

アルツハイマー型認知症の神経変性メカニズム解明とバイオマーカー・治療標的探索  
(24-20)

主任研究者 飯島 浩一 国立長寿医療研究センター 神経遺伝学研究部 (部長)

研究要旨

人口の高齢化に伴い、認知症の最大の原因であるアルツハイマー病患者数が急速に増加し、大きな社会問題となっている。近年、高感度・高精度のバイオマーカーの開発が進み、アルツハイマー病の発症前診断が可能になりつつある。また、抗アミロイドβ (Aβ) 抗体薬も承認され、アルツハイマー病の治療に新たな選択肢が加わった。しかし現在のところ、新薬の適応範囲並びに治療効果は限定的であり、さらなる治療法の開発が望まれている。

アルツハイマー病の脳では、大脳皮質にAβ病理が蓄積し、慢性的な神経炎症、脳血管障害、神経突起の変性が生じている。一方、神経細胞の脱落は、大脳皮質でのAβ病理の重篤化に伴い、脳幹の青斑核や縫線核、大脳皮質下のマイネルト基底核、海馬などから始まることが知られている。青斑核と縫線核は、それぞれノルアドレナリン神経とセロトニン神経の細胞体が集まる神経核であり、広く脳全体に軸索を投射して、情動や睡眠、認知機能などを制御する。一方、マイネルト基底核は、アセチルコリン神経の神経核であり、大脳皮質に軸索を投射して認知機能の制御に関わる。これらの神経核の脱落は、アルツハイマー病で見られる周辺症状や認知機能低下に関わると考えられ、症状改善薬の標的になっている。また、これらの神経核には老化に伴いタウが蓄積することが知られ、その変性脱落は、脳の広範な領域へのタウ病理の拡大に寄与している可能性がある。従って、大脳皮質でのAβ病理の増悪化が、脳幹や皮質下の神経核の変性を引き起こすメカニズムを明らかにし、治療標的を同定することは、アルツハイマー病の進行を初期の段階で抑止する治療法の開発につながる可能性がある。しかし、その変性機序は明らかではない。

そこで本研究では、アルツハイマー病の前駆期から初期に進行していると考えられるが、大脳皮質や海馬に比べて知見が少なく不明な点も多く残されている、脳深部の神経核から大脳皮質へ投射するノルアドレナリン、セロトニン、アセチルコリン神経軸索の変性メカニズムを解明し、神経軸索を保護しその再生を促す治療標的の同定を目指す。

主任研究者

飯島 浩一 国立長寿医療研究センター 神経遺伝学研究部 (部長)

分担研究者

関谷 倫子 国立長寿医療研究センター 神経遺伝学研究部 (副部長)

## A. 研究目的

人口の高齢化に伴い、認知症の最大の原因であるアルツハイマー病患者数が急速に増加し、大きな社会問題となっている。近年、高感度・高精度のバイオマーカーの開発が進み、アルツハイマー病の発症前診断が可能になりつつある。また、抗アミロイドβ (Aβ) 抗体薬も承認され、アルツハイマー病の治療に新たな選択肢が加わった。しかし現在のところ、新薬の適応範囲並びに治療効果は限定的であり、さらなる治療法の開発が望まれている。

アルツハイマー病の脳では、その原因と考えられる Aβ 病理は大脳皮質に蓄積し、慢性的な神経炎症や脳血管障害、神経突起の変性が生じている。一方、神経細胞の脱落は、皮質下のマイネルト基底核や海馬、さらに脳幹の青斑核や縫線核など、脳の深部から始まり、中でも青斑核が最初に脱落することが知られている。青斑核と縫線核は、それぞれノルアドレナリン神経とセロトニン神経の細胞体が集まる神経核であり、広く脳全体に軸索を投射して、情動や睡眠、認知機能などを制御する。一方、マイネルト基底核は、アセチルコリン神経の神経核であり、大脳皮質に軸索を投射して認知機能の制御に関わる。

これらの神経核の脱落は、アルツハイマー病で見られる周辺症状や認知機能低下に関わると考えられ、古くから症状改善薬の標的になってきた。また、これらの神経核には老化に伴いタウが蓄積するため、その変性脱落は、脳の広範な領域へのタウ病理の拡大に寄与している可能性がある。従って、大脳皮質での Aβ 病理の蓄積が、皮質下の神経系から投射する神経軸索を傷害するメカニズムを明らかにし、その変性を防ぐ治療標的を同定できれば、アルツハイマー病の進行を初期の段階で抑止する治療法の開発につながる可能性がある。しかし、その変性機序は明らかではない。

そこで本研究では、青斑核、縫線核、マイネルト基底核から大脳皮質へ投射するノルアドレナリン、セロトニン、アセチルコリン神経系の変性メカニズムを解明し、神経軸索を保護しその再生を促す治療標的を同定する（**研究計画 1**）。またこれまでに、Aβ 病理の蓄積に伴い亢進する神経炎症、特に反応性アストロサイトの活性化が、神経軸索の変性に関わる可能性を見出している。そこで、アストロサイトの活性を正常化することで、神経軸索の変性を抑制できるかを調べる（**研究計画 2**）。さらに、アルツハイマー型認知症患者の多くに併存する、αシヌクレイノパチーや TDP-43 病理を皮質下に蓄積する新規モデル動物を作製し、これらの併存病理に基づいて認知症患者を層別化するためのバイオマーカー探索や、併存病理存在下での疾患メカニズムの解明と治療標的を同定する（**研究計画 3**）。

## B. 研究方法

**【研究計画 1】アルツハイマー病初期の周辺症状の表出に関わる神経変性の機序解明と抑止法開発**

1-1) 青斑核ノルアドレナリン神経系の軸索の変性を抑止する治療標的の探索

A $\beta$  病理モデルマウスの青斑核神経特異的な遺伝子発現解析等から、分泌因子 A や、B 受容体を介した神経伝達の賦活化が、軸索の維持に関わる可能性を見出した。そこで、アデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子導入によるアストロサイトからの分泌因子 A の分泌促進、B 受容体作動薬の経鼻投与により、神経軸索変性を抑制できるかを調べる。またヒト剖検脳を用い、治療標的としての妥当性を検証する。現在進めているヒト青斑核神経細胞でのシングル核 RNA シーケンス解析から同定する治療標的候補についても検証を進める。さらに、ショウジョウバエモデルも利用して神経保護作用を持つ遺伝子を探索する。

### 1-2) アルツハイマー病初期の縫線核セロトニン神経とマイネルト基底核アセチルコリン神経の軸索変性の機序解明と治療標的の探索

A $\beta$  病理モデルマウスの大脳皮質では、セロトニン神経系やアセチルコリン神経系の軸索も変性・退縮している。これらの神経軸索を保護する治療薬の開発には、各神経系の軸索変性機序の共通点や相違点を明らかにし、最大の効果を見込める治療標的を同定する必要がある。そこで、A $\beta$  病理モデルマウスの神経核に特異的な遺伝子発現解析と、モデルマウス、ヒト剖検脳を用いた免疫組織解析を行い、神経軸索変性の機序を明らかにする。ヒト剖検脳切片は東京都健康長寿医療センター（齊藤祐子 部長）より提供を受ける。

### 【研究計画 2】反応性アストロサイト活性化の機序解明とその抑制による神経保護効果の解析

#### 2-1) 反応性アストロサイトの活性化抑制による神経軸索保護効果の解析

AD 脳ではアストロサイトが活性化し、脳内の恒常性が乱れて神経変性が生じている可能性があり、その正常化は重要な治療標的と考えられる。計画 2 では、A $\beta$  病理モデルマウス脳において、アストロサイト活性化に関わる C 経路の内因性阻害分子である D をアストロサイト特異的に発現させる、あるいは、アストロサイト活性化への関与を新たに見出した CD38 のノックアウトマウスを用い、アストロサイト活性化抑制による軸索変性と脳病理への影響を調べる。

### 【研究計画 3】アルツハイマー型認知症の併存病理に関する研究

#### 3-1) TDP-43 病理が引き起こす神経変性への修飾因子 E 遺伝子の解析

TDP-43 病理はアルツハイマー型認知症の 30~60% に併存し、記憶障害や海馬萎縮と相関することから、重要な治療標的と考えられる。これまでに、加齢性海馬硬化症のリスク遺伝子である E の発現低下が、TDP-43 病理や神経変性を抑制することを、ショウジョウバエモデルを用いて見出した。本計画では、TDP-43 病理モデルマウスを用い、E の発現低下による TDP-43 病理形成への抑制効果と、その機序を解明する。

#### 3-2) 脳領域特異的に $\alpha$ -シヌクレインを蓄積する新規モデルマウスの開発

レビー小体病理 ( $\alpha$ -シヌクレイン凝集体) は、アルツハイマー型認知症にも併存する。パーキンソン病 (PD) では、レビー小体病理は末梢自律神経系から脳幹を上行し中脳や大

脳に拡大すると考えられ、一方アルツハイマー病では、扁桃体から海馬を中心に認められる。従って、領域特異的なレビー小体病理の形成機序や、疾患特異的なバイオマーカー探索には、新たなモデルマウスが必要である。本計画では、末梢神経や脳領域特異的に $\alpha$ -シヌクレインを蓄積するモデルマウスを作製し、さらに大脳皮質の $A\beta$ 病理や青斑核や海馬でのタウ病理も併存する新規モデルマウスを作製する。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え生物等の使用については「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」に従い、マウスを用いた実験は「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に従って実施した。また、ヒト剖検脳を用いた実験は、「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」、その他の関連法令に従い、国立研究開発法人国立長寿医療研究センターおよび関係機関の倫理委員会にて審査、承認の下に実施した。

## C. 研究結果

### 【研究計画 1】アルツハイマー病初期の周辺症状の表出に関わる神経変性の機序解明と抑止法開発

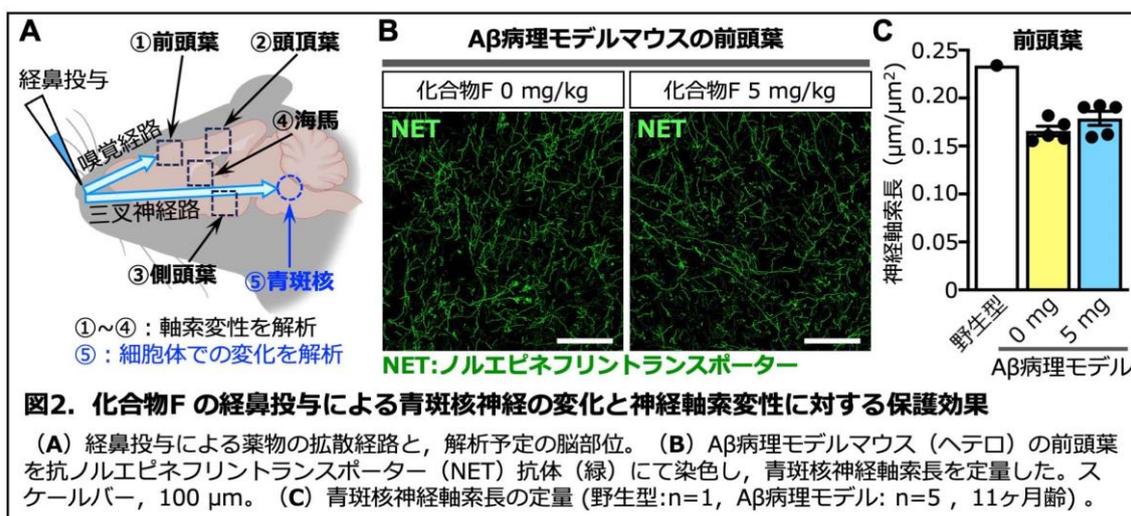
$A\beta$ 斑の蓄積からアルツハイマー病 (AD) 発症に至るまでの数十年間に渡る「AD プレクリニカル期」に、どのように神経変性が進行していくのかは不明であり、そのメカニズムの解明は、新たなバイオマーカーや予防法、先制治療法を開発する上で必要である。これまでに、AD プレクリニカル期から見られる $A\beta$ 病理を呈する $A\beta$ 病理モデルマウスの解析から、 $A\beta$ 斑の近傍では、血液バイオマーカーリン酸化タウ (p-tau217) 陽性の興奮性シナプスの変性と、髄液バイオマーカーリン酸化タウ (p-tau181) 陽性の抑制性神経の軸索変性が出現することを報告した (Hirota et. al., *Brain Commun*, 2022, Hirota et. al., *JAD*, 2023)。さらに、 $A\beta$ 斑に対する神経炎症 (グリア細胞の活性化) の亢進に伴い、大脳皮質の広範な領域で、皮質下や脳幹から投射するノルアドレナリン、アセチルコリン、セロトニン神経系の神経軸索が変性・退縮していることを見出し報告してきた (Sakakibara et. al., *JAD*, 2021, Hirota et. al., *JAD*, 2023, 他)。

また、本研究と並行して進めているAMED 認知症研究開発事業の研究から、AD プレクリニカル期の脳においても同様の変化が観察されることを見出した (ヒト剖検脳切片は東京都健康長寿医療センターの齊藤祐子 部長より提供)。 $A\beta$ 病理がない健常高齢脳、 $A\beta$ 病理を呈するがタウ病理が少ないプレクリニカル AD 脳、 $A\beta$ 病理とタウ病理が顕著な AD 脳を含む AD 連続体 (AD Continuum) の剖検脳を用いた免疫組織解析から、プレクリニカル AD の大脳皮質においても、 $A\beta$ 斑の近傍に、血液バイオマーカー関連 p-tau217 のシグ



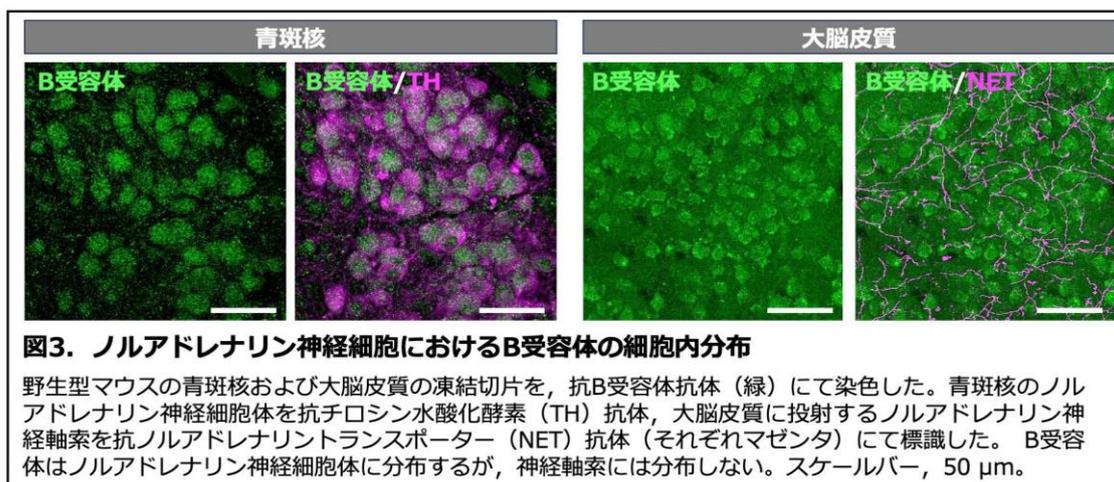
ミトコンドリアの輸送低下, 3) ミトコンドリア分解機構の上昇, 4) シャペロン誘導などストレス応答の低下, 等の変化が生じている可能性を見出した (Sakakibara, Hirota et al., 論文準備中)。さらに, これらの変化の上流で働き, かつ既存薬が存在する治療標的を探索し, 神経保護作用が知られる B 受容体を介したシグナル伝達や, 神経細胞の生存や軸索の維持に関わる神経栄養因子を見出した。そこで, これらの経路の賦活化により, ノルアドレナリン神経軸索の変性や, 神経細胞内で生じている変化を抑止できるかを検討した。

B 受容体に対する作動薬 (化合物 F) は, パーキンソン病の治療薬として知られるが, 最近, 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対する治療効果も報告され, 様々な神経変性疾患に対する神経保護作用が期待されている。そこで, 青斑核神経の軸索変性が始まる 6 ヶ月齢の Aβ 病理モデルマウスに対し, 化合物 F を経鼻投与し, 神経保護作用を調べた。先行研究を参考に, 薬剤の投与濃度は 0, 1, 5 mg/kg に設定した。経鼻投与された薬剤は, 嗅覚経路, また三叉神経を介して脳に送達され, 嗅覚経路からは前頭葉へ, 三叉神経からは青斑核のある脳幹領域へ薬剤が送達されることが報告されている (図 2A)。週 5 日間, 2 ヶ月間の継続投与後に脳組織を採取し, まず, 大脳皮質 (前頭葉, 頭頂葉, 側頭葉) や海馬における神経軸索変性に対する保護効果を調べた (図 2B)。これまでに, 前頭葉における青斑核神経軸索の長さを定量解析し, 最大濃度の 5 mg/kg 化合物 F 投与群において, 対照群に比べて神経軸索の長さが微増したが, 統計的な有意差には至らなかった (図 2C)。他の脳領域でも神経軸索長の定量解析を進めたが, 神経軸索の長さに変化は見られなかった。また, 化合物 F 投与による, Aβ 蓄積や神経炎症への影響も見られなかった。



以上の結果を受けて, 化合物 F 投与の効果を捉えるためには, 青斑核ノルアドレナリン神経細胞における B 受容体の分布様式を把握する必要があると改めて考えた。そこで, マウス脳組織とヒト剖検脳を用いて, B 受容体特異的抗体による免疫組織染色を行った。その結果, ノルアドレナリン神経細胞における B 受容体は, 青斑核の神経細胞体で高発現しているが, 大脳皮質や海馬に投射した神経軸索にはほとんど分布していないことを見出した

(図3)。経鼻投与された薬剤の一部は、三叉神経を介して青斑核のある脳幹領域へ直接送達されると考えられるため、化合物 F の作用点と考えられる青斑核領域の神経細胞体への保護作用（コレステロール合成の亢進，神経軸索輸送の低下，ミトコンドリア分解機構の向上，ストレス応答の低下に対する抑制効果）について解析を進めている。



また， $A\beta$  病理モデルマウス脳とヒト剖検脳の解析から， $A\beta$  病理に対する神経炎症，特に反応性アストロサイトの活性化に伴い，青斑核から大脳皮質へのノルアドレナリン神経の投射軸索が変性・退縮することを見出した。分泌因子 A は，強力な神経保護作用を有するアストロサイト由来の分泌因子であり，核移行型や分泌型など，長さの異なる複数のアイソフォームが存在する。野生型マウスの脳内では，分泌因子 A はアストロサイトの細胞核や細胞質，さらに分泌されて細胞外に分布する。一方， $A\beta$  病理モデルマウスの脳内では，反応性アストロサイトの活性化に伴い， $A\beta$  斑の周囲に分泌因子 A のシグナルが集積する様子が観察された（図4A）。さらに，ヒト剖検脳を用いた解析からも，健常高齢検体では，分泌因子 A はアストロサイトの細胞核や細胞質，細胞外に分布するのに対し，AD 検体では， $A\beta$  斑の周囲また  $A\beta$  斑上に分泌因子 A が集積する様子が観察された（図4B）。さらに，分泌因子 A の受容体である G 受容体が，マウス，ヒトのノルアドレナリン神経軸索で発現していることも確認した。以上から， $A\beta$  病理に対する反応性アストロサイトの活性化により，大脳皮質で分泌因子 A などの神経栄養因子の分布や分泌が乱れたことが，青斑核神経などの軸索変性に寄与している可能性が考えられた。

そこで，分泌因子 A の発現増進による保護作用を調べるために，3 ヶ月齢の  $A\beta$  病理モデルマウスに，ヒト分泌因子 A をアストロサイトで特異的に発現するアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを投与した。対照群には蛍光タンパク質（mCherry）を発現する AAV ベクターを投与した。AAV の血清型は，脳へ送達されやすい血液脳関門透過型を選定した。眼窩静脈叢への投与から 3 または 9 ヶ月後に脳組織を採取し，病理学的解析を開始した。眼窩静脈投与による AAV の送達は，前頭葉のアストロサイトに高い感染率を示すことを見出した。そこで，前頭葉におけるヒト分泌因子 A の発現確認（図5A），神経軸索変性の抑

止効果 (図 5 B-C), ならびに A $\beta$  病理形成や神経炎症への影響の解析を進めた。これまでに, 分泌因子 A 発現 AAV の投与から 3 ヶ月後と 9 ヶ月後の群について解析を行い, 分泌因子 A 投与後 9 ヶ月後の群において, 統計的に有意に神経軸索変性が抑制される傾向を見出ししており, 例数を増やし再現性を確認している (図 5 B-C)。一方, 分泌因子 A の発現下においても A $\beta$  病理の蓄積や神経炎症の抑制は見られなかった。また, 分泌因子 A の受容体は多くの神経細胞でも発現していることから, 他の神経系への保護効果についても合わせて明らかにする。

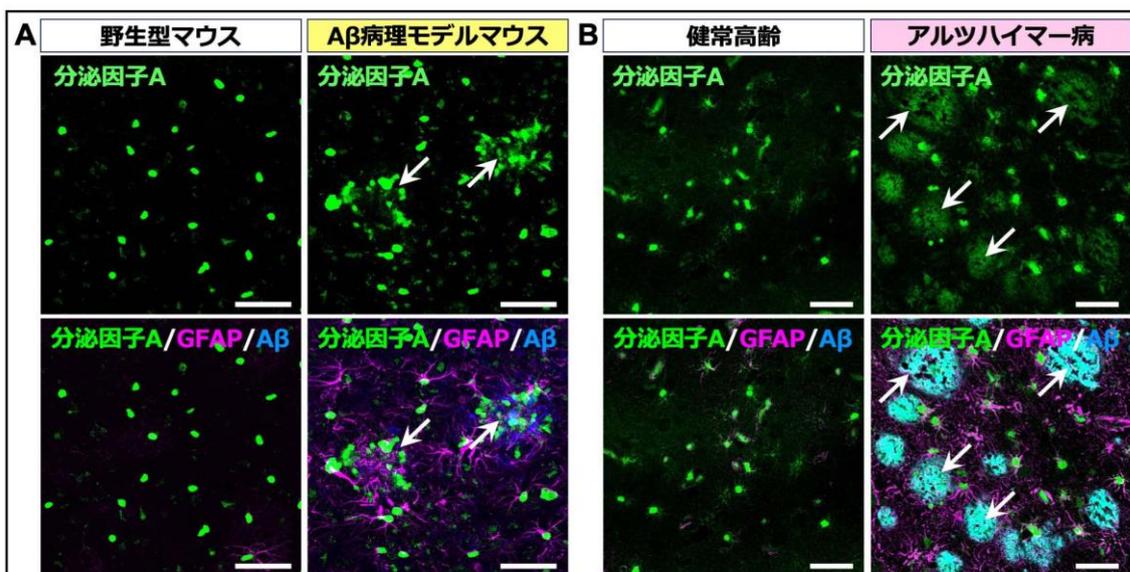


図4. A $\beta$ 病理モデルマウスおよびヒト剖検脳におけるA $\beta$ 病理と分泌因子A の局在変化

(A-B) 24ヶ月齢のマウス的大脑皮質 (A) ならびにヒト剖検脳的大脑皮質 (B) を抗分泌因子A抗体 (緑), アストロサイトマーカー: 抗GFAP抗体 (マゼンタ) にて染色した。青はA $\beta$ 斑を示す。スケールバー, 50  $\mu$ m。

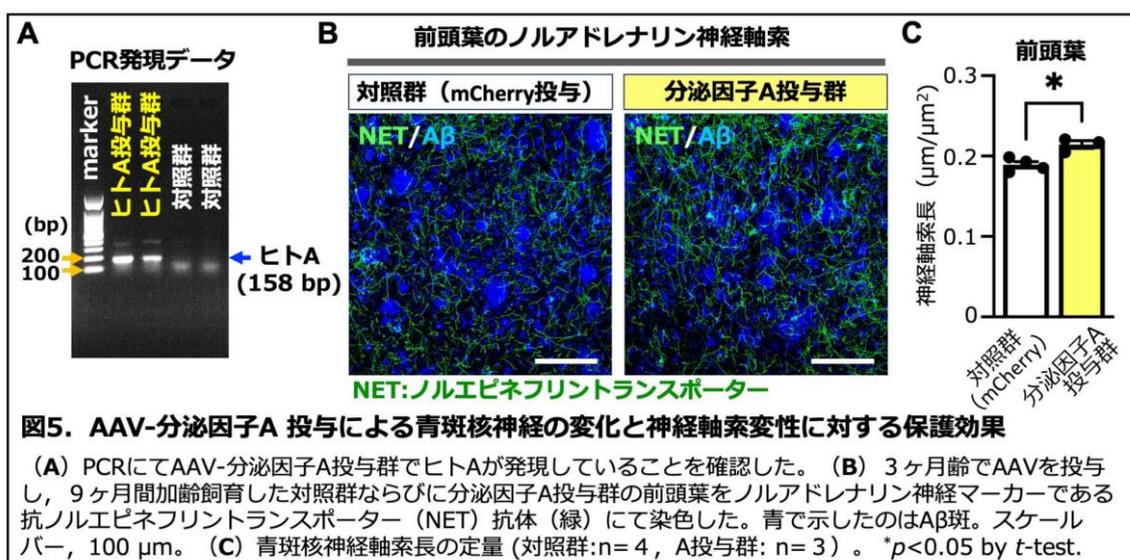


図5. AAV-分泌因子A 投与による青斑核神経の変化と神経軸索変性に対する保護効果

(A) PCRにてAAV-分泌因子A投与群でヒトAが発現していることを確認した。(B) 3ヶ月齢でAAVを投与し, 9ヶ月間加齢飼育した対照群ならびに分泌因子A投与群の前頭葉をノルアドレナリン神経マーカーである抗ノルエピネフリントランスポーター (NET) 抗体 (緑) にて染色した。青で示したのはA $\beta$ 斑。スケールバー, 100  $\mu$ m。(C) 青斑核神経軸索長の定量 (対照群: n = 4, A投与群: n = 3)。\* $p$  < 0.05 by  $t$ -test.

## 1-2) アルツハイマー病初期の縫線核セロトニン神経とマイネルト基底核アセチルコリン神経の軸索変性の機序解明と治療標的の探索

A $\beta$ 病理モデルマウスの大脳皮質では、アセチルコリン神経系やセロトニン神経系の軸索も変性・退縮している。これらの神経軸索を保護する治療薬の開発には、各神経系の軸索変性機序の共通点や相違点を明らかにし、最大の効果を見込める治療標的を同定する必要がある。そこで本研究では、A $\beta$ 病理モデルマウスの神経核に特異的な遺伝子発現解析と、ヒト剖検脳を用いた免疫組織解析による検証を進めた。ヒト剖検脳切片は東京都健康長寿医療センター、国立精神・神経医療研究センターより提供を受けた。

アセチルコリン神経系の投射様式は、ヒトとマウスでよく保存されている（図6A）。A $\beta$ 病理モデルマウスで観察されるアセチルコリン神経軸索の変性メカニズムを明らかにするために、アセチルコリン神経核の一つであるマイネルト基底核に着目し、シングルセル解析を行うことにした。これまでに、マウス脳アトラスを参照し、マイネルト基底核を含む脳領域を摘出する方法を確立した。マイネルト基底核は無名質の中に位置しており（図6B上）、明確な領域の判別が難しいことから、マイネルト基底核を含んだ脳領域として摘出することにした。ブレインマトリックスを用いて2mm厚の脳スライスを作製し、左右のマイネルト基底核領域を生検トレビン（直径2mm）にて切り出し（図6B下）、解析に必要な組織量を確保するため、2個体分の組織を1サンプルとし、12ヶ月齢のA $\beta$ 病理モデルマウス2サンプルと対照群マウス2サンプルについて、シングルセルRNAシーケンス解析を実施した。上記4サンプルで合計約5万細胞のシーケンスが得られた。これらデータの品質解析後にクラスタリング解析を行い、アセチルコリン神経細胞マーカー遺伝子（Chat, Ache, Scl18a3）の発現からアセチルコリン神経細胞クラスタを同定した（図6C, 赤線の部分）。約400細胞からなるアセチルコリン神経細胞クラスタでの発現変動遺伝子を解析したところ、A $\beta$ 病理モデルマウス発現増加する遺伝子は85個、発現が低下する遺伝子は77個検出され（ $p < 0.05$ ,  $pct > 0.1$ のカットオフ）、発現が低下する遺伝子は”シナプス構成制御”

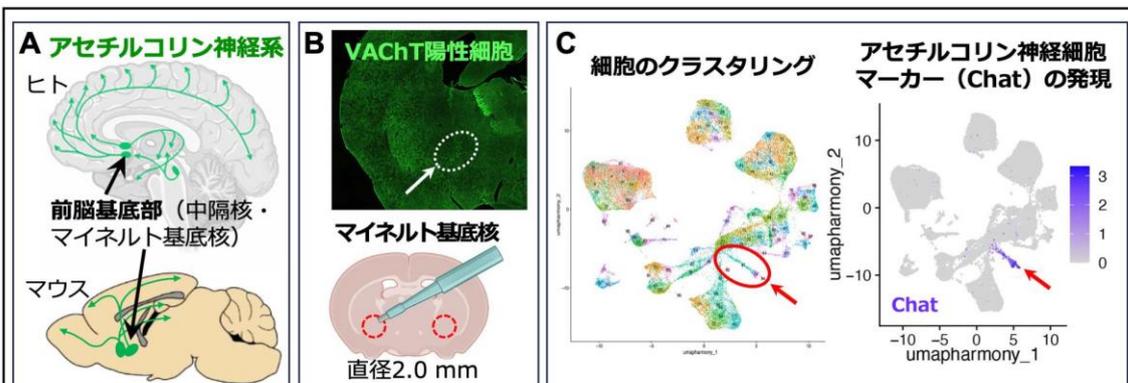


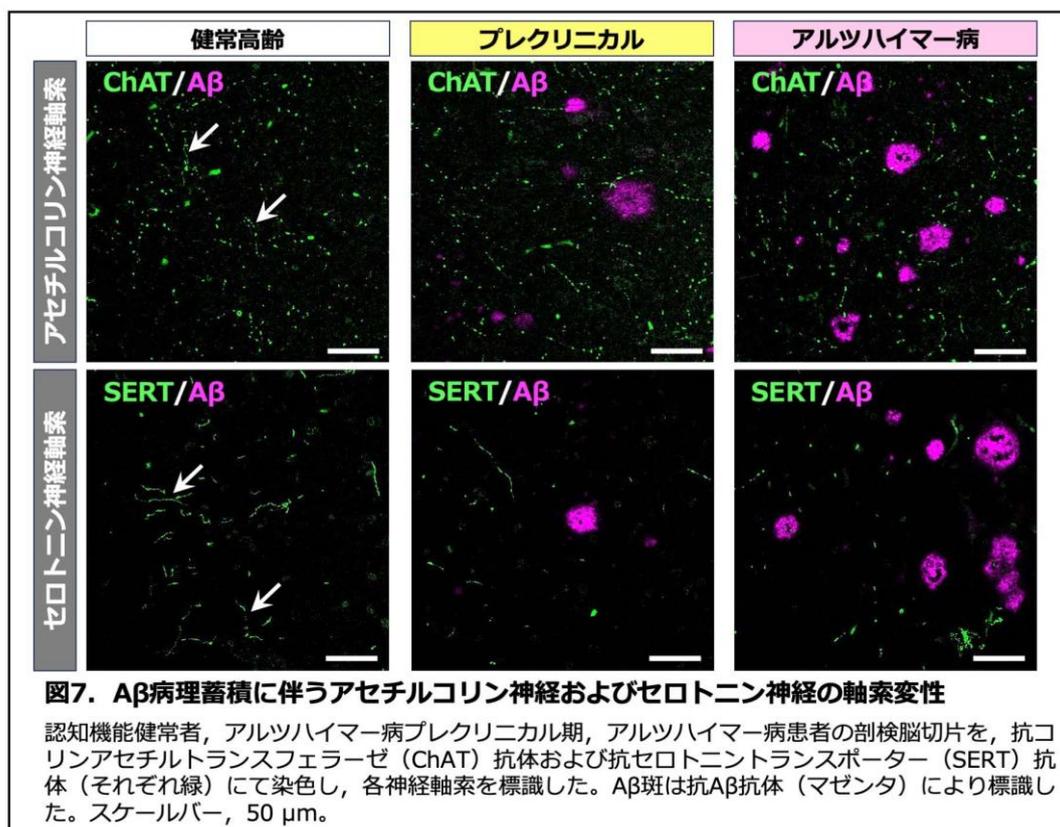
図6. A $\beta$ 病理モデルマウスの前脳基底部のシングルセル解析

(A) ヒトおよびマウスでのアセチルコリン神経系の投射様式。(B) A $\beta$ 病理モデルマウスの脳をアセチルコリン神経マーカーである抗小胞アセチルコリントランスポーター（VChT）抗体にて染色した。マイネルト基底核を点線で示す。(C) 前脳基底部分ルセル解析による細胞クラスタとマーカー遺伝子である Choline acetyltransferase (Chat) の発現パターン。赤で示したのがアセチルコリン神経細胞クラスタ。

のパスウェイに集積しており，神経軸索変性の過程を捉えられている可能性が示された。

また並行して，マイネルト基底核領域のバルク RNA シーケンスも行った。その結果，A $\beta$  病理モデルマウスにおいて，アセチルコリン神経系含む神経・シナプス関連遺伝子が低下し，グリア細胞での免疫・炎症関連遺伝子の増加が認められた。さらに，シングルセル解析で同定したアセチルコリン神経細胞クラスタにおいて高発現する遺伝子群を選定し，それら遺伝子群の発現変動をバルク RNA シーケンス解析から抽出したところ，A $\beta$  病理モデルマウスで発現低下する遺伝子が“細胞間シグナリング”や“細胞間接着”などのパスウェイに集積することも見出した。これらの結果をモデルマウス脳，さらにヒト剖検脳を用いた免疫組織解析により検証し，治療標的の選定から機能解析へとつなげていく。

加えて，A $\beta$  病理モデルマウスで観察されたアセチルコリン神経系やセロトニン神経系の軸索変性が，AD プレクリニカル期の脳においても観察されるかについても検討を進めている。これまでに，国立精神・神経医療研究センターから提供を受けた認知機能健常高齢者の大脳皮質のパラフィン切片を用いて，セロトニントランスポーター抗体，コリンアセチルトランスフェラーゼ抗体，ドパミントランスポーター抗体，およびチロシン水酸化酵素抗体を用いて，セロトニン，アセチルコリン，ドパミン神経軸索を安定して標識し，定量解析する実験系を確立した。東京都健康長寿医療センターから提供を受けた AD continuum の検体の解析を進め，AD プレクリニカル期における神経軸索変性と A $\beta$  病理や神経炎症等との関係を明らかにする（図 7）。



## 【研究計画 2】反応性アストロサイト活性化の機序解明とその抑制による神経保護効果の解析

### 2-1) 反応性アストロサイトの活性化抑制による神経軸索保護効果の解析

脳実質や脳血管への A $\beta$  の蓄積に伴い、AD プレクリニカル期からアストロサイトが活性化し、脳内の恒常性が慢性的に乱されて神経変性が生じている可能性がある。また、脳脊髄液や血液中におけるアストロサイト活性化マーカーである GFAP の上昇が、認知機能の低下と相関する報告もあり、アストロサイト活性の正常化は、重要な治療標的と考えられる。そこで、A $\beta$  病理モデルマウスを用い、アストロサイト活性化抑制による、脳深部からの投射神経軸索変性、ならびに A $\beta$  斑の形成や近傍のシナプス変性への抑止効果を調べる。

これまでに、A $\beta$  病理の蓄積が引き起こす脳病変を反映する血液バイオマーカーを探索する目的で、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) 法を用い、A $\beta$  病理モデルマウス血漿中のメタボローム解析を行なった。その結果、A $\beta$  病理モデルマウスの血漿中で最も変動の大きい代謝物としてニコチンアミドを同定した。さらにパスウェイ解析からも、代謝物の変動が NAD<sup>+</sup>代謝経路に集積することを見出した (図 8 A-B)。

次に、血中ニコチンアミドの変動の原因を探索するために、A $\beta$  病理モデルマウス脳における NAD<sup>+</sup>代謝経路の変化を調べたところ、生体内の主要な NAD<sup>+</sup>消費酵素である CD38 遺伝子 (図 8 C 参照) のタンパク質発現が、A $\beta$  病理モデルマウスの脳内で顕著に増加して

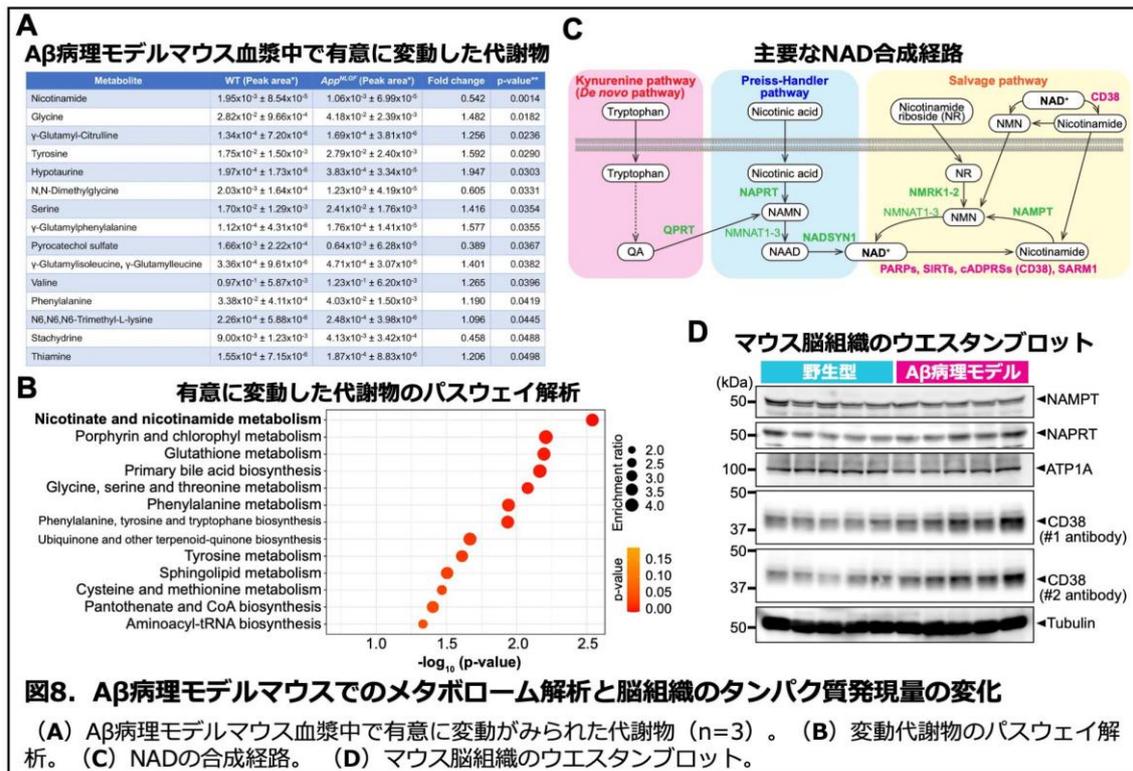
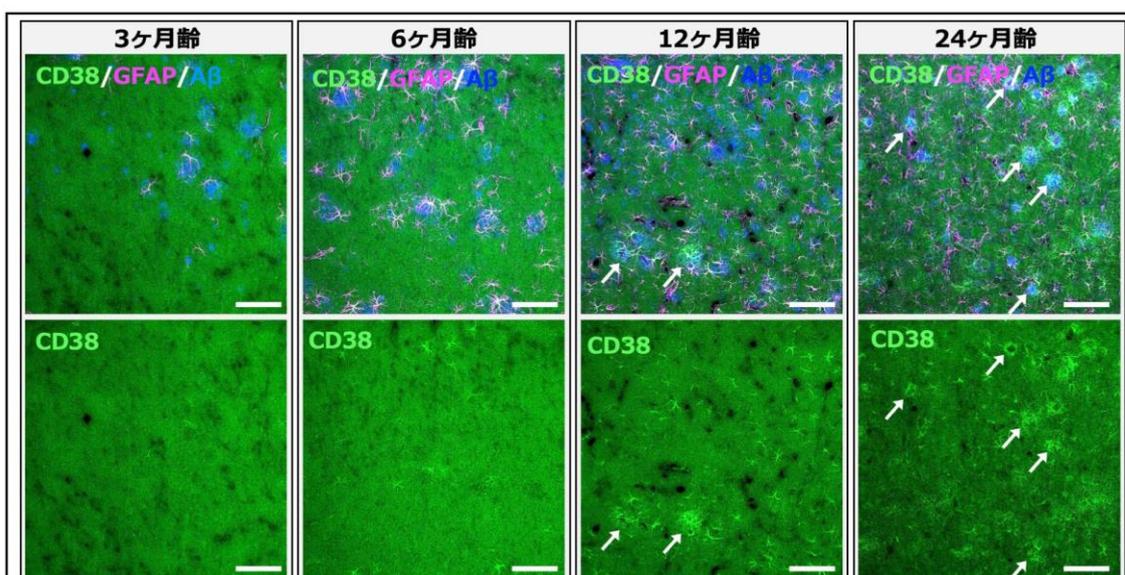


図8. A $\beta$ 病理モデルマウスでのメタボローム解析と脳組織のタンパク質発現量の変化

(A) A $\beta$ 病理モデルマウス血漿中で有意に変動がみられた代謝物 (n=3)。 (B) 変動代謝物のパスウェイ解析。 (C) NADの合成経路。 (D) マウス脳組織のウエスタンブロット。

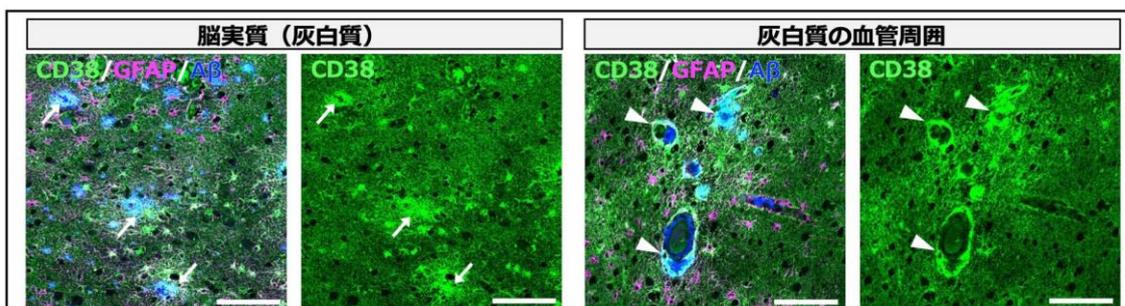
いることを見出した (図 8 D)。さらに、免疫組織学的解析を行い、CD38 が A $\beta$  斑を取り囲むアストロサイトで強く誘導されていることを見出した (図 9, 12-24 ヶ月齢) (Sekiya, et. al., *Neurobiology of Disease*, 2024)。

さらに、A $\beta$  斑の蓄積や反応性アストロサイトの汎マーカーである GFAP 陽性アストロサイトの出現と、CD38 陽性アストロサイト出現の時空間的な関係について、免疫組織学的解析により調べた。その結果、A $\beta$  病理モデルマウス脳においては、GFAP 陽性アストロサイトが 6 ヶ月齢から増加するのに対し、CD38 はそれに遅れて 12 ヶ月齢頃から顕著に増加することが明らかになった (図 9)。さらに、ヒト剖検脳の解析からも、大脳皮質において、脳実質の A $\beta$  斑や血管アミロイドシスの周囲に CD38 陽性アストロサイトが出現することを確認した (図 10) (論文準備中)。



**図9. A $\beta$ 病理モデルマウス脳皮質におけるCD38陽性アストロサイトの加齢依存的な増加**

A $\beta$ 病理モデルマウスの大脳皮質を抗CD38抗体 (緑), アストロサイトマーカーである抗GFAP抗体 (ピンク), 抗A $\beta$ 抗体 (青) にて染色した。スケールバー, 100  $\mu$ m。



**図10. アルツハイマー病患者脳におけるCD38陽性アストロサイトの分布**

アルツハイマー病患者脳切片を抗CD38抗体 (緑), アストロサイトマーカーである抗GFAP抗体 (マゼンタ), 抗A $\beta$ 抗体 (青) にて染色した。白矢印はA $\beta$ 斑, 白矢頭は血管を示す。スケールバー, 100 $\mu$ m。

CD38 は、NAD<sup>+</sup>を消費してカルシウムシグナリングを活性化する ADPR, cADPR を産生し、アストロサイトの活性化を引き起こすことが知られるが、AD 病態形成への関与は知られていない。そこで、CD38 の発現を遺伝学的に低下させることで、A $\beta$  病理が惹起するアストロサイトの活性化を抑制できるか、さらに神経軸索変性に対しては、どのような影響を及ぼすのかについて解析を開始した。当初は、AAV を用いて CD38 に対する microRNA をアストロサイト特異的に発現させ、アストロサイトで CD38 の発現を抑制する計画であった。しかし、AAV によるノックダウン効率が限定的であること、また CD38 ノックアウト (CD38KO) マウスが国内で入手できることから、CD38KO マウスを利用する研究計画へと変更した。本年度、RIKEN BRC より CD38KO マウスの凍結胚を入手し個体化を実施したが、生存産仔が得られなかった。そこで、RIKEN BRC より CD38KO マウスの凍結精子を入手し、体外受精による個体化を実施した。その結果、無事 CD38KO マウス (ヘテロ) を得ることができた。現在、CD38KO のホモ化、A $\beta$  病理マウス、ヒトタウノックインマウスとの交配を進めている。今後、A $\beta$  病理・ヒトタウノックイン・CD38KO マウスを作出し、CD38 発現抑制 (ヘテロならびにホモ欠損) が、アストロサイトの活性化や神経変性、認知機能や運動機能、さらに脳内や血液、末梢組織での NAD<sup>+</sup>代謝に及ぼす影響を検討する。加えて、CD38 の活性を薬理的に抑制する方法についても検討する。

### 【研究計画 3】アルツハイマー型認知症の併存病理に関する研究

#### 3-1) TDP-43 病理が引き起こす神経変性への修飾因子 E 遺伝子の解析

TDP-43 病理は AD の 30~60% に併存し、記憶障害や海馬萎縮と相関することから、重要な治療標的と考えられる。これまでに、加齢性海馬硬化症のリスク遺伝子である E の発現低下が、TDP-43 病理や神経変性を抑制することを、ショウジョウバエモデルを用いて見出した (論文準備中)。本計画では、TDP-43 病理モデルマウスを用い、E の発現低下による TDP-43 病理形成や神経毒性への抑制効果と、その機序を解明する。

すでに導入済みのヒト TDP-43 発現マウスを加齢し、報告されている表現型 (体重減少、後肢反射の消失、後肢握力の低下) が表出する時期の確認を行なった。その結果、24 ヶ月齢まで加齢飼育を行なった個体でも、これらに顕著な変化は認められなかった。一方、18 ヶ月齢を超える個体では、加齢による脱肛等の障害、また突然死の確率が高くなることから、18 ヶ月齢をエンドポイントとし、組織採取を行った。ヒト TDP-43 発現マウスで、最も顕著に変化の認められる脊髄の免疫組織解析を行ったところ、ヒト TDP-43 の発現が確認でき、凝集タンパク質の指標であるユビキチン化タンパク質の増加傾向も認められたため、18 ヶ月齢での組織採取が妥当であると考えられた。

本実験として、ヒト TDP-43 を発現する遺伝子組換えマウスと、E ノックアウトマウス (EKO) を交配し、野生型マウス、TDP-43 発現マウス、E のヘテロ欠損マウス、TDP-43 発現/E のヘテロ欠損マウス、の 4 種類のマウスを得た。本年度は、これらのマウスについ

て、経時的な体重、後肢反射、後肢握力の変化について測定を行い、18ヶ月齢に達した時点で、血液ならびに、脳、脊髄、筋肉組織を採取した。

その結果、体重は6ヶ月齢から18ヶ月齢まで増加を示し、4群間で違いは認められなかった。握力も6ヶ月齢から18ヶ月齢にかけて、増加する傾向を示した。雄マウスでは4群間で違いは認められなかったが、メスマウスでは、TDP-43発現マウスと比べてTDP-43/Eヘテロ欠損マウスにおいてより握力が増加する傾向が認められた。また、EKOマウスでは、組織へのグルコースの取り込みや、血中グルコースの濃度に変化が認められるという報告もあることから、上記4群のマウスの血液中の糖、脂質、インスリン濃度の測定を行ったところ、メスのマウスでは、野生型マウスと比較してTDP-43発現/Eのヘテロ欠損マウスにおいて血中グルコースの有意な増加が認められた。今後、脊髄、脳について順次解析を行う予定である。

### 3-2) 脳領域特異的に $\alpha$ -シヌクレインを蓄積する新規モデルマウスの開発

レビー小体病理( $\alpha$ -シヌクレイン凝集体)は、ADにも比較的高い頻度で併存する。パーキンソン病(PD)では、レビー小体病理は末梢自律神経系から脳幹を上行し中脳や大脳に拡大すると考えられ、一方ADでは、扁桃核から海馬を中心にレビー小体病理が認められる。従って、領域特異的なレビー小体病理の形成機序や、疾患特異的なバイオマーカー探索には、新たなモデルマウスが必要である。本計画では、末梢神経や脳領域特異的に $\alpha$ -シヌクレインを蓄積するモデルマウスを作製し、さらに大脳皮質のA $\beta$ 病理、青斑核や海馬でのタウ病理を併存する新規モデルマウスを作製する。

脳領域特異的に(Cre/loxP発現システム)ヒト $\alpha$ -シヌクレインを発現するモデルマウスを作成するために、Cre発現依存的にヒト $\alpha$ -シヌクレインを発現するloxPマウスの作製に取り組んでいる。昨年度から、受精卵へのマイクロインジェクション法にて、CRISPR-Cas9(ドナーベクター、ガイドRNA、酵素)を導入し、遺伝子組換えマウスの作出を試みた(研究推進基盤センター・小木曾先生、メディカルゲノムセンター・下田先生の研究協力)。4回のインジェクションで、計53匹の個体を得たが、組換え体は得られなかった。ゲノムの標的部位へのニックングの有無を確認しながら、インジェクション試薬の濃度等を変更したが、効果は得られず、本手法でのマウスの作製は中止することとした。

次に、マイクロインジェクション法のように習熟した技術を要さず、簡便に効率よく遺伝子組換え体を得る方法として、CRISPR-Cas9をAAVとエレクトロポレーションの両方を利用して導入する方法を検討することとした(研究推進基盤センター・由利先生の研究協力)。本年度は、本手法に使用するためのAAV6-ターゲティングベクターを作製し、現在、ウイルス粒子の調整を行っている。来年度には遺伝子導入を実施予定である。

#### D. 考察と結論

脳内に蓄積した A $\beta$  斑やタウ病理を生前に検出できるバイオマーカー開発が進み、アルツハイマー病 (AD) の発症前診断が可能になりつつある。最近、レカネマブやドナネマブなどの抗 A $\beta$  抗体薬も承認され、AD の治療に新たな選択肢が加わった。しかし、抗体医薬の適応範囲や治療効果は限定的であり、さらなる治療法の開発は急務の課題である。

AD は神経細胞死を伴い不可逆的に進行するため、先制治療が極めて重要になる。しかし、A $\beta$  斑の蓄積から AD 発症に至るまでの数十年間に渡る「AD プレクリニカル期」に進行する神経変性の実体は不明であり、そのメカニズムの解明は、新たな先制治療法を開発する上で必須である。研究計画 1 では、AD プレクリニカル期から初期の周辺症状の表出や認知機能低下に関わり、症状改善薬の標的にもなっている、青斑核ノルアドレナリン神経系の変性メカニズムに、アストロサイト由来の神経栄養因子シグナルの低下に関わり、さらに分泌因子 A の分泌増強により神経軸索変性を抑止できる可能性を見出しつつあり、抗 A $\beta$  抗体薬とも併用でき、神経保護を目的とする治療薬開発への展開を期待できる。

また、研究計画 2 の結果から、A $\beta$  の蓄積に対してアストロサイトが慢性的に活性化し、脳内の恒常性が乱された結果、AD 初期の神経変性が惹起されている可能性を見出した。血液中での反応性アストロサイトマーカーの上昇が、認知機能の低下と関連する報告もあり、過剰なアストロサイト活性化の制御は重要な治療標的と考えられる。これまでに、AD 患者脳のアストロサイトの活性化に、生体内の主要な NAD<sup>+</sup>分解酵素である CD38 が関わる可能性を見出しており、研究計画 2 を継続することで、アストロサイト活性の正常化と神経変性の抑止を目的とした治療薬や、血液中の NAD<sup>+</sup>代謝物に着目した神経炎症マーカー開発への展開が期待できる。

アルツハイマー型認知症の多くに、A $\beta$  やタウ病理に加えて、TDP-43 病理やレビー小体病理が併存し、記憶障害や神経変性に関わることから、重要な治療標的と考えられる。これまでに、TDP-43 病理モデルマウスにおいて、ATP 依存性カリウムチャネルの活性調節サブユニットであり薬物標的でもある E の発現低下により、雌マウスにおいて神経毒性が改善する可能性を見出しており、研究計画 3 を継続することで、AD の併存病理に対する治療薬開発への展開が期待できる。

以上の研究を進めることで、A $\beta$  やタウを標的とする医薬とは異なるメカニズムの治療薬開発により、抗体医薬との併用、また抗体医薬の適応から外れる患者への新たな医薬の提供にも貢献する。さらに、AD 病態の個人差に応じた、プレシジョンメディシンの開発にもつながる可能性がある。また、種々の病理を併存する新規 AD モデルマウスやモデルショウジョウバエの開発により、国内・外の研究者と連携した、トランスレーショナル研究の推進にも貢献できると考えられる。

本研究により、AD に対する革新的な診断・治療薬標的が同定できれば、国民の保険・医療・福祉の向上等、大きな社会的成果が挙げられると期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Michiko Sekiya, Yasufumi Sakakibara, Yu Hirota, Naoki Ito, Sachie Chikamatsu, Kimi Takei, Risa Nishijima, **Koichi M Iijima**, Decreased plasma nicotinamide and altered NAD<sup>+</sup> metabolism in glial cells surrounding A $\beta$  plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 2024, Nov:202:106694., doi:10.1016/j.nbd.2024.106694. Epub 2024 Oct 5.
- 2) Sachie Chikamatsu, Yasufumi Sakakibara, Kimi Takei, Risa Nishijima, **Koichi M Iijima**, Michiko Sekiya, Supplementation of essential amino acids suppresses age-associated sleep loss and sleep fragmentation but not loss of rhythm strength under yeast-restricted malnutrition in *Drosophila*. *Journal of Biochemistry* 2025 Mar 4;177(3):225-237. doi: 10.1093/jb/mvae090.
- 3) 関谷倫子, 山本 洵, **飯島浩一**, 脳老化とアルツハイマー病がたどる道筋を決めるグリア細胞の多様性 (実験医学ミニレビュー), 実験医学 43(3), 2025年2月号

2. 学会発表

- 1) 廣田 湧, 榊原泰史, 伊藤尚基, 竹井喜美, 近松幸枝, 竹井喜美, 西島里咲, **飯島浩一**, 関谷倫子, アミロイド病理モデルマウスにおける血漿中ニコチンアミドの減少とアミロイド斑周囲のグリア細胞での NAD<sup>+</sup>代謝の変化, **6NC** リトリート 2024, ポスター発表, 4月13日, 国立国際医療研究センター
- 2) Michiko Sekiya, Yasufumi Sakakibara, Yu Hirota, Naoki Ito, Kimi Takei, Sachie Chikamatsu, Risa Nishijima and **Koichi M. Iijima**, Reduced plasma nicotinamide level and altered NAD<sup>+</sup> metabolism in glial cells surrounding A $\beta$  plaques in the mouse model of Alzheimer's disease, **AAIC 2024**, ポスター発表, 7月30日, フィラデルフィア
- 3) Masataka Kikuchi, Akinori Miyashita, Yu Hirota, Norikazu Hara, Mai Hasegawa, Yasufumi Sakakibara, Michiko Sekiya, Yuko Saito, Shigeo Murayama, **Koichi M Iijima**, Takeshi Ikeuchi, Omics analysis of Alzheimer's disease stratified by the

microglial polygenic effect, **AAIC 2024**, ポスター発表, 7月30日, フィラデルフィア

- 4) 近松幸枝, 竹井喜美, 西島里咲, 佐治多美子, 糸 和彦, 飯島浩一, 関谷倫子, ショウジョウバエモデルを用いた加齢時の睡眠障害の発症機序に関する研究, **第97回日本生化学会大会**, 2024, ポスター発表, 11月6日, 口頭発表, 11月7日, 横浜
- 5) 関谷倫子, アルツハイマー型認知症のプレクリニカル期を検出する体液バイオマーカーと脳病態の関係, **第97回日本生化学会大会**, シンポジウム: アルツハイマー型認知症の診断・治療法開発に向けた基礎研究の最前線 (オーガナイザー: 飯島浩一), 11月8日, 横浜
- 6) 榊原泰史, 廣田 湧, 森島真帆, 佐野輝典, 高尾昌樹, 村山繁雄, 齊藤祐子, 関谷倫子, 飯島浩一, 老化とアミロイド $\beta$ 蓄積に伴う大脳皮質での青斑核ノルアドレナリン神経軸索の変性様式, **第43回日本認知症学会学術集会**, 2024, ポスター発表, 11月21日, 郡山
- 7) 廣田 湧, 榊原泰史, 森島真帆, 佐野輝典, 高尾昌樹, 村山繁雄, 齊藤祐子, 飯島浩二, 関谷倫子, アルツハイマー病プレクリニカル期におけるバイオマーカーリン酸化タウの脳内局在解析, **第43回日本認知症学会学術集会**, 2024, ポスター発表, 11月21日, 郡山
- 8) 菊地正隆, 宮下哲典, 廣田 湧, 原 範和, 長谷川舞衣, 榊原泰史, 関谷倫子, 齊藤祐子, 村山繁雄, 飯島浩一, 池内健, アルツハイマー病のポリジェニックリスクスコア層別化によるマルチオミックス解析, **第43回日本認知症学会学術集会**, 2024, ポスター発表, 11月22日, 郡山

#### 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