

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06910

研究課題名(和文)運動による認知症予防メカニズムの解明

研究課題名(英文)The mechanism of the prevention for dementia, focusing exercise therapy

研究代表者

野田 泰葉 (Noda, Yasuha)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：50784146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：認知症は、超高齢社会の本邦において大きな社会問題の一つであるが、根本的治療法は解明されていないため、いかにして認知症発症を防ぐか、あるいは進行を抑制するかが重要である。特に生活習慣病との関連性は疫学研究でも明らかとなっており、発症前の生活習慣改善は認知症予防に多いに有効と考えられる。申請者はこれまで、運動による認知症予防メカニズムを、運動に伴い発現が促進するタンパク質に着目し、アルツハイマー病原因タンパク質のアミロイド に対して抑制効果を発揮する事を明らかにする。更に動物を用いて、運動が認知症病態に対して予防、抑制効果を与える根拠、それに基づく早期運動介入やスクリーニングの意義を明らかにする。

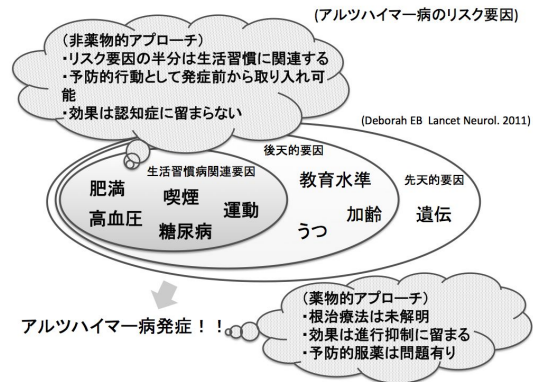
研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease is the principal disease causing dementia, and has not been completely cured. So it's so important to avoid the development and delay the onset of AD. The association between AD and life style disease is widely reported. We consider that the improvement of lifestyle can be suppress the pathogenesis of AD. Especially, we focus on exercise-related molecule X. We analysis of the effect of molecule X for A level, the most major cause in the AD pathology, furthermore we will reveal that by using intervention experiments using AD model mice.

研究分野：在宅医療看護学

キーワード：アルツハイマー病

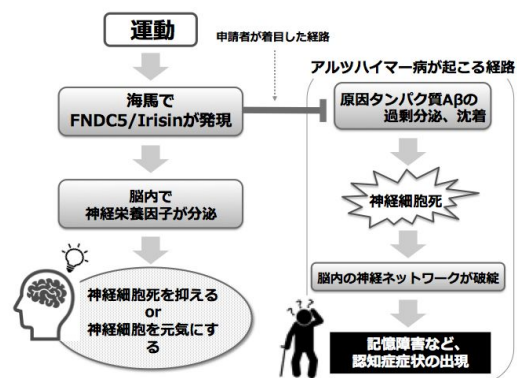
### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の本邦において認知症は重大な社会問題の一つであり、加齢との相関率は他の疾患と比較しても異常な高さである(朝田隆 et al. 認知症対策総合研究事業 総合報告書 2013)。認知症の主原因であるアルツハイマー病(AD)は未だ原因が明らかになっておらず、一刻も早い病態解明、根治療法の確立が求められる。AD 発症の最も有力な原因とされているのは、アミロイド β (Aβ) の脳への過剰沈着である。認知機能障害が呈する 20~30 年ほど前から Aβ 沈着が確認されていることから、この Aβ が AD 病態を引き起こす最初の因子と考えられている。Aβ を減少させるアプローチ方法が研究されているが、現時点では有効な薬剤は存在しない上、そのような薬剤が開発されたとしても、数十年に渡って発症予防のために飲み続けなければならないという点で倫理的・経済的な問題が残る。近年、生活習慣病が AD の後天的危険因子として注目されており、生活習慣病に関連する適切な治療により、AD 発症を予防できる可能性がある(Kivipelto M et al. Lancet Neurol 2017, Maesako M et al. Journal of Biological Chemistry 2012, SchlosserCovell GE et al. Neurologist 2015)。運動療法は薬剤療法と異なり、長期継続が可能であり、また安価である。更に生活習慣病治療の対策としてだけではなく、脳に対してポジティブな作用を持つ(Wrann CD et al. Cell Metabolism 2013)。従って、認知症にも効果を発揮する可能性があるが、実際に認知症予防として運動療法を取り入れるにはエビデンスが不足している。以上の背景から、申請者はアルツハイマー病予防のための運動療法を実践するにあたり、科学的エビデンスを確立する必要があると考えた。



### 2. 研究の目的

申請者は、運動に伴い発現が増加するタンパク質 X に着目し、培養細胞を用いた実験において Aβ との相互作用について検討してきた。発現したタンパク質 X が何らかの酵素によって分泌型となり、血中にホルモン Y として放出される。申請者は、このタンパク質 X もしくはホルモン Y が、Aβ に影響を与えるのかどうかを検討した。更に、この事象が in vivo でも証明できるのかどうかを、運動介入実験を通して明らかにすることを目的とした。また、ヒト血中バイオマーカーとしてこのホルモン Y が機能するかどうかを検証する。



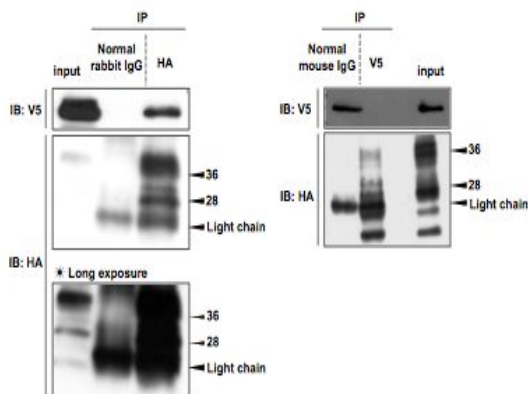
### 3. 研究の方法

培養細胞に Aβ 前駆体タンパク質 (APP) と運動関連タンパク質 X を一過性発現させた。C 末端側に V5 タグを付加した APP770、APP695 のプラスミドを作成し、

またタンパク質 X については HA タグを付加したプラスミドを作成した。両者の相互作用についてまずは免疫沈降法にて検証し、それぞれタグ抗体を用いて結合を検証した。内在性の APP とタンパク質 X の結合を検証するため、wild type のラットを入手し、海馬を単離し、ホモジナイズしたものを、APP (4G8) 抗体とタンパク質 X 抗体で免疫沈降を行った。また、これらの結合データを補足するデータとして、計算科学的技法を用いて結合モードをシミュレーションした。タンパク質 X に寄る A $\beta$  への影響の検討については、ELISA キットを用いて検証した。マウスを用いた実験に関しては、まずは実験開始のための条件検討から始めた。ヒトの検体サンプル (髄液) は、京都大学病院に通院する患者のうち、同意を得られた方から採取した。

#### 4. 研究成果

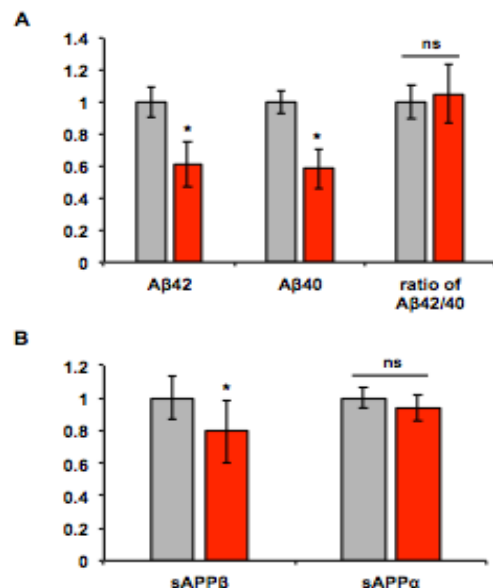
培養細胞系ではタンパク質 X を人工的に発現させる事で運動環境を模倣した。プラスミドに付加したタグ抗体で免疫沈降を行ったところ、APP とタンパク質 X が結合していることが明らかになった。



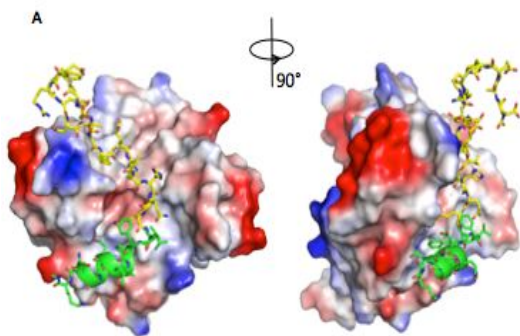
この結果は、8 週齢ラット (wild type) の海馬を用いた免疫沈降法でも同様に検出することができ、内在性の APP とタンパク質 X の結合を初めて明らかにした。

またタンパク質 X を一過性発現させた際の A $\beta$  を ELISA にて測定したところ、有意に A $\beta$  産生量が減少していた。

尚、この際の APP 発現量に変化は見られなかった。また APP は  $\beta$  セクレターゼもしくは  $\alpha$  セクレターゼという切断酵素によって切断された後、 $\gamma$  セクレターゼによって 2 回目の切断を受ける。 $\beta$  セクレターゼによって切断された APP の C 末端側フラグメントは C99 と呼ばれ、その後  $\gamma$  セクレターゼによって切断されるため A $\beta$  が産生されやすい一方、 $\alpha$  セクレターゼによって切断された C 末端側フラグメントは C83 と呼ばれ、これはその後  $\gamma$  セクレターゼに切断されても A $\beta$  を産生しない (Hardy J, Selkoe DJ et al. Science 2002)。今回申請者が行った研究では、タンパク質 X の発現によって、C99 に有意な変化は見られなかったものの、C83 は増加していた。これらの結果から、タンパク質 X を発現させることにより、 $\alpha$  セクレターゼによる切断亢進、すなわち A $\beta$  が産生されにくい経路が誘導されていることが示唆された (グレーのバーはタンパク質 X を発現していない場合であり、赤のバーはタンパク質 X を発現させた場合を示している)。

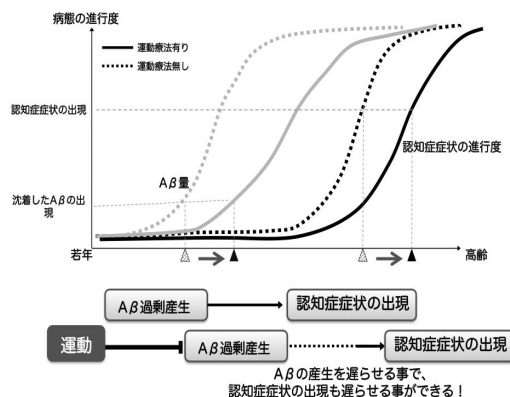


また、APP とタンパク質 X が結合すると仮定した際の結合モードについて、シミュレーションを行った。タンパク質 X がダイマー化する事でできる溝のようになった所に、APP の C 末端がはまる形で結合する事が予測された。これらは、もしこのタンパク質が創薬ターゲットを見つける上でのキータンパク質となる場合に、非常に有用なデータになると考え、補足データとして獲得したデータである。これらの結果に関しては、現在論文として纏め、投稿準備中である。



マウスの条件検討に関しては、野生群とアルツハイマー病モデル群のマウスをそれぞれ繁殖中の状況である。また、preliminary ではあるが、野生群と変異群に運動負荷を行っても、認知機能等の差が客観的に評価しづらいため、運動の効果を評価しやすい条件を更に検討する必要がある。

(予想される結果)



血中バイオマーカーとしてのホルモン Y の有効性については、現在髄液・血清サ

ンプルを取得している最中である。

(参考文献)

- 1) 朝田 隆 認知症対策総合研究事業 総合報告書 2013
- 2) Kivipelto M, Mangialasche F, Ngandu T: **Can lifestyle changes prevent cognitive impairment?** *Lancet Neurol* 2017, **16**:338-339.
- 3) Maesako M, Uemura K, Kubota M, Kuzuya A, Sasaki K, Hayashida N, Asada-Utsugi M, Watanabe K, Uemura M, Kihara T, et al: **Exercise is more effective than diet control in preventing high fat diet-induced beta-amyloid deposition and memory deficit in amyloid precursor protein transgenic mice.** *J Biol Chem* 2012, **287**:23024-23033.
- 4) Schlosser Covell GE, Hoffman-Snyder CR, Wellik KE, Woodruff BK, Geda YE, Caselli RJ, Demaerschalk BM, Wingerchuk DM: **Physical activity level and future risk of mild cognitive impairment or dementia: a critically appraised topic.** *Neurologist* 2015, **19**:89-91.
- 5) Wrann CD, White JP, Salogiannis J, Laznik-Bogoslavski D, Wu J, Ma D, Lin JD, Greenberg ME, Spiegelman BM: **Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1alpha/FNDC5 pathway.** *Cell metabolism* 2013, **18**:649-659.
- 6) Hardy J, Selkoe DJ: **The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.** *Science* 2002, **297**:353-356.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Masakazu Miyamoto, Akira Kuzuya,

Yasuha Noda, Kengo Uemura, Megumi Asada-Utsugi, Yoshiyasu Fukusumi, Hiroshi Kawachi, Shinji Ito, Ryosuke Takahashi, Ayae Kinoshita.  
SV2B can regulate BACE1 localization in the hippocampus. Journal of the Neurological Sciences 2017

〔学会発表〕(計 2件)

Masakazu Miyamoto, Akira Kuzuya, Yasuha Noda, Kengo Uemura, Megumi Asada-Utsugi, Shinji Ito, Yoshiyasu Fukusumi, Hiroshi Kawachi, Ryosuke Takahashi, Ayae Kinoshita  
SV2B can regulate BACE1 localization  
第 59 回日本神経学会 (札幌)

宮本 将和、野田 泰葉、葛谷 聡、植村 健吾、浅田-宇津木 めぐみ、伊藤 慎二、福住 好恭、河内 裕、高橋 良輔、木下 彩栄  
シナプスにおける新規の BACE1 活性制御タンパクの探索  
第 40 回神経科学大会 (幕張) 2017

第 39 回日本神経科学会 神戸 2016  
P1-322 Yasuha Noda, Akira Kuzuya, Masato Maesako, Yoshitaka Tashiro, Megumi Asada, Masakazu Miyamoto, Hirofumi Yamashita, Kengo Uemura, Ryosuke Takahashi, Ayae Kinoshita et al.  
The effect of fibronectin type 3 domain-containing protein 5 (FNDC5) for the pathogenesis of alzheimer's disease

Masakazu Miyamoto, Akira Kuzuya, Yasuha Noda, Kengo Uemura, Megumi Asada-Utsugi, Shinji Ito, Yoshiyasu Fukusumi, Hiroshi Kawachi, Ryosuke Takahashi, Ayae Kinoshita  
A search for novel interacting proteins to modulate synaptic BACE1 activity.  
Society for Neuroscience (San Diego USA) 2016

宮本将和、葛谷聡、野田泰葉、浅田めぐみ、植村健吾、伊藤慎二、高橋良輔、木下 彩栄  
A search for novel interacting proteins to modulate synaptic BACE1 activity.

第 57 回日本神経学会学術大会、(神戸) 2016

宮本将和、葛谷聡、野田泰葉、浅田めぐみ、植村健吾、伊藤慎二、高橋良輔、木下 彩栄  
A search for novel interacting proteins to modulate synaptic BACE1 activity.  
第 39 回神経科学大会、(横浜) 2016

〔図書〕(計 2件)

野田 泰葉 他、技術情報協会 「在宅医療市場に向けたマーケティングと製品開発」 第 4 章 第 4 節、2017

野田 泰葉 他、同人化学社 現代化学「運動と認知機能」 30-32、2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
野田 泰葉 (NODA, Yasuha)  
京都大学・大学院医学研究科・特定助教  
研究者番号：5 0 7 8 4 1 4 6

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )