

長寿医療研究開発費 平成25年度 総括研究報告

アルツハイマー病におけるエンドサイトーシス障害の意義：
家族性アルツハイマー病病態解明への展開（25-20）

主任研究者 木村 展之 国立長寿医療研究センター 室長

研究要旨

アルツハイマー病（AD）患者の脳組織では、肥大化したエンドソームが細胞内に多数蓄積するなどのエンドサイトーシス障害病変が初期病態として確認される。また、木村らはエンドサイトーシス障害が AD 原因蛋白である β アミロイド蛋白（ $A\beta$ ）が時間依存性に蓄積する要因となることを発見したことから（Kimura et al., JBC 2009）、エンドサイトーシス障害が AD 発症メカニズムに深く関与している可能性が示唆された。

そこで本研究は、エンドサイトーシス障害という独自の新たな観点から AD の病理学的変化を見つめ直し、AD の病態メカニズム解明と新規治療薬の開発を目指すものである。また、エンドサイトーシス障害は孤発性・家族性を問わず AD 患者の脳組織において確認される病変であることから、未だ謎の多い変異型 Presenilin-1（PS1）に代表される家族性 AD の病態解明に向けた取り組みも行う。

主任研究者

木村 展之 国立長寿医療研究センター 室長

分担研究者

保富 康宏 医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター センター長

松田 潤一郎 医薬基盤研究所 研究リーダー

高橋 一朗 医薬基盤研究所 主任研究員

A. 研究目的

これまでの研究成果により、神経細胞のエンドサイトーシス障害は $A\beta$ の細胞内蓄積やシナプス小胞の輸送障害を引き起こす要因となることを明らかにしたが、その詳細な分子メカニズムは不明な点が多く、同障害が認知機能障害に代表される AD 病態そのものに及ぼす直接的・間接的影響の全容も未だ不明である。

そこで本研究は、既に確立したエンドサイトーシス障害の細胞モデル、およびヒトに近縁な霊長類であるカニクイザル脳組織を用いてA β の前駆体であるアミロイド前駆体蛋白質 (APP) の細胞内動態を検索し、エンドサイトーシス障害が A β 蓄積を引き起こすメカニズムの解明に向けた検索を行う (木村)。

近年の疫学調査研究により、日本における生活習慣病の代表格とも言える II 型糖尿病が老年期におけるアルツハイマー病発症のリスクを約 1.5~2 倍にも高めるということが明らかとなった。ヒトに近縁な霊長類であり、老人斑や神経原線維変化という AD 二大病変を老年性に再現できるカニクイザルは、老化に伴う AD 病変形成機構を探る上で非常に有用なモデル動物である。成熟齢を迎えたカニクイザルの中には、肥満等に由来する II 型糖尿病を自然発症するものが存在する。そこで、これら糖尿病を自然発症したカニクイザルの脳組織を用いて、糖尿病病態が AD 病変の形成にどのような影響を与えるのかを病理組織が雨滴に明らかにし、エンドサイトーシス障害との関係についても詳細に検索する (保富)。

一方、エンドサイトーシス障害はシナプス機能障害を介して、直接的に脳神経系の機能低下に関与する可能性が過去の研究成果によって明らかとなっている (Kimura et al., *Am J Pathol* 2012)。そこで、エンドサイトーシス障害が認知機能に及ぼす影響について *in vivo* で検証を行うため、人為的にエンドサイトーシス障害を誘発する動物モデルの開発を試みる (松田、高橋)。

B. 研究方法

(木村)

比較的細胞が大きくエンドソームの動態を検索しやすい COS7 細胞と、神経系株化細胞である Neuro2a 細胞を用いてエンドサイトーシス障害モデルを作出し、APP の細胞内動態について生化学的および免疫細胞化学的検索を行った。また、化学物質処理によってエンドサイトーシスを障害したマウス初代培養神経細胞を用いて同様の検索を行った。

若齢 (10 歳以下) およびアルツハイマー病変が確認される老齢 (25 歳前後) のカニクイザルの脳組織を用いて、APP の細胞内動態について生化学的および免疫細胞化学的検索を行った。とりわけ、カニクイザル脳組織からショ糖濃度勾配法によって各種膜画分を抽出し、各種画分における APP の老年性局在変化を検索した。

(保富)

医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターには、糖尿病を発症して死亡したカニクイザルの脳組織サンプルが保存されている。これら自然発症モデルサルの脳組織から病理切片を作成して病理組織学的にアルツハイマー病変を検索した。

(松田)

Tet-ON システムにより脳神経細胞特異的に目的因子を発現するトランスジェニックマウスを作成するため、テトラサイクリン応答性で GFP と lacZ を発現するレポータートラン

スジェニックマウス(tetO-GFP マウス)をジャクソン研究所より導入し、PCRによる遺伝子型判定を行い、目的の遺伝子を持つ個体を選別して繁殖コロニーを樹立した。

(高橋)

培養細胞を用いてエンドサイトーシス障害を起こすための特異的 shRNA が働くかどうかを調べる予備実験を行う。評価系細胞として株化マウス神経芽細胞である Neuro2a 細胞を用い、この細胞に rtTA (リバーステトラサイクリン活性化因子) を発現させるための DNA コンストラクトを導入する。細胞株樹立後、テトラサイクリン応答性プロモーター配列をつないだ GFP や目的 shRNA を発現させるためのコンストラクトを構築して導入する。

(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)

人為的にエンドサイトーシス障害を誘導した細胞モデルを用いて検索を行った結果、エンドサイトーシス障害は APP の細胞内輸送を包括的に阻害することが明らかとなった。カニクイザル脳組織においても、細胞での実験結果と同様に APP の細胞内輸送が包括的に阻害され、老化とともにエンドソームに蓄積することが明らかとなった。

(保富)

糖尿病を発症したカニクイザルの脳組織を用いた検索により、糖尿病は A β 凝集を促進することで老人斑病変形成を加速化させることが明らかとなった。また、糖尿病を発症したカニクイザルの脳内では、同年齢群の健常個体に比べて老年性エンドサイトーシス障害が増悪していることが明らかとなった。

(松田)

エンドサイトーシス障害モデルマウスの作成に必要な各種交配用マウスを導入し、繁殖コロニーを樹立することが出来た。

(高橋)

エンドサイトーシス障害モデルマウス作成に必要な各種遺伝子コンストラクトを作成し、その効果をまずは *in vitro* において確認した。

D. 考察と結論

培養細胞並びにカニクイザル脳組織を用いた研究成果により、エンドサイトーシス障害は APP の細胞内輸送を包括的に阻害することでエンドソームにおける蓄積を誘導することが明らかとなった。APP の正常な細胞内輸送は、A β 産生の抑制にも繋がる重要な働きを担っている。このことから、エンドサイトーシス障害はライソゾームにおける A β の代謝を阻害するのみならず、APP の不要なエンドソーム内蓄積を誘導することで時間依存性に A β を蓄積させるという可能性が示唆された。

糖尿病サルを用いた検索により、糖尿病は A β 重合を促進することで AD 発症リスクを高めている可能性が示唆された。また、糖尿病サルの脳組織ではエンドサイトーシス障害病変の増悪性が確認されたことから、糖尿病による AD 発症リスク増大メカニズムにもエンドサイトーシス障害が関与している可能性が示唆された。

エンドサイトーシス障害モデルマウス作成に向けた取り組みは着実に前進しており、次年度以降は実際にマウス受精卵に遺伝子コンストラクトを導入して産仔を得るための実験作業に移行できるよう努力する所存である。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Kimura N**, Okabayashi S, Ono F. Dynein dysfunction disrupts A β clearance in astrocytes via endocytic disturbances. *Neuroreport* (2014) 25(7): 514-520.
- 2) Morihara T, Hayashi N, Yokokoji M, Akatsu H, Silvermana MA, **Kimura N**, Sato M, Saito Y, Suzuki T, Yanagida K, Kodama TS, Tanaka T, Okochi M, Tagami S, Kazui H, Kudo T, Hashimoto R, Itoh N, Nishitomi K, Kabata-Yamagichi Y, Tsunoda T, Takamura H, Katayama T, Kimura R, Kamino K, Hashizume Y, Takeda M. Transcriptome analysis of distinct mouse strains reveals kinesin light chain-1 splicing as an amyloid beta accumulation modifier. *PNAS* (2014) 111(7): 2638-2643.
- 3) I. Shimozawa N, Ono R, Shimada M, Shibata H, Takahashi I, Inada H, Takada T, Nosaka T, **Yasutomi Y**. Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells established by using exogenous genes derived from the same monkey species. *Differentiation* (2013) 85(4-5):131-9.

2. 学会発表

- 1) Endocytic dysfunction in astrocytes of aged cynomolgus monkey brains. Kimura N, Okabayashi S, Ono F. Neuro2013 (第 56 回日本神経化学会として参加)
2013 年 6 月 20～23 日 京都府京都市
- 2) Retromer の加齢性局在変化と Dynein 機能障害との関係. 木村展之, 岡林佐知, 小野文子, 上田直也, 下澤律浩, 保富康宏, 柳澤勝彦. 第 32 回日本認知症学会
2013 年 11 月 8～10 日 長野県松本市
- 3) BCG ウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチン. 加藤誠一 保富康宏 松尾和浩.
第 3 回感染症若手フォーラム 長崎 2014 年 2 月 13～15 日 長崎県長崎市
- 4) 抗酸菌分泌抗原を組み込んだ弱毒エイズウイルスの霊長類カニクイザルにおける細胞性免疫反応の解析. 岡村 智崇, 松尾 和浩, 保富 康宏. 第 61 回日本ウイルス学会 2013 年 11 月 10 日～12 日 兵庫県神戸市
- 5) 産地別 SPF カニクイザルを用いたサル免疫不全ウイルスのエイズ病態に関する研究
岡村 智崇, 松尾 和浩, 保富 康宏. 第 27 回日本エイズ学会
2013 年 11 月 20～22 日 熊本県熊本市
- 6) インフルエンザウイルス感染におけるヘルパーT 細胞 (Th) の病態への関与 「シンポジウム: もっと効くインフルエンザワクチンを目指して」. 保富康宏. 第 54 回日本臨床ウイルス学会 2013 年 6 月 8～9 日 岡山県倉敷市
- 7) 教育講演: 「ワクチン開発のストラテジー: HIV ワクチン・結核ワクチン開発の経験から」 ワクチン開発に必要な研究を取り巻く環境の重要性. 保富康宏.
第 17 回日本 ワクチン学会 2013 年 11 月 30 日～12 月 1 日 三重県津市

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。