を CARD (熊本大学生命資源研究・支援センター動物資源開発研究部門) マウスバンク経由にて大阪大学 目加田英輔教授より寄託を受けた。当センター実験動物施設内規程によりクリーン化を行い、ヘテロでの飼育を開始し、現在ホモ化作業を行っている。
- 若齢期と老齢期における β アミロイドに対する生体防御反応の変化の検討の為に、時間・空間的 β アミロイド発現マウスとして、これまでの研究により作製した ROSA-tet-off-App K670N-M671L-I716F マウスをドキシサイクリン下で Cre 発現マウスとの交配を行い、若齢期と老齢期の実験群の取得を行っている。
- 非 AD 型、老人斑優位型、AD 型の臨床検体を用いて、細胞老化で誘導される因子のひとつである p16^{lnk4a} の mRNA の発現レベルを比較検討したところ、老人斑優位型で有意に発現の亢進がみられた。現在、詳細な解析を進めるために、文部科学省科学研究費助成事業 新学術領域研究「学術研究支援基盤形成」のコホート・生体試料支援プラットフォームとして、「ブレインリソースの整備と活用支援」の申請を行い、高齢者ブレインバンクより臨床検体の入手を進めている。

D. 考察と結論

① 糖尿病による認知症促進の因子の解明

- ◆糖尿病とアルツハイマー病が合併することによって初めて発現増加する Btg2 (B cell translocation gene 2), Cyr61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61), LSS (Lanosterol synthase) , Dusp1 (Dual specificity phosphatase 1) の病態における役割が解明されつつある。特に Btg2 はグリア系細胞の増殖抑制に関与することが示唆されており、今後の研究の発展が望まれる。また、Cyr61 は β アミロイドの産生に関与するというデータを得ており、さらに細胞および個体レベルの研究を継続していく。
- ◆糖尿病とアルツハイマー病の合併によるモデル動物の寿命の短縮化および脳内グリア細胞の変容に関する論文発表を行ったが、今後は一細胞解析など最先端の解析技術を用いたさらなるメカニズムの解明が期待される。

② 加齢による認知症促進機構の解明

- ◆神経原線維変化の進展が加齢により変化するかが明らかになると考えられるので東京都健康長寿医療研究センターにおける学術審査を含め、手続きを進める。
- ◆ β アミロイドを時間・空間的に発現するマウスの脳内でのドキシサイクリン依存的な蛋白の発現を確認したので、 β アミロイドに対する生体防御反応が加齢により変

化するかを検討できる実現性が出てきたのでさらに研究を進めて行く。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shinohara M., Tashiro Y., Suzuki K., Fukumori A., Bu Guoju, Sato N. Interaction between APOE genotype and diabetes in cognitive decline. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*.2020, 12, e12006.
2. Shinohara M., Tashiro Y., Shinohara M., Hirokawa J., Suzuki K., Onishi-Takeya M., Mukouzono M., Takeda S., Saito T., Fukumori A., Saido T. C., Morishita R., Sato N. Increased levels of A β 42 decrease the lifespan of ob/ob mice with dysregulation of microglia and astrocytes. *The FASEB Journal* 2020, 34(2), 2425-2435.
3. Shinohara M., Sato N. The Roles of Apolipoprotein E, Lipids, and Glucose in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Diabetes Mellitus, A risk factor for Alzheimer's Disease*. Eds: Yusaku Nakabeppu & Toshiharu Ninomiya. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 85-101, 2019.
4. 里 直行, 認知症と血管因子の関連-最近の知見, 認知症の最新医療 第9巻 第2号 (通巻33号), 2019年発行
5. 里 直行, 猪原 匡史, 富本 秀和., 認知症と血管因子のホットトピックス (鼎談), 最新医学 第74巻 第6号, 2019年6月10日発行
6. 里 直行, 生活習慣病と認知症予防, カラントセラピー 通巻439号, 2019年8月1日
7. 里 直行, 糖尿病による認知症促進機構, 老年精神医学雑誌 第30巻 第9号 通巻390号, 2019年9月20日発行

2. 学会発表

1. 里 直行, 「糖尿病による認知症・アルツハイマー病促進のメカニズム」第116回日本内科学会総会・講演会 シンポジウム1, 2019年4月26日 名古屋市
2. Shinohara M., Tashiro Y., Shinohara M., Hirokawa J., Suzuki K., Onishi-Takeya M., Mukouzono M., Takeda S., Saito .T, Fukumori A., Saido T.C., Morishita R, and Sato N. "Increased Levels of A β 42 Decrease the Lifespan of Ob/Ob Mice with Dysregulation of Microglia and Astrocytes", .Alzheimer's Association International Conference 2019 ポスター発表.July 16, 2019, Los Angeles, United States.
3. 篠原 充, 里 直行 他, 「ob/ob マウスにおける A β 42 の増加は寿命を短くさせる」第61回日本老年医学会学術集会 一般演題, 口述 2019年6月7日 仙台市

4. 里 直行, 「アルツハイマー病の基礎研究」, 第13回老年医学サマーセミナー, 2019年8月30日 大府市
5. 里 直行, 「糖尿病と認知症の基礎研究の最近の進歩」, 第34回日本糖尿病合併症学会, 2019年9月27日 大阪市
6. Sato N. “Bidirectional interactions between obesity/diabetes and Alzheimer's disease.”, Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities in Alzheimer's Disease., Oct.11,2019., Tokyo,Japan.
7. 里 直行, 「神経変性を予測する血液バイオマーカーとしての Neurofilament light(NFL)概説」, 第9回日本認知症予防学会学術集会, 2019年10月19日 名古屋市
8. 篠原 充, 田代 善崇, 鈴木 香, 竹屋-大西 美幸, 武田 朱公, 斉藤 貴志, 福森 亮雄, 西道 隆臣, 森下 竜一, 里 直行. 「ob/ob マウスにおける A β 42 の増加は寿命を短くさせる」, 第38回日本認知症学会学術集会 ポスター発表, 2019年11月7日, 東京都
9. Sato N. “Bidirectional interactions between obesity/diabetes and Alzheimer's disease”, The 15th International Symposium on Geriatrics and Gerontology. 2020年2月15日, 大府市

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