

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 病因遺伝子研究室長

研究要旨

AD患者の脳組織では、 β アミロイド蛋白（ $A\beta$ ）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メカニズムが存在すると考えられ、そのメカニズムこそが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。

研究代表者は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の環境性リスク因子であるII型糖尿病は老化に伴うエンドサイトーシス障害を増悪することを明らかにした。これらのことから、エンドサイトーシスを含む細胞内輸送機能の障害は少なくとも $A\beta$ 病理の形成・進行に関与していると考えられるが、なぜII型糖尿病が輸送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。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 $A\beta$ 病理のみならず、Tau病理も含めたAD病態そのものに関与している可能性が示唆されている。

そこで本研究は、研究代表者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。

平成30年度について

昨年度の研究成果により、エンドソームの輸送に重要な役割を果たすRab GTPaseの過剰な活性化を抑制することで、エンドサイトーシス障害による $A\beta$ 蓄積を改善できる可能性が示された。そこで今年度は、Rab GTPase活性の抑制がin vivoでも $A\beta$ 蓄積を改善できるか否かを明らかにするため、 $A\beta$ 病変を再現できるモデルマウスを用いて検証を行った。

一方、近年ではオートファジーと $A\beta$ を初めとするAD病変形成メカニズムとの関係性が注目され、オートファジーの活性化によってAD病変が改善されるという種々の報告がな

されているが、オートファジーもまたエンドサイトーシスと密接にリンクする細胞内システムであるため、老化に伴うエンドサイトーシス障害による影響を受ける可能性が高い。そこで、オートファジーの誘導がエンドサイトーシス障害に伴う $A\beta$ の蓄積に及ぼす影響について新たな検索を行った。

昨年度までの研究成果により、長期抑圧（LTD）の持続が Tau のリン酸化と蓄積を促すことが明らかとなった。そこで、細胞内輸送障害が神経活動に及ぼす影響を明らかにするため、マウスのスライス培養を用いた電気生理学的検索を行った。また、若齢から老齢までのカニクイザル脳組織を用いた遺伝子発現解析を継続的に行った。

主任研究者

木村 展之 国立長寿医療研究センター 病因遺伝子研究室長

分担研究者

木村 哲也 国立長寿医療研究センター 病態モデル動物解析室長

下田 修義 国立長寿医療研究センター 組織再生再建研究室長

研究期間 平成28年4月1日～平成31年3月31日

A. 研究目的

これまでの研究成果により、エンドサイトーシスを含む細胞内輸送機能の障害が老化に伴う β アミロイド蛋白 ($A\beta$) の蓄積を引き起こす要因となることが明らかとなった。しかしその一方で、何故、アルツハイマー病 (AD) 患者の脳組織では健常者に比べて細胞内輸送機能の障害が増悪しているのかは不明のままであり、 $A\beta$ 病理から Tau 病理 (神経原線維変化) への移行メカニズムもまた依然として謎が多い。このことが、AD の根本的治療薬が未だ開発されていない要因の1つでもあると考えられている。

そこで本研究は、AD の発症・進行メカニズムの解明につなげることを最終目的として、これまで着実に成果を積み重ねてきた細胞内輸送系に着目した研究活動をベースに、主に以下の項目に重点を置いて研究活動を行った。

①環境リスク因子による $A\beta$ 病理の増悪メカニズムを明らかにするため、既に過去の研究成果によって明らかな $A\beta$ 病理の増悪化が確認されているⅡ型糖尿病の動物モデルを主な対象として研究計画を実施する。

② $A\beta$ 病理から Tau 病理への移行 (進行) メカニズムを明らかにするため、主にラット初代培養神経細胞を用いてエンドサイトーシス障害を初めとする様々な老年性変化を人為的に誘導し、内因性 Tau の変化を詳細に検索する。

③AD 患者と健常人とを比較した遺伝子解析研究は広く世界的に行われているが、老化そのものが脳内での遺伝子発現にどのような影響を及ぼすのかについては不明な点が多く、ヒ

トでは倫理面での問題が大きい。そこで、ヒトに近縁なカニクイザルを用いて老化に伴う各種遺伝子の発現解析を行い、細胞内輸送障害や AD 病変形成との関係性を検討する。

B. 研究方法

3 年間全体について

①環境リスク因子による A β 病理の増悪メカニズムの検索

Ⅱ型糖尿病を自然発症したカニクイザル、および同一年齢の健常カニクイザルの脳組織を用いてインスリンシグナルや脂質代謝関連因子の変化を検索する。変動が確認された因子については、神経系セルラインやラット初代培養神経細胞を用いて同因子の変化がエンドサイトーシス系にどのような影響を及ぼすかを検索し、A β の蓄積についても評価する。

これまでの研究成果により、エンドサイトーシス障害にはエンドソーム輸送に必須の因子である Rab GTPase の発現量および活性化の変化が関与している可能性が示唆されている。そこで、神経系セルラインを用いてエンドサイトーシス障害と関連のある Rab GTPase を人為的に過剰発現し、A β 蓄積への影響を明らかにする。また、Rab をターゲットとしたエンドサイトーシス障害の改善が可能か否かもあわせて検索する。

近年、オートファジーの AD 病変形成への関与が注目されている。そこで、神経系セルラインを用いて、オートファジーの誘導や阻害がエンドサイトーシス障害に伴う A β 蓄積にどのような影響を及ぼすのかを検索し、治療ターゲットとしての可能性を検討する。

②A β 病理から Tau 病理への移行（進行）メカニズムの検索

過剰発現系では AD の病態を正しく理解することが困難なことは、これまでの AD 治療薬開発研究における数々の失敗が物語っている。そこで、主にラット初代培養神経細胞を用いてエンドサイトーシス障害を初めとする様々な老年性変化を誘導し、あくまでも内因性 Tau が示す量的・質的变化を詳細に検索する。また、これまでの研究報告により、A β は神経細胞のグルタミン酸レセプターに結合して神経活動を変化させることが知られているが、Tau の病的変化もまた神経活動との関係が指摘されている。そこで、ラット初代培養神経細胞に様々な方法で神経活動刺激を与え、内因性 Tau のリン酸化や蓄積を誘導できる手法を検索する。また、エンドサイトーシス障害が神経活動に及ぼす影響についても電気生理学的手法を用いて検索を行う。

③カニクイザルを用いた老化に伴う各種遺伝子の発現解析

若齢から老齢まで、様々な年齢のカニクイザル脳組織から mRNA を抽出してマイクロアレイ解析を行い、老化に伴い発現量が変動する遺伝子群を同定する。また、Ⅱ型糖尿病を自然発症したカニクイザルの脳組織から抽出した mRNA についても遺伝子発現解析を行い、Ⅱ型糖尿病という AD の環境性リスク因子が脳に及ぼす影響について検討する。

平成 30 年度について

①環境リスク因子による A β 病理の増悪メカニズムの検索

これまでの研究成果により、エンドサイトーシス障害にはエンドソーム輸送に必須の因子である **Rab GTPase** の発現量および活性化の変化が関与している可能性が示唆されている。そこで、神経系セルラインを用いてエンドサイトーシス障害と関連のある **Rab GTPase** を人為的に過剰発現し、 $A\beta$ 蓄積への影響を明らかにする。また、**Rab** をターゲットとしたエンドサイトーシス障害の改善が可能か否かもあわせて検索する。

近年、オートファジーの **AD** 病変形成への関与が注目されている。そこで、神経系セルラインを用いて、オートファジーの誘導や阻害がエンドサイトーシス障害に伴う $A\beta$ 蓄積にどのような影響を及ぼすのかを検索し、治療ターゲットとしての可能性を検討する。

② $A\beta$ 病理から **Tau** 病理への移行（進行）メカニズムの検索

前年度までの研究成果により、持続的な長期抑圧（**LTD**）刺激によって **Tau** のリン酸化と蓄積が確認された。そこで、ラット初代培養神経細胞を用いて様々な手法で **LTD** 誘導を行い、最も効果的に内因性 **Tau** の病的変化を誘導する経路の同定を試みる。また、エンドサイトーシス障害が神経活動に及ぼす影響を明らかにするため、マウスのスライス培養系を用いて電気生理学的検索を行う。

③ カニクイザルを用いた老化に伴う各種遺伝子の発現解析

近年、**AD** 病態との関係性が注目されているオートファジー関連因子に注目し、カニクイザル脳組織における遺伝子発現レベルの老化に伴う変動を明らかにする。

（倫理面への配慮）

3年間全体について

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

3年間全体について

① 環境リスク因子による $A\beta$ 病理の増悪メカニズムの検索

Ⅱ型糖尿病を発症したカニクイザルの脳組織では、*srebf2* や *hmgcr* など、コレステロール合成を正に制御する因子の遺伝子発現亢進が確認され、コレステロールの輸送や取込みに重要な **ApoE**、**ABCA1**、**LRP1** の蛋白質レベルが上昇していることが明らかとなった。また、実際に生体膜画分におけるコレステロール量が健常群に比べて有意に上昇していることが明らかとなった。そこで、神経系株化細胞である **Neuro2a** 細胞に薬剤を用いて膜コレステロール量を人為的に増加させたところ、膜コレステロール量の増加はライソゾームの代謝機能を低下させることでエンドサイトーシス障害を増悪化し、 $A\beta$ の蓄積が有意に上

昇することが明らかとなった。

AD 患者の脳組織やⅡ型糖尿病患者の脳内では、初期エンドソームの輸送に関わる **Rab5** と、後期エンドソームの輸送ならびにライソゾームとの融合に必須の **Rab7** という 2 種類の **Rab GTPase** の蛋白レベル亢進が確認される。また、これまでの研究成果により、軸索輸送モーター蛋白質 **Dynein** の機能低下はリサイクリングエンドソームの輸送に重要な **Rab11** の蛋白レベルを変化させることが明らかとなっている。そこで、これらの **Rab GTPase** がエンドサイトーシス障害に伴う $A\beta$ の蓄積を改善するターゲットとして有用か否かを評価するため、**Neuro2a** 細胞とラット初代培養神経細胞を用いて検索を行った。その結果、**Neuro2a** 細胞に各種 **Rab** を過剰発現させた結果、**Rab7** と **Rab11** の過剰発現によって $A\beta$ の有意な蓄積が誘導されることが明らかとなった。また、あらかじめエンドサイトーシス障害を誘導した **Neuro2a** 細胞や初代培養神経細胞に **Rab** の機能を低下させる薬剤を処理したところ、各種 **Rab** の蛋白レベル亢進が抑制されるとともに細胞内 $A\beta$ の蓄積も有意に減少することが明らかとなった。さらに、過剰発現に頼らない新世代の **APP** ノックインマウスを用いた検索により、同薬剤は *in vivo* においても老化に伴う $A\beta$ の蓄積を抑制し、老人斑形成数の有意な減少が確認された。

近年、AD 患者の脳内でオートファジー関連遺伝子の発現量が低下していることや、オートファジーの誘導・活性化によって AD モデルマウスの病変形成が改善することが注目されている。しかしながら、オートファジーもまたエンドサイトーシスと密接に関与することから、老齢脳ではエンドサイトーシス障害の影響を受ける可能性が高い。そこで、エンドサイトーシス障害の生じている環境下でオートファジーを誘導したところ、従来の報告に反して $A\beta$ の蓄積が大幅に増悪することが明らかとなった。さらに、オートファジーの誘導は、それ自体がエクソソームの放出を阻害することで細胞内 $A\beta$ の蓄積を促進することが明らかとなった。

② $A\beta$ 病理から **Tau** 病理への移行（進行）メカニズムの検索

ラット初代培養神経細胞を用いて軸索輸送モーター蛋白質 **Dynein** の阻害剤である **cilobrevin D** やライソゾーム阻害剤である **chloroquine** 等を処理してエンドサイトーシス障害を誘導したところ、残念ながら **Tau** のリン酸化や蓄積といった病的変化は確認されなかった。そこで、ラット初代培養神経細胞の培養液中に **glycine** や **picrotoxin**（いずれも **LTP** を誘導）、**NMDA**（**LTD** 誘導）、**DHPG**（代謝型グルタミン酸受容体を介した **LTD**）などを添加し、様々な神経刺激を加えたところ、シナプス外 **NMDA** 受容体を介した **LTD** を長時間（24 時間）継続させたときのみ、内因性 **Tau** のリン酸化亢進を伴う著しい蓄積が確認された。一方、シナプス **NMDA** 受容体も含めた包括的な **LTD** の長期刺激は細胞毒性のみが誘導され、**Tau** の変化は確認されないことが明らかとなった。シナプス外 **NMDA** 受容体を刺激した場合に比べて効果は弱いものの、**NMDA** 受容体の阻害剤を添加した場合も **Tau** のリン酸化が誘導されることが明らかとなった。

これまでの研究成果により、エンドサイトーシス障害はシナプス小胞の輸送のみならず、

神経伝達物質の放出や取り込みにも大きく影響を及ぼす可能性が示唆されている。また、LTPやLTD発生時に生じるAMPARの局在変化はエンドサイトーシスによってコントロールされていることから、エンドサイトーシス障害が神経活動そのものに影響を及ぼす可能性は十分に考えられる。そこで、マウスの海馬スライスに軸索輸送モーター蛋白質 Dynein の阻害剤やクロロキンを処理してエンドサイトーシス障害を誘導したところ、ポストシナプスのみならずプレシナプスの機能も低下して神経活動が障害を受けることが電気生理学的に明らかとなった。

③カニクイザルを用いた老化に伴う各種遺伝子の発現解析

カニクイザル脳組織から抽出した mRNA のマイクロアレイ解析により、*app* や *mapt*、*apoe*、*ps1*、*ps2* などの AD 関連因子は年齢に寄らずほぼ一定の遺伝子発現レベルを保つことが明らかとなった。また、線虫やショウジョウバエなどで老化に伴い変動することが知られている *sirt1* や *sirt2* など、カニクイザルでは年齢によってほぼ一定であることが明らかとなった。一方、Ⅱ型糖尿病カニクイザルの脳内では、*srebf2* や *hmger* など、コレステロール合成を正に制御する因子の遺伝子発現亢進が確認され、蛋白質レベルにおいても発現量の亢進が確認された。

近年、アルツハイマー病患者の脳内ではオートファジー関連遺伝子の発現レベルが低下していることが注目されているが、カニクイザル脳組織においても老化に伴い *atg5* や *map1lc3a* などのオートファジー関連遺伝子の発現が低下することが明らかとなった。

平成30年度について

①環境リスク因子による A β 病理の増悪メカニズムの検索

AD 患者の脳組織やⅡ型糖尿病患者の脳内では、初期エンドソームの輸送に関わる **Rab5** と、後期エンドソームの輸送ならびにライソゾームとの融合に必須の **Rab7** という2種類の **Rab GTPase** の蛋白レベル亢進が確認される。また、これまでの研究成果により、軸索輸送モーター蛋白質 Dynein の機能低下はリサイクリングエンドソームの輸送に重要な **Rab11** の蛋白レベルを変化させることが明らかとなっている。そこで、これらの **Rab GTPase** がエンドサイトーシス障害に伴う A β の蓄積を改善するターゲットとして有用か否かを評価するため、**Neuro2a** 細胞とラット初代培養神経細胞を用いて検索を行った。その結果、**Neuro2a** 細胞に各種 **Rab** を過剰発現させた結果、**Rab7** と **Rab11** の過剰発現によって A β の有意な蓄積が誘導されることが明らかとなった。また、あらかじめエンドサイトーシス障害を誘導した **Neuro2a** 細胞や初代培養神経細胞に **Rab** の機能を低下させる薬剤を処理したところ、各種 **Rab** の蛋白レベル亢進が抑制されるとともに細胞内 A β の蓄積も有意に減少することが明らかとなった。さらに、過剰発現に頼らない新世代の APP ノックインマウスを用いた検索により、同薬剤は *in vivo* においても老化に伴う A β の蓄積を抑制し、老人斑形成数の有意な減少が確認された。

近年、AD 患者の脳内でオートファジー関連遺伝子の発現量が低下していることや、オー

トファジーの誘導・活性化によって AD モデルマウスの病変形成が改善することが注目されている。しかしながら、オートファジーもまたエンドサイトーシスと密接に関与することから、老齢脳ではエンドサイトーシス障害の影響を受ける可能性が高い。そこで、エンドサイトーシス障害の生じている環境下でオートファジーを誘導したところ、従来の報告に反して A β の蓄積が大幅に増悪することが明らかとなった。さらに、オートファジーの誘導は、それ自体がエクソソームの放出を阻害することで細胞内 A β の蓄積を促進することが明らかとなった。

②A β 病理から Tau 病理への移行（進行）メカニズムの検索

シナプス NMDA 受容体も含めた包括的な LTD の長期刺激は細胞毒性のみが誘導され、Tau の変化は確認されないことが明らかとなった。シナプス外 NMDA 受容体を刺激した場合に比べて効果は弱いものの、NMDA 受容体の阻害剤を添加した場合も Tau のリン酸化が誘導されることが明らかとなった。

これまでの研究成果により、エンドサイトーシス障害はシナプス小胞の輸送のみならず、神経伝達物質の放出や取り込みにも大きく影響を及ぼす可能性が示唆されている。また、LTP や LTD 発生時に生じる AMPA 受容体の局在変化はエンドサイトーシスによってコントロールされていることから、エンドサイトーシス障害が神経活動そのものに影響を及ぼす可能性は十分に考えられる。そこで、マウスの海馬スライスに軸索輸送モーター蛋白質 Dynein の阻害剤やクロロキンを処理してエンドサイトーシス障害を誘導したところ、ポストシナプスのみならずプレシナプスの機能も低下して神経活動が障害を受けることが電気生理学的に明らかとなった。

③カニクイザルを用いた老化に伴う各種遺伝子の発現解析

近年、アルツハイマー病患者の脳内ではオートファジー関連遺伝子の発現レベルが低下していることが注目されているが、カニクイザル脳組織においても老化に伴い atg5 や map1lc3a などのオートファジー関連遺伝子の発現が低下することが明らかとなった。

D. 考察と結論

3年間全体について

①環境リスク因子による A β 病理の増悪メカニズムの検索

II 型糖尿病を発症したカニクイザルと培養細胞を用いた研究活動により、II 型糖尿病は脳内のコレステロール代謝を変化させて生体膜に含まれるコレステロール量を増加させ、その結果として生じるライソゾームの分解機能低下が老化に伴うエンドサイトーシス障害を増悪して A β の蓄積を加速化させることが明らかとなった。コレステロールは脳内で最も重要な脂質の 1 つであり、孤発性 AD の最も強力な遺伝的リスク因子が脳内でのコレステロール輸送に関わる ApoE であることは、周知の事実である。このことから、II 型糖尿病もまたコレステロール代謝系の異常を介して AD 発症を加速化させている可能性が考えら

れ、コレステロール代謝系を正常に制御することが高齢者の AD 発症を予防する最も重要なターゲットである可能性が示唆された。

一方、エンドソームの輸送に不可欠の因子である Rab GTPase の過剰発現によって A β が蓄積すること、さらに Rab の機能を低下させる薬剤によってエンドサイトーシス障害を誘導した培養細胞や APP ノックインマウスにおける A β 蓄積を抑制することができたことから、Rab は老化に伴う A β 病理の進行を抑制し、AD の早期介入・病態進行抑制を目的とする薬剤のターゲット因子となり得る可能性が示唆された。今後はさらに検討を重ね、老化に伴うエンドサイトーシス障害をターゲットとする本格的な AD 予防・治療薬の開発研究へとつなげたい。

また、エンドサイトーシス障害の生じている環境下でオートファジーを誘導したところ、従来の報告に反して A β の蓄積が大幅に増悪することが明らかとなったこと、さらにオートファジーの誘導はエクソソームの放出を阻害することで細胞内 A β の蓄積を促進することが明らかとなった。また逆に、オートファジーの抑制はエクソソームの放出を促進することで細胞外への A β 排出を促進することが明らかとなった。興味深いことに、カニクイザルの脳組織でも老化に伴いオートファジー関連因子の発現レベルが確認され、その低下は A β 病理である老人斑が形成される以前から生じていることが確認された。また、老人斑はエクソソームマーカーに対する免疫染色で陽性を示すことから、エクソソーム由来の A β が老人斑を構成している可能性が従来から指摘されている。これらの結果から、老化に伴うオートファジーの低下は細胞内に蓄積した A β を細胞外へと排出するための代償性反応である可能性が示唆される。

②A β 病理から Tau 病理への移行（進行）メカニズムの検索

残念ながら、エンドサイトーシス障害処理単独による内因性 Tau への明確な影響は確認されなかった。このことから、Tau の病的変化は A β と異なり、単純に細胞内輸送系の障害だけで生じているものではないことが明らかとなった。一方、シナプス外 NMDA 受容体に対する LTD の長期持続刺激によって Tau のリン酸化と蓄積が確認されたことから、神経活動の変化・障害が Tau の病的変化をもたらす根本的要因である可能性が示唆された。また、シナプス NMDA 受容体も含めた包括的な LTD の長期刺激は細胞毒性のみが誘導され、シナプス外 NMDA 受容体を介した LTD を持続させたときのみ内因性 Tau のリン酸化と蓄積が確認されたことから、限局的な LTD の長期刺激が Tau の病的変化に重要である可能性が示唆された。また、NMDA 受容体の阻害剤によっても Tau のリン酸化が促進されたことから、シナプスにおける NMDA 受容体の機能障害が関係している可能性も考えられる。A β が最も蓄積する場所がシナプス領域であることを鑑みると、A β 病理期から Tau 病理期への移行には、シナプスでのグルタミン酸代謝の変化が重要であることが示唆された。

マウスの海馬スライスに軸索輸送モーター蛋白質 Dynein の阻害剤やクロロキンを処理してエンドサイトーシス障害を誘導したところ、ポストシナプスのみならずプレシナプスの機能も低下して神経活動が障害を受けることが電気生理学的に明らかとなったことから、

エンドサイトーシス障害による神経活動への影響は、従来想定していたポストシナプスにおける AMPA 受容体や NMDA 受容体の局在変化だけではなく、プレシナプスにおけるエクソサイトーシスも視野に含めて検索を続けていく必要性が確認された。今後、さらに両社の関係について検索を深めていきたい。

③カニクイザルを用いた老化に伴う各種遺伝子の発現解析

カニクイザル脳組織から抽出した mRNA のマイクロアレイ解析により、無脊椎動物を用いた研究で老化との関連が報告されている遺伝子群は、高等霊長類ではほとんど発現レベルが変動しないことが明らかとなった。これらの結果は、ヒトの老年性疾患を研究する上でカニクイザルの有用性を大いに支持するものと考えられる。一方、Ⅱ型糖尿病カニクイザルの脳内では、srebf2 や hmgcr など、コレステロール合成を正に制御する因子の遺伝子発現亢進が確認され、蛋白質レベルにおいても発現量の更新が確認された。本来、脳内の脂質代謝は血液脳関門によって末梢（または全身性）の脂質代謝と分離されていると考えられているが、本研究によって両者の間に何らかのクロストーク機構が存在する可能性が示唆された。末梢の脂質代謝異常がどのようにして脳内の脂質代謝異常を引き起こすのか、今後の更なる解析が必要であると考えられる。その結果、末梢の脂質代謝を改善することで脳内の脂質代謝を改善する方法を確立することができれば、少なくともⅡ型糖尿病による AD の発症リスクを軽減する新たな予防法の確立につながられる可能性が期待できる。

近年、アルツハイマー病患者の脳内ではオートファジー関連遺伝子の発現レベルが低下していることが注目されているが、カニクイザル脳組織においても老化に伴い atg5 や map1lc3a などのオートファジー関連遺伝子の発現が低下することが明らかとなった。培養細胞を用いた実験結果（①にて記載）から鑑みて、老化に伴うオートファジー関連遺伝子の発現量低下は細胞内に蓄積した A β を細胞外へと排出するための代償性反応である可能性が示唆される。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

平成30年度

1) Takeuchi S, Ueda N, Suzuki K, Shimozawa N, Yasutomi Y, Kimura N.

Elevated Membrane Cholesterol Disrupts Lysosomal Degradation to Induce β -Amyloid Accumulation: The Potential Mechanism Underlying Augmentation of β -Amyloid Pathology by Type 2 Diabetes Mellitus. Am J Pathol, 189(2): 391-404

doi: 10.1016/j.ajpath.2018.10.011. (2019).

- 2) 木村展之. アルツハイマー病理の促進機序. 月刊糖尿病 In Press
- 3) Kimura N. Type II Diabetes mellitus accelerates age-dependent A β pathology in cynomolgus monkey brain. Diabetes Mellitus: A risk factor for Alzheimer disease ? Springer (book) In Press.

平成 29 年度

- 1) Kimura N, Yanagisawa K. Traffic Jam Hypothesis: The Relationship Between Endocytic Dysfunction and Alzheimer's Disease. Neurochem Int S0197-0186(17): 30249-8 (2017).
- 2) 木村展之. 認知症研究におけるカニクイザルの有用性. 実験医学増刊 Vol.35 No.12 「認知症 発症前治療のために解明すべき分病態は何か？」 (2017).
- 3) Kimura T, Suzuki M, Akagi T. Age-dependent changes in synaptic plasticity enhance tau oligomerization in the mouse hippocampus. Acta Neuropathologica Communications 2017; 5:67
- 4) Maekawa M, Watanabe A, Iwayama Y, Kimura T, Hamazaki K, Balance S, Oba H, Hisano Y, Nozaki Y, Onishi T, Toyoshima M, Shimamoto C, Iwamoto K, Bundo M, Osumi N, Takahashi Y, Takashima A, Yoshikawa T. Polyunsaturated fatty acid deficiency during neurodevelopment in mice models the prodromal state of schizophrenia through epigenetic changes in nuclear receptor genes. Translational Psychiatry 2017; 7: e1229
- 5) Umeda T, Kimura T, Yoshida K, Matsuyama S, Takao K, Sakai A, Yamashita Y, Fujita Y, Suzuki M, Miyakawa T, Takashima A, Morita T, Mori H, Tomiyama T. Mutation-induced loss of APP function causes GABAergic depletion in recessive familial Alzheimer's disease: analysis of Osaka mutation-knockin mice. Acta Neuropathologica Communications 2017; 5:59
- 6) Suzuki M, Kimura T. Microtubule-associated tau contributes to intra-dendritic trafficking of AMPA receptors in multiple ways. Neuroscience Letters 2017; 653: 276-282

平成 28 年度

- 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).

- 3) Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y. Dynein Dysfunction Reproduces Age-Dependent Retromer Deficiency: Concomitant Disruption of Retrograde Trafficking Is Required for Alteration in APP Metabolism. *Am J Pathol* 2016, 186(7): 1952-1966
- 4) Ueda N, Tomita T, Yanagisawa K, Kimura N. Retromer and Rab2-dependent trafficking mediate PS1 degradation by proteasomes in endocytic disturbance. *J Neurochem* 2016, 137(4): 647-658
- 5) Ishiguro A, Kimura N, Watanabe Y, Watanabe S, Ishihama A. TDP-43 recognizes RNA G-quadruplex structures, and controls neurite mRNA transport for local protein synthesis. *Genes Cells* 2016, 21(5): 466-481

2. 学会発表

平成30年度

- 1) Kimura N, Takeuchi S, Ueda N, Suzuki K, Shimozawa N, Yasutomi Y. Elevated membrane cholesterol disrupts lysosomal degradation, leading to enhanced A β accumulation: a potential mechanism underlying exacerbation of A β pathology by type 2 diabetes mellitus. ADPD2019, 2019年3月29-30日, Lisbon (Portugal)
- 2) 白井均樹, 高山和也, 田谷郁実, 下田修義, 菊池裕. ゼブラフィッシュ Dnmt3aa の標的とするゲノム領域の同定第41回日本分子生物学会年会, 2018年11月30日, 横浜市
- 3) 岩波礼将, 下田修義, Michael Schorpp, Thomas Boehm. DNAメチル化を介した造血異常の次世代への継承. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年11月30日, 横浜市
- 4) Ishiguro A, Kimura N, Noma T, Kon T. Molecular mechanisms of interaction between ALS causative proteins and an RNA G-quadruplex. 第41回日本分子生物学会 2018年11月28日 神奈川県横浜市
- 5) Kimura N, Takeuchi S, Ueda N, Suzuki K, Shimozawa N, Yasutomi Y. Elevated membrane cholesterol aggravates endocytic disturbance, resulting in enhanced A β accumulation: a potential mechanism underlying exacerbation of A β pathology by type 2 diabetes mellitus. Society for Neuroscience 2018, 2018年11月4日, San Diego (USA)
- 6) 木村展之, 竹内真吾, 上田直也, 鈴木恵子, 下澤律浩, 保富康弘. 2型糖尿病によるA β 病理増悪化機構: 膜コレステロール増加とエンドサイトーシス障害. 第37回日本認知症学会 2018年10月13日 北海道札幌市
- 7) 木村展之, 竹内真吾, 上田直也, 鈴木恵子, 下澤律浩, 保富康弘. 膜コレステロールの増加はエンドサイトーシス障害を増悪化する: 2型糖尿病によるA β 病理増悪化メカニズムの解明. 第91回日本生化学会 2018年9月25日 京都府京都市

- 8) Kimura N, Takeuchi S, Ueda N, Suzuki K, Shimozawa N, Yasutomi Y. Type 2 diabetes mellitus aggravates endocytic disturbance via elevated membrane cholesterol: mechanism underlying augmentation of age-dependent A β pathology. 第 61 回日本神経化学会 2018 年 9 月 7 日 兵庫県神戸市
 - 9) 岩波礼将, 下田修義, Michael Schorpp, Thomas Boehm. DNA methylation controlling hematopoiesis. 第 24 回小型魚類研究会, 2018 年 8 月 26 日, 名古屋市
 - 10) Kimura N, Endo K, Kondo H, Adachi E, Shimozawa N, Yasutomi Y, Uchihara T. Age-Related Tau Pathology in Cynomolgus Monkey brain. 第 41 回日本基礎老化学会 2018 年 6 月 1 日 東京都葛飾区
 - 11) 下田修義, 上住円. Age-related DNA methylation changes are accelerated in regenerated tissues. 第 41 回日本基礎老化学会大会 2018 年 5 月 31 日, 東京都
 - 12) 坂口和弥, 橋本有弘, 下田修義. CyGnusPlotter: A user-friendly and cross-platform tool for plotting CpG distributions. 第 12 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2018 年 5 月 24 日, 札幌市
- 平成 29 年度
- 1) 石黒亮, 野間崇志, 木村展之, 昆隆英. グアニン四重鎖の酸化は TDP-43 による mRNA 輸送機能を阻害する. ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会) 2017 年 12 月 8 日 兵庫県神戸市
 - 2) Kimura N, Suzuki K, Tsuhiya Y. Concomitant disruption of retrograde trafficking induces intracellular accumulation of A β . ConBio2017 (第 90 回日本生化学会) 2017 年 12 月 6 日 兵庫県神戸市
 - 3) 竹内真吾, 下澤律浩, 保富康弘, 木村展之. 低グルコースに伴うオートファジーの亢進はエンドサイトーシス障害を増悪する. Conbio2017 (第 40 回日本分子生物学会) 2017 年 12 月 6 日 兵庫県神戸市
 - 4) 木村展之, 鈴木恵子, 土屋由加子. 逆行性軸索輸送の包括的機能低下が A β の細胞内蓄積を誘導する. 第 36 回日本認知症学会 2017 年 11 月 24 日, 石川県金沢市
 - 5) Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y. Dynein dysfunction impedes retromer trafficking and concomitant disruption of retrograde trafficking is required for the alteration in APP metabolism. Society for Neuroscience 2017, 2017 年 11 月 11 日, Washington DC (USA)
 - 6) Kimura N. Age-related endocytic dysfunction is involved in Alzheimer's disease pathology. 第 60 回日本神経化学会, 招待講演, 2017 年 9 月 9 日, 宮城県仙台市
 - 7) Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y. Concomitant disruption of dynein-mediated retrograde endosome trafficking impedes APP metabolism. 第 60 回日本神経化学会 2017 年 9 月 8 日 宮城県仙台市
 - 8) Kimura N, Ueda N, Tomita T, Yanagisawa K. Retromer and Rab2-dependent

trafficking mediate PS1 degradation by proteasomes in endocytic disturbance.

第 40 回日本基礎老化学会 2017 年 6 月 15 日 愛知県名古屋市

- 9) 木村哲也. タウの生理学的・病態生理学的機能について. 第 59 回日本老年医学会学術集会, 教育講演, 2017 年 6 月 14 日, 名古屋市

平成 28 年度

- 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, 2017 年 4 月 1 日, Vienna (Austria)
- 2) 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, 2016 年 12 月 2 日, 青森県青森市
- 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, 12 月 1 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, 12 月 1 日, 神奈川県横浜市
- 5) 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, 2016 年 11 月 14 日, サンディエゴ (米国)
- 6) 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 26 日, 福岡県福岡市
- 7) 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 β 病理. 第 39 回日本基礎老化学会, 2016 年 5 月 28 日, 神奈川県伊勢原市
- 8) 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 回エピジェネティクス研究会年会, 2016 年 5 月 19 日, 大阪府豊中市
- 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 28 日, 神奈川県伊勢原市

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(分担研究者：木村哲也)

出願番号：特願 2018-206594

出願日：平成 30 年 11 月 1 日

発明者：河合昭好、木村哲也、呼和哈斯

発明の名称：「タウオパチーの治療薬または予防薬のスクリーニング方法」

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。