

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16912

研究課題名(和文) 脳内A $\beta$ 蓄積を制御する全身性液性因子の探索同定とその機能解析

研究課題名(英文) The search identification and functional analysis of the systemic humoral factor controlling Abeta accumulation in the brain

研究代表者

中野 将希 (Nakano, Masaki)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・助教

研究者番号：00823890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アルツハイマー病(AD)の基本病態である脳内アミロイド(A $\beta$ )蓄積の一次的原因ないし促進/抑制因子を、とくに老化関連液性因子の視点から探索し、発症前診断や先制治療の開発に貢献することを目的とした。ADモデルマウスと野生型マウスの老若個体を並体結合(パラバイオーシス)することにより、循環因子を共有させることで、脳内A $\beta$ 蓄積に影響する全身性循環因子の存在が示唆された。また、RNAシーケンス解析により脳内A $\beta$ 蓄積を制御する候補分子を見出している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病の治療法開発においては、臨床治験での多くの失敗を踏まえ、症状発現を指標とした治療から、発症前の脳内A $\beta$ 蓄積を指標とした先制治療への転換を迫られており、脳内A $\beta$ 蓄積の一次的要因を明らかにすることが一つの重要な課題である。しかし、これまでその知見は極めて乏しく先制治療実現の一つの障害になっている。加齢はアルツハイマー病に最大の危険因子であるが、その基盤となる分子メカニズムは未だ明らかにされていない。本研究による脳内A $\beta$ 蓄積を促進ないし抑制する全身性液性因子の存在の検証成果は、老化に伴うアルツハイマー病発症リスクのバイオマーカーやリスク介入の標的にもなる可能性を持つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we searched for primary cause and acceleration/inhibition factors of the amyloid (A $\beta$ ) accumulation in the brain which was the basic pathology of Alzheimer's disease (AD) from the viewpoint of the particularly aging-related humoral factor. The purpose of this study was to contribute to presymptomatic diagnosis and development of the initiative treatment.

The existence of the systemic circulation factor which influenced the A $\beta$  accumulation in the brain was suggested by the heterochronic parabiosis, a surgical model which results in shared circulation between the AD model mouse and the young or old individual of wild type mouse. In addition, we found candidate molecules which can control the A $\beta$  accumulation in the brain by RNA sequence analysis.

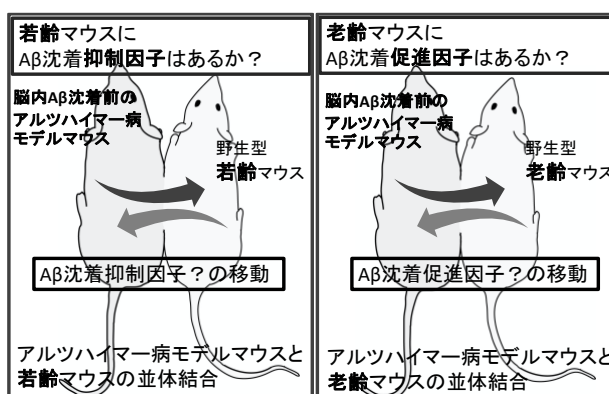
研究分野：分子神経病態学

キーワード：アルツハイマー病 Amyloid- 老化 液性因子 並体結合

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) の基本病態はアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) の脳内蓄積であることが解明されているが、病態に基づいた根治治療は未だ確立されていない。また、認知症発症後に  $A\beta$  蓄積を除去しても認知症の進行は止められなかったことから、認知症発症よりも 20 年以上前に始まる脳内  $A\beta$  蓄積を標的とした先制医療の開発が根治治療を目指す上で求められている。

アルツハイマー病の最大の危険因子は加齢つまり老化とされるが、「個体老化による何が脳内  $A\beta$  蓄積、引いてはアルツハイマー病発症に寄与するのか？」という重大な問いは明らかになっていない。個体の老化については、それ自体に未解明な事象が多いため、模倣する培養細胞モデル等はなく、この問いの基盤となる分子メカニズムは未だ明らかにされていない。アルツハイマー病の基本病態である脳内アミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) 蓄積の一次的原因ないし促進/抑制因子を、とくに老化関連液性因子の視点から探索し、発症前診断や先制治療の開発に貢献することを目的とした意義のある研究である。本研究では、AD モデルマウスと野生型マウスの老若個体を並体結合 (パラバイオーシス) すること (図 1) により、循環因子を共有させ、脳内  $A\beta$  蓄積に影響する全身性循環因子の存在を評価し、老化に伴うアルツハイマー病発症リスクのバイオマーカーや予防的治療法の開発に向けた基礎研究を進めた。



(図1) 全身性液性因子探索のためのマウスを用いた並体結合

### 2. 研究の目的

本研究では、脳内  $A\beta$  蓄積と個体老化を関連づけることが可能なマウス並体結合を用いて、脳内  $A\beta$  蓄積を促進ないし抑制する全身性因子を探索することを目的とした。

- (1) 脳内  $A\beta$  を制御する全身性因子の存在の確認: 若齢個体との並体結合で老齢個体臓器 (骨格筋、肝臓、心臓など) に若返り効果が報告されるなど、血液に含まれる何らかの因子が臓器の老化に影響を及ぼすことが報告されており、アルツハイマー病、特に定量評価が可能な  $A\beta$  に焦点を当てることで脳内  $A\beta$  蓄積を制御する全身性因子の存在を確認することを第一の目的とした。
- (2) 免疫系細胞やミトコンドリアホメオスタシス亢進による  $A\beta$  分解の関与を検証:  $A\beta$  貪食することで知られるマクロファージなどの免疫系細胞の脳内移行や、 $A\beta$  分解に関与すると報告されているミトコンドリアホメオスタシス (ミトコンドリアストレス応答、ミトコンドリアストレス応答 (UPR<sup>mt</sup>)、マイトファジー、呼吸鎖) 亢進、ネプリライシンの関与を調べた。
- (3) 脳 RNA-seq による脳内候補分子の絞り込み: マウス並体結合により脳内  $A\beta$  蓄積で差が見られた APP-KI マウス大脳の網羅的 RNA-seq 解析を行うことで  $A\beta$  蓄積を制御する脳内候補分子の絞り込みを行なった。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脳内 $A\beta$ を制御する全身性因子の存在の確認

「⊗:  $A\beta$  蓄積前 APP-KI マウス (12 ヶ月齢) と若齢野生型 (WT) マウス (2 ヶ月齢)」、「⊙:

A $\beta$  蓄積前 APP-KI マウス (12 ヶ月齢)と同齢 WT マウス (12 ヶ月齢)、「㊸ : A $\beta$  蓄積前 APP-KI マウス (12 ヶ月齢)と老齢 WT マウス (18 ヶ月齢)」のペアで循環系を共有させる並体結合 (図 1)を 3 または 6 ヶ月飼育で行い、APP-KI マウスの大脳 A $\beta$  蓄積レベルを組織免疫染色及び ELISA で定量的に解析することで脳内 A $\beta$  蓄積が促進ないし抑制されているかを検討した。

#### (2) 免疫系細胞やミトコンドリアホメオスタシス亢進による A $\beta$ 分解の関与を検証

相手マウスの免疫系細胞が脳内に移行して働く可能性を検討するため、APP-KI マウスと GFP 全身発現 Tg マウス (C57BL/6/Tg (CAG-EGFP)マウス (= GFP マウス))との組み合わせでも実施した。並体結合した APP-KI マウスの大脳から mRNA を抽出し、ミトコンドリアホメオスタシス関連分子とネプリライシンの mRNA レベルを real-time PCR にて定量した。

#### (3) 脳 RNA-seq による脳内候補分子の絞り込み

並体結合した APP-KI マウスの大脳から mRNA を抽出し、RNA-seq 解析を行い、脳内 A $\beta$  蓄積量と相関する分子を絞り込んだ。マウスの個体差が考えられるため、各群 (㊸、㊹、㊺)3 匹ずつの解析を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 脳内 A $\beta$ を制御する全身性因子の存在の確認

「㊸ : A $\beta$  蓄積前 APP-KI マウス (12 ヶ月齢)と若齢野生型 (WT)マウス (2 ヶ月齢)」、「㊹ : A $\beta$  蓄積前 APP-KI マウス (12 ヶ月齢)と同齢 WT マウス (12 ヶ月齢)」、「㊺ : A $\beta$  蓄積前 APP-KI マウス (12 ヶ月齢)と老齢 WT マウス (18 ヶ月齢)」のペアで並体結合 (図 1)を行った APP-KI マウスの大脳 A $\beta$  蓄積を定量すると、若齢個体との並体結合により抑制される一方、老齢個体との並体結合では促進される結果を得た

(図 2)。この結果は 3 ヶ月飼育でも 6 ヶ月飼育でも同様の結果を得ており、脳内 A $\beta$  蓄積を制御する加齢性全身性因子が存在することを示唆していた。



(図2) APP-KIマウス大脳皮質におけるA $\beta$ 蓄積(白色斑点)への並体結合の効果

#### (2) 免疫系細胞やミトコンドリアホメオスタシス亢進による A $\beta$ 分解の関与を検証

GFP マウスとの並体結合における APP-KI マウス脳内への GFP 陽性細胞の侵入を免疫染色にて確認したが、観察されなかった。また、ミトコンドリアホメオスタシス関連分子とネプリライシンに対して mRNA レベルを㊸、㊹、㊺で定量比較したが大きく変化しなかった。したがって、これらの分解系が大きく関わっている可能性は低いと考えられた。

#### (3) 脳 RNA-seq による脳内候補分子の絞り込み

若齢、同齢または老齢マウスと並体結合した APP-KI マウス大脳皮質で網羅的 RNA-seq 解析を行った。相対的発現差 1.1 倍以上、 $p$  値 0.1 以下をフィルターに㊸<㊹<㊺ないし㊸>㊹>㊺に応じた変化を示す分子を探索した結果、14 分子が該当した。これらの発現差をさらに real-time PCR 法でも追加で確認することで、10 分子まで絞り込むことができた。そのうち、5 分子は「A $\beta$  蓄積量」と正の相関 (㊸<㊹<㊺)が、5 分子は「A $\beta$  蓄積量」と負の相関 (㊸>㊹>㊺)があり、これらを脳内一次候補分子とした。この中に A $\beta$  蓄積を制御する加齢依存的な分子が存在する可能性が高く、加齢依存的循環因子の同定を進め、培養細胞での強制発現及び knockdown を用いた実験系も含めて機能解析評価を継続している。

## 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 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Watanabe N., Nakano M., Mitsuishi Y., Hara N., Mano T., Iwata A., Murayama S., Suzuki T., Ikeuchi T., Nishimura M.	4. 巻 31
2. 論文標題 Transcriptional downregulation of FAM3C/ILEI in the Alzheimer's brain.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 122-132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddab226	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 Nishimura M., Watanabe N., Hibino E., Nakano M., Mitsuishi Y., Liu L., Sugi T.	4. 巻 2
2. 論文標題 FAM3C in Alzheimer's disease. A risk-related molecule and potential therapeutic target	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Neuroscience of Dementia	6. 最初と最後の頁 293-307
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Alam S., Nakano M., Ishihara S., Kakuda N., Miyasaka T., Uchiyama H., Shirai Y., Moniruzzaman M., Saito T., Saïdo C T., Nishimura M., Funamoto S.	4. 巻 535
2. 論文標題 A Potential Defense Mechanism Against Amyloid Deposition in Cerebellum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 25-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.12.036.	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 Nakano M., Mitsuishi Y., Liu L., Watanabe N., Hibino E., Hata S., Saito T., Saïdo C T., Murayama S., Kasuga K., Ikeuchi K., Suzuki T., Nishimura M.	4. 巻 80
2. 論文標題 Extracellular release of ILEI/FAM3C and amyloid- is associated with the activation of distinct synapse subpopulations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's disease	6. 最初と最後の頁 159-174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/JAD-201174.	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 Sugiyama U., Shudo T., Hosokawa S., Watanabe A., Nakano M., Kakizuka A.	4. 巻 8
2. 論文標題 Emodin, as a mitochondrial uncoupler, induces strong decreases in ATP levels and proliferation of B16F10 cells, owing to their poor glycolytic reserve	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 569-584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12712	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9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 中野将希、三ツ石弥千代、Lei Liu、渡邊直希、斉藤貴志、西道隆臣、鈴木利治、西村正樹
2. 発表標題 Extracellular release of ILE1/FAM3C and A is associated with the activation of distinct synapse subpopulation
3. 学会等名 AAIC2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野 将希、斉藤 貴志、西道 隆臣、西村 正樹
2. 発表標題 ニコチン性アセチルコリン受容体刺激がA 産生に与える影響
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野将希、三ツ石弥千代、渡邊直樹、日比野絵美、斉藤貴志、西道隆臣、鈴木利治、西村正樹
2. 発表標題 Activation of distinct synaptic populations regulates extracellular release of ILE1/FAM3C and A
3. 学会等名 AAIC2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野 将希、杉 琢磨、西村 正樹
2. 発表標題 A 産生を抑制するFAM3C/ILEIは線虫において記憶学習に関連する
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Alam Shahnur、中野将希、石原聖子、宮坂知宏、角田伸人、斉藤貴志、西道隆臣、舟本 聡
2. 発表標題 なぜA 沈着は脳で多く小脳で少ないのか？ 小脳からの盛んなA 排出ー
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊直希、中野将希、西村正樹
2. 発表標題 A 産生を抑制するILEI/FAM3Cの転写制御メカニズム解析
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野将希、三ツ石弥千代、渡邊直希、日比野絵美、斉藤貴志、西道隆臣、鈴木利治、西村正樹.
2. 発表標題 Synaptic activity-dependent release of presynaptic ilei/FAM3C.
3. 学会等名 AAIC 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野将希、三ツ石弥千代、渡邊直希、日比野絵美、斉藤貴志、西道隆臣、鈴木利治、西村正樹
2. 発表標題 大脳皮質における ILE1/FAM3C および A の間質液への分泌様式に関する比較検討
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野将希、三ツ石弥千代、渡邊直希、日比野絵美、杉拓磨、斉藤貴志、西道隆臣、鈴木利治、西村正樹.
2. 発表標題 Presynaptic ILE1/FAM3C is released in an activity-dependent manner like A exocytosis.
3. 学会等名 Neuro2019
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
---------	---------