

長寿医療研究開発費 平成29年度 総括研究報告

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  
(28-45)

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

高齢化社会においてアルツハイマー病 (AD) に対する根本的治療薬は最重要課題の一つである。AD の原因とされている  $A\beta$  やタウを中心に根本的治療薬が開発されているものいまだ臨床使用可能となるような薬剤はいまだなく、これら以外の開発戦略も必要であると考えられる。本研究では  $A\beta$  やタウを踏まえながら、先天的および後天的危険因子が AD の発症を促進する分子機序を明らかにすることにより、次世代認知症薬の標的分子を同定することを目的とする。① 糖尿病による認知症促進の鍵分子 Factor X の解明、② 老人斑と神経原線維変化 (NFT) を繋ぐ因子の解明、③  $A\beta$  と神経変性を加齢により繋ぐ因子の解明、④  $A\beta$  産生を修飾する因子の解明と老化の影響の4つの戦略で標的候補分子を同定する。

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

福森 亮雄 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (室長)

篠原 充 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (室長)

A. 研究目的

高齢化社会において認知症は根本的治療薬がないことから解決が迫られている重要な課題である。その中でもアルツハイマー病 (AD) は認知症のおおよそ半分以上を占めることから、特に重要である。AD に対する根本的治療薬は老人斑の主要構成成分である  $A\beta$  を標的とした治療薬の開発が進んでおり、またもう一つの主要病理である神経原線維変化の本態であるタウに対する治療法の開発もその途上にある。本研究では  $A\beta$  やタウを踏まえながら、先天的および後天的危険因子が AD の発症を促進する分子機序を明らかにすることにより、次世代認知症薬の標的分子を同定することを目的とする。

## B. 研究方法

以下の4つの戦略で標的候補分子を同定する。

### ① 糖尿病による認知症促進の因子の解明

糖尿病合併 AD モデルのトランスクリプトーム解析により、糖尿病と AD が合併することによって初めて発現増加する遺伝子群などを見出している。さらに脳内環境に存在する比較的分子量の大きい蛋白質を解析可能な独自に開発した脳内マイクロダイアリス (Neuroscience, 2011, Neurobiol. Aging, 2013. 特許第 4625914 号) を用いて量的・質的に発現変化のある分子を同定する。これらの遺伝子あるいは分子に関して *in vitro* 実験系で機能スクリーニングを行い、さらに APP マウスに対し、作成した遺伝子欠損マウスとの交配や、特異的阻害剤の投与を通じ、糖尿病負荷による認知機能の変化を検討することで生体での機能解析をおこなう。また認知症が糖尿病を促進する作用や機序も検討することで、両者をつなぐ標的候補分子や因子を同定する。

### ② 老人斑と神経原線維変化(NFT)を繋ぐ因子の解明

糖尿病合併 AD マウスではタウのリン酸化が亢進する方向に働くことを見出しているが NFT は認められない。糖尿病合併 AD マウスとヒト化タウ・マウスとの掛け合わせを行い、NFT ができるかを評価し、 $A\beta$  と NFT の missing link を見つける。またヒト剖検脳 (健常者、老人斑優位型 (NFT(-) 神経変性(-))、AD) の網羅的解析を行い、老人斑と NFT を繋ぐ因子を検索する。

### ③ $A\beta$ と神経変性を加齢により繋ぐ因子の解明

独自に作成した時間・空間的  $A\beta$  発現マウスを用いて「 $A\beta$  に対する生体防御反応」(独自データを既に得ている) への加齢による影響を *in vivo* で解析する。また加齢依存的な  $A\beta$  の作用をヒト検体の解析、データベースの検索からも検討する。

### ④ $A\beta$ 産生を修飾する因子の解明と老化の影響

$A\beta$  標的治療薬の候補として  $\gamma$  セクレターゼ阻害薬があるが、Notch の切断阻害による副作用が起り開発は難航している。我々が同定した  $\gamma$  セクレターゼのエクソサイトと呼ばれる基質結合部位 (Fukumori et al. EMBO J. 2016) は触媒部位でないため、Notch の切断阻害をしない標的部位となりえる。このエクソサイトでの基質認識メカニズムを解明し、 $A\beta$  産生を修飾する因子 (構造、特性、アミノ酸部位) を同定し、さらにこれらに対する老化の影響を検討する。

(倫理面への配慮)

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)

「研究機関などにおける動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年度厚生労働省告示第 71 号)

また、剖検脳を用いた研究に関しては、研究に関する倫理指針(人を対象とする医学系研究に関する倫理指針およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針)を遵守しながら、国立長寿医療研究センターでの倫理委員会に本研究での解析の申請を行い、承認されたあと、実験を行う。高齢者ブレインバンクにて設定された匿名化番号を付けた書類、サンプルが国立長寿医療研究センターに送付される。

## C. 研究結果

### ① 糖尿病による認知症促進の因子の解明

- ・ 糖尿病合併 AD モデルの解析により、糖尿病と AD が合併することによって初めて発現増加する遺伝子のゲノム編集マウスの作出に成功した。このそれぞれのラインを大阪大学から精巣上体の形で輸送し、野生型マウスに人工授精を行い、F1 ラインを得、ジェノタイピングを行い、目的のラインを得(ヘテロ)、そのヘテロ同士を掛け合わせ、ホモマウスを得つつある段階である。実際にノックアウトできているかを確認した後に、APP マウスと交配予定である。
- ・ 糖尿病合併 AD モデルの解析により、糖尿病で短くなる寿命がさらに AD を発症することでより短くなることを見出した。また実際に臨床的にもその現象が起きているかを全米のデータベースを用いて確認した。この寿命への影響は、認知症と糖尿病の相互作用を理解するうえで大変重要な発見と考えている。そこで、さらに回収した糖尿病合併 AD モデルの検体の解析などを通じ、その機序を理解する予定としている。
- ・ 糖尿病合併 AD モデルにて、糖尿病と AD が合併することによって初めて発現増加する遺伝子をバイオインフォマティクスのアプローチであらたに解析すると、過去にアルツハイマー病研究(Zhang et al., Cell 2013)で報告のあったある遺伝子モジュールとかなり有意に相関することが判明した。またそのような遺伝子の発現を制御しうる転写因子として、転写因子 X を同定した。今後この転写因子 X の制御下で、糖尿病合併 AD モデルの表現型が改善するかを検証する予定である。
- ・ マイクロダイアリシスに必要な機材(エイコム SFIDA マウス・ラット用脳光刺激装置一式)を購入し、マイクロダイアリシス実験のセットアップを順次進めている。

## ② 老人斑と神経原線維変化(NFT)を繋ぐ因子の解明

- ・ ヒト化タウ・トランスジェニックマウス（大阪市立大学）およびヒト化タウ・ノックインマウス（理化学研究所）の導入（いずれも精巢上体）を終えた。動物施設のスペースや研究人員の充足を待って、糖尿病合併 AD マウスとヒト化タウ・マウスとの掛け合わせを行っていく。
- ・ また大阪大学にて供与されたヒト剖検脳（健常者、老人斑優位型（NFT(-)神経変性(-)、AD）の RNA 抽出も終えてはいるが、2017 年 2 月より着任した篠原がこれまで行ってきた剖検脳解析の手法を導入するために、長寿医療研究センター内での倫理・利益相反審査を終了後、東京都健康長寿医療センターにて、共同研究者である村山繁雄博士との綿密な相談のもと、外部審査員による審査を行っている段階である。解析に必要な A $\beta$  やタウ、シナプスや炎症マーカーなどのいくつかの ELISA を立ち上げつつある。

## ③ A $\beta$ と神経変性を加齢により繋ぐ因子の解明

- ・ 独自に時間・空間的 A $\beta$  発現マウスの大阪大学からの導入を進めた。現在、その時間・空間的 A $\beta$  発現マウスとドライバーライン CAG-Cre マウスのかけ合せを行った。
- ・ マイクロアレイ解析により、「A $\beta$  に対する生体防御反応」を示唆する独自データを既に得た（Cc13 および 4: Chemokine (C-C motif) Ligand3 および 4 など）。またデータベースの検索より、AD で変化する遺伝子や加齢で変化する遺伝子を同定している。

## ④ A $\beta$ の産生を修飾する因子の解明と老化の影響

### ⑤

- ・  $\gamma$  セクレターゼ酵素複合体への代表的な基質 C83 に絞り、解析を大阪大学で行った。
- ・ A $\beta$  の産生を修飾する因子に対する老化の影響の検討については、ヒト脳を老化のマーカーで染色する手続きや準備を進めている。

## D. 考察と結論

高齢化社会において、AD に対する根本的治療薬は最重要課題の一つであり、AD の原因とされている A $\beta$  やタウを中心に根本的治療薬が開発されているものの、いまだ臨床使用可能となるような薬剤はいまだなく、これら以外の開発戦略も必要であると考えられる。

本研究では A $\beta$  やタウを踏まえながら、先天的および後天的危険因子が AD の発症を促進する分子機序を明らかにすることにより、次世代認知症薬の標的分子を同定することを目的として、① 糖尿病による認知症促進の鍵分子 Factor X の解明、② 老人斑と神経原線維変化(NFT)を繋ぐ因子の解明、③ A $\beta$  と神経変性を加齢により繋ぐ因子の解明、④ A $\beta$  の産生を修飾する因子の解明の、4つの戦略で標的候補分子の同定を目指している。

①の研究からは、糖尿病による認知症の促進のみならず、認知症による糖尿病そのもの、もしくはそれに付随する現象への促進作用や、それらがどのように生命を脅かすかについての分子的機序の解明、またそれらの理解に基づく病態を反映するバイオマーカーの開発や、新規治療戦略の創出がもたらされることが期待される。

②の研究からは、篠原室長のこれまでの研究をさらに発展させることで、なぜ老人斑が蓄積するかについての分子的な理解や、どのように老人斑がタンパク質として成熟し神経原線維変化と関連するのか、またなぜ神経原線維変化はすくなくとも初期にはその蓄積に老人斑を必要としないのか、というアルツハイマー病における根本的な病態の理解がもたらされると期待される。

③の研究からは、「A $\beta$  に対する生体防御反応」というアルツハイマー病の本態に切り込む上での重要な仮説を科学的に検証するとともに、アルツハイマー病における最大の危険因子である加齢が、どのようにA $\beta$  の蓄積をもたらし、神経変性へと繋ぐのかその分子メカニズムを解明することにより、アルツハイマー病研究において重要な知見をもたらすことが期待される。

④の研究からは、エクソサイトを標的とする新タイプのA $\beta$  産生抑制による治療薬の開発につながるのみならず、エクソサイトで酵素の抑制はほかのさまざまな酵素阻害戦略に貢献する。さらに、アミロイド産生に老化がどう影響を及ぼすかも明らかになるだろう。

糖尿病による認知症促進の鍵分子 Factor X の解明に関しては、モデルマウスを用いることから、モデルの特異性を排除する必要があり、複数のモデルマウスを用いる必要があると考えられる。AD および糖尿病の両疾患について複数×複数の組み合わせで共通する分子に着目し、さらに剖検脳やヒトの生物学的試料を用いてその妥当性を証明することが重要であると考えられる。

当該研究によって直接得られる成果に加え、間接的に期待される社会的成果も得られると考えられる。例えば、糖尿病による認知症促進の機序が明らかにされることによって、社会において「認知症予防のためにも糖尿病にならないように、生活習慣を改善しよう」という啓蒙がなされることが期待される。特に生活習慣病や肥満などの認知症リスクがある方々に対して、運動や食事療法、血管リスクの管理が認知症発症の予防につながること(文献1)の、さらなる論理的裏付けとして当該研究が役に立つと考えられる。

文献1. Ngandu T, et al. Lancet. 2015 Jun 6;385(9984):2255-63.

#### E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

(主任研究者)

1) Shinohara M, Sato N.

Bidirectional interactions between diabetes and Alzheimer's disease.  
Neurochem Int, 108 : 296-302, 2017.

2) 里 直行

糖尿病から探る認知症メカニズム.

実験医学 増刊, 35(12) : 169-172, 2017.

3) 里 直行

加齢および加齢関連疾患からみたアルツハイマー病の発症機構.

BIO Clinica 老化とアルツハイマー方認知症, 32(8) : 28-33, 2017.

4) 里 直行

認知症と糖尿病—原因と結果の双方向の関係.

神経心理学, 33(3) : 177-182, 2017.

5) 里 直行

生活習慣病と認知症.

形成外科, 61(3) : 295-304, 2018.

6) 里 直行

糖尿病と認知症—糖尿病と認知症の分子レベルの関連.

医療の広場, 58(3) : 4-5, 2018.

(分担研究者 福森)

1) Fukumori A, Johannes Trambauer, Lukas Feilen, Harald Steiner,

Identifizierung von Substratbindestellen in der  $\gamma$ -Sekretase.

BioSpektrum, 24(1) : 4-36, 2018.

(分担研究者 篠原)

1) Shinohara M, Sato N.

Bidirectional interactions between diabetes and Alzheimer's disease.

Neurochem Int, 108 : 296-302, 2017.

2) 篠原 充

AD のリスク遺伝子 APOE の多彩な機能.

分子精神医学誌, 17(2) : 40-47, 2017.

※発表誌名、巻号・頁・発行年等も記載すること。

2. 学会発表

(主任研究者)

1) 里 直行

糖尿病による認知症促進機構の解明.

第 59 回 日本老年医学会学術集会 シンポジウム 2 糖尿病と認知症—研究中心—, 2017 年 6 月 14 日, 名古屋市.

2) Sato N

Bidirectional interaction between Alzheimer's disease and diabetes.

The 3rd NCGG-ICAH Symposium--Satellite Symposium of 59th Annual meeting of the Japan Geriatrics Society--, Sep.7, 2017, Aichi.

3) Fukumori A, Sato N

Mechanism of Substrate Recognition by the Exosites in  $\gamma$ -Secretas.

International Symposium 2017 -Understanding Intramembrane Proteolysis from Substrates to Enzymes, Oct.5, 2017, Regensburg, Germany.

4) 里 直行

アミロイド $\beta$ と糖尿病.

第12回 臨床ストレス応答学会 シンポジウム1【神経変性疾患における異常蛋白質の毒性、蓄積および伝播】(座長 渡部 和彦先生・永井 義隆先生), 2017年11月4日, 東京都.

5) 里 直行

糖尿病による認知症促進機構の解明.

第36回 日本認知症学会 学術集会 シンポジウム18【生活習慣・生活習慣病と認知症・アルツハイマー病】(座長 神崎 恒一先生・木下 彩栄先生), 2017年11月25日, 金沢市.

6) 里 直行

糖尿病と認知症—炎症性分子の関与も含めて.

平成29年度 日本歯周病学会 60周年記念京都学会 シンポジウムIV【超高齢社会を生き抜く歯周病予防・治療の考え方】(座長 吉成 伸夫先生), 2017年12月17日, 京都市.

7) 里 直行

Bidirectional interaction between diabetes and Alzheimer' s disease.

第10回 NAGOYA グローバルリトリート 招待講演 (座長 野田 万里子先生・佐藤 亜希子先生・向井 智美先生), 2018年2月16日, 大府市.

(分担研究者 福森)

1) Fukumori A, Sato N

Mechanism of Substrate Recognition by the Exosites in  $\gamma$ -Secretas.

International Symposium 2017 -Understanding Intramembrane Proteolysis from Substrates to Enzymes, Oct.5, 2017, Regensburg, Germany.

2) 福森 亮雄, 里 直行

$\gamma$ セクレターゼのエクソサイトでの基質認知期は立体構造変化に感受性がある.

第36回 日本認知症学会 学術集会 ポスター <基礎 (A $\beta$ 、APP、Presenilin、ApoE)>, 2017年11月24日, 金沢市.

0

3) 福森 亮雄, 里 直行

エキソサイトの立体構造の柔軟性により  $\gamma$ セクレターゼは APP 基質を認識する.

第 36 回 日本認知症学会 学術集会 ポスター <基礎 (A $\beta$ 、APP、Presenilin、ApoE)>, 2017 年 11 月 24 日, 金沢市.

4) 福森 亮雄, 里 直行

Substrate recognition of C99 by  $\gamma$ -secretase is sensitive to steric alterations in the extracellular domain.

第 10 回 NAGOYA グローバルリトリート フラッシュトーク・ポスター発表, 2018 年 2 月 16 日, 大府市.

(分担研究者 篠原)

1) 篠原 充

アミロイド  $\beta$  の脳領域分布に着目したアルツハイマー病研究. (口述発表、座長 北澤茂先生)

第 6 回 大阪大学神経難病フォーラム, 2017 年 8 月 19 日, 大阪市.

2) 篠原 充

Distinct spatiotemporal accumulation of N-truncated and full-length A $\beta$  42.

第 36 回 日本認知症学会 学術集会 ポスター<アルツハイマー病 (病理、病態)>, 2017 年 11 月 24 日, 金沢市.

3) 篠原 充

Distinct spatiotemporal accumulation of N-truncated and full-length A $\beta$  42 in Alzheimer's disease.

第 10 回 NAGOYA グローバルリトリート ポスター発表, 2018 年 2 月 16 日, 大府市.

4) 篠原 充

アミロイド  $\beta$  の脳領域分布に着目した研究.

第 18 回関西・中部認知症研究会 一般講演 II (座長 里 直行部長), 2018 年 3 月 3 日, 大阪市.

5) 篠原 充

脳領域間の違いに着目したアルツハイマー病研究.

第 25 回メイヨーニューロサイエンスフォーラム Frontier Talk (座長 岡 秀宏先生), 2018 年 3 月 17 日, 福岡市.

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

※予定を含めて記載すること。該当がない場合には「なし」と記載すること。