

アルツハイマー病リスク因子であるⅡ型糖尿病状態下における脳内グリア細胞の機能解析
(28-37)

主任研究者 竹内 真吾 国立長寿医療研究センター 流動研究員

研究要旨

2年間全体について

アルツハイマー病（AD）罹患者数が増加しているにもかかわらず、ADの根本的治療法はいまだ存在しないため、新しい治療法や予防手法の開発が切望されている。近年ではAD病態の進行にグリア細胞の関与が指摘されている。一方でⅡ型糖尿病がAD発症の重要なリスク因子として大きな注目を浴びている。私たちはⅡ型糖尿病を罹患したカニクイザルの脳組織を解析した結果、加齢に伴うエンドサイトーシス障害が増悪化しており、老人斑の沈着が早期から起こっていることを明らかにしてきた。しかし、同疾患が脳内グリア細胞の機能にどのような変化をもたらし、ADの発症リスクを増大させるのかについては不明な部分が多い。そこでⅡ型糖尿病によるAD発症促進メカニズムの解明するために、Ⅱ型糖尿病状態下における脳内グリア細胞の機能について解析を行った。その結果、Ⅱ型糖尿病カニクイザル脳内でコレステロール合成に関わる転写因子である **SREBP2** や、脳内でのコレステロール輸送に関わる **ApoE** の発現量が上昇していることが明らかとなった。さらに脳内の細胞膜コレステロール量が上昇しており、Ⅱ型糖尿病カニクイザルの脳内でコレステロールの代謝異常が生じている可能性が示唆された。そこで細胞膜コレステロール量の上昇がアルツハイマー病態の増悪化に寄与するのか **N2a** 細胞を用いて検証を行ったところ、細胞膜コレステロール量の上昇はエンドサイトーシス障害を増悪化させ、**Aβ**の蓄積を引き起こすことが明らかとなった。以上の結果からⅡ型糖尿病脳内におけるコレステロール代謝異常が加齢に伴うエンドサイトーシス障害を増悪化させることでアルツハイマー病の発症リスクを高めている可能性が考えられた。

平成29年度について

Ⅱ型糖尿病カニクイザルの脳内における細胞膜コレステロール量を測定した結果、健全なカニクイザルに比べて有意に上昇していることが明らかとなった。Ⅱ型糖尿病カニクイザルでは加齢に伴うエンドサイトーシス障害が増悪化しており、老人斑の沈着が早期から観察されており、AD病理の加速化が起きている。そこで細胞膜コレステロール量の上昇

がⅡ型糖尿病カニクイザルで見られるAD病理の加速化に寄与するのか、N2a細胞を用いて検証した結果、細胞膜コレステロール量の上昇はエンドサイトーシス障害を増悪化し、Aβの蓄積を引き起こした。これらの結果から、脳内コレステロール代謝の異常がⅡ型糖尿病によるAD発症リスクの増大に寄与する可能性が示唆された。

主任研究者

竹内 真吾 国立長寿医療研究センター 流動研究員

研究期間 平成28年4月1日～平成30年3月31日

A. 研究目的

本研究はアルツハイマー病のリスク因子であるⅡ型糖尿病状態下における脳内グリア細胞の機能を解析することで、Ⅱ型糖尿病によるAD発症促進メカニズムの解明に繋げることを目的とする。

B. 研究方法

2年間全体について

Ⅱ型糖尿病カニクイザルの脳組織を用いて、定量PCR及びウェスタンブロットによりグリア細胞の機能に関わる遺伝子の発現を解析した。また、それらの解析結果から示唆される細胞の変化を神経系細胞株であるN2a細胞において模倣することで、アルツハイマー病態の増悪化、特にAβ病理と密接に関わるエンドサイトーシス障害についてウェスタンブロット及び細胞染色を用いて、詳細に検証した。

平成29年度について

コレステロール測定キットによりⅡ型糖尿病カニクイザル脳内の細胞膜コレステロール量を測定した。またN2a細胞を用いて、薬剤による細胞膜コレステロール量の上昇がエンドサイトーシス障害の増悪化やAβの蓄積に及ぼす影響についてウェスタンブロット、ELISA及び細胞染色により検証を行った。

(倫理面への配慮)

2年間全体について

本研究では動物実験取扱規定および長寿医療研究センターの各種規程、関係法令等を遵守したうえで、適正に実験等を行う。

C. 研究結果

2年間全体について

3ヶ月間、フルクトース水を自由摂取させたラットの脳組織を用いて、遺伝子発現解析を行ったが、アストロサイト、ミクログリアおよびオリゴデンドロサイトのいずれのグリア細胞についても活性化に関わる因子に変化は見られなかった。このラットではⅡ型糖尿病を発症していない可能性が考えられたため、老齢マウスにスクロース水を自由摂取させる方法に変更して、Ⅱ型糖尿病モデル動物の作成を行った。このⅡ型糖尿病モデルマウスの脳組織を解析した結果、Aktのリン酸化が少し亢進している傾向が得られた。また、Ⅱ型糖尿病を自然発症したカニクイザルの脳組織を解析した結果においても、Akt, GSK3 β , mTORのリン酸化が亢進しており、PI3K-Aktシグナルが亢進していることが明らかとなった。Ⅱ型糖尿病の病態として慢性的な高血糖、高インスリン、インスリン抵抗性、脂質代謝異常などが知られており、インスリンシグナルはPI3K-Akt経路を活性化させることから、Ⅱ型糖尿病脳内におけるインスリンシグナルの異常亢進が考えられた。グリア細胞のうちアストロサイトはAD発症に関わるA β を細胞内に取り込み、リソソームで分解する。リソソームの機能異常はAD発症に関与することが知られており、実際、Ⅱ型糖尿病カニクイザルではリソソームの機能異常とともに、老人斑の早期の沈着が見られる。そこで初代培養アストロサイトを慢性的にインスリンで刺激すると、PI3K-Aktシグナルの亢進、およびインスリン抵抗性の獲得というⅡ型糖尿病の病態の一部が再現され、糖尿病モデル培養アストロサイトを作成することができた。しかし、この糖尿病モデル培養アストロサイトのリソソームの機能を検索しても、異常は見られなかった。また糖尿病モデル培養アストロサイトをリソソームの阻害剤でクロロキンを処理してみても、リソソームの機能異常が増悪化することはなかった。さらに高グルコース培養条件下で慢性的なインスリン刺激を行ってみたが、それでもリソソームの機能異常を示すことはなかった。様々な条件下で実験を行ったが、アストロサイトにおけるインスリンシグナルの異常亢進がリソソームの機能異常などのAD発症リスクの増大につながるような知見は得られなかった。

Ⅱ型糖尿病カニクイザルの脳組織を再び解析した結果、Pi3K-Aktシグナルの亢進だけでなく、コレステロール合成に関わる転写因子SREBP2、およびコレステロールの輸送に関わるApoEの発現量が上昇していることを見出した。さらに脳内の細胞膜中のコレステロールの量が有意に上昇していることが確認された。以上の結果からⅡ型糖尿病脳内ではコレステロール代謝の恒常性が破綻していることが示唆された。脳内におけるコレステロールの供給はグリア細胞による寄与が大きいいため、ニューロン-グリア間における脳内コレステロール代謝異常がⅡ型糖尿病によるエンドサイトーシス障害の増悪化に関与しているのではないかと仮説を立てた。そこでNeuro2a細胞を用いて培養液中にコレステロールを添加することで細胞膜コレステロール量を増加させた時に、クロロキンによるエンドサイト

ーシス障害への影響について検証を行った。その結果、クロロキンを処置した細胞では、培養液中へのコレステロールの添加による細胞膜コレステロールの増加が対照群に比べてより増大することが明らかとなった。また細胞膜コレステロールの増加はクロロキンによる APP や A β の細胞内集積を増大させるだけでなく、クロロキンによる Rab5 や Rab7 の増加、及びエンドソームの肥大化も増大させたことから、細胞膜コレステロールの増加はクロロキンによるエンドサイトーシス障害を増悪化させることが明らかとなった。また細胞膜コレステロールの増加はクロロキンによるオートファジーのマーカである LC3-II、及びオートファジーの基質である p62 の蓄積も増大させたことから、リソソームの機能障害の増悪化が示唆された。そこで細胞膜コレステロール増加がクロロキンによるエンドサイトーシス障害の増悪化に寄与するのか明らかにするため、Neuro2a 細胞にカテプシンの阻害剤である pepstatinA, E64d, leupeptin の 3 種混合カクテルを処置した。その結果、カテプシン阻害剤カクテルだけではエンドサイトーシス経路に特に影響を及ぼさなかったが、クロロキンによるエンドサイトーシス障害存在下では APP や A β の細胞内蓄積を増大させることが明らかとなった。以上の結果から細胞膜コレステロールの増加はリソソームの代謝機能を阻害することでクロロキンによるエンドサイトーシス障害を増悪化させることが示唆された。

以上の結果をまとめて *Journal of Neurochemistry* 誌に投稿し、現在 Revise 中である

一方で、II 型糖尿病カニクイザルの脳で 一方で、II 型糖尿病カニクイザルの脳では、アストロサイトに発現しているグルタミン酸トランスポーター EAAT2/GLT-1 の発現が減少していることが明らかとなった。EAAT2/GLT-1 の発現低下は上述の II 型糖尿病モデルマウスにおいても減少傾向が見られた。EAAT2/GLT-1 は神経細胞から放出されたグルタミン酸を取り込むのに働いており、ニューロン-アストロサイト間でのグルタミン酸-グルタミン回路に重要な役割を果たしていることから、II 型糖尿病脳内ではこのグルタミン酸-グルタミン回路の機能が低下していることが示唆された。事業計画書に記載した EAAT2/GLT-1 の機能障害と AD 病態との関連性に関する研究については、上述した II 型糖尿病モデル動物の作成に予想以上に時間がかかってしまったため、検証することができなかった。

平成 29 年度について

健全なカニクイザルに比べて、II 型糖尿病カニクイザルでは脳内の細胞膜コレステロール量が有意に上昇していることが明らかとなった。脳内におけるコレステロールの供給はグリア細胞による寄与が大きいため、ニューロン-グリア間における脳内コレステロール代謝異常が II 型糖尿病によるエンドサイトーシス障害の増悪化に関与しているのではないかと仮説を立てた。そこで Neuro2a 細胞を用いて培養液中にコレステロールを添加することで細胞膜コレステロール量を増加させた時に、クロロキンによるエンドサイトーシス障害

への影響について検証を行った。その結果、クロロキンを処置した細胞では、培養液中へのコレステロールの添加による細胞膜コレステロールの増加が対照群に比べてより増大することが明らかとなった。また細胞膜コレステロールの増加はクロロキンによる APP や A β の細胞内集積を増大させるだけでなく、クロロキンによる Rab5 や Rab7 の増加、及びエンドソームの肥大化も増大させたことから、細胞膜コレステロールの増加はクロロキンによるエンドサイトーシス障害を増悪化させることが明らかとなった。また細胞膜コレステロールの増加はクロロキンによるオートファジーのマーカである LC3-II、及びオートファジーの基質である p62 の蓄積も増大させたことから、リソソームの機能障害の増悪化が示唆された。そこで細胞膜コレステロール増加がクロロキンによるエンドサイトーシス障害の増悪化に寄与するのか明らかにするため、Neuro2a 細胞にカテプシンの阻害剤である pepstatinA, E64d, leupeptin の 3 種混合カクテルを処置した。その結果、カテプシン阻害剤カクテルだけではエンドサイトーシス経路に特に影響を及ぼさなかったが、クロロキンによるエンドサイトーシス障害存在下では APP や A β の細胞内蓄積を増大させることが明らかとなった。以上の結果から細胞膜コレステロールの増加はリソソームの代謝機能を阻害することでクロロキンによるエンドサイトーシス障害を増悪化させることが示唆された。以上の結果をまとめて Journal of Neurochemistry 誌に投稿し、現在 Revise 中である

D. 考察と結論

2年間全体について

本研究において II 型糖尿病カニクイザルではコレステロール代謝に関わる遺伝子発現の変化及び細胞膜コレステロール量の上昇が確認された。さらに培養細胞を用いた実験から、細胞膜コレステロール量の上昇はリソソームの機能障害の増悪化を引き起こし、それがエンドサイトーシス障害を増悪化させるとともに、A β の蓄積を引き起こすことが明らかとなった。これらの結果から II 型糖尿病は脳内コレステロールの代謝異常を介して、加齢に伴うエンドサイトーシス障害を増悪化することで A β の蓄積を加速化させている可能性が示唆された。

ApoE のアイソフォームのうち ApoE4 は孤発性 AD における最大の遺伝的リスク因子であることが知られている。ApoE は脳内に最も豊富に存在する lipoprotein であり、細胞間のコレステロールの輸送を担っていることから、ApoE のアイソフォームによる脳内コレステロール代謝の違いが AD の発症に関わっている可能性が考えられる。また複数の疫学的調査によって、コレステロールの合成を抑制するスタチンは AD の発症を抑える効果があると報告されている。これらの知見と本研究結果から、脳内のコレステロール代謝を正常にすることは AD の発症を予防する重要な治療標的であると考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

平成29年度

1) 第40回日本分子生物学会年会 ポスター発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし