

長寿医療研究開発費 2022年度 総括研究報告

糖尿病や加齢、APOE 遺伝子多型等の危険因子にも着目したアルツハイマー病の病態研究と治療標的の同定、次世代治療薬の開発 (21-12)

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

前年度 (2020 年度) までの長寿医療研究開発費「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(19-9)」および「危険因子にも着目したアルツハイマー病の治療標的の同定と治療薬の開発 (19-18)」、「国立長寿医療研究センター・東京都健康長寿医療センターの共同事業による、高齢者ブレインバンク・バイオリソースセンターの構築並びに老化・認知症の病態研究と治療開発 (20-6)」を継続・発展させる形で研究を行う。

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

篠原 充 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (副部長)

武倉アブトグプル 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (研究員)

村山 繁雄 大阪大学 子どものこころの分子統御機構研究センター (特任教授)

齊藤 祐子 東京都健康長寿医療センター 神経病理学 (部長)

福森 亮雄 大阪薬科大学 薬物治療学Ⅱ (教授)

A. 研究目的

① 糖尿病による認知症促進の因子の解明

これまでの研究において、糖尿病を合併させた新規アルツハイマー病モデルマウス (APP ノックインマウス) において寿命が短くなること、アストロサイトの **dysregulation** を伴うこと、また糖尿病マウスではミクログリアの性質が野生型と異なることを見出した。一方でこのモデルマウスは家族性変異 APP をヘテロで発現しているため 18 か月齢でも老人斑蓄積は認められず (Shinohara, Sato et al. FASEB J

2020)、よりアルツハイマー病態との関係性を理解するには 老人斑が蓄積する状態での解析が必要と考えられた。そこで、家族性変異 APP をホモで発現する糖尿病合併アルツハイマー病モデルマウスを作製し、老人斑を蓄積させることで、よりアルツハイマー病に近づけた場合の表現型を解析する。アルツハイマー病理、認知機能変化の評価など様々な解析を行う予定であり、特にアストロサイトやマイクログリアの変化にも着目したいと考えている。また、糖尿病と合併する従来のアルツハイマー病モデルマウス (APP23 トランスジェニックマウス) において特異的に増加する遺伝子のノックアウトの解析を進めており、興味深い知見が集積しつつある。単一細胞解析など新しい手法も取り入れて病態解明を行う。

② 加齢による認知症促進機構の解明

我々は時間・空間的に β アミロイド発現が制御可能な ROSA-APP マウスを大阪大学宮崎先生らとの共同研究により開発した。そのマウスを用いて加齢依存的な A β に対する生体防御反応の変化を検討する。また東京都総合医学研究所の長谷川先生らが開発したタウを脳に播種することによる神経原線維変化進展モデルを用いて加齢の影響を調べる。そのために、長寿研のエイジングファームの加齢マウスに加え、加齢促進マウスとして英国ケンブリッジ大学成田先生らが開発した Atg5i マウスを使用する。

③ APOE 遺伝子多型の作用機序についての研究、治療薬開発

APOE 遺伝子多型はアルツハイマー病の大きな危険因子であるが、同時に寿命にも影響を与えることが知られている。最近、我々は、APOE 遺伝子多型がアルツハイマー病の病理を介さずとも、認知機能や寿命に影響を与えることを報告した (Shinohara et al. *Ann Neurology* 2016, & *eLife* 2020)。これまでは米国の臨床データベースの解析を行ってきたことに加えて、長寿研の縦断研究である NILS-LSA のデータを解析するとともに、動物モデルで詳細な作用機序を検討する。また APOE そのものを標的とした治療薬開発も目指す。

④ 危険因子間の相互作用の検討

アルツハイマー病の個々の危険因子に着目した研究は数多くなされてきているが、それらの相互作用に着目した研究は少なく危険因子間の関係性は十分に分かっていない。実際に我々は最近、糖尿病と APOE 遺伝子多型の認知機能や神経病理に対する関係性を米国の臨床データベースを用いて解析すると、糖尿病と APOE4 多型には交互作用があることを見出し報告した (Shinohara et al., *Alzheimer's Dementia* (Amst) 2020)。そこで本研究ではその作用を長寿研の NILS-LSA データベースから追試検討するとともに、東京都健康長寿医療センターのヒト剖検脳解析からも検討する。また動物モデルの利用についても、長寿研で決められた一研究部の動物飼育限度数、研究費など様々な制限はあるが、前向きに検討する。

⑤ Aβやタウの蓄積機構についての作用機序の解明や、治療薬の開発

アルツハイマー病の中核病理であるAβやタウの分子病態については世界中で研究が多数なされてきたが、脳内でなぜ蓄積するかについてまだ不明であり、また治療法開発も課題が多いのが現状である。Aβの脳内領域分布に着目した剖検脳解析から、初期の全長型Aβの蓄積にはシナプスが関係し、後期のN末端が断片化されたAβの蓄積には他因子が関係している仮説を我々は提唱した(Shinohara et al., Brain 2017)。そこで解析手法を更に発展させ、タウの蓄積に関与する因子を同定する。これまでに脳内のタウ蓄積を正確に評価するELISAを開発しており、さらなる利用を行う。同定した因子については、細胞や動物モデルを導入し検証を進める。Aβを標的とした治療薬の開発も、新たな視点から並行してすすめる。

⑥ 認知症およびフレイルに対する次世代テイラーメイド全人医療の開発

認知症とフレイルとの関係を検証するとともに、機序を解明し、バイオマーカーを探索する。また運動と日常生活動作をリンクさせる「マイエブリサイズ®」および日々の予定を書き込み、行動を行ったら赤線で印をつける「コグマップ」を用いて認知症およびフレイルに対する全人医療の方法を開発する。

B. 研究方法

① 糖尿病による認知症促進の因子の解明(里:統括、篠原、武倉:実施)

我々が最近報告した家族性変異APPノックインマウスをベースにした糖尿病合併アルツハイマー病モデルマウスは、APPがヘテロで発現していたため18か月齢でも老人斑蓄積は認められなかった。そこで、新たに、家族性変異APPをホモで発現する糖尿病合併アルツハイマー病モデルマウスを作製し、老人斑が蓄積する、よりアルツハイマー病に近づけた場合の表現型を解析する。AD病理、認知機能変化の評価など様々な解析を行う予定であるが、先述の理由から特にアストロサイトやマイクログリアの変化に着目したいと考えている。また、別の糖尿病合併アルツハイマー病モデルで脳内で発現が増加した遺伝子群(Shinohara, Sato et al., 投稿中)の中で特に4つの遺伝子(Btg2, Cyr61, LSS, Dusp1)に着目し、そのノックアウトマウスを作製しており、それら遺伝子のアルツハイマー病、認知症における役割を解析するための研究を進める。

② 加齢による認知症促進機構の解明(里:統括、篠原、武倉:実施)

ROSA-APPマウスを用いて、時間・空間的βアミロイド発現の制御がマウスの系で機能することを確認しつつある。東京都総合医学研究所の長谷川先生らが開発したタウを脳に播種することによる神経原線維変化進展モデルを用いて加齢の影響を調べる。エイジングファームの加齢マウスに加え、加齢促進マウス(CD9;CD81 DKOマウスおよびAtg5i)を導入し、検討する。またアルツハイマー病剖検脳を用いて細胞

老化の役割も評価する。

- ③ APOE 遺伝子多型の作用機序についての研究、治療薬開発（篠原：統括&実施、齊藤、村山：検体提供）

APOE 遺伝子多型はアルツハイマー病の大きな危険因子であるが、同時に寿命にも影響を与えることが知られている。最近、我々は、APOE 遺伝子多型がアルツハイマー病の病理を介さずとも、認知機能や寿命に影響を与えることを報告した（Shinohara et al. Ann Neurology 2016、& eLife 2020）。これまでは米国の臨床データベースの解析を行ってきたことに加えて、長寿研の縦断研究である NILS-LSA のデータを解析するとともに、動物モデルで詳細な作用機序を検討する。また APOE そのものを標的とした治療薬開発も目指す。

- ④ 危険因子間の相互作用の検討（里：統括、篠原：実施、齊藤、村山：検体、データ提供）

米国臨床データベースを用いた我々自身の解析から糖尿病と APOE 遺伝子多型の間には交互作用があり、APOE4 非保因者でのみ糖尿病の認知機能の憎悪効果があり、それが糖尿病による血管病変の憎悪作用と関係する可能性を見出し報告した

（Shinohara et al., Alzheimer's Dementia (Amst) 2020）。そこで本研究ではそのような交互作用をさらに検証する。米国臨床データベースについて寿命など別の尺度を検討するとともに、長寿研の NILS-LSA データベースを用いた追試、東京都健康長寿医療センターのヒト剖検脳解析からも検討する。また動物モデルの利用についても、研究所で決められた一研究部の動物飼育限度数、研究費など様々な制限はあるが、前向きに検討する。

- ⑤ A β やタウの蓄積機序の剖検脳解析を基にした検討、および A β 治療薬の開発（篠原：統括&実施）

A β の脳内領域分布に着目した剖検脳解析から、初期の全長型 A β の蓄積にシナプスが関係し、後期の N 末端が断片化された A β の蓄積に他因子が関係していると提唱した。そこで解析の手法を更に発展させてタウの蓄積に関与する因子を同定する。これまでに脳内のタウ蓄積を正確に評価する ELISA を開発しており、さらなる利用を行う。同定した因子については、細胞や動物モデルを導入し検証を進める。A β を標的とした治療薬開発も、新たな視点から並行してすすめる。

- ⑥ 認知症およびフレイルに対する次世代テイラーメイド全人医療の開発（里：統括&実施 篠原：一部実施）

患者や介護者にやすらぎをとどける「マイエブリサイズ®」、「コグマップ」というオリジナルのメソッドの実用化に向けたエビデンスを構築するとともに、認知症やフレイルを予測できるバイオマーカーの探索、開発を行う。

（倫理面への配慮）

すべての基礎研究は事前に組み替え DNA および動物実験プロトコルなどが国立長寿医療研究センターで承認された後に開始する。組み換え DNA 実験に関しては平成 16 年 2 月に施行されたカルタヘナ法（遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律）を遵守し、規定に則った実験プロトコルを作成し遵守して研究を行う。加えて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）

「厚生労働省の所管する動物実験等の実施に関する基本指針」（平成 18 年 6 月 1 日科発第 0601001 号厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）

また、臨床試験およびヒト血液を用いた研究に関しては、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」（平成 26 年度文部科学省・厚生労働省告示第 3 号）を遵守する。国立長寿医療研究センターでの倫理委員会にそれぞれの研究についての申請を行う。

C. 研究結果

① 糖尿病による認知症促進の因子の解明（里：統括、篠原、武倉：実施）

- ・肥満糖尿病合併アルツハイマー病モデルの回収を終えた（18 か月齢、6 群、合計約 160 匹）。これまで通り、ELISA や免疫染色での解析をつづけるとともに、そのマウスを使用し、一細胞解析を行った（ $n=3 \times 4$ 群）。
- ・Btg2 ノックアウトマウスと 5XFAD を交配し、一部コホートについて行動実験を行い、脳組織などを回収した（9 か月齢、4 群、合計約 50 匹）。解析を引き続き進めていく。
- ・Cyr61,LSS コンディショナルノックアウト(flox)マウスと、Aldh111-Cre/ERT2（タモキシフェン投与により、アストロサイトに多く発現する Aldh111 プロモーターで Cre recombinase を発現する）マウス、および家族性変異 APP ノックインマウスとの交配をすすめた。その過程で、LSS flox × Aldh111-Cre/ERT2 のマウスにタモキシフェン投与をすると数日で死ぬことが分かった。その死因について調査中であるが、Aldh111 は肝臓や腎臓などの末梢組織にも発現しているため、末梢組織の機能不全もあるとみて、検討を続けている。Cyr61 flox × Aldh111-Cre/ERT2 のマウスは死ぬことはなかった。したがって、少なくとも LSS の機能を解析するには、Aldh111-Cre/ERT2 を用いるのでは難しいと考えられたため、GFAP-Cre/ERT2 を再度購入し、交配していく予定である。
- ・Duspl ノックアウトマウスと 5XFAD マウスとの交配をすすめた。

② 加齢による認知症促進機構の解明（里：統括、篠原、武倉：実施）

- ・ROSA-APP マウスと CamkII-Cre の交配をすすめ、若齢時と高齢時における APP 発現によって、脳内 A β 病理や、炎症などの病理への応答性の違いを検討してい

る。中齢時（12か月齢）から12カ月間 APP を発現すると、行動変容が起きることが観察できた。回収し、組織の解析を進めている。

- ・英国ケンブリッジ大学成田先生との共同研究のもと Atg5i を導入し、5XFAD マウスとの交配をすすめている。
- ・マウス脳虚血モデルにおいて凝集タウを脳に播種することによってタウの伝搬がどう影響するか評価し、昨年度の認知症学会で報告した。
- ・5XFAD マウスに凝集タウを播種するとともに、脳虚血を起こすことで、神経変性が起きないかどうか、検討を進めている。
- ・Btg ノックアウトマウスに凝集タウを脳に播種することによってタウの伝搬がどう影響するか評価している。

③ APOE 遺伝子多型の作用機序についての研究、治療薬開発（篠原：統括&実施、齊藤、村山：検体提供）

- ・APOE ノックインマウスを加齢させることでホームケージモニタリングでの測定による活動量にどのような変化がでるか解析を進めている。
- ・APOE と受容体との結合阻害作用を有する薬物の開発を進めている。薬物スクリーニングから得られた化合物について動物に投与すると血液中での APOE や脂質プロファイルの増加がみられ、APOE2 と同様の表現型を示すことが証明できた。また脳に直接投与することにより脳内の APOE 蛋白の増加がみられ、APOE2 と同様の表現型を示した。論文投稿の準備をしている。
- ・家族性アルツハイマー病の発症を防ぐ Christchurch 変異(R136S)をノックインしたマウスを作製し、5FAD や PS19 との交配を進めている。
- ・APOE4 の加齢に伴う認知機能低下作用について NILS-LSA のデータから解析し、論文を報告した（老化疫学研究部 西田裕紀子副部長らとの共同研究）。

④ 危険因子間の相互作用の検討（里：統括、篠原、齊藤、村山：検体、データ提供）

- ・NILS-LSA の長期縦断疫学データから糖尿病と APOE 多型の関係性を評価した。糖尿病の認知機能変化に対する影響が APOE 多型によって異なるデータが一部得られたが、それが認知機能全般に言えるのか、また年齢依存性があるのかなどを今後も検証していく。
- ・米国 NACC データベースを解析し、APOE 多型と肥満の認知機能に対する影響について興味深い知見を得た。論文を投稿している。

⑤ A β やタウの蓄積機序の剖検脳解析を基にした検討、および A β 治療薬の開発（篠原：統括&実施）

- ・マイクロアレイ解析から A β やタウの蓄積の領域分布と相関する遺伝子、経路について、ELISA や real-time PCR による検証作業を進めた。また動物モデルの解析

に先行して、細胞モデルでの解析も進めた。動物モデルの解析を進めている。

- ・家族性変異 PSEN1 にも有効な A β 産生阻害剤の検証作業を進めたところ、期待していた A β 38 の増加をもたらす化合物はないことが判明した。スクリーニングの再検討を考えている。
- ・A β t-42 と領域相関するカテプシンなどの分解酵素について検証を進めた。
- ・A β 1-42 が分解され A β t-42 が産生する実験系を立ち上げた。

⑥ 認知症およびフレイルに対する次世代テイラーメイド全人医療の開発（里：統括&実施、篠原：実施）

・アストロサイトマーカーGFAPやシナプスマーカーであるPSD95やSYT1, マイクログリアマーカーであるCD11bについてSIMOAによる超高感度ELISAの開発を行い、従来のELISAよりも感度が100~1000倍程度増加する測定系を開発することができた。またその他のELISAも立ち上げている。現在、脳神経外科の百田先生との共同研究のもと脳脊髄液や血液中においてこれら蛋白の測定が可能か否か、また疾病の有無の影響などについて、検討を進めようとしている。

・「マイエブリサイズ®」の効果検証評価に用いる身体／文化活動頻度質問票の臨床試験について大府市において検者間信頼性および再現性の検証試験を行った。両者ともに良好なデータが得られており、現在、論文（英語および日本語）作成・投稿中である。

・「コグマップ」を用いたストレス軽減に関する臨床試験については倫理審査を通過し、大府市と連絡を取り、10名について実施した。

D. 考察と結論

※「D. 考察」、「E. 結論」としても差し支えないこと。

本研究は、前年度（2020年度）までの長寿医療研究開発費「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（19-9）」および「危険因子にも着目したアルツハイマー病の治療標的の同定と治療薬の開発（19-18）」を引き継ぐ形でスタートした3年計画の2年目の研究である。

肥満・糖尿病合併ADマウスで初めて発現増加する遺伝子群の機能解析が進んでいる。さらに同マウスの単一細胞解析も進め、12検体の検討を終えデータ解析を行っている。またAPOEに着目した治療法の開発や真のADモデル動物の作成の試みも一步一步、進んでいる。当研究部の強みであるマウスとヒト・サンプルの両者の長所を生かして研究を進めることで効率的な目標達成が期待できる。さらにコホート研究データ・ベースを用いた遺伝因子と後天的危険因子の交互作用の報告なども進んでいる。今後は当センターの特色である研究所と病院の連携を生かした独自性のあるコホートの立案も重要であると考えられる。

一部には進捗に僅かながらの遅延が発生している項目はあるものの、全体的として順調に進んでいる。今後の研究成果が最終的な臨床へと還元され、アルツハイマー病の病態研究と治療標的の同定、次世代治療薬の開発を達成する成果をあげていきたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishita Y, Sala G, Shinohara M, Tange C, Ando F, Shimokata H, Sato N, Otsuka R. Effects of APOEε4 genotype on age-associated change in cognitive functions among Japanese middle-aged and older adults: A 20-year follow-up study. *Experimental Gerontology*. 2023 Jan;171:112036
2. Kasuga K, Kikuchi M, Tsukie T, Suzuki K, Ihara R, Iwata A, Hara N, Miyashita A, Kuwano R, Iwatsubo T, Ikeuchi T, Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Different AT(N) profiles and clinical progression classified by two different N markers using total tau and neurofilament light chain in cerebrospinal fluid. *BMJ neurology open*. 2022 Aug 10;4(2):e000321.

2. 学会発表

1. Sato N

INTERACTION BETWEEN APOE GENOTYPE AND DIABETES IN LONGEVITY AND DEMENTIA AD/PD™ 2023 March 28, 2023 Gothenburg, Sweden

2. 里 直行

認知症における肥満パラドックスとそのメカニズムの解明 41回 日本認知症学会学術集会 2022年11月27日 東京都

3. 武倉 アブドグブル、鈴掛 雅美、篠原 充、渡邊 淳、新堂 晃大、富本 秀和、長谷川 成人、里 直行

DS タウを用いたタウ伝播における慢性脳低灌流の影響の解明 第41回 日本認知症学会学術集会 2022年11月26日 東京都

4. 篠原 充、Ioana Olan、武倉アブドグブル、斉藤 貴志、西道 隆臣、成田 匡志、里 直行

ごく微量のAβ42の増加でも、肥満糖尿病と加齢下では脳の遺伝子発現に大きく影響する 第41回 日本認知症学会学術集会 2022年11月26日 東京都

5. 篠原 充、武倉アブドグプル、人見 淳一、Guojun Bu、里 直行
APOE 多型と肥満の認知機能への相互作用の検討 第 41 回 日本認知症学会学術集
会 2022 年 11 月 25 日 東京都
6. 篠原 充, Ioana Olan, 武倉アブドグプル, 斉藤貴志, 西道隆臣, 成田匡
志, 里 直行
ごく微量の $A\beta 42$ の増加でも、肥満糖尿病と加齢下では脳の遺伝子発現に大きく
影響する 第 64 回 日本老年医学会学術集会 2022 年 6 月 2 日 大阪市

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