

長寿医療研究開発費 平成30年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

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

3年間全体について

高齢化社会において認知症は解決が望まれている。認知症の創薬には認知症における病態の生物学的な理解が必須である。本研究ではアルツハイマー病（AD）の従来の創薬標的であるAβおよびタウを踏まえながら、危険因子、特に後天的危険因子である糖尿病および加齢に着目して解析を行った。まず動物モデルの解析から糖尿病とADが合併して初めて発現増加する遺伝子群を同定した。この遺伝子群にはヒトADで発現増加する遺伝子が豊富に含まれていることが判明した。その中には創薬標的となるような病態に重要な遺伝子が含まれていることが想定されたことから、遺伝子発現変化の強い順に、遺伝子欠損マウスの作製を行い、解析を行った。いくつかの遺伝子に関しては解析が進み、病態に深く関わるとされる知見が得られた。また興味深いことにAD合併糖尿病マウスでは糖尿病マウスに比し寿命が短くなることが判明した。このAD合併糖尿病マウスでは糖尿病マウスに比し、体重が減少しており、フレイル様の外見を示した。本マウス（18か月齢）の脳内ではアストロサイト・マーカーが増加しており、一方、6か月の若年ではこのマーカーはむしろ減少しており、ライフステージによる変化と捉えられた。さらにアストロサイトの一細胞解析などさらに病態を深く解析していく予定である。また米国データベースを用いて、糖尿病と認知症の関係について興味深い臨床研究の解析結果が得られた。糖尿病ありの人では糖尿病のない人に比べて、認知機能低下が早まることが確認されたが、その効果はAPOE遺伝子型に依存することが判明した。すなわち、APOEε4を持たない人において糖尿病は認知機能低下を早めるがAPOEε4を持つ人では糖尿病のそのような効果は認められなかった。その理由と

して糖尿病と APOEε4 が同様のメカニズムを共有している可能性が考えられた。さらに認知機能低下を寿命に置き換えても、同様の結果が得られた。本結果は米国データベースを用いたものであるため、今後は日本のデータを用いた解析を進めて行く予定である。また加齢に関しては独自の時間・空間的 Aβ 発現マウスを用いて、「Aβ に対する生反応が加齢によって変化する」という仮説を検証しようとしている。本研究期間において、時間・空間的 Aβ 発現マウスの系がワークすることを確認し、実際の仮説検証に向けて準備を進めている。さらに神経原線維変化進展モデルの導入、AD 剖検脳を用いた細胞老化の研究を加えつつあり、「糖尿病および加齢による認知症促進機構の解明」をさらに発展継続させていく。

#### 平成30年度について

これまで蓄積してきた研究成果の発表論文を複数、投稿あるいは準備中である。まず、糖尿病と AD の合併による寿命の短命化およびその機序に関する論文を投稿した。さらに米国データベースを用いた糖尿病と認知症の合併による認知機能低下に関する論文、および寿命に関する論文を別途、準備中である。また糖尿病と AD の合併で初めて発現増加する遺伝子群に関する最初の論文を準備中である。

進行中の研究としては、認知症創薬の標的分子の候補に関する知見が得られつつある。糖尿病と AD の合併で初めて発現増加する遺伝子群の複数の遺伝子に関して、その欠損マウスを作製し、興味深い結果を得た。この中にはミクログリアに関する知見や Aβ に関する知見が含まれる。

着任して2年半強となったが、室長・研究員・研究補助員などの人材確保、時間・空間的 Aβ 発現マウスや独自開発の ELISA や蛋白解析技術などの研究ツール、最近では高感度 ELISA システムなどの最先端の機器の導入など研究体制も整いつつある。

※複数年度の研究期間全体について記載し、その後当該年度の分を記載すること。

#### 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）

※研究開始当初より研究者に変更があった場合には、それぞれいつの年度に研究を行った研究者か分かるように記載すること。年度途中に変更があった場合には「(平成〇〇

年〇月〇〇日～平成〇〇年〇月〇〇日)」と記載しても差し支えないこと。

研究期間 平成28年9月1日～平成31年3月31日

#### 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薬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、先天の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。そのために、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、③A $\beta$ と神経変性を加齢により繋ぐ因子の解明、④A $\beta$ 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。

※複数年度の研究期間全体について記載すること。

#### B. 研究方法

3年間全体について

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Btg2, Cyr61, Fos, JunB, Dusp1などの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シス (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。さらに APP のリガンド候補を最新の部位特異的光親和性架橋法を用いて同定する。上記マウスをリガンドの有無で刺激し、AD 病理の修飾を調べる。

## 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。

### 平成30年度について

- ①「糖尿病による認知症促進の因子の解明」については、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 Btg2, Cyr61 のノックアウトマウスの解析を進めるとともに、同様の遺伝子として LSS のノックアウトマウスの作成を行う。また糖尿病合併 AD モデルマウスの寿命が短くなることについての機序の検討をさらに行い、論文としてまとめ投稿する。またこれまでのデータを整理し、論文化の可能性について検討するとともに、昨年度に引き続き実験系を立ち上げ、研究体制を整える。
- ②「老人斑と神経原線維変化(NFT)を繋ぐ因子の解明」については、剖検脳の入手を引き続き進めるとともに、これまでに立ち上げつつある ELISA について、さらなる導入や検証を行い、論文化へと近づける。
- ③「 $A\beta$  と神経変性を加齢により繋ぐ因子の解明」については、開発した時間・空間的  $A\beta$  発現マウスの妥当性を検証していくとともに、加齢依存的に変化する遺伝子についてデータベースをもとに検証する。また APP のリガンド候補を最新の部位特異的光親和性架橋法を用いて同定する。

④「A $\beta$ の産生を修飾する因子の解明と老化の影響」については、 $\gamma$ セクレターゼ酵素複合体へのAPPが最初に結合するサイトであるエクソサイトについてその構成を検討するとともに、A $\beta$ 産生に対する老化の検討を行う。

(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

3年間全体について

### 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うち、Btg2, Cyr61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巢上体の形で輸送し、野生型マウスに人工授精を行い、F1ラインを得、ジェノタイプングを行い、目的のラインを得(ヘテロ)、そのヘテロ同士を掛け合わせ、ホモマウスを得た。しかしながら、Cyr61マウスに関しては、ノックアウトにより胎生致死であることが判明したため、コンディショナルノックアウトマウスを大阪大学 真下知士博士らとの協力のもとに作製し、F1ラインを得た。このマウスにバッククロスを行いながら、実際にノックアウトできるかを確認した後、APPマウスと交配予定である。さらに、HEK293細胞において、Cyr61の発現によりA $\beta$ が増加することを見つけた。このA $\beta$ 増加機構を調べるため、Cyr61の欠損変異体コンストラクト、その安定発現株とリコンビナント蛋白を作成している。リコンビナント蛋白は大腸菌では代謝を受け、断片化している為、今後HEK細胞を含め、他の発現系に切り替えて行う。またBtg2ノックアウトマウスに関しては、本遺伝子が脳虚血でも増加することが報告されているため、両側頸動脈結索術(BCAS)を施し、白質障害への影響などを検討している。このBCASモデルにおいて抗Btg2抗体で染色すると障害領域の近傍にてグリア系細胞と考えられる細胞において発現の増加を認めた。共染色などの手法を用いて細胞種を同定し、虚血における役割を、ノ

ックアウトマウスを用いて検証する。

- 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。回収した糖尿病合併 AD モデルの検体の ELISA を用いた生化学的解析により、脳内の  $A\beta$  の量には変化はないが、炎症性細胞、特にアストロサイトが糖尿病合併 AD モデルマウスの脳内で増加していることが判明した。論文を投稿中である。
- 全米のデータベースを用いて APOE 多型と糖尿病の認知機能に関する影響を調べた。APOE 3 や APOE 2 多型では糖尿病存在下では認知機能の衰えが悪化していたが、AD 危険因子である APOE 4 多型では糖尿病の認知機能悪化との相関は認められなかった。また病理所見として、APOE 3 や APOE 2 多型では糖尿病存在下では血管病理頻度が増大したが、APOE 4 多型ではすでに血管病変頻度は増大しており、糖尿病の影響は認められなかった。これらの結果をまとめ論文投稿の準備中である。
- 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 AD 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は、データベース上で AD 患者の海馬で同様な発現変動が起きていること、およびそれらの発現を制御する転写因子として、Serum Response Factor (SRF) をはじめとするいくつかの転写因子群を同定した。それら結果について論文としてまとめ、投稿の準備をしている。
- 動物の行動実験解析ソフトを購入するとともに、必要な設備を整え、行動実験系を立ち上げた (水迷路、オープンフィールド、新規物体探索試験)。導入した水迷路実験系により、我々が過去に報告している若齢での糖尿病合併 AD モデルマウス (APP23 x ob/ob) の記憶学習障害 (Takeda et al., Pro. Natl. Acad. Sci 2010) の追試を行っている。さらに新規物体探索試験や、もう少し加齢させた上での、記憶学習能力の検討も並行してすすめるなど、今後の各遺伝子の病態における役割検討のための多角的な評価法を確立する。
- 糖尿病合併 AD モデルで発現が増加する LSS (ラノステロール合成酵素) 遺伝子や DUSP1 遺伝子に対するコンディショナルノックアウトマウスの作成を、大阪大学 真下知士博士らとの協力のもと進めている。特に前者は完成し、動物実験施設に導入された。その妥当性を確認するとともに、バッククロスをすすめた後、研究に使用する予定である。
- マイクロダイアリス実験のセットアップを進めており、パイロット試験として APP23 マウスでマイクロダイアリスを行い、 $A\beta$  の経時変化を検討中である。

## ② 老人斑と神経原線維変化(NFT)を繋ぐ因子の解明

- 最近、東京都医学総合研究所の長谷川成人博士らが、野生型マウスの脳内で神経原線維変化を引き起こすモデルを開発している。そのモデルを導入し、Amyloid 蓄積による影響や糖尿病による影響を、加齢という因子も考慮しつつ、検討していきたいと考えており、準備を進めている。そのようなモデルマウスの確立は、創薬モデルとして非常に有用なものとなる。
- 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、森島真帆博士らとの綿密な相談のもと、剖検脳の選択、切り出し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。特にタウについては、いくつかの ELISA を立ち上げ、AD 患者脳での反応性を比較していったところ、興味深い知見が得られ、論文としてまとめつつある。

## 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い、A $\beta$  の前駆体の発現を確認し、作成したマウスが設計通りに時間・空間的に A $\beta$  を発現することが示された。現在、このマウスを CAMKII-Cre マウスとかけて脳特異的に A $\beta$  を発現するマウスを作成中である。このマウスを用いて、我々の見出した糖尿病と AD の寿命への影響を検討する。
- 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)。A $\beta$  に対する生体防御反応を若年期と老年期で比較すべく、上記の時間・空間的 A $\beta$  発現マウスの数を増やしているところである。またデータベースの検索より、脳内で、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。上述のマウスでの遺伝子の発現変化とヒトのそれらを比較した論文作成案を練っているところである。
- in vivo* での APP 部位特異的光親和性架橋システムを構築のために、大阪大学所属時に *in vivo* での非天然アミノ酸発現系のコンストラクトの改変を行い、GFP を指標とし、非天然アミノ酸発現効率を 10 倍高めた。APP 部位特異的光親和性架橋のための APP 変異体コンストラクトをいくつか作成した。711-721 の領域の結合を調べたが、著名な結合は見られなかった。

## ④ A $\beta$ の産生を修飾する因子の解明と老化の影響

- $\gamma$  セクレターゼ酵素複合体への代表的な基質 C83 に絞り、共同研究者の大阪大学の丸山先生が解析を行った。 $A\beta$  の直接の前駆体である C99 と同じく、アミロイド前駆体蛋白 (APP) 由来の  $\gamma$  セクレターゼの基質に C83 がある。C83 は、C99 がエクソサイトと相互作用する主要なアミノ酸残基を欠いており、エクソサイトの結合メカニズムを観察できると考えた。部位特異的光クロスリンク法を用いて、単一アミノ酸レベルでの  $\gamma$  セクレターゼとの相互作用を直接調べ、C83 もエクソサイト構成蛋白と相互作用し、しかも C99 とは異なるアミノ酸残基であることを明らかにした。以上の事から、エクソサイトの結合にはアミノ酸配列の異なる基質を認識する柔軟性があることを発見した。また、一方で、エクソサイトでの基質結合は、APP 結合ペプチドや変異によって結合阻害された。このことから、エクソサイトへの結合を阻害する創薬の可能性が示唆された。
- $A\beta$  の産生を修飾する因子に対する老化の影響の検討を行う。その一環としてヒト AD 脳における細胞老化の役割を検証する倫理申請手続きや準備を進めている。
- $A\beta$  の産生を制御する薬剤をスクリーニング予定である。そのために必要な、細胞系や解析方法の確立を進めている。

平成30年度について

#### 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うち、Btg2, Cyr61 の研究をすすめた。まず、HEK293 細胞において、Cyr61 の発現により  $A\beta$  が増加すること発見した。この  $A\beta$  増加機構を調べるため、Cyr61 の欠損変異体コンストラクト、その安定発現株とリコンビナント蛋白を作成した。また Btg2 については、ノックアウトマウスの解析をすすめ、本遺伝子が脳虚血でも増加することが報告されているため、両側頸動脈結索術 (BCAS) を施し、白質障害への影響などを検討した。この BCAS モデルにおいて抗 Btg2 抗体で染色すると障害領域の近傍にてグリア系細胞と考えられる細胞において発現の増加を認めた。
- 糖尿病合併 AD モデルの検体の ELISA を用いた生化学的解析により、脳内の  $A\beta$  の量には変化はないが、炎症性細胞、特にアストロサイトが糖尿病合併 AD モデルマウスの脳内で増加していることが判明し、論文としてまとめ投稿した。
- 全米のデータベースを用いて APOE 多型と糖尿病の認知機能に関する影響を調べた。APOE 3 や APOE 2 多型では糖尿病存在下では認知機能の衰えが悪化していたが、AD 危険因子である APOE 4 多型では糖尿病の認知機能悪化との相関は認められなかった。また病理所見として、APOE 3 や APOE 2 多型では糖尿病存在下では血管病理頻度が増大したが、APOE 4 多型ではすでに血管病変頻度は増大しており、糖尿病の影響は認められなかった。これらの結果をまとめ論文投稿の準備中である。



- 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、そのような遺伝子は、データベース上で AD 患者の海馬で同様な発現変動が起きていること、およびそれらの発現を制御しうる転写因子として、Serum Response Factor (SRF) をはじめとするいくつかの転写因子群を同定した。それら結果について論文としてまとめ、投稿の準備をしている。
- 動物の行動実験解析ソフトを購入するとともに、必要な設備を整え、行動実験系を立ち上げた（水迷路、オープンフィールド、新規物体探索試験）。導入した水迷路実験系や新規物体探索試験により、我々が過去に報告している若齢での糖尿病合併 AD モデルマウス (APP23 x ob/ob) の記憶学習障害 (Takeda et al., Pro. Natl. Acad. Sci 2010) の追試を行った。
- 糖尿病合併 AD モデルで発現が増加する LSS (ラノステロール合成酵素) 遺伝子に対するコンディショナルノックアウトマウスの作成を、大阪大学 真下知士博士らとの協力のもと進め、動物を作製し、遺伝子動物実験施設に導入した。
- マイクロダイアリシス実験のセットアップを進めており、パイロット試験として APP23 マウスでマイクロダイアリシスを行い、 $A\beta$  の経時変化を検討した。

## ② 老人斑と神経原線維変化(NFT)を繋ぐ因子の解明

- 最近、東京都医学総合研究所の長谷川成人博士らが、野生型マウスの脳内で神経原線維変化を引き起こすモデルを開発した。このモデルを用いて、Amyloid 蓄積による影響や糖尿病による影響を、加齢という因子も考慮しつつ、検討していきたいと考えており、長谷川博士と話し合いを行い、そのモデルを導入することに快諾を得た。モデルの導入に必要な準備を進めた。そのようなモデルマウスの確立は、創薬モデルとして非常に有用なものと予想される。
- 東京都健康長寿医療センターの共同研究者である村山繁雄博士、森島真帆博士らとの綿密な相談を行い、剖検脳の入手導入方法についての方向性を定めた。そこで、一部の剖検脳を選択し、長寿研への輸送し、切り出しを行った。
- 剖検脳の解析に必要な  $A\beta$  やタウ、シナプスや炎症マーカーなどのいくつかの ELISA を立ち上げた。特にタウについては、いくつかの ELISA を立ち上げ、AD 患者脳での反応性を比較していったところ、特に中間～C 末側の抗体を組み合わせた ELISA ではタウの蓄積をよりよく反映することが分かるなど、興味深い知見が得られ、論文としてまとめつつある。

## 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 マウスのかかけせを行い、 $A\beta$  の

前駆体の発現を確認し、作成したマウスが設計通りに時間・空間的に A $\beta$  を発現することが示された。現在、このマウスを CAMKII-Cre マウスとかけて脳特異的に A $\beta$  を発現するマウスを作成中である。このマウスを用いて、我々の見出した糖尿病と AD の寿命への影響を検討する。

- 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 (Ccl3 および 4: Chemokine (C-C motif) Ligand3 および 4 など)。A $\beta$  に対する生体防御反応を若年期と老年期で比較すべく、上記の時間・空間的 A $\beta$  発現マウス の数を増やしているところである。またデータベースの検索より、脳内で、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。上述のマウスでの遺伝子の発現 変化とヒトのそれらと比較した論文作成案を練っているところである。
- *in vivo* での APP 部位特異的光親和性架橋システムを構築のために、大阪大学所属時 に *in vivo* での非天然アミノ酸発現系のコンストラクトの改変を行い、GFP を指標と し、非天然アミノ酸発現効率を 10 倍高めた。APP 部位特異的光親和性架橋のための APP 変異体コンストラクトをいくつか作成した。711-721 の領域の結合を調べたが、 著名な結合は見られなかった。

#### ④ A $\beta$ の産生を修飾する因子の解明と老化の影響

- $\gamma$  セクレターゼ酵素複合体への代表的な基質 C83 に絞り、共同研究者の大阪大学の 丸山先生が解析を行った。A $\beta$  の直接の前駆体である C99 と同じく、アミロイド前駆 体蛋白 (APP) 由来の  $\gamma$  セクレターゼの基質に C83 がある。C83 は、C99 がエクソサイト と相互作用する主要なアミノ酸残基を欠いており、エクソサイトの結合メカニズムを 観察できると考えた。部位特異的光クロスリンク法を用いて、単一アミノ酸レベルで の  $\gamma$  セクレターゼとの相互作用を直接調べ、C83 もエクソサイト構成蛋白と相互作用 し、しかも C99 とは異なるアミノ酸残基であることを明らかにした。以上の事から、 エクソサイトの結合にはアミノ酸配列の異なる基質を認識する柔軟性があることを 発見した。また、一方で、エクソサイトでの基質結合は、APP 結合ペプチドや変異に よって結合阻害された。このことから、エクソサイトへの結合を阻害する創薬の可能 性が示唆された。
- A $\beta$  の産生を修飾する因子に対する老化の影響の検討を行う。その一環としてヒト AD 脳における細胞老化の役割を検証する倫理申請手続きや準備を進めている。
- A $\beta$  の産生を制御する薬剤をスクリーニング予定である。そのために必要な、細胞系 や解析方法の確立を進めている。

#### D. 考察と結論

※「D. 考察」、「E. 結論」としても差し支えないこと。

##### 3年間全体について

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。この3年で糖尿病と認知症の寿命への影響に関する基礎的検討をメカニズムも含め、論文にまとめることができた(投稿中)。また糖尿病と APOE の寿命への影響および認知機能低下への影響に関するデータを得た(論文2報投稿準備中)。さらにモデルマウスにおいて糖尿病と AD が合併して初めて発現増加する遺伝子群にヒト AD で発現増加する遺伝子が豊富に存在することを見出した(論文執筆中)。さらにモデルマウスにおいて糖尿病と AD の合併により、グリア系細胞に興味深い変化が認められたことから、これらの一細胞解析といったより最先端の技術を利用した研究への発展が期待された。

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 AD 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。この3年で神経原線維変化の本態であるリン酸化タウの ELISA を用いた剖検脳の研究において今後の基盤となるデータが得られた(論文執筆中)。さらに東京都医学総合研究所の長谷川成人先生が開発した神経原線維変化進展モデルを導入したので今後の展開が期待できる。

③の研究からは、「A $\beta$  に対する生体防御反応」という AD 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、AD 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、AD 研究において重要な知見をもたらすことが期待される。この3年間でこの系がワークするこ

とが判明したので最初の論文化および、上記仮説の検証実験へと進めて行く。

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。本研究で用いる蛋白解析技術はまだ確立されていない未踏の領域である。この難問題を解決すれば画期的な成果が期待できると考えられる。

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。現在、複数の Factor X 候補分子に関して、遺伝子欠損マウスの作製、抗体の作成、および機能解析を進めている。さらに血液バイオマーカーとしての可能性などを臨床グループと研究体制を構築して検討を行っていく。認知症の緻密な生物学的な理解の基盤の上に創薬という目標が達成され则认为している。

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（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。特に運動に関しては最近、我々が提唱している運動と生活習慣動作をリンクさせる「マイ・エブリサイズ」の普及にもつながるのではないかと考えられる。

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

#### E. 健康危険情報

なし

※該当がある場合には年度別に記載すること。（班のすべての健康危険情報について記載すること。該当がない場合には年度区分をしないで「なし」と記載すること。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

平成30年度

#### 1. 原著

(分担研究者 福森)

- 1) Matsunaga H, Fukumori A, Mori K, Honda T, Uema T, Tomonaga K.  
Two neuropsychiatric cases seropositive for bornavirus improved by ribavirin.  
Jpn J Infect Dis, 71(5): 338-342, 2018.

(分担研究者 篠原)

- 1) Shinohara M, Shinohara M, Zhao J, Fu Y, Liu C C, Kanekiyo T, Bu G.  
5-HT<sub>3</sub> Antagonist Ondansetron Increases ApoE Secretion by Modulating the LXR-  
ABCA1 Pathway.  
Int. J. Mol. Sci, 20(6): 1488, 2019

#### 2. 総説

(主任研究者)

- 1) 里 直行  
認知症 アルツハイマー病の成因.  
日本臨牀 増刊号 老年医学 (下) 第76巻増刊号7 (通巻第1148号), 2018年8  
月31日発行.

#### 3. 著書、Chapters

(主任研究者)

- 1) 里 直行  
「アミロイドカスケード仮説について教えてください」「タウ蛋白とは何ですか,また  
アルツハイマー病への影響を教えてください」.  
理学療法士のための知っておきたい! 認知症知識Q&A, 2018年5月25日発行.

(分担研究者 篠原)

- 1) 篠原 充  
「認知症治療薬の歴史と今後の見通しについて教えてください」  
理学療法士のための知っておきたい! 認知症知識Q&A, 2018年5月25日発行.
- 2) Shinohara M, Sato N.

The Roles of Apolipoprotein E, Lipids, and Glucose in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease.

Diabetes Mellitus, A risk factor for Alzheimer's Disease. Volume 1128, Springer Nature. 【in press】

#### 4. 新聞・報道等

(主任研究者)

1) 里 直行

アルツハイマー病に対する治療薬開発：最近の話題.

薬事日報, 第 12071 号, 2018 年 9 月 21 日発行

平成 29 年度

#### 1. 原著

該当なし

#### 2. 総説

(主任研究者)

1) 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.

2) 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.

3) 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.

4) 里 直行

生活習慣病と認知症.

形成外科, 61(3) : 295-304, 2018.

5) 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 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.

(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.

3. 著書、Chapters

該当なし

4. 新聞・報道等

(主任研究者)

- 1) 里 直行 (メディア紹介)  
週刊エコノミスト 7 月 4 日特大号, 毎日新聞出版, 2017 年 6 月 26 日発行.
- 2) 里 直行  
認知症の 8 つのリスク.  
すべてがわかる認知症 2017, 週刊朝日 MOOK, 2017 年 8 月 15 日発行.
- 3) 里 直行  
最近のアルツハイマー病の薬物治療.  
薬事日報, 第 11923 号, 2017 年 9 月 22 日発行.

平成 28 年度

1. 原著

該当なし

2. 総説

該当なし

### 3. 著書、Chapters

(主任研究者)

1) 里 直行

糖尿病による認知症促進機構とその予防—糖・脂質代謝の観点から  
実験医学増刊「糖尿病研究の“いま”と治療の“これから”」編集＝綿田裕孝  
2017, Vol. 35 No. 2, 226-231

### 4. 新聞・報道等

(主任研究者)

1) 里 直行、綿田 裕孝

朝日新聞デジタル、平成 29 年 3 月 30 日 「糖尿病予防は認知症予防」  
認知症の患者さんとそのまわりの方々に「くすり」と「やすらぎ」を (最終回)

2) 里 直行、綿田 裕孝

朝日新聞デジタル、平成 29 年 2 月 9 日 「糖尿病予防は認知症予防」  
忘れることへの恐れやストレスを和らげる方法—見て思い出せばいい

3) 里 直行、綿田 裕孝

朝日新聞デジタル、平成 28 年 12 月 8 日 「糖尿病予防は認知症予防」  
脳の萎縮予防へ「マイ・エブリサイズ」の提案

4) 里 直行、綿田 裕孝

朝日新聞デジタル、平成 28 年 11 月 17 日 「糖尿病予防は認知症予防」

### 5. その他

(主任研究者)

1) 里 直行

理想の老い方・最期の迎え方をする方法—クリエイティブ・エイジングのすすめ  
大法輪 3月号 68-72

### 2. 学会発表

平成 30 年度

#### 1. シンポジウム、特別講演

(主任研究者)



- 1) Sato N  
Bidirectional interactions between diabetes and Alzheimer's disease.  
The Fourth ICAH-NCGG Symposium, May 10, 2018, Taipei, Taiwan.
- 2) 里 直行  
糖尿病とアルツハイマー病の悪循環の分子機構.  
第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年 11 月 30 日, 横浜市 (招待講演)
- 3) Sato N  
Bidirectional Interactions between Diabetes and Alzheimer's Disease.  
The 14th Internatinal Symposium on Geriatrics and Gerontology, Dec.1 st, 2018,  
Obu city (Invited)

(分担研究者 篠原)

- 1) 篠原 充  
APOE2 promotes longevity; a clinical and preclinical assessment.  
第 41 回日本基礎老化学会大会 日韓老化学会合同シンポジウム  
日韓合同シンポジウム 2, 2018 年 6 月 1 日, 東京都

## 2. 国際学会発表

(分担研究者 篠原)

- 1) 篠原 充  
Insights from biochemical analyses of regional distribution of Alzheimer's  
pathologies.  
ICN2018 TOKYO, 2018 年 9 月 26 日, 東京都

## 3. 国内学会発表

(主任研究者)

- 1) 里 直行  
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して.  
第 24 回創剤フォーラム若手研究会, 2018 年 9 月 22 日, 神戸市

(分担研究者 篠原)

- 2) 篠原 充  
アルツハイマー病危険因子 APOE の長寿に対する効果.  
第 7 回 大阪大学神経難病フォーラム, 2018 年 8 月 18 日, 吹田市

- 3) 篠原 充  
ポスター発表  
APOE2 promotes longevity: a clinical and preclinical assessment.  
第 37 回日本認知症学会学術集会, 2018 年 10 月 12 日, 札幌市
- 4) 篠原 充  
アルツハイマー病危険因子 APOE の認知機能や長寿に対する作用.  
第 20 回関西・中部認知症研究会, 2019 年 3 月 16 日, 京都市

(分担研究者 福森)

- 1) 福森 亮雄  
アルツハイマー病のアミロイドβ蛋白を切り出すγセクレターゼの基質認識機構.  
第 19 回関西・中部認知症研究会, 2018 年 9 月 29 日, 名古屋市
- 2) 福森 亮雄  
ポスター発表  
γセクレターゼのエクソサイトでの認識機構.  
第 37 回日本認知症学会学術集会, 2018 年 10 月 12 日, 札幌市

平成 29 年度

1. シンポジウム、特別講演

(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) 里 直行  
アミロイドβ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】，2017年11月4日，東京都.

4) 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】，2017年11月25日，金沢市.

5) 里 直行

糖尿病と認知症一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】，2017年12月17日，京都市.

6) 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，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. 国内学会発表

(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)

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, 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, 2018 年 3 月 17 日, 福岡市.

(分担研究者 福森)

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

平成28年度

1. シンポジウム、特別講演

(主任研究者)

1) 里 直行

糖尿病と認知症—原因と結果の双方向の関係

第40回日本神経心理学会学術集会 公募シンポジウム II 「認知症の食行動異常」

2016年9月16日 熊本

2) 里 直行

糖尿病と認知症

第38回日本臨床栄養学会総会・第37回日本臨床栄養協会総会 第14回大連合大会

ワークショップ 5 「高齢者糖尿病患者の栄養管理」2016年10月7日 大阪

3) 里 直行

糖尿病と認知症

第56回 近畿理学療法学会学術大会 シンポジウム3「認知機能改善のアプローチ—運動処方の可能性を探る—」2016年11月27日 和歌山

4) 里 直行

認知症の予防の最前線—糖尿病が認知症を促進する分子メカニズムの解明

脳心血管抗加齢研究会 2016 シンポジウム6「認知症における Topics (周辺情報・在宅を含めて)」2016年12月18日 東京

5) Sato N

Bidirectional Interactions between Diabetes and Alzheimer's disease: Exploring Therapeutic Options.

2nd Geriatric Innovation Forum, January 21th, 2017, Nagoya

6) Sato N

Bidirectional Interactions between Diabetes and Alzheimer's disease

The 7th BRI International Symposium 2017, Alzheimer's disease: Narrowing the gap between basic science and clinical application, March 11th, 2017, Niigata

2. 国際学会発表

(分担研究者 篠原)