

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04154

研究課題名(和文) 糖尿病および加齢はなぜ認知症の危険因子なのか？

研究課題名(英文) Interactions between diabetes, aging and dementia

研究代表者

里 直行 (Sato, Naoyuki)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・部長

研究者番号：70372612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病がアルツハイマー病(AD)の危険因子である機序を調べるため、肥満・糖尿病合併ADモデルマウス脳の遺伝子発現を調べたところ、肥満・糖尿病合併ADモデルマウスに特有の遺伝子発現変化を認め、さらにADの原因と考えられているアミロイドは肥満・糖尿病マウスにおいて寿命を短くすることを見出し、そのメカニズムとしてミクログリアおよびアストロサイトの変容が認められた。またヒト臨床データを解析することにより、糖尿病による認知機能低下がAPOE遺伝子多型に依存すること、すなわち、APOE4の人よりAPOE2やAPOE3の人のほうが糖尿病による認知機能の低下が顕著であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会が進み、認知症、特にADが問題となっている。しかし、アミロイドを標的としたADの治療薬の開発が難渋している。我々は肥満・糖尿病合併ADモデルマウスの脳内の遺伝子発現や細胞特異的な変化を見出し、それらが新しい治療標的となる可能性を見出した。今後、本研究を継続・発展させることにより、画期的な認知症治療法の開発が期待される。また糖尿病による認知機能低下がAPOE遺伝子型に依存するという臨床的に意義のある知見も見出した。認知症におけるAPOEといった先天的因子と肥満・糖尿病といった後天的因子の交互作用は、学術的にも社会的にも意義のある重要な学問領域であることを提示した。

研究成果の概要(英文)：We performed the gene expression analysis of Amyloid Precursor Protein (APP); ob/ob mice, generated by crossing APP mice, which overexpress familial AD-linked APP mutation, and ob/ob mice, which are obese and mildly diabetic. Gene expression analysis showed the characteristic features of APP, ob/ob and APP; ob/ob mice. It is also well known that both diabetes and AD reduces life expectancy. We found that APP knock-in; ob/ob mice showed the shortest lifespan, compared to wildtype, APP knock-in mice, and ob/ob mice. While diabetes and apolipoprotein E (APOE) are both significant risk factors for AD, it remains to be clarified how they interact each other to contribute to the risk of AD. By reviewing the National Alzheimer's Coordinating Center (NACC) clinical records, we investigated whether diabetes affects cognitive decline depending on APOE genotype. Interestingly, diabetes was associated with earlier cognitive decline in APOE2 and APOE3 carriers, but not in APOE4 carriers.

研究分野：老年医学

キーワード：アルツハイマー病 肥満 糖尿病 グリア 遺伝子型

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

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 アミロイド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。しかし、問題の大きさから アミロイドやタウ以外の分子を標的とした次世代型認知症治療薬の開発が必要である。一方、AD の後天的な加齢や糖尿病が注目されているがその機序は十分に明らかとは言えない。

## 2. 研究の目的

本研究では アミロイドやタウを踏まえながら、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。

## 3. 研究の方法

### (1) 糖尿病による認知症促進の鍵分子 Factor X 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 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で、量的・質的に発現変化のある分子を同定する。これらの分子に関して in vitro 実験系で機能スクリーニングを行い、さらに遺伝子欠損マウスを作成し、APP マウスと交配して糖尿病負荷による認知機能の変化を検討し生体での機能解析を行う。特に候補遺伝子(Btg2, Cyr61, IL1 )ノックアウトマウスの解析、APP マウスとかけ合せと評価を行う。また、糖尿病 AD 合併で増加する遺伝子群を制御する転写因子の阻害剤の薬効評価を行う。さらに糖尿病合併 AD マウスが短寿命であるメカニズムを検討する。

### (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、アミロイドと NFT の missing link を見つける。またヒト剖検脳を、生化学およびトランスクリプトームを取り入れデータベースも参照しながら網羅的に解析し、老人斑と NFT を繋ぐ因子を検索する。ヒト剖検脳の追加入手(健常、老人斑優位、神経原線維型、AD の 4 群)による検体の解析と候補因子の検索を行う。候補因子の検索と細胞モデル、動物モデルを用いた妥当性の検討を行う。妥当性を確認された標的因子に関する解析およびそれを標的とする化合物の探索を行う。

### (3) アミロイドと神経変性を加齢により繋ぐ因子の解明

独自の時間・空間的 A 発現マウスを用いて「アミロイド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。また加齢依存的なアミロイド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。本マウスを用いて、「アミロイドに対する生体防御反応」への加齢による影響を、CamKII-Cre マウスとクロスし、mPFC (medial prefrontal cortex) 領域で発現させて検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 糖尿病による認知症促進の鍵分子 Factor X の解明

肥満・糖尿病合併 APP トランスジェニックマウス APP; *ob/ob* (Takeda, Sato, et al. PNAS 2010)の脳における遺伝子発現解析を RNAseq にて行い、クラスターに分類した。また AD 脳における遺伝子発現の公共データベースとの比較を行った。さらに *in silico* の解析によって、共通する制御分子の検討を行った。その結果、APP23 マウスや *ob/ob* マウスでは発現上昇が認められないが、APP;*ob/ob* マウスにおいて発現上昇する遺伝子群を見出した。この遺伝子群には AD 脳の海馬においても発現増加する遺伝子が多く認められた。この遺伝子群を制御する転写因子として X が *in silico* 解析によって同定された。X は最近、AD 脳の一細胞解析で重要な因子として報告されていることから、この遺伝子群に属する遺伝子の今後の解析は、AD そのものの病態の理解や AD と肥満・糖尿病の関係の理解に役立つと考えられる (Shinohara, Sato et al. 論文投稿中)。その遺伝子群の中から、遺伝子発現の高い順から遺伝子欠損マウスの作成を行い、解析を行っている。1 つの遺伝子に関してはミクログリア系細胞において細胞増殖抑制に関する遺伝子であることが示唆されたが、その KO マウスの脳虚血モデルを作成すると行動異常が増悪することが判明した。そのほか、1 つは細胞外分泌蛋白であり、アミロイドの産生に関与するというデータを得ており、また、さらにもう 1 つは脂質代謝に必須の遺伝子あり、それぞれコンディショナルノックアウトマウスを作成した。

また APP ノックインマウスと *ob/ob* マウスの掛け合わせマウスの解析により、アミロイドによる肥満・糖尿病マウスの寿命の短命化が確認され、そのメカニズムとしてミクログリアとアストロサイトの不均衡が示唆された (図 1 および 2、文献 1)

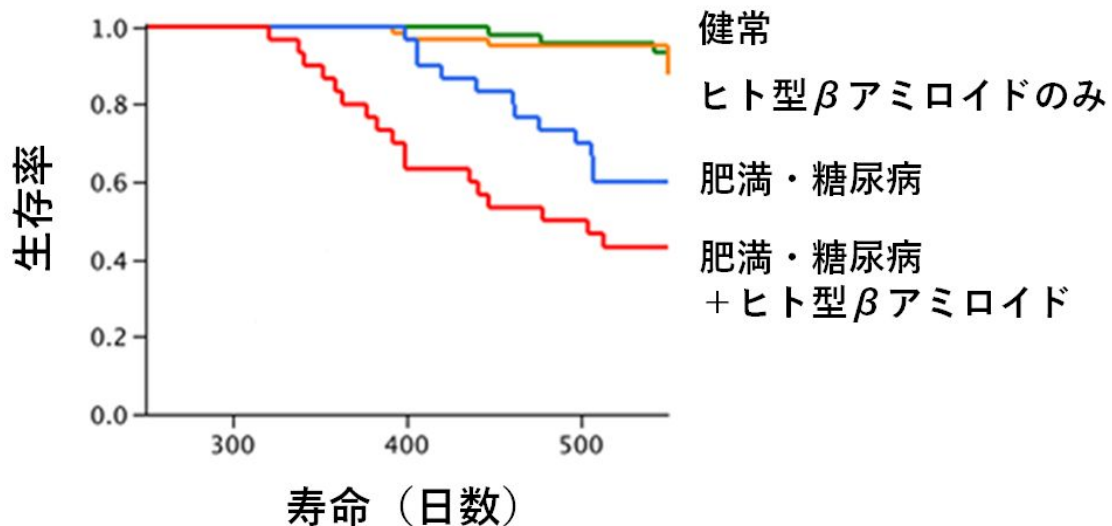


図 1 . アルツハイマー病の原因物質である アミロイドは肥満・糖尿病マウスにおいて寿命をさらに短くする

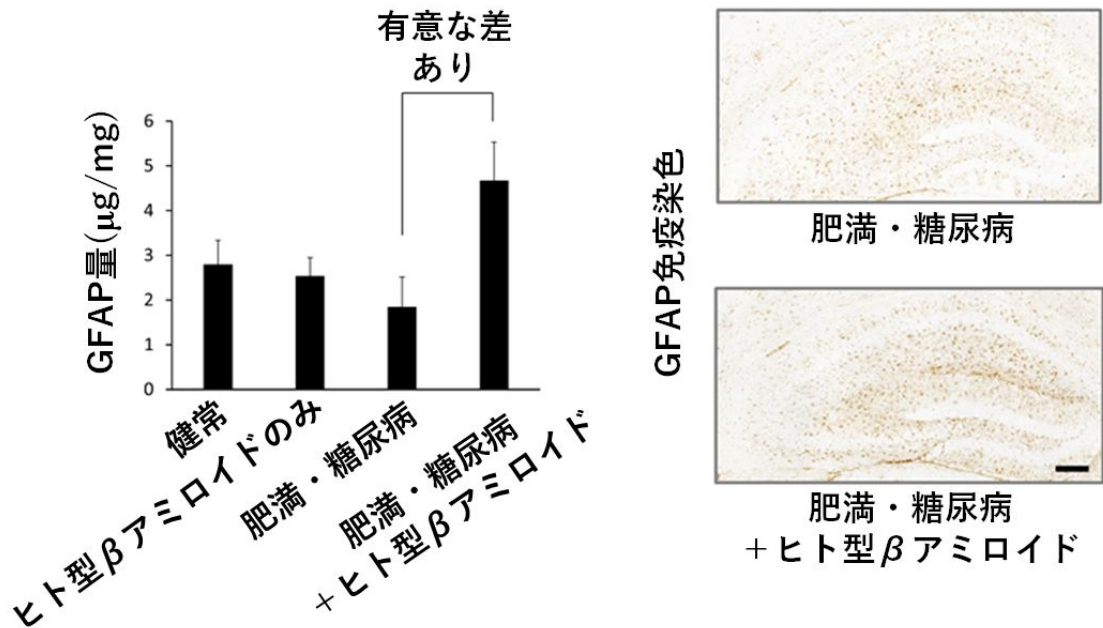


図2．肥満・糖尿病マウスの脳内に アミロイドが加わると、アストロサイトを構成する細胞骨格の一つ GFAP が増加する

今後はさらに APP ノックインマウスと ob/ob マウスの掛け合わせマウスにおけるミクログリアとアストロサイトそれぞれの単細胞解析を行うなど、さらなる分子機序の解明が期待される。また米国のデータベースを用いて糖尿病の認知機能低下への影響は APOE 遺伝子型に依存すること、すなわち APOE 4 の人より APOE2 や APOE3 の人のほうが糖尿病による認知機能低下への影響が顕著であることを報告した(図3、文献2)。さらにそのメカニズムとして APOE 4 の人ではすでに血管病変が存在することが示唆された(図4、同)。

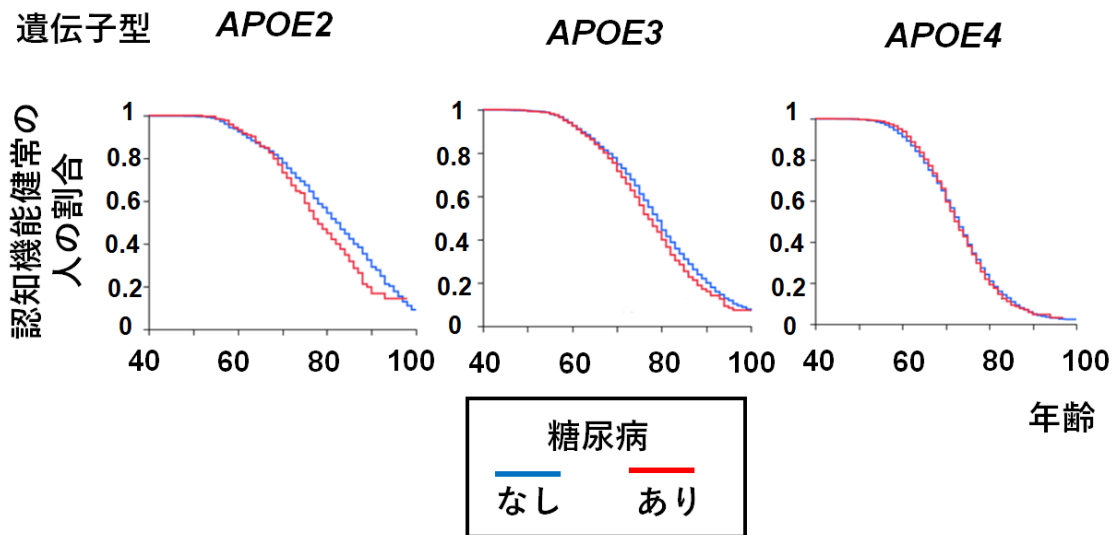


図3．APOE 遺伝子型別に見た糖尿病による認知機能低下への影響

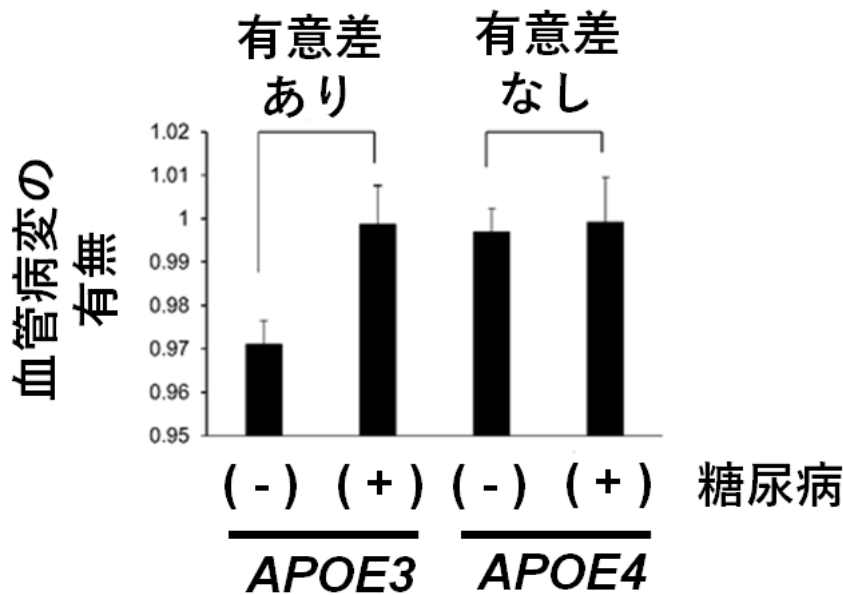


図4. APOE 遺伝子型および糖尿病の血管病変への影響

(2) 老人斑と神経原線維変化(NFT)を繋ぐ因子の解明

非AD型、老人斑優位型、AD型の臨床検体を用いて、細胞老化で誘導される因子のひとつであるYのmRNAの発現レベルを比較検討したところ、老人斑優位型で有意に発現の亢進がみられた。現在、詳細な解析を進めるために、文部科学省科学研究費助成事業 新学術領域研究「学術研究支援基盤形成」のコホート・生体試料支援プラットフォームとして、「ブレインリソースの整備と活用支援」の申請を行い、高齢者ブレインバンクより臨床検体の入手を進めている。

(3) アミロイドと神経変性を加齢により繋ぐ因子の解明

若齢期と老齢期におけるアミロイドに対する生体防御反応の変化の検討の為に、時間・空間的アミロイド発現マウスとして、これまでの研究により作製したROSA-tet-off-App K670N-M671L-I716FマウスとCre発現マウスとの交配を行い、ドキシサイクリン依存的なアミロイドの脳内発現を確認した。現在、若齢期と老齢期におけるアミロイド発現の実験群の取得を行っており、これによりアミロイドに対する生体反応の違いを若齢期と老齢期にて比較する。

(文献)

1. Mitsuru Shinohara, Yoshitaka Tashiro, Motoko Shinohara, Junko Hirokawa, Kaoru Suzuki, Miyuki Onishi-Takeya, Masahiro Mukouzono, Shuko Takeda, Takashi Saito, Akio Fukumori, Takaomi C. Saido, Ryuichi Morishita, Naoyuki Sato. Increased levels of Aβ42 decrease the lifespan of *ob/ob* mice with dysregulation of microglia and astrocytes. *The FASEB Journal*. 2020 Feb;34(2):2425-2435.
2. Mitsuru Shinohara, Yoshitaka Tashiro, Kaoru Suzuki, Akio Fukumori, Guojun Bu, Naoyuki Sato. "Interaction between APOE genotype and diabetes in cognitive decline" *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, 2020 Feb 6;12(1):e12006.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shinohara Mitsuru, Tashiro Yoshitaka, Shinohara Motoko, Hirokawa Junko, Suzuki Kaoru, Onishi Takeya Miyuki, Mukouzono Masahiro, Takeda Shuko, Saito Takashi, Fukumori Akio, Saido Takaomi C., Morishita Ryuichi, Sato Naoyuki	4. 巻 34
2. 論文標題 Increased levels of A $\beta$ 42 decrease the lifespan of ob/ob mice with dysregulation of microglia and astrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 2425 ~ 2435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901028RR	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 Shinohara Mitsuru, Tashiro Yoshitaka, Suzuki Kaoru, Fukumori Akio, Bu Guojun, Sato Naoyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Interaction between APOE genotype and diabetes in cognitive decline	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring	6. 最初と最後の頁 e12006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dad2.12006	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 該当する

1. 著者名 Mitsuru Shinohara, Naoyuki Sato	4. 巻 108
2. 論文標題 Bidirectional interactions between diabetes and Alzheimer's disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 296 ~ 302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2017.04.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 11件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Naoyuki Sato
2. 発表標題 Bidirectional interactions between obesity/diabetes and Alzheimer's disease
3. 学会等名 The 15th International Symposium on Geriatrics and Gerontology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 里 直行
2. 発表標題 糖尿病による認知症・アルツハイマー病促進のメカニズム
3. 学会等名 第116回日本内科学会総会・講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 里 直行
2. 発表標題 アルツハイマー病の基礎研究
3. 学会等名 第13回老年医学サマーセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 里 直行
2. 発表標題 糖尿病と認知症の基礎研究の最近の進歩
3. 学会等名 第34回日本糖尿病合併症学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoyuki Sato
2. 発表標題 Bidirectional interactions between obesity/diabetes and Alzheimer's disease.
3. 学会等名 Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities in Alzheimer's Disease（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 里 直行
2. 発表標題 神経変性を予測する血液バイオマーカーとしてのNeurofilament Light(NFL)概説
3. 学会等名 第9回日本認知症予防学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoyuki Sato
2. 発表標題 Bidirectional Interactions between Diabetes and Alzheimer's Disease
3. 学会等名 1) The 14th International Symposium on Geriatrics and Gerontology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 里 直行
2. 発表標題 糖尿病とアルツハイマー病の悪循環の分子機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 里 直行
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第24回創剤フォーラム若手研究会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Naoyuki Sato
2. 発表標題 Bidirectional interactions between diabetes and Alzheimer's disease
3. 学会等名 The 4th ICAH-NCGG Symposium
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 里 直行
2. 発表標題 Bidirectional interaction between diabetes and Alzheimer ' s disease
3. 学会等名 第10回NAGOYAグローバルリトリート 招待講演
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoyuki Sato
2. 発表標題 Bidirectional interaction between Alzheimer's disease and diabetes
3. 学会等名 The 3rd NCGG-ICAH Symposium--Satellite Symposium of 59th Annual meeting of the Japan Geriatrics Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 里 直行
2. 発表標題 アミロイド と糖尿病
3. 学会等名 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】 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 里 直行
2. 発表標題 糖尿病による認知症促進機構の解明
3. 学会等名 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】(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 里 直行
2. 発表標題 糖尿病と認知症－炎症性分子の関与も含めて
3. 学会等名 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 【超高齢社会を生き抜く歯周病予防・治療の考え方】(招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shinohara M, Sato N	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature Singapore Pte Ltd.	5. 総ページ数 17
3. 書名 Diabetes Mellitus, A risk factor for Alzheimer's Disease. Eds: Yusaku Nakabeppu & Toshiharu Ninomiya.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレスリリース アルツハイマー病原因物質 アミロイドは、肥満・糖尿病マウスの寿命を短くする 脳内グリア細胞の関与を示唆 <a href="https://www.ncgg.go.jp/camd/news/20191225.html">https://www.ncgg.go.jp/camd/news/20191225.html</a></p> <p>プレスリリース 認知機能低下への遺伝因子と後天的危険因子の相互作用を解明糖尿病の認知機能低下への影響はAPOE遺伝型により異なる <a href="https://www.ncgg.go.jp/camd/news/20200214.html">https://www.ncgg.go.jp/camd/news/20200214.html</a></p> <p>国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 ホームページ <a href="http://www.ncgg.go.jp/camd/department/nba/index.html">http://www.ncgg.go.jp/camd/department/nba/index.html</a></p>
---

## 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
研究分担者	津田 玲生  (Tsuda Leo)  (30333355)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・室長   (83903)	
研究分担者	村山 繁雄  (Murayama Shigeo)  (50183653)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長   (82674)	
研究分担者	櫻井 孝  (Sakurai Takashi)  (50335444)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・もの忘れセンター・センター長   (83903)	
研究分担者	宮崎 早月  (Miyazaki Satsuki)  (60452439)	大阪大学・医学系研究科・助教   (14401)	