

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11415

研究課題名（和文）運動により筋より放出されるmyokineを介したアルツハイマー病改善効果の検証

研究課題名（英文）Preventive Effect of amyloid beta production in Alzheimer's disease by myokines after exercise

研究代表者

木下 彩栄（Kinoshita, Ayae）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：80321610

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病への介入としての運動療法は疫学的研究の結果より極めて注目されている。我々は、ここに、筋より放出されるmyokineの関与に着目した。myokineの一種であるFNDC5はAPPの切断部位にBACE1と競合的に結合してBACE1の活性を低下させ、その結果として、A₄₀、A₄₂の産生を減少させることを示した。運動により、筋よりFNDC5が産生されると、それが切断されて短いペプチドであるirisinとなって血中を巡り、（不明な機序で）神経細胞に働きかけてA₄₀の産生を抑える可能性があることが推定され、運動によるアルツハイマー病の進行予防の機序の一つとなり得るかも知れない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病は現時点では根治療法がなく、現在開発されている治験薬も非常に効果であると言われていいる。また長期における副作用も懸念される。今後、高齢化の進行により、アルツハイマー病患者がさらに増加することは確実であり、運動療法のように、効果的かつ副作用のない介入が求められる。本研究のように、運動療法の効果の機序を解明することは、将来的にエビデンスを持った介入の確立に重要であり、新たな創薬のターゲットとなり得る。

研究成果の概要（英文）：Exercise therapy as an intervention in Alzheimer's disease has received much attention from the results of epidemiological studies. We focused here on the involvement of myokines released from muscle. It was shown that FNDC5, a type of myokines, competitively binds to BACE1 at the -cleavage site of APP to reduce the activity of BACE1 and, as a result, reduce the production of A₄₀ and A₄₂. When exercise produces FNDC5 from muscles, it may be cleaved into a short peptide, irisin, that circulates in the blood and acts on nerve cells (by an unknown mechanism) to suppress A₄₀ production. It is presumed that this may be one of the mechanisms for preventing the progression of Alzheimer's disease by exercise.

研究分野：神経内科学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド 老人斑 運動 マイオカイン

1. 研究開始当初の背景

本邦で 2025 年には認知症患者が 700 万人を超えるとされる。その 6/7 割を占めるアルツハイマー病の根治薬はまだ存在しない。世界中の研究者が、アルツハイマー病の原因物質である A β に対する治療薬の開発を進めているが、現在のところアメリカで条件付き認可を受けた Aducanumab のみが、A β に対して効果があるとされている。しかしながら、その効果は不十分であるとして、本邦および欧米では申請は承認されていない。その一方で、昨今、アルツハイマー病(AD)と生活習慣との関連性は疫学的に数多く示唆されてきている。特に、生活習慣への介入は、薬剤と違って安価ですむこと、長期に継続できること、そして AD のみならず生活習慣の改善により、さまざまな良い効果をもたらすというメリットがある。これまでの研究で、認知症発症の 20 年ほど前から脳内にアミロイド (A β) タンパク質が老人斑としてたまり始めているということが知られているため、preclinical な時期からの「副作用のない」介入が望まれている。そのため、生活習慣を改善させることでアルツハイマー病発症・進行を予防することに非常に大きな注目が集まっている。

中でも、これまでの国内外の研究結果より、アルツハイマー病の危険因子として「身体不活発 (physical inactivity)」の寄与が非常に大きいことが示されている (Barnes et al., Lancet Neurology)。新しく改定された 2017 年の認知症診療ガイドラインでも非薬物療法の中で「運動」のエビデンスレベルが最も高いとして推奨されるに至っている。このように、AD への介入としての運動療法は疫学的研究の結果より極めて注目されている。しかしながら、どのような機序を介して AD を改善しうるのか、という点についての研究は十分進んでいない。

これまでの研究では、運動が神経再生を促したり、運動が心血管系へ良い影響を与えることが、間接的に神経細胞にも良い効果があるという可能性が指摘されている。たとえば、2011 年に、Erickson らが有酸素運動により、健康なヒトの海馬の体積が増大したという結果を出している (Erickson et al., PNAS 2011)。

しかしながら、健康なヒトでなく、AD の病理への影響に対してはまだ十分に報告されていない。特に、AD の病理の中で最も早期に起きるアミロイド (A β) の蓄積に対する影響は十分に検討されているとは言えない。中でも、運動により A β が減少するのかという点は未解明であった。

申請者らは、これまでに、アルツハイマー病モデルマウスを用いた検討で、自発的な運動は、マウスの学習障害を改善し、脳内の A β の蓄積を減少させると言うことを報告してきた (Maesako et al., JBC 2011)。しかしながら、このメカニズムは十分にはわかっていない。今後、この機序について検討することは、運動がアルツハイマー病に対してどのように効果があるのかということをも分子レベルで解明することにつながり、また将来的に創薬のターゲットとなり得る分子を見いだす事にも役立つと考えられる。

2. 研究の目的

運動の関与を分子レベルで解明したいと考え、我々は、運動により筋より放出される myokine (cytokine の一種) の影響が関与しているという作業仮説をたてた。実際に、myokine の 1 種である FNDC5 に着目し、A β の前駆体である APP から A β への切り出しにどのような影響を与えるのかについて検討したいと考えて、本研究を立案した。

3. 研究の方法

A β は前駆体タンパク質 APP より切り出されて産生される。培養細胞系において、APP と FNDC5 をコードしたプラスミドを HEK293 細胞に強制発現させ、FNDC5 が A β 産生へ与える影響を、培養細胞の conditioned media に放出される A β の量を ELISA 法で測定した。2 種

類の APP の代謝産物である A₄₀ と A₄₂ の量を測定した。

また、これまでの研究で、FNDC5 が *in silico* で APP の切断酵素の一つである BACE1 切断部位近傍に結合しうる可能性を報告してきた。その *in silico* の結果を検証するために、実際に、FNDC5 が BACE1 の発現量や BACE 活性に与えるかどうかを、培養細胞の Western blotting や、BACE 活性測定にて検討した。

さらなる検討として、野生型マウスに回し車による自発運動を行うことができるような飼育環境で飼育し、自発運動後の筋および血中の irisin (FNDC5 から切り出されて生じる産物で、血中を circulate する代表的な myokine) を ELISA で測定した。

4. 研究成果

FNDC5 /irisin の A₄₀ 産生に与える影響

APP と FNDC5 を HEK293 細胞に強制発現させることで、培養上清中の A₄₀ を測定したところ、A₄₀, A₄₂ とともに著明に減少していることが示された。従来、A₄₀ は凝集しにくく、A₄₂ は凝集性が高く、アルツハイマー病において蓄積しやすいのは後者であると考えられている。しかしながら、本研究の結果、両者ともに産生を抑制することがわかった。この原因として、APP の N 末側の切断部位における切断が抑制されると、総 A₄₀ (A₄₀, A₄₂ の両者ともに) 産生が減少することが想定される。そのため、次の実験として、FNDC5/irisin が N 末側の切断酵素である BACE に与える影響を調べた。

FNDC5/irisin が BACE に与える影響

FNDC5 が *in silico* で APP の BACE1 切断部位近傍に結合しうることをすでに報告しているため、この部位で BACE との間で競争的阻害が起きる可能性を考え、BACE の活性について測定した。実際に、Western blotting および BACE 活性の検出において、BACE1 のタンパク量および活性は有意差を持って低下している事が明らかになった。これにより、APP が BACE1 の切断部位で切断されず、その結果として、APP-C99 が産生されないため、そこから セクレターゼによる切断を受けなくなり、A₄₀, A₄₂ とともに産生が減少するのではないかと示唆された。実際に、FNDC5 は C99 には結合するが、BACE1 切断部位を持たない C83 には結合しなかった。さらに、C99 への結合は、競争的なペプチドを添加することで抑制された。これらにより、FNDC5 は APP の切断部位 (BACE1 による) に BACE1 と競合的に結合して BACE1 の活性を低下させ、その結果として、A₄₀, A₄₂ の産生を減少させることが示された。

運動により、筋より FNDC5 が産生されると、それが何らかの切断酵素により irisin となって血中を巡り、(不明な機序で) 神経細胞に働きかけて A₄₀ の産生を抑える可能性があることが推定され、運動によるアルツハイマー病の進行予防の機序の一つとなり得るかも知れない。

in vivo における検討

上記はすべて培養細胞における検討であったため、次に *in vivo* における検討を行った。野生型のマウスに自発運動をさせることにより、血漿および筋肉由来の irisin (FNDC5 より切り出されてできる myokine) が変動するかどうかを検討した。残念ながら、irisin の濃度は大きく変動はしたものの、運動後の採血の時期によっても変動は認められ、生理学的な意義については不明であった。

今後は、実際にヒトの検体での測定や筋量との相関などを見ていきたいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asada-Utsugi M, Uemura K, et al.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Failure of DNA double-strand break repair by tau mediates Alzheimer's disease pathology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 岡橋さやか、木下彩栄	4. 巻 50
2. 論文標題 AR/VR 高次脳機能リハビリテーション	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 総合リハビリテーション	6. 最初と最後の頁 367-374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Tominari M, Uozumi R, Becker C, Kinoshita A	4. 巻 8
2. 論文標題 Reminiscence therapy using virtual reality technology affects cognitive function and subjective well-being in older adults with dementia. Cogent Psychology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cogent Psychology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Miao Y, Jurica P, Struzik ZR, Hitomi T, Kinoshita A Takahara Y, Ogawa K, Hasegawa H, Chichoki A	4. 巻 15
2. 論文標題 Dynamic theta/beta ratio of clinical EEG in Alzheimer's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Methods	6. 最初と最後の頁 109219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jneumeth.2021.109219	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 -

1. 著者名 Shimosaka M, Nishimoto H, Kinoshita A	4. 巻 in press
2. 論文標題 Analysis of clock-reading ability in patients with cognitive impairment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-215471	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Asada-Utsugi M, Uemura K, Kubota M, Noda Y, Tashiro Y, Uemura T. M, Yamakado H, Urushitani M, Takahashi R, Hattori S, Miyakawa T, Ageta-Ishihara N, Kobayashi K, Kinoshita M and Kinoshita A	4. 巻 14
2. 論文標題 Mice with cleavage-resistant N-cadherin exhibit synapse anomaly in the hippocampus and outperformance in spatial learning tasks	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00738-1.	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 -

1. 著者名 Peng Z, Nishimoto H and Kinoshita A	4. 巻 79
2. 論文標題 Driving Performance and Its Correlation with Neuropsychological Tests in Senior Drivers with Cognitive Impairment in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's disease	6. 最初と最後の頁 1575-1587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-201323	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野田泰葉、木下彩栄
2. 発表標題 最大の内分泌器官である筋の役割
3. 学会等名 日本整形外科学会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------