

長寿医療研究開発費 2020年度 総括研究報告

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)** , **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

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を用いた若年マウスと老齢マウスの比較 (エイジングファーム)

◆加齢促進マウスにおけるβアミロイドやタウ病理の検討

◆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

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)

福森 亮雄 大阪薬科大学 薬物治療学Ⅱ研究室 (教授)

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)

A. 研究目的

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.)。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 revision.*) 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.[#], Kikuchi M.[#], Onishi-Takeya M., Tashiro Y., Suzuki K., Noda Y., Takeda S., Mukouzo M., Nagano S., Fukumori A., Morishita R., Nakaya A., Sato N.* Upregulated expression of a subset of genes in APP;ob/ob mice: Evidence of an interaction between diabetes-linked obesity and Alzheimer's disease. *FASEB BioAdvances* 3(5):323-333, 2021
3. Shinohara M., Tashiro Y., Shinohara M., Hirokawa J., Suzuki K., Onishi-Takeya M., Mukouzo 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.* 34(2):2425-2435. 2020
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*, Feb 6;12(1):e12006. 2020
5. Shinohara M.* , Suzuki K., Bu G., Sato N.* Interaction between APOE genotype and diabetes in longevity. *Journal of Alzheimer's disease*, *in revision*.

筆頭著者 *責任著者

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。

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）

すべての基礎研究は事前に組み替え DNA および動物実験プロトコルなどが国立長寿医療研究センターで承認された後に開始する。組み換え DNA 実験に関しては平成 16 年 2 月に施行されたカルタヘナ法（遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律）を遵守し、規定に則った実験プロトコルを作成し遵守して研究を行う。加えて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）

「厚生労働省の所管する動物実験等の実施に関する基本指針」（平成 18 年 6 月 1 日科発第 0601001 号厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）

また、剖検脳を用いた研究に関しては、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」

（平成 26 年度文部科学省・厚生労働省告示第 3 号）を遵守する。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う。高齢者ブレインバンクの脳から東京都総合医学研究所にて抽出された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 に関する結果

- ノックアウトマウスの維持管理 大阪大学より導入した Btg2KO マウスは exon 1 の 11 塩基欠損型マウスを 6 回のバッククロスにより CRISPR/Cas9 のオフターゲット効果を排除して用いた。またこれら Btg2KO マウスにおいてアルツハイマー病を発症し脳内炎症が誘発された際の Btg2 欠損の影響を調べるため、アミロイド前駆体タンパク過剰発現系マウス APP23/+ と交配し、APP23/+;Btg2^{-/-}マウスを得、維持している。
- BCAS 施術マウスにおける白質病変の誘発 本研究所にて BCAS を施したマウス白質

(脳梁、視索)ではミエリンの空胞化(矢頭)を特徴とする白質病変が確認され、偽手術に対して白質病変の重症化がみられた。

- **BCAS 施術した野生型および Btg2KO マウスでの行動への影響** 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結果、BCAS 施術 Btg2 ノックアウトマウス、特に雄において活動量の有意な増加が見られた。認知行動試験であるモリス水迷路では、BCAS 施術マウス、各遺伝子群共に有意な差は認められなかったが、1日目の試験結果に対し最終日の試験結果では逃避時間が有意差に短縮したが、BCAS 施術 Btg2KO マウスでは有意な差はみられなかった。
- **BCAS 施術した野生型及び Btg2KO マウス脳内の遺伝子発現** リアルタイム PCR によりアストロサイト、ミクログリア、マクロファージの各マーカー分子における遺伝子発現を解析した結果、アストロサイトマーカー *Gfap* と活性化マクロファージマーカー *Cd45* の発現が BCAS 施術 Btg2KO マウスで有意に高く、また有意差はないがミクログリアマーカー *Cd11b*、疾患ミクログリアマーカー *Dap12*、単球マーカー *Cd14* も有意差はみられなかったが発現上昇する傾向にあった。
- **In vitro における Btg2 の細胞増殖抑制機能の解析** 慢性脳低灌流による白質病変および AD 等の脳内炎症が誘発された際の Btg2 の細胞増殖抑制機能を解析するため、野生型および Btg2KO マウス脳のアストロサイト細胞への炎症刺激と分裂活性を調べた。その結果 LPS および LPS + IFN γ で炎症を誘発した Btg2KO マウス由来の総グリア細胞では野生型と比較し有意に BrdU 陽性細胞率が高かった。また BrdU 陽性の細胞について抗 GFAP 抗体および抗 Iba1 抗体の各陽性細胞で定量したところ、抗 GFAP 抗体陽性細胞において有意に BrdU 陽性細胞が多く、抗 Iba1 陽性細胞では BrdU 陽性細胞数に有意な差は認められなかった。

Cyr61 に関する結果

- 大阪大学(当時)真下知士博士らとの協力のもと、ゲノム編集技術により、Cyr61 のコンディショナル・ノックアウトマウス (Cyr61cKO)を得た。Cyr61 コンディショナル KO マウスの B6 バッククロスを行うとともに、APP23 マウスとの交配を進めた。また、CAG-Cre マウスと掛け合わせ、実際に Cyr61 ノックアウトできるかを確認した。また、アストロサイトでの Cyr61 の KO を行うために ALDH1-Cre マウスを導入し、そのバッククロスを開始した。さらに、HEK293 細胞において、Cyr61 の発現により A β が増加すること発見した。また、Cyr61 の安定発現 HEK 細胞を作成し、その細胞の培養上清に放出される Cyr61 を部分精製した。この部分精製した Cyr61 を用いても A β 増加効果を再現できた。

Lss に関する結果

- LSS コンディショナルノックアウトマウスについてバッククロスを進め、F6 世代まで誕生した。今後、Aldh111-cre/ERT2 マウス、家族性変異 APP ノックインマウスとの交配を進める。

その他の本課題に関する結果

- 当研究部でゲノム編集により開発した *Dusp1* ノックアウトマウスについてバッククロスを進めた（現在 F3 世代）。
- 米国ジャクソンラボより購入したタモキシフェン存在下でアストロサイト特異的に Cre を発現する *Aldh111-cre/ERT2* マウスについて C57BL6J へのバッククロスを進め、F6 世代まで誕生した。
- 昨年度学術誌に報告した糖尿病合併アルツハイマー病モデルの寿命短縮に関する論文「Increased levels of A β 42 decrease the lifespan of ob/ob mice with dysregulation of microglia and astrocytes」で報告したマウスモデルは家族性変異 APP をヘテロで発現しており老人斑の形成には至っていなかった。老人斑の形成が起きる方がアルツハイマー病の病態評価には望ましいため、老人斑を形成するモデルにすべく APP をホモでノックインしたマウスと肥満糖尿病 ob/ob マウスを交配し、加齢化を進めた。死亡率の他、月 1 回のペースで体重変化を観察した。
- 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、モデルの導入を進めていく。長谷川先生から凝集したタウをいただき、マウス脳に播種する実験を進めている。
- 時間・空間的 β アミロイド発現マウスを解析したところ、2つのラインのうち、ライン Fの方がライン H よりも同じ *CamkII driver* でも脳内の A β の量が多いことが分かった。これまでライン H で解析をすすめようとしてきたが、ライン H を一旦閉じて、ライン Fでの解析を行おうとしている。
- 加齢促進マウスとして英国ケンブリッジ大学より *Atg5i* マウスを導入した。

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)を論文報告し、さらにそ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を報告した。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。*Lss* および *Dusp1* についても解析を進め、糖尿病による認知症促進機構の解明につなげる。
- ◆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モデルを東京都健康長寿医療研究センターより導入できたので今後の認知症病態解明に役立つことが出来ると考えられる。
- ◆ 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 β アミロイド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・糖尿病などの修飾因子により変化するかを検討できると考えられ、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.*, Suzuki K., Bu G., Sato N.* Interaction between APOE genotype and diabetes in longevity. Journal of Alzheimer's disease, *in revision*.
2. Shinohara M.*, Hirokawa J., Shimodaira A., Tashiro Y., Suzuki K., Fukumori A., Matsubara T., Morishima M., Saito Y., Murayama S., Sato N.* Characterization of tau ELISAs for evaluating tau accumulation in the brains with Alzheimer's disease, Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, *in revision*.
3. Suzuki K., Shinohara M., Uno Y., Tashiro Y., Gheni G., Yamamoto M., Fukumori A., Shindo A., Mashimo T., Tomimoto H. & Sato N.*, Deletion of B-cell translocation gene 2 (BTG2) alters the responses of glial cells in white matter to chronic cerebral hypoperfusion., Journal of Neuroinflammation, *accepted*.
4. Shinohara M.#, Kikuchi M.#, Onishi-Takeya M., Tashiro Y., Suzuki K., Noda Y., Takeda S., Mukouzono M., Nagano S., Fukumori A., Morishita R., Nakaya A., Sato N. * Upregulated expression of a subset of genes in APP;ob/ob mice: Evidence of an interaction between diabetes-linked obesity and Alzheimer's disease. FASEB BioAdvances 3(5):323-333, 2021.
5. Sato N. The Emerging role of the apolipoproteins APOE and APOJ in the interaction between diabetes and Alzheimer's disease. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. Nov 1;105(11), 2020.
6. 里 直行, 「認知症予防・治療の未来戦略－2020－」, 日本老年医学会雑誌, 2020年 第57巻 第4号 374～396
7. 里 直行, 「 β アミロイド42の増加はグリア細胞の破綻を伴ってob/obマウスの短命化をもたらす」Diabetes Strategy 第10巻第3号(通巻第38号), 2020年8月10日発行
8. 里 直行, 「糖尿病と認知症の基礎研究の最近の進歩」, 糖尿病合併症 vol.34 no.1, 2020年6月20日発行

筆頭著者 *責任著者

2. 学会発表

1. 里 直行, 篠原 充, 菊池 正隆, 大西-竹屋 美幸, 田代 善崇, 鈴木 香, 野田 泰裕, 武田 朱公, 向園 昌弘, 長野 清一, 福森 亮雄, 森下 竜一, 中谷 明弘 第39回日本認知症学会学術集会 肥満・糖尿病合併 APP トランスジェニックマウス脳における遺伝子発現解析 2020年11月26日 名古屋市
2. 篠原 充, 田代 善崇, 鈴木 香, 福森 亮雄, 森島 真帆, 村山 繁雄, 里 直行 第39回日本認知症学会学術集会 タウ ELISA の剖検脳での検討 2020年11月26日 名古屋市
3. 篠原 充, 鈴木 香, Bu Guojun, 里 直行 第39回日本認知症学会学術集会 APOE 多型と糖尿病の認知機能や寿命への交互作用の検討 2020年11月26日 名古屋市
4. 鈴木 香, 篠原 充, 田代 善崇, 新堂 晃大, 福森 亮雄, 真下 知士, 富本 秀和, 里 直行 第39回日本認知症学会学術集会 Btg2 遺伝子欠損マウスにおける慢性脳低灌流の影響 2020年11月26日 名古屋市
5. 鈴木 香, 篠原 充, 真下 知士, 田代 善崇, 野田 泰裕, 福森 亮雄, 新堂 晃大, 富本 秀和, 里 直行 第43回日本神経科学大会 Investigation of glial cells by chronic cerebral hypoperfusion in B-cell translocation gene 2 (BTG2) knockout mice 2020年7月30日 神戸市

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