

長寿医療研究開発費 平成28年度 総括研究報告

細胞内輸送障害とアルツハイマー病態：アルツハイマー病発症・進行の促進メカニズム  
解明を目的とする研究（28-27）

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

近年の研究成果により、エンドサイトーシスと呼ばれる膜輸送系の機能障害（以下、エンドサイトーシス障害）がアルツハイマー病(AD)の原因蛋白であるβアミロイド蛋白(Aβ)の蓄積を引き起こす要因となることが明らかとなったが、エンドサイトーシス障害がADの発症そのものや病態進行に及ぼす影響については未だ不明な点が多い。特に、①なぜAD患者ではエンドサイトーシス障害が健常人より増悪化しているのか、また、②Aβ病理からTau病理への進行にエンドサイトーシス障害がどのように関与しているのかを明らかにすることは、新たな予防・治療薬の開発研究へと展開するためにも必要不可欠である。

そこで本研究は、上記①と②の二大項目に着目して解析を進め、細胞内輸送障害という独自の視点から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。

#### 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

木村 哲也 国立長寿医療研究センター 室長

下田 修義 国立長寿医療研究センター 室長

#### A. 研究目的

AD患者の脳組織では、βアミロイド蛋白(Aβ)の凝集・沈着病変である老人斑と、微小管結合蛋白Tauの重合・蓄積病変である神経原線維変化の形成が病理学的特徴として知られているが、実はこれらの病変はヒトのみならず動物の脳組織においても老化に伴い形成されることが知られている。このことから、AD患者の脳組織ではそれら二大病変の形成を過剰に促進する（増悪する）メカニズムが存在すると考えられ、その促進（増悪）メカ

ニズムこそが AD の発症・病態進行に大きな影響を及ぼしているのではないかという可能性が示唆される。

これまでの研究成果により、脳内では老化に伴い細胞内輸送機能が障害されることで A $\beta$  が時間依存性に蓄積すること、そして AD の環境リスク因子である二型糖尿病は老化に伴う細胞内輸送障害を増悪することが明らかとなった。これらのことから、細胞内輸送機能の障害は少なくとも AB 病理の形成・進行に深く関与していると考えられるが、なぜ II 型糖尿病が細胞内輸送機能の障害を増悪するのかは不明のままである。一方、A $\beta$  病理から Tau 病理への移行については様々な研究報告が存在するが、未だ決定的なメカニズムが明らかになっていないこともまた事実である。近年、AD 患者を対象とした大規模なゲノムワイド関連解析によって細胞内輸送機能に関連する遺伝子が次々と発見されたことから、細胞内輸送機能の障害は AB 病理のみならず、Tau 病理も含めた AD 病態そのものに関係している可能性が示唆されている。

そこで本研究は、我々がこれまで積み重ねてきた細胞内輸送機能に関する研究成果をベースとして、A $\beta$  病理の増悪メカニズム、および A $\beta$  病理から Tau 病理への移行メカニズムを明らかにし、AD の発症および進行メカニズムの解明につなげることを目的とする。

## B. 研究方法

(木村 (展))

II 型糖尿病を自然発症した中等齢 (15 歳以上 30 歳未満) のカニクイザルの脳組織を用いて、エンドサイトーシス関連因子の変化を生化学的に検索した。また、II 型糖尿病において代表的な病態である高インスリン血症状態や糖代謝不全状態がエンドサイトーシス系に及ぼす影響を、神経系株化細胞である Neuro2a 細胞を用いて検索した。

神経系株化細胞である Neuro2a 細胞や SH-SY5Y 細胞を用いて、エンドサイトーシス障害とともに異常な活性化が確認される Rab5、Rab57、および Rab11 の遺伝子コンストラクトを導入し、A $\beta$  とその前駆体であるアミロイド前駆体蛋白 (APP) の細胞内蓄積に関する検索を行った。

(木村 (哲))

神経原線維変化の形成には、その主要構成蛋白である Tau の異常リン酸化のみならず、Tau の断片化や総蛋白レベルの蓄積を伴うことが知られている。そこで、まずは Tau の蓄積に焦点を置き、神経系株化細胞である Neuro2a 細胞やラット初代培養神経細胞を用いて、エンドサイトーシスを含む細胞内輸送機能の障害が Tau に及ぼす影響を検索した。

(下田)

脳内では老化に伴いどのような遺伝子 (または遺伝子群) の発現に変化が見られるのか

を明らかにするため、若齢（2歳以上10歳未満）からA $\beta$ 病理の形成が確認される老齢（25歳以上32歳未満）、およびTau病理の形成が確認される超老齢（32歳以上）カニクイザルの側頭葉皮質からmRNAを抽出し、遺伝子発現解析を行った。

（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（展））

II型糖尿病を発症したカニクイザルの脳組織では、AktやGSK3 $\beta$ など、インスリンシグナルの下流に存在する因子群の過剰なリン酸化が確認された。これは、高インスリン血症によってインスリンシグナルが絶えず脳内で活性化されている可能性が考えられる。そこで、神経系株化細胞であるNeuro2a細胞にインスリン処理を行ったところ、残念ながらエンドサイトーシス障害の誘導や増悪化は認められなかった。II型糖尿病患者の体内では、インスリン耐性によって血中からの糖の取り込みが著しく低下していることが知られている。また、AD患者の脳内では発症初期から糖代謝が低下していることがイメージング解析によっても確認されている。そこで、ライソゾーム阻害剤等を用いてエンドサイトーシス障害を誘発したNeuro2a細胞の培養液中に含まれるグルコース濃度を段階的に減少させたところ、グルコース濃度の低下度に反比例してオートファゴソームマーカーであるLC3IIやRab GTPaseの蛋白レベルが上昇した。

AD患者の脳組織やII型糖尿病患者の脳内では、エンドソームの輸送に重要な働きを持ち、エンドサイトーシス障害の指標ともなる各種Rab GTPaseの蛋白レベルが著しく上昇している。とりわけ、Rab5とRab7については、初期AD患者脳においても発現レベルの上昇が報告されている。そこで、神経系培養細胞であるNeuro2a細胞やSH-SY5Y細胞にRab5、Rab7、およびRab11を過剰発現させてAPPやA $\beta$ の蛋白レベルについて検索を行ったところ、大きな変化は確認されなかった。Rab GTPaseは、GTPと結合した活性型と、自らのGTPase機能によって加水分解されたGDPと結合した不活型に大別される。そこで、GTP結合型と同様の分子構造をとる恒常活性型（constitutive active form: CA）のRab5、Rab7、Rab11（それぞれRab5CA、Rab7CA、Rab11CA）を培養細胞に発現させたところ、

Rab5CA 発現細胞では APP や A $\beta$  の細胞内蓄積が確認された。免疫染色によるエンドソームの変化を確認したところ、野生型 Rab5 を発現させた細胞では特に大きな変化が見られなかったのに対し、Rab5CA を発現した場合は初期エンドソームの明らかな肥大化が生じており、同部位における APP の蓄積が確認された。

(木村 (哲))

カニクイザルの脳組織では、神経原線維変化形成に先立って Tau の老化に伴う蓄積が確認される。そこで、Tau の蓄積メカニズムを明らかにするため、レチノイン酸処理によって神経分化誘導を行った SH-SY5Y 細胞、およびラット初代培養神経細胞を用いて各種蛋白代謝阻害剤を用いて Tau の蓄積を検索した。その結果、プロテアソーム、ライソゾームともに、高濃度の薬剤を用いて短期間 (24 時間以内) で代謝機能を阻害しても Tau の蓄積は生じなかったが、低濃度の阻害剤を長期間 (72 時間) 処理することで微弱な Tau の蓄積が確認された。

(下田)

AD 病変の形成や進行に関与する遺伝子群を明らかにするため、若齢 (10 歳未満)・成熟齢 (10 歳以 20 歳未満)・老齢 (25 歳前後)・超老齢 (30 歳前後)、および II 型糖尿病発症成熟齢のカニクイザル脳組織から mRNA を抽出し、遺伝子発現の変化を行った。その結果、APP や Tau といった病変関連蛋白は、老化によってほとんど mRNA の発現量が変化しないことが明らかとなった。一方、エネルギー代謝やミトコンドリアの ATP 産生機能など、老化に伴い mRNA の発現量が減少する遺伝子がいくつか確認されたが、その中にシナプス小胞の輸送や膜融合に関わるエンドサイトーシス関連因子も複数確認された。一方、家族性 AD の最大危険因子である Presenilin-1 (PS1) と、そのホモロジーである Presenilin-2 (PS2) は老化に伴い発現量が上昇していた。

#### D. 考察と結論

II 型糖尿病発症カニクイザル、および培養細胞を用いた研究成果により、II 型糖尿病によるエンドサイトーシス障害の増悪化は、慢性的なインスリンシグナル刺激によるものではなく、低糖代謝状態によるオートファジーの活性化が原因である可能性が示唆された。オートファジーは低栄養状態によって誘導されることが知られているが、オートファジーは最終的にライソゾームにおける内容物の分解が必須のステップとなる。このため、必要以上にライソゾームの負担が増すことになり、老化に伴う老廃物の蓄積や輸送機能の低下がエンドサイトーシス障害を増悪化する要因となっている可能性が示唆された。

一方、Rab GTPase の過剰活性化が APP や A $\beta$  の蓄積に繋がるエンドサイトーシス障害の本体である可能性が示唆された。興味深いのは、これまで我々が注目して研究を行って

きた軸索輸送モーター蛋白である Dynein や、海外の研究グループが注力しているライソゾームの代謝機能に関係なく、ある特定の Rab GTPase の活性を過剰に上昇するだけでエンドサイトーシス障害が引き起こされることである。AD 患者の脳内では健常人に比べて特定の Rab GTPase の発現が上昇していることは既に知られているが、A $\beta$  病理がより進行している II 型糖尿病発症カニクイザルの脳組織においても Rab5 や Rab7、Rab11 の発現レベル上昇が見られることである。今後は、なぜ AD 患者や II 型糖尿病患者の脳内で Rab GTPase の発現レベルおよび活性化が上昇するのかを明らかにするための研究活動に着手し、エンドサイトーシス障害をターゲットとする新たな予防・治療薬の開発研究へとつなげたい。

Tau 病理の発生に重要なカギとなる Tau の細胞内蓄積については、蛋白代謝酵素の阻害だけでは微弱な蓄積を誘導するのみにとどまったことから、他に何らかの条件が加わって初めて Tau の蓄積が誘導される可能性が示唆された。AD 患者の脳内ではコレステロール代謝に障害が生じていることはよく知られているが、遺伝子変異によってライソゾーム内にコレステロールが異常蓄積するニーマンピック病 C 型 (NPC) 患者の神経細胞でも神経原線維変化は頻繁に確認される。このことから、今後はコレステロール代謝の変化と Tau 蓄積の関係に着目して検索を続けていく予定である。

様々な年齢のカニクイザルを用いた遺伝子発現解析によって APP や Tau の遺伝子発現に変化が見られなかったことから、老化に伴う AD 病変の形成は原因蛋白の過剰産生が原因なのではなく、代謝障害によるものであるという我々の仮説が大いに支持される結果が得られた。また、複数のエンドサイトーシス関連遺伝子に発現レベルの低下が認められたことから、エンドサイトーシス障害が脳の老年性変化の 1 つである可能性が大いに高まった。一方、A $\beta$  産生に不可欠な切断酵素の活性中心であり、家族性 AD の原因遺伝子でもある PS1 と PS2 の遺伝子発現が老化に伴い上昇していたことから、A $\beta$  産生とは直接関係の無い機能が脳の老化と関与している可能性が示唆された。これまでの研究報告によると、PS1 は細胞内カルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) の調節に関与する可能性が示唆されており、老齡カニクイザルの脳内では様々な Ca<sup>2+</sup>イオンチャネルの遺伝子発現変化も確認された。今後は老化と Ca<sup>2+</sup>濃度変化との関係にも着目して、エンドサイトーシス障害や A $\beta$  病理、Tau 病理との関係について検索を進めていきたい。

#### E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uchihara T, Endo K, Kondo H, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y, Adachi E, Kimura N.

Tau pathology in aged cynomolgus monkeys is progressive supranuclear palsy/corticobasal degeneration-but not Alzheimer disease-like-Ultrastructural mapping of tau by EDX.

*Acta Neuropathol Commun* 4(1): 118 (2016)

- 2) Kimura N.

Diabetes mellitus induces Alzheimer's disease pathology: histopathological evidence in animal models. *Int J Mol Sci* 17(4): 503 (2016).

2. 学会発表

- 1) Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y.

Dynein Dysfunction Reproduces Age-Dependent Retromer Deficiency: Concomitant Disruption of Retrograde Trafficking Alters APP Metabolism. ADPD2017, 3月29日～4月2日, Vienna (Austria)

- 2) Kimura N, Ueda N, Tomita T, Yanagisawa K.

Retromer and Rab2-dependent trafficking are involved in PS1 degradation by proteasomes in endocytic disturbance.

Society for Neuroscience 2016, 11月12日～16日, San Diego (USA)

- 3) 石黒亮, 野間崇志, 木村展之, 昆隆英, 石浜明.

mRNA グアニン四重鎖の酸化は TDP-43 による特異的結合を低下させる.

第39回日本分子生物学会, 11月30日～12月2日, 神奈川県横浜市

- 4) 野間崇志, 山本遼介, 下理恵子, 木村展之, 石黒亮, 昆隆英.

mRNA グアニン四重鎖との分子間相互作用に影響する TDP-43 ALS 変異の同定.

第39回日本分子生物学会, 11月30日～12月2日, 神奈川県横浜市

- 5) 木村展之, 岡林佐知, 下澤律浩, 保富康弘.

II型糖尿病発症カニクイザル脳組織を用いた生化学的検索.

第35回日本認知症学会, 12月1日～3日, 東京都千代田区

- 6) Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y.

Dynein dysfunction causes endosomal accumulation of APP via alteration in

retromer trafficking.

第 89 回日本生化学会 2016 年 9 月 25～27 日 宮城県仙台市

- 7) 木村展之, 上田直也, 富田泰輔, 柳澤勝彦.

Presenilin-1 の細胞内局在調節 : Retromer と ERAD による共役機構.

第 59 回日本神経化学会 2016 年 9 月 8～10 日 福岡県福岡市

- 8) 木村展之, 岡林佐知, 小野文子.

アストログリア細胞における老年性エンドサイトーシス障害と A $\beta$  病理.

第 39 回日本基礎老化学会 2016 年 5 月 27 日～28 日 神奈川県伊勢原市

- 9) 坂口和弥, 新飯田俊平, 橋本有弘, 下田修義

アルツハイマー病の発症を血中 DNA のメチル化から予測する.

第 39 回日本基礎老化学会 2016 年 5 月 27 日～28 日 神奈川県伊勢原市

- 10) 坂口和弥, 新飯田俊平, 橋本有弘, 下田修義

血中 DNA のメチル化を指標としたアルツハイマー病早期診断法の開発.

第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会 2016 年 5 月 19～20 日 大阪府吹田市

#### 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。