

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：32661

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K19526

研究課題名（和文）可溶性アポEレセプター分断放出破綻による糖尿病とアルツハイマー病の病態連関の探索

研究課題名（英文）Exploration of the pathological relationship between diabetes and Alzheimer's disease through disruption of soluble apoE receptor shearing and release

研究代表者

武城 英明（Bujo, Hideaki）

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：80291300

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、アルツハイマー病の病態基盤に、糖尿病で提唱されたアポEレセプターLR11のプロセッシングにおけるプロテアーゼ作用障害が存在する可能性を探索した。アルツハイマー病脳組織切片の免疫学的解析から、神経細胞におけるLR11染色は、アポE genotype E4の患者細胞で低下し、アルツハイマー病発症早期より増大していた。その程度はLR11細胞膜外領域とC末端領域をそれぞれ認識する抗体による染色結果の間で異なっていた。脂肪細胞トランスディファレンシエーション過程で重要な役割を担う様に、プロテアーゼ作用障害によるレセプタープロセッシング異常がアルツハイマー病の病態基盤に関わる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LR11は研究代表者らが動脈硬化巣に発現するアポEレセプターとしてクローニングした新規遺伝子で、プロテアーゼによりプロセッシングを受けて可溶性レセプターとなり、その血中濃度は血管病に加えて糖尿病やアルツハイマー病の病態を反映する。本研究の学術的意義は、プロテアーゼ作用障害によるレセプタープロセッシング異常が、脂肪細胞トランスディファレンシエーション過程の障害のみならず、アルツハイマー病の病態基盤に関わる可能性を示したことである。本研究成果は、糖尿病患者がアルツハイマー病を合併しやすいという社会的課題への新規の治療開発のアプローチを提示したことに意義がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate that the possible involvement of disturbed proteinase action for the processing of apo E receptor LR11, which has been proposed in the pathological basis of diabetes mellitus, in that of Alzheimer's disease. The immunohistochemical analysis of brain tissues from patients with Alzheimer's disease showed that the LR11 staining levels in the neurons, which were decreased with patients with apo E genotype E4, increased in the early clinical stage. The LR11 staining levels were different between the results using antibodies detecting for the ectodomain region and the C-terminal region, respectively. The abnormal processing of LR11 by the disturbed action of proteinases, which play a key role in the trans-differentiation of adipocytes, may be involved in the pathological basis of Alzheimer's disease.

研究分野：病態検査学

キーワード：アルツハイマー病 アポEレセプター 免疫学的解析 プロセッシング異常 プロテアーゼ 脳組織

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の神経変性が進展する過程で特徴的な脳内アミロイドプラークの形成は認知症症状の出現前から認められる早期の病像である。このアミロイドプラークの形成はシナプス活性に伴い増大するアミロイドペプチド (A $\beta$ ) 産生に代謝分解が伴わないことでオリゴマーが蓄積されることが一因となる。近年の GWAS 研究などにより A $\beta$  産生が増加する遺伝子変異が家族性アルツハイマー病の原因となる一方、散发性アルツハイマー病の主要リスクとして A $\beta$  代謝に関わるアポ E ゲノタイプ e4 と LR11 (sorLA, SORL1) の遺伝子多型が指摘されている。LR11 は神経細胞トランスゴルジネットワーク (TGN) でアミロイド前駆体タンパク (APP) と結合し A $\beta$  をライソソームへ転送することで A $\beta$  の代謝を促進する。LR11 は、3 種のアポ E アイソフォームとそれぞれ異なる親和性 (E4>E3>E2) で結合するアポ E レセプターであり、その結合は APP と競合する。したがって、アルツハイマー病発症における LR11 とアポ E ゲノタイプの関連を調べることでこの 2 つのリスク遺伝子の病態形成における意義が明らかになる可能性がある。

これまでに研究代表者は、LR11 はプロテアーゼによりプロセッシングを受け、細胞膜外領域と C 末端領域に分断され、細胞膜外領域は細胞外へ放出され可溶性 LR11 として存在すること、アルツハイマー病患者の脳脊髄液 (CSF) でその濃度が増加していることを明らかにした。しかしながら、アポ E ゲノタイプとの関連は明らかでない。一方、LR11 は脂肪細胞のトランスディファレンシエーションに重要な役割を担い、肥満糖尿病の血中可溶性 LR11 濃度は早期より高値となることが明らかになった。これまで多くの疫学研究より報告されてきた糖尿病患者がアルツハイマー病を合併しやすいことの一因に、神経細胞と脂肪細胞の間に LR11 を介した共通の細胞制御メカニズムが存在し、その破綻により糖尿病とアルツハイマー病という病態が形成される可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究は、糖尿病を引き起こす脂肪細胞のトランスディファレンシエーション障害とアルツハイマー病を引き起こす早期神経変性の共通メカニズムとして、LR11 が機能分子として関わる『可溶性アポ E レセプター-LR11 の分断放出制御の破綻』による病態基盤が存在するという仮説をたて、ヒトアルツハイマー病の脳組織切片と髄液の検体解析を行い、可溶性アポ E レセプター-LR11 から見た糖尿病とアルツハイマー病の発症に共通する細胞機能の病的障害を探索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

アルツハイマー病患者 CSF235 検体 ( Normal (CDR 0) E2/3 30 検体、3/3 50 検体、4+ 50 検体; preclinical AD (CDR 0) E3/3 30 検体, E4+ 30 検体; Very mild AD (CDR 0.5) E3/3 15 検体, E4+ 30 検体 ) の可溶性 LR11 濃度は ELISA ( 積水メディカル ) により測定した。脳組織切片( Normal (CDR 0) E2/3 4 検体、3/3 12 検体、3/4 3 検体; preclinical AD (CDR 0) E2/3 6 検体、E3/3 4 検体、E3/4 5 検体; AD Dementia (CDR >0) E3/3 13 検体, E3/4 13 検体, E4/4 3 検体 ) の LR11 発現は、レセプター細胞膜外領域 ( A2-2-3、Ab190684 ) および C 末端領域 ( Ab16642 ) をそれぞれ認識する 3 種類の抗体を用いて免疫組織染色し、染色強度により 6 段階にスコア化し解析した。

本研究計画は米国ワシントン大学および東邦大学倫理委員会に承認され実施した。試料は米国アルツハイマー病研究拠点 ( ADRC ) バンクにて匿名化され研究代表者に送付され LR11 測定および免疫染色され、データ解析は研究協力者 R. Perrin 博士により行われた。

#### 4 . 研究成果

##### 1 ) アルツハイマー病の病期、アポ E ゲノタイプと CSF 可溶性 LR11 濃度

全検体の CSF 中の可溶性 LR11 濃度の測定結果から、アポ E ゲノタイプ間で CSF 中の可溶性 LR11 濃度に差異はなかった。ゲノタイプ別に LR11 濃度を解析したところ、Preclinical 群は Normal 群より E3/3 群でのみ軽度に高値を示したものの、ハイリスクである E3/4 群では両者に差異はなかった。これらの結果から、CSF 中の可溶性 LR11 値はアポ E ゲノタイプに関わるアルツハイマー病発症を直接反映はしていないと考えられた。

##### 2 ) アルツハイマー病の病期、アポ E ゲノタイプと LR11 組織発現強度

アポ E ゲノタイプ間の LR11 組織染色強度をレセプター細胞膜外領域を認識する抗体 A2-2-3 を用いて比較したところ、Normal 群で明らかなアポ E ゲノタイプ間の差異を認めなかった ( E2/3 > E3/3 > E3/4 ) ( 図 1 )。この差異は Preclinical AD 群や AD dementia 群では見られなかった。ゲノタイプ別に病期による染色強度を比較した結果、E3/3 群および E3/4 群ともにアルツハイマー病検体では Normal 検体に比べて Preclinical AD 群および AD dementia 群で有意に高値だった ( 図 2 )。すなわち、正常の神経細胞では、アポ E4 キャリアで神経細胞内の LR11 発現は低下していて、病態の進行とともに早期より発現が増大していた。

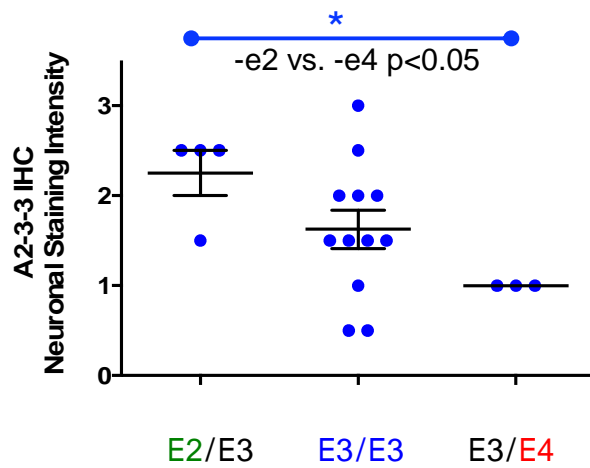


図 1 アポ E ゲノタイプ別の神経細胞 LR11 染色強度

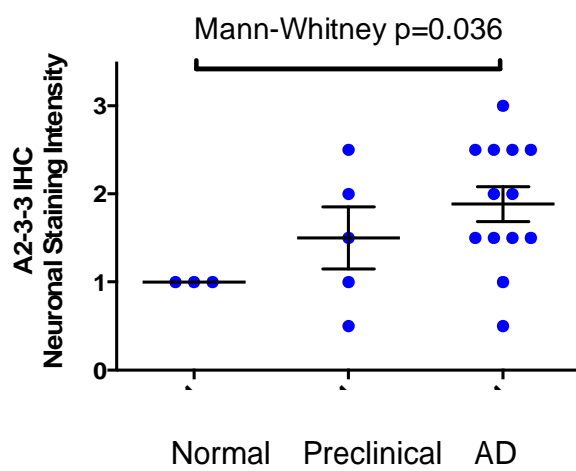


図 2 アポ E3/4 における神経細胞 LR11 染色強度

### 3) 細胞膜外領域および C 末端領域を認識する LR11 抗体染色の比較

LR11 は細胞膜直上でプロテアーゼによりプロセッシングされ、膜貫通型蛋白から細胞膜外 LR11 と C 末端 LR11 に分断され、細胞膜外 LR11 は CSF に放出される。そこでレ

セプター細胞膜外領域と C 末端領域の染色強度についてそれぞれ検討した。上記の Normal 群( 図 1 参照 )で、レセプター細胞膜外領域の別の部位を認識する抗体 Ab190684 は、A2-2-3 抗体による染色結果と同等だったのに対して、C 末端領域を認識する抗体 Ab16642 による強度は A2-2-3 抗体による染色結果とほぼ鏡像の関係を示した。レセプター細胞膜外領域を認識する 2 つの抗体である A2-2-3 抗体と Ab190684 による強度の間には病期に関わらず明らかな正の相関を認めただ一方、レセプター細胞膜外領域を認識する抗体 A2-2-3 と C 末端領域を認識する抗体 Ab16642 の強度の間には負の相関が認められた。以上の結果は、プロテアーゼによりプロセッシングを受けた後のレセプター細胞膜外領域と C 末端領域はアポ E の代謝やアルツハイマー病の病態においてそれぞれ異なる役割を担う可能性を示している。

## 総括

神経細胞における LR11 発現はアポ E ゲノタイプ E4 で低下し、アルツハイマー病発症とともに早期より増大することから、アルツハイマー病の進行に促進的に働く役割より、脂肪細胞のトランスディファレンシエーションで抑制的に働いているように、APP の TGN におけるプロセッシング破綻などの病態の進行を抑制する働きのある可能性がある。一方、CSF 内の可溶性 LR11 はゲノタイプや病期の間で明瞭な差異を認めなかったことから病態を直接反映しないと考えられた。さらに、異なる領域を認識する 3 種類の抗体を用いた染色強度を解析した結果、プロテアーゼによりプロセッシングを受けて分断された細胞膜外領域と C 末端領域は、それぞれアポ E ゲノタイプや病期の間で異なる変動を示し、その分断にかかわるプロテアーゼの活性化がこれらの異なる変動に関わると考えられる。このことは、アルツハイマー病における細胞変性に、脂肪細胞でのトランスディファレンシエーションに見られるような機能分子として可溶性 LR11 が細胞機能を修飾し、とりわけ、細胞膜外領域 LR11 を生成する共通のプロテアーゼ機能の調節障害が糖尿病とアルツハイマー病の病態に関与する可能性がある。

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 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Watanabe K, Suzuki H, Jiang M, Tsukano S, Kataoka S, Ito S, Sakai T, Hirokawa T, Haniu H, Numano F, Hoshina S, Hasegawa S, Matsunaga M, Chiba K, Saito N, Yoshida H, Takami S, Okubo S, Hirano H, Saitoh A, Bujo H.	4. 巻 86
2. 論文標題 Soluble LR11 as a Novel Biomarker in Acute Kawasaki Disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 977-983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-20-1271	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 Watanabe K, Suzuki H, Jiang M, Tsukano S, Kataoka S, Ito S, Sakai T, Hirokawa T, Haniu H, Numano F, Hoshina S, Hasegawa S, Matsunaga M, Chiba K, Saito N, Yoshida H, Takami S, Okubo S, Hirano H, Saitoh A, Bujo H.	4. 巻 521
2. 論文標題 Soluble LR11 as a Novel Biomarker in Acute Kawasaki Disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circ J.	6. 最初と最後の頁 278-284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-20-1271	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 Suwa Satoru, Ogita Manabu, Takahashi Norihito, Wada Hideki, Dohi Tomotaka, Kasai Takatoshi, Okazaki Shinya, Shimada Kazunori, Miyauchi Katsumi, Bujo Hideaki, Daida Hiroyuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Impact of LR11 as Residual Risk on Long-Term Clinical Outcomes in Patients with Coronary Artery Disease Treated with Statins after First Percutaneous Coronary Intervention	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 470 ~ 475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.19-686	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 Shoko Nakamura, Meizi Jiang, Rena Oka, Takashi Yamaguchi, Nobuyuki Hiruta, Hiroyuki Ebinuma, Wolfgang J Schneider, Ichiro Tatsuno and Hideaki Bujo	4. 巻 7
2. 論文標題 LR11, an LDL Receptor Gene Superfamily Member, Represses the Norepinephrine-Induced Expression of Uncoupling Protein 1 in Primary Cultured Beige Adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toho Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 48-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14994/tohojmed.2020-019	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 Yano K, Hirayama S, Misawa N, Furuta A, Ueno T, Motoi Y, Seino U, Ebinuma H, Ikeuchi T, Schneider WJ, Bujo H, Miida T	4. 巻 489
2. 論文標題 Soluble LR11 competes with amyloid in binding to cerebrospinal fluid-high-density lipoprotein.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Chim Acta.	6. 最初と最後の頁 29-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2018.11.024.	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

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 姜 美子, 武城英明
2. 発表標題 疾患マーカーとしての可溶性リポ蛋白受容体 - 脂肪細胞バイオマーカーの可能性 -
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Meizi Jiang, Tatsuro Kanaki, Akiteru Hayashi, Hiroyuki Ebinuma, Wolfgang J. Schneider, Hideaki Bujo
2. 発表標題 The LDL-receptor relative LR11 is an autonomous regulator of white-to-beige trans-differentiation in polymer-scaffold 3D-cultured adipocytes.
3. 学会等名 American Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2019 (国際学会)
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			
米国	ワシントン大学セントルイス校 病理免疫学教室			