

長寿医療研究開発費 2021年度 総括研究報告

糖尿病や加齢、APOE 遺伝子多型等の危険因子にも着目したアルツハイマー病の病態研究
と治療標的の同定、次世代治療薬の開発（21-12）

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

前年度までの長寿医療研究開発費「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(19-9)」および「危険因子にも着目したアルツハイマー病の治療標的の同定と治療薬の開発（19-18）」、「国立長寿医療研究センター・東京都健康長寿医療センターの共同事業による、高齢者ブレインバンク・バイオリソースセンターの構築並びに老化・認知症の病態研究と治療開発（20-6）」を継続・発展させる形で研究を行う。

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

篠原 充 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部（副部長）

武倉アブトグブル 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部（研究員）

村山 繁雄 大阪大学 子どものこころの分子統御機構研究センター（特任教授）

齊藤 祐子 東京都健康長寿医療センター 神経病理学（部長）

福森 亮雄 大阪薬科大学 薬物治療学Ⅱ（教授）

A. 研究目的

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、糖尿病を合併させた新規アルツハイマー病モデルマウス（APP ノックインマウス）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、また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。一方でこのモデルマウスは家族性変異 APP をヘテロで発現していたため18か月齢でも老人斑蓄積は認められず(Shinohara, Sato et al. FASEB J

2020)、よりアルツハイマー病態との関係性を理解するには 老人斑が蓄積する状態での解析が必要と考えられた。そこで、家族性変異 APP をホモで発現する糖尿病合併アルツハイマー病モデルマウスを作製し、老人斑を蓄積させることで、よりアルツハイマー病に近づけた場合の表現型を解析する。アルツハイマー病理、認知機能変化の評価など様々な解析を行う予定であり、特にアストロサイトやマイクログリアの変化にも着目したいと考えている。また、糖尿病と合併する従来のアルツハイマー病モデルマウス (APP23 トランスジェニックマウス) において特異的に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も取り入れて病態解明を行う。

② 加齢による認知症促進機構の解明

我々は時間・空間的に β アミロイド発現が制御可能な ROSA-APP マウスを大阪大学宮崎先生らとの共同研究により開発した。そのマウスを用いて加齢依存的な $A\beta$ に対する生体防御反応の変化を検討する。また東京都総合医学研究所の長谷川先生らが開発したタウを脳に播種することによる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。そのために、長寿研のエイジングファームの加齢マウスに加え、加齢促進マウスとして英国ケンブリッジ大学成田先生らが開発した Atg5i マウスを使用する。

③ APOE 遺伝子多型の作用機序についての研究、治療薬開発

APOE 遺伝子多型はアルツハイマー病の大きな危険因子であるが、同時に寿命にも影響を与えることが知られている。最近、我々は、APOE 遺伝子多型がアルツハイマー病の病理を介さずとも、認知機能や寿命に影響を与えることを報告した (Shinohara et al. Ann Neurology 2016、& eLife 2020)。これまでは米国の臨床データベースの解析を行ってきたことに加えて、長寿研の縦断研究である NILS-LSA のデータを解析するとともに、動物モデルで詳細な作用機序を検討する。また APOE そのものを標的とした治療薬開発も目指す。

④ 危険因子間の相互作用の検討

アルツハイマー病の個々の危険因子に着目した研究は数多くなされてきているが、それらの相互作用に着目した研究は少なく危険因子間の関係性は十分に分かっていない。実際に我々は最近、糖尿病と APOE 遺伝子多型の認知機能や神経病理に対する関係性を米国の臨床データベースを用いて解析すると、糖尿病と APOE4 多型には交互作用があることを見出し報告した (Shinohara et al., Alzheimer's Dementia (Amst) 2020)。そこで本研究ではその作用を長寿研の NILS-LSA データベースから追試検討するとともに、東京都健康長寿医療センターのヒト剖検脳解析からも検討する。また動物モデルの利用についても、長寿研で決められた一研究部の動物飼育限度数、研究費など様々な制限はあるが、前向きに検討する。

⑤ A β やタウの蓄積機構についての作用機序の解明や、治療薬の開発

アルツハイマー病の中核病理である A β やタウの分子病態については世界中で研究が多数なされてきたが、脳内でなぜ蓄積するかについてまだ不明であり、また治療法開発も課題が多いのが現状である。A β の脳内領域分布に着目した剖検脳解析から、初期の全長型 A β の蓄積にはシナプスが関係し、後期の N 末端が断片化された A β の蓄積には他因子が関係している仮説を我々は提唱した (Shinohara et al., Brain 2017)。そこで解析手法を更に発展させ、タウの蓄積に関与する因子を同定する。これまでに脳内のタウ蓄積を正確に評価する ELISA を開発しており、さらなる利用を行う。同定した因子については、細胞や動物モデルを導入し検証を進める。A β を標的とした治療薬の開発も、新たな視点から並行してすすめる。

⑥ 高齢者ブレインバンク・バイオリソースセンターの構築並びに老化・認知症の病態研究と治療開発

長寿研と東京都健康長寿医療センターの共同事業により、高齢者ブレインバンク・バイオリソースセンターの構築並びに老化・認知症の病態研究に引き続き寄与する。

B. 研究方法

① 糖尿病による認知症促進の因子の解明 (里：統括、篠原、武倉：実施)

我々が最近報告した家族性変異 APP ノックインマウスをベースにした糖尿病合併アルツハイマー病モデルマウスは、APP がヘテロで発現していたため 18 か月齢でも老人斑蓄積は認められなかった。そこで、新たに、家族性変異 APP をホモで発現する糖尿病合併アルツハイマー病モデルマウスを作製し、老人斑が蓄積する、よりアルツハイマー病に近づけた場合の表現型を解析する。AD 病理、認知機能変化の評価など様々な解析を行う予定であるが、先述の理由から特にアストロサイトやマイクログリアの変化に着目したいと考えている。また、別の糖尿病合併アルツハイマー病モデルで脳内で発現が増加した遺伝子群 (Shinohara, Sato et al., 投稿中) の中で特に 4 つの遺伝子 (Btg2, Cyr61, LSS, Dusp1) に着目し、そのノックアウトマウスを作製しており、それら遺伝子のアルツハイマー病、認知症における役割を解析するための研究を進める。

② 加齢による認知症促進機構の解明 (里：統括、篠原、武倉：実施)

ROSA-APP マウスを用いて、時間・空間的 β アミロイド発現の制御がマウスの系で機能することを確認しつつある。東京都総合医学研究所の長谷川先生らが開発したタウを脳に播種することによる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 マウスおよび Atg5i) を導入し、検討する。またアルツハイマー病剖検脳を用いて細胞老化の役割も評価する。

- ③ APOE 遺伝子多型の作用機序についての研究、治療薬開発（篠原：統括&実施、齊藤、村山：検体提供）

APOE 遺伝子多型はアルツハイマー病の大きな危険因子であるが、同時に寿命にも影響を与えることが知られている。最近、我々は、APOE 遺伝子多型がアルツハイマー病の病理を介さずとも、認知機能や寿命に影響を与えることを報告した（Shinohara et al. *Ann Neurology* 2016、& *eLife* 2020）。これまでは米国の臨床データベースの解析を行ってきたことに加えて、長寿研の縦断研究である NILS-LSA のデータを解析するとともに、動物モデルで詳細な作用機序を検討する。また APOE そのものを標的とした治療薬開発も目指す。

- ④ 危険因子間の相互作用の検討（里：統括、篠原：実施、齊藤、村山：検体、データ提供）

米国臨床データベースを用いた我々自身の解析から糖尿病と APOE 遺伝子多型の間には交互作用があり、APOE4 非保因者でのみ糖尿病の認知機能の憎悪効果があり、それが糖尿病による血管病変の憎悪作用と関係する可能性を見出し報告した

（Shinohara et al., *Alzheimer's Dementia (Amst)* 2020）。そこで本研究ではそのような交互作用をさらに検証する。米国臨床データベースについて寿命など別の尺度を検討するとともに、長寿研の NILS-LSA データベースを用いた追試、東京都健康長寿医療センターのヒト剖検脳解析からも検討する。また動物モデルの利用についても、研究所で決められた一研究部の動物飼育限度数、研究費など様々な制限はあるが、前向きに検討する。

- ⑤ A β やタウの蓄積機序の剖検脳解析を基にした検討、および A β 治療薬の開発（篠原：統括&実施）

A β の脳内領域分布に着目した剖検脳解析から、初期の全長型 A β の蓄積にシナプスに関係し、後期の N 末端が断片化された A β の蓄積に他因子が関係していると提唱した。そこで解析の手法を更に発展させてタウの蓄積に関与する因子を同定する。これまでに脳内のタウ蓄積を正確に評価する ELISA を開発しており、さらなる利用を行う。同定した因子については、細胞や動物モデルを導入し検証を進める。A β を標的とした治療薬開発も、新たな視点から並行してすすめる。

- ⑥ 高齢者ブレインバンク・バイオリソースセンターの構築並びに老化・認知症の病態研究と治療開発（村山&齊藤：統括&実施）

長寿研と東京都健康長寿医療センターの共同事業により、高齢者ブレインバンク・バイオリソースセンターの構築並びに老化・認知症の病態研究に引き続き寄与する。

（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、臨床試験およびヒト血液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それぞれの研究についての申請を行う。

C. 研究結果

①糖尿病による認知症促進の因子の解明（里：統括、篠原、武倉：実施）

- ・肥満糖尿病合併アルツハイマー病モデルの回収をすすめた（18 か月齢、6 群、合計約 120 匹）。
- ・Btg2 ノックアウトマウスと APP 過剰発現マウスを交配し、6 か月齢で回収、解析した。行動実験では特に有意差はなかった。脳内の $A\beta$ 40 が Btg2 ノックアウトマウスで増加する傾向はあったが、有意差はなかった。今回の検討では「マウスの絶対数が少ない」く、「APP 過剰発現マウスのため、想定よりも死亡マウスが多い」、「脳内に十分蓄積する前の早期の解析であった」という複合的な理由で Btg2 ノックアウトの影響が十分に検討できなかった可能性がある。そこで今後は、解析数を多くするとともに、より早期で解析できかつ死亡マウスの少ない 5XFAD に切り替えて、交配し解析を進める予定である。
- ・Cyr61,LSS コンディショナルノックアウトマウスと家族性変異 APP ノックインマウスとの交配をすすめた。
- ・Dusp1 ノックアウトマウスと 5XFAD マウスとの交配をすすめた。

② 加齢による認知症促進機構の解明（里：統括、篠原、武倉：実施）

- ・凝集タウを播種することによる神経原線維変化進展モデルを導入し、若年マウスと老齢マウスの比較を進めている。まだパイロットスタディの段階であるが興味深い結果を得つつある。
- ・ROSA-APP マウスと CamkII-Cre の交配をすすめ、若齢時と高齢時における APP 発現によって、脳内 $A\beta$ 病理や、炎症などの病理への応答性の違いを検討している。予備検討から CamkII-Cre では APP の発現が弱く $A\beta$ が蓄積しにくい可能性が考えられたため、強く APP 発現を引き起こす CAG-Cre との交配も別途すすめている。

- ・英国ケンブリッジ大学成田先生との共同研究のもと Atg5i を導入し、5XFAD マウスとの交配をすすめている。
- ③ APOE 遺伝子多型の作用機序についての研究、治療薬開発（篠原：統括&実施、齊藤、村山：検体提供）
- ・ APOE ノックインマウスを加齢させることでホームケージモニタリングでの測定による活動量にどのような変化がでるか解析を進めている。
 - ・ APOE と受容体との結合阻害作用を有する薬物の開発を進めている。薬物スクリーニングから得られた化合物の検証作業を進めるとともに、パイロットスタディではあるが、動物に投与すると血液中での APOE と受容体の結合が阻害されていることを示唆するデータが得られた。
- ④ 危険因子間の相互作用の検討（里：統括、篠原、齊藤、村山：検体、データ提供）
- ・ NILS-LSA の長期縦断疫学データから糖尿病と APOE 多型の関係性を評価した。糖尿病の認知機能変化に対する影響が APOE 多型によって異なるデータが一部得られたが、それが認知機能全般に言えるのか、また年齢依存性があるのかなどを今後も検証していく。
 - ・ 米国 NACC データベースを解析し、APOE 多型と肥満の認知機能に対する影響について興味深い知見を得た。論文投稿の準備をしている。
- ⑤ A β やタウの蓄積機序の剖検脳解析を基にした検討、および A β 治療薬の開発（篠原：統括&実施）
- ・ マイクロアレイ解析から A β やタウの蓄積の領域分布と相関する遺伝子、経路について、ELISA や real-time PCR による検証作業を進めた。また動物モデルの解析に先行して、細胞モデルでの解析も進めた。
 - ・ 家族性変異 PSEN1 にも有効な A β 産生阻害剤の検証作業を進めたところ、期待していた A β 38 の増加をもたらす化合物はないことが判明した。スクリーニングの再検討を考えている。
- ⑥ 高齢者ブレインバンク・バイオリソースセンターの構築並びに老化・認知症の病態研究と治療開発（村山&齊藤：統括&実施）
- ・ 今年度もコロナ渦のために剖検例は少ないが、生前ドナー登録者の剖検があり、17 例の半脳凍結を収集した。アルツハイマー病をはじめとする変性型の認知症例や、非精神・神経疾患例がほとんどである。ドナー登録者は 19 例増え合計 221 例となった。

D. 考察と結論

※「D. 考察」、「E. 結論」としても差し支えないこと。

本研究は、前年度までの長寿医療研究開発費「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(19-9)」および「危険因子にも着目したアルツハイマー病の治療標的の同定と治療薬の開発(19-18)」を引き継ぐ形でスタートした3年計画の1年目の研究である。

肥満・糖尿病合併ADマウスで初めて発現増加する遺伝子群の機能解析が進んでいる。さらに同マウスの単一細胞解析も着手し、数例の検討を既に終えており、ヒト剖検脳への応用が期待される。またAPOEに着目した治療法の開発や真のADモデル動物の作成の試みも一步一步、進んでいる。当研究部の強みであるマウスとヒト・サンプルの両者の長所を生かして研究を進めることで効率的な目標達成が期待できる。さらにコホート研究データ・ベースを用いた遺伝因子と後天的危険因子の交互作用の報告なども進んでいる。今後は当センターの特色である研究所と病院の連携を生かした独自性のあるコホートの立案も重要であると考えている。

一部には進捗に僅かながらの遅延が発生している項目はあるものの、全体的として順調に進んでいる。今後の研究成果が最終的な臨床へと還元され、アルツハイマー病の病態研究と治療標的の同定、次世代治療薬の開発を達成する成果をあげていきたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shinohara M.*, Suzuki K., Bu G., Sato N.* Interaction between APOE genotype and diabetes in longevity. *Journal of Alzheimer's Disease*, 82(2):719-726 2021.
2. Shinohara M.*, Hirokawa J., Shimodaira A., Tashiro Y., Suzuki K., Gheni G., Fukumori A., Matsubara T., Morishima M., Saito Y., Murayama S., Sato N. ELISA Evaluation of Tau Accumulation in the Brains of Patients with Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 20 July 2021.
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*;18(1) Article number:86. 2021.
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.

2. 学会発表

1. 里 直行 「タンパク質蓄積病態に影響するファクターとは」第40回日本認知症学会学術集会 ディベートセッション2 座長・演者、2021年11月28日 東京都（現地開催+LIVE 配信）
2. 鈴木 香, 篠原 充, 舩野 善弘, 田代 善崇, 武倉 アブドグプル, 山本 美帆, 福森 亮雄, 新堂 晃大, 真下 知士, 富本 秀和, 里 直行 「B-cell translocation gene 2 (BTG2)欠損による慢性脳低灌流および in vitro でのグリア細胞動態変化」第44回日本神経科学大会 ポスター「4P」脳血管障害と虚血、2021年7月31日 神戸市(オンライン)
3. 里 直行 「糖尿病による認知機能障害の機序_臨床データベースとモデル動物の解析から」第63回日本老年医学会学術集会 シンポジウム4 糖尿病と認知機能障害、2021年6月11日 名古屋市（WEB 開催）
4. 篠原 充, 鈴木 香, Bu Guojun, 里 直行 「APOE 多型と糖尿病の寿命への交互作用の検討」第63回日本老年医学会学術集会 一般演題 A-8:老化マーカー、2021年6月11日-13日 名古屋市（WEB 開催）

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