

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03561

研究課題名（和文） 連関する全臓器の恒常性変化を可視化する技術を利用した認知症の超早期診断法開発

研究課題名（英文） Development of ultra-early diagnosis of dementia using technology to visualize homeostatic changes of all related organs

研究代表者

山本 正道（masamichi, yamamoto）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特任部長

研究者番号：70423150

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：生体内のATP動態を可視化する技術を用いて、連関する臓器の関係を明らかにし、認知症の早期診断に応用する取り組みが行われました。この技術により、細胞レベルから臓器レベルまでのATP量を計測することが可能になりました。この技術を用いた研究により、本来は腎臓に作用するSGLT2阻害薬が心臓のミトコンドリア機能改善に關与することが発見されました。さらに、認知症モデルマウスの実験により、脳の海馬の錐体細胞でATP量の低下が認知行動異常の3ヶ月前に生じることが明らかになりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内のATP動態を可視化する技術の開発により、細胞質とミトコンドリアのエネルギー代謝をマウスモデルでイメージングすることが可能になりました。SGLT2阻害薬（エンパグリフロジン）が心臓のミトコンドリア機能を改善することを発見し、その適応拡大やメカニズムの解明に重要な意味があります。さらに、認知症モデルマウスで早期の異常が起こる領域と時期を特定することができ、ヒト臨床試験への応用にも期待があります。これらの研究結果を通じて、臨床応用に向けた整備が進み、学術的・社会的に重要な成果となる可能性があります。

研究成果の概要（英文）：Using a technique to visualize ATP dynamics within the body, efforts were made to uncover the relationship between interconnected organs and apply it to early diagnosis of dementia. This technique enabled the measurement of ATP levels from the cellular to the organ level. Through research utilizing this technique, it was discovered that SGLT2 inhibitors, originally known to affect the kidneys, contribute to improving mitochondrial function in the heart. Additionally, experiments conducted on a dementia mouse model revealed that a reduction in ATP levels in the pyramidal cells of the hippocampus occurs three months prior to the manifestation of cognitive and behavioral abnormalities.

研究分野：代謝イメージング

キーワード：アデノシン三リン酸 エネルギー代謝 イメージング

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) モデルマウスの研究において、AD 発症前からミトコンドリア保護薬である MitoQ や ATP 量を増加させる AICAR を投与すると、AD の症状であるアミロイドブラーク形成や行動異常につながるシナプス損失を抑制することが報告されました (J.Neurosci. 31: 15703-15715, 2011, J. Alzhe. Dis. 43: 775-784, 2015)。しかし、ミトコンドリア異常などが現れてからこれらの投与を行った場合には抑制効果が見られなかったと報告されています。このことから、AD の根本的な治療には症状が現れる前の超早期の治療介入が必要であると考えられました。

AD の診断は、脳の MRI による海馬容積の低下、アミロイドや神経免疫炎症反応の可視化 PET 法、脳より放出される因子の高濃度存在を検出する髄液の臨床検査などによって行われます。脳画像解析では、数百から千個の立法ミリメートルという低解像度で診断が行われていますが、画像取得原理から高解像度化は限界に近づいています。また、高コストや低効率という課題も存在しています。髄液の検査は臨床診断において優れた方法ですが、侵襲性のためスクリーニングには向いていません。一方、早期診断法の開発では、血液や尿を対象とする質量分析を用いたタンパク質量定量技術 (multiplexed-multiple reaction monitoring) の解析が進められていますが、ELISA 法に適用可能なタンパク質はまだ見つかっていません (Annu Rev Med. 30, 413-430, 2017)。実際にどの時期から異常が生じ始めるのかについては、まだ十分に検討されていません。

AD では、糖尿病、心疾患、味覚障害、膵炎・膵がん、腎疾患などでみられる恒常性の破綻による多彩な臓器異常が報告されています。これらの異常の原因としては、血管傷害や神経傷害などが示唆されていますが、明確な結論には至っていません (Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 1863, 1078-1089, 2017)。

ATP 量は、筋収縮運動だけでなく、細胞内イオン濃度の調節やシグナル伝達のための分子のリン酸化、エピジェネティック制御に関わるクロマチンリモデリング因子の制御、タンパク質の状態制御など、恒常性の制御に関与しています。したがって、ATP 量の変化は恒常性の変化と関連していると考えられます。

このような背景から、最初に非臨床研究として、AD モデルマウスにおいて脳異常 (ATP 動態異常) がいつ発症し始めるのかを詳細に特定し、それに基づいて新たな AD 診断法の開発につながる非臨床研究を検討することとしました。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アルツハイマー病 (AD) の簡便かつ効率的な超早期診断方法 (参考: www.adni3.org) の確立に寄与し、非臨床評価基盤を構築することです。具体的には、以下の目標を追求します。

AD モデルマウスにおいて、脳内の ATP 動態異常が生じる時期と部位を同定する。

脳内の異常が生じる時期において、他の組織における ATP 動態異常の特定と機能解析を行う。

これらの研究を通じて、生体内で超早期に AD を診断する方法の確立に向けた非臨床評価研究を実施します。

3. 研究の方法

マウス生体内の ATP 動態の計測:

マウス生体内の細胞質およびミトコンドリア内の ATP 動態を計測するために、ATP に感受性のある GO-ATeam を全身に発現させました。このマウスに、イソフルラン気化麻酔薬を使用して麻酔し、気管挿管を行い、開胸手術を実施して心臓を表出した。その後、蛍光実体顕微鏡を用いて心

臓を観察しました。観察では、470/40nm の励起光を照射し、GFP(緑色蛍光タンパク質)の吸収光(515/30nm)および FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)の吸収光(570/40nm)を観察しました。その後、各蛍光の強度を ImageJ または Metamorph を用いて測定し、FRET/GFP 比を計算しました。

アルツハイマー病モデルにおける ATP 動態の計測:

・脳内の ATP 動態の経時的計測:

6 週齢の AD マウスを用いて、CA1 錐体細胞の長期観察のための手術を行いました。手術では、2%のイソフルラン麻酔下でマウスを麻酔し、プレグマより 2.0 mm 後方および 2.0 mm 外側(右側海馬直上)に直径 2.5 mm の円形の穴を開けました。皮質を最小限に除去し、海馬 CA1 上に位置する脳面を露出させ、イメージングウィンドウを埋め込みました。このイメージングウィンドウは、ポリカーボネートリングに底面に丸いカバーガラスが取り付けられた構造でした。さらに、カバーガラスの下部に結合性シリコンシートを取り付けることで、脳の位置ずれを抑制しました。1 週間の回復期間後、週ごとに 2 光子顕微鏡を用いて CA1 錐体細胞を観察しました。CA1 錐体細胞のイメージングでは、1.5%から 2.0%のイソフルラン麻酔下でマウスを麻酔し、自作の固定器具でマウスを固定し、ステージヒーターで保温しました。必要に応じて、痛みの管理のために Meloxicam(Metacam)または buprenorphine を投与しました。Leica の TCS SP8 MP と HC FLUOTARL 25 × /NA0.95 の水浸型対物レンズを搭載した倒立型多光子顕微鏡を使用して CA1 錐体細胞を観察しました。

・脳内の ATP 分布の詳細な計測:

マウスを 4.0%のイソフルラン麻酔で麻酔し、断頭した後に脳を取り出し、冷却されたリンガー液に浸しました。リンガー液には Ibuki #180 エアストーンを使用し、95%の酸素と 5%の二酸化炭素を供給しました。その後、ピプラトームスライサー(VT 1000S; Leica)を使用して 300 μm 厚の急性脳スライスを作製し、30 分の静置後、リンガー液で満たされたチャンバーに入れて顕微鏡のステージ上に配置しました。急性脳スライスは倒立型多光子顕微鏡で観察されました。

・全身の ATP 動態の計測:

マウスを 1.5%から 2.0%のイソフルラン麻酔で麻酔し、人工呼吸と ECG モニタリングで管理しました。体毛を電動クリッパーで剃り、電気メスにより胸腔と腹腔を露出させ、マウスを自作の固定器具で固定し、ステージヒーターで保温しました(Tokai Hit)。痛みの管理のために必要に応じて Meloxicam(Metacam)または buprenorphine を投与しました。PLAN APO 1.0 × 対物レンズ(Leica)を搭載した蛍光実体顕微鏡(M165FC; Leica)を使用して観察しました。蛍光発光ピークを解析するために、組織には ET470/40 で励起光を照射し、双視点蛍光 cMOS カメラ(ORCA-Flash 4.0, Hamamatsu photonics, Japan)で画像を取得しました。

4. 研究成果

マウス生体内で細胞質内とミトコンドリア内 ATP 動態を計測とその応用。

様々な工夫の末にマウス生体内で細胞質内とミトコンドリア内の ATP 動態を計測することが可能となりました。この計測手法の有用性を評価するために、SGLT2 阻害剤であるエンパグリフロジンが 2 型糖尿病モデルマウスの心臓エネルギー状態に及ぼす影響を検討しました。特に、エンパグリフロジンが糖尿病に伴う心不全に対して心機能を改善する可能性とそのメカニズムを評価しました。

糖尿病マウスモデル(db/db)を用いて、エンパグリフロジンを10週間投与しました。その後、エンパグリフロジンが心臓エネルギー代謝に及ぼす影響と心臓保護効果について評価しました(図1)。

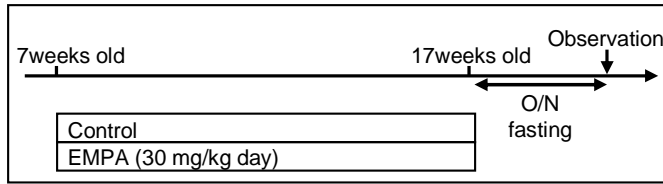


図1: エンパグリフロジンの投与計画

結果として、エンパグリフロジン投与により心臓エネルギー状態が著しく改善されました。具体的には、エンパグリフロジンはマウスの心臓において重要なエネルギー供給分子である ATP (アデノシン三リン酸) の細胞質内およびミトコンドリア内のレベルを増加させました(図2, 3)。この ATP 産生の増加は、心筋収縮などの細胞プロセスにおいて重要な役割を果たしています。

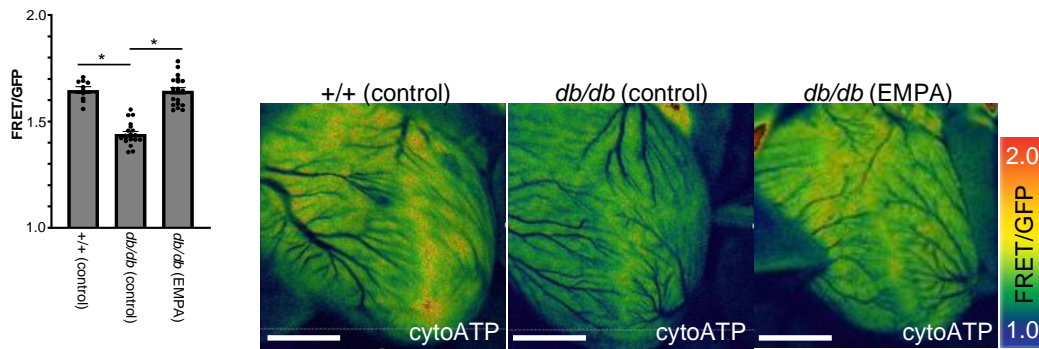


図2: エンパグリフロジン投与時の2型糖尿病モデルマウス心臓での細胞質内 ATP 量

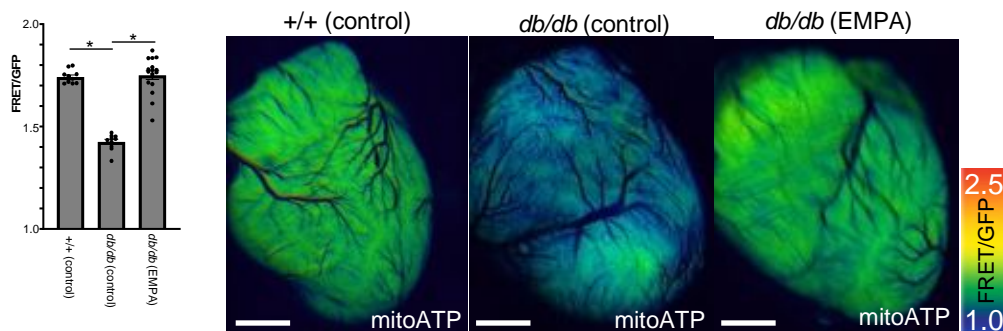


図3: エンパグリフロジン投与時の2型糖尿病モデルマウス心臓でのミトコンドリア内 ATP 量

さらに、エンパグリフロジン処置マウスで観察された ATP 産生の増加は、心臓のロバストネスの向上および虚血再灌流中の回復能力の改善と関連していました。具体的には、虚血再灌流は一時的に血流が遮断され、その後再灌流される状態であり、心臓の正常な機能回復能力は全体的な予後にとって重要です。

これらの結果は、エンパグリフロジンが心臓のエネルギー代謝にプラスの影響を与え、心臓保護効果を発揮する可能性を示唆しています。エンパグリフロジンによる ATP 産生の増加により、心臓はストレスに耐え、虚血性イベントからの回復能力が向上する可能性があります。これは、糖尿病や心血管疾患を抱える患者にとって非常に重要な成果であると考えております。

この研究の結論として、エンパグリフロジンが糖尿病マウスの心臓エネルギー状態にプラスの効

果をもたらすことが強調されました。エンパグリフロジン治療による ATP 産生の増加は、心臓保護剤としての潜在性を示唆しています。

アルツハイマー病モデルマウスにおける ATP 動態解析

細胞質内 ATP 動態可視化マウスと J20-hAPP マウスを交配させ、アルツハイマー病モデル ATP 可視化マウス(AD モデル ATP 可視化マウス)を作成しました。AD モデル ATP 可視化マウスは、ヒトの遺伝子組み換え技術によってアミロイドプロテイン前駆体 (hAPP (Swedish/Indiana mutation)) を過剰発現させた遺伝性アルツハイマー病マウスモデルです。

12 か月の AD モデル ATP 可視化マウスの脳内における ATP パターンを詳細に観察するために、脳から急性スライスを作成し、蛍光実体顕微鏡や二光子顕微鏡を使用して観察しました。その結果、AD モデル ATP 可視化マウスの脳スライス全体で ATP 濃度が野生型マウスに比べて減少していることが示されました(図4)。特に、基底前頭部のサブリージョン (PALv+NDB) と内側前頭部のサブリージョン (PL+ORBm) では、ATP の濃度が著しく低下していました。これらの脳領域はアルツハイマー病患者においても機能的な異常が認められる領域です。また、細胞レベルでも特に海馬内で ATP レベルのモザイク状の減少が観察されました。

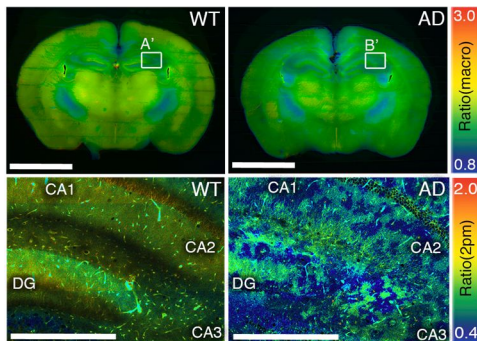


図4: 12ヶ月齢のアルツハイマー病モデル ATP 可視化マウスの脳内 ATP 分布

さらに、若い AD モデル ATP 可視化マウスの脳で早期段階の異常を探るために、海馬領域にイメージングウィンドウを外科的に装着し、ATP レベルを経時的に観察しました。その結果、AD モデル ATP 可視化マウスの海馬においては、8 週齢から既に ATP レベルが抑制されていることが検出されました(図5)。特に海馬領域 CA1、CA3、および DG の樹状突起においてこの傾向が顕著でした。これらの結果から、AD モデル ATP 可視化マウスの脳における異常な ATP レベルは、アルツハイマー病の初期段階(8 週齢)から既に存在し、病態の進行とともに異常な領域が広がっていく可能性が示唆されました。

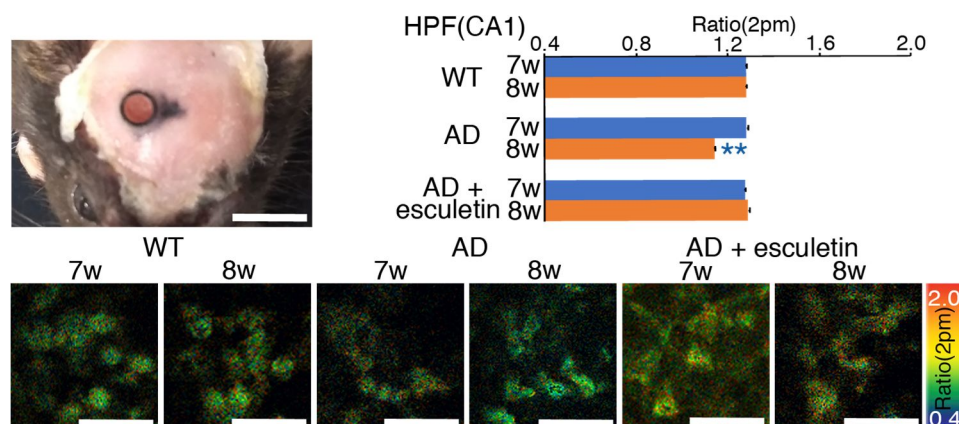


図5: 若年のアルツハイマー病モデル ATP 可視化マウスの脳内 ATP 分布 (CA1 錐体細胞)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Choi Jungmi, Matoba Naoki, Setoyama Daiki, Watanabe Daiki, Ohnishi Yuichiro, Yasui Ryuto, Kitai Yuichirou, Oomachi Aki, Kotobuki Yutaro, Nishiya Yoichi, Pieper Michael Paul, Imamura Hiromi, Yanagita Motoko, Yamamoto Masamichi	4. 巻 6
2. 論文標題 The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves cardiac energy status via mitochondrial ATP production in diabetic mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04663-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takenaka Tomofumi, Ohnishi Yuichiro, Yamamoto Masamichi, Setoyama Daiki, Kishima Haruhiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Glycolytic System in Axons Supplement Decreased ATP Levels after Axotomy of the Peripheral Nerve	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 0353-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0353-22.2023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa Keizo, Seno Shigeto, Yoshihara Toshitada, Narazaki Ayako, Sugiura Yuki, Shimizu Reito, Kikuta Junichi, Sakaguchi Reiko, Suzuki Norio, Takeda Norihiko, Semba Hiroaki, Yamamoto Masamichi, Okuzaki Daisuke, Motooka Daisuke, Kobayashi Yasuhiro, Suematsu Makoto, et al	4. 巻 22
2. 論文標題 Osteoclasts adapt to physioxia perturbation through DNA demethylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e53035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202153035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 He Jiazhou, Yamamoto Masamichi, Sumiyama Kenta, Konagaya Yumi, Terai Kenta, Matsuda Michiyuki, Sato Shinya	4. 巻 35
2. 論文標題 Two photon AMPK and ATP imaging reveals the bias between rods and cones in glycolysis utility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101121R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohnishi Yuichiro, Yamamoto Masamichi, Sugiura Yuki, Setoyama Daiki, Kishima Haruhiko	4. 巻 3
2. 論文標題 Rostro-caudal different energy metabolism leading to differences in degeneration in spinal cord injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Communications	6. 最初と最後の頁 fcab058
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/braincomms/fcab058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山本正道
2. 発表標題 マウス生体内のATP動態
3. 学会等名 がんとハイポキシア研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本正道
2. 発表標題 運動時のATP代謝動態解析
3. 学会等名 日本体力医学学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本正道
2. 発表標題 マウス生体内におけるATP動態の可視化
3. 学会等名 日本生理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本正道
2. 発表標題 マウス生体内におけるATP動態の可視化と応用
3. 学会等名 第94回 生化学学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本正道
2. 発表標題 マウス生体内におけるATP動態の可視化と応用
3. 学会等名 第147回 関西実験動物研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本正道
2. 発表標題 マウス生体内におけるATP動態の可視化
3. 学会等名 第99回日本生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本正道
2. 発表標題 マウス生体内のATP可視化技術によるアルツハイマー病の解明
3. 学会等名 日本認知症学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------