

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K21585

研究課題名(和文) Alzheimer病の分子病態をトリガーする循環因子の探索

研究課題名(英文) Identification of circulating factors triggering molecular pathological processes of Alzheimer's disease

研究代表者

西村 正樹(Nishimura, Masaki)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・教授

研究者番号：40322739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳A沈着をきたすアルツハイマー病モデルマウス用い、老若ペアの全身循環系を共有させる並体結合から、脳A沈着を制御する加齢依存的全身循環因子の同定を試みた。モデルマウスを若齢、同齢、老齢の各野生型マウスと並体結合した結果、脳A沈着の程度は「若齢と結合したモデルマウス」<「同齢と結合したモデルマウス」<「老齢と結合したモデルマウス」であった。これは、A蓄積を制御する加齢依存的な循環因子の存在を示唆する。さらに、網羅的脳mRNA発現解析を行った結果、脳A蓄積レベルと相関した変化を示す候補分子を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により同定した因子は、アルツハイマー病に対するプレクリニカル期からの予防的医療に向けた診断と治療の両面における標的分子として有望であり、短期的には診断手法や創薬リードなどの知的財産を生むことが期待できる。長期的には、プロテオパシーを基本病態とする脳疾患に対する先制医療の実現が本研究により加速されると予想される。プロテオパシーは神経変性疾患に限らず、2型糖尿病や動脈硬化など加齢に関連する主要疾患の病態でも重要視されており、それらへの効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's diseases (AD) is the leading cause of senile dementia. Aging is the most important risk factor for AD development. Aggregation and deposition of amyloid-peptides (A $\beta$ ) in brain triggers the pathogenetic process of AD. A $\beta$  levels become abnormal long before onset of severe memory loss, and the strategies to prevent A $\beta$  deposition could have great benefits for effective intervention at the preclinical stage of disease. Our study of heterochronic parabiosis using AD model mice has revealed that circulating factors of younger and older mice can suppress and promote A $\beta$  deposition of model mice through altering the molecular expression profile in brain, respectively. We have successfully identified several molecules of which expression levels in brain were altered by the heterochronic parabiosis. These factors are candidate targets of disease-modifying therapies for AD.

研究分野：脳分子病態学

キーワード：アルツハイマー病 老化 循環因子 アミロイド 脳

### 1. 研究開始当初の背景

老年期認知症の主要な原因疾患であるアルツハイマー病を脳内アミロイド B (A $\beta$ )蓄積症のスペクトラムとして広義に捉える概念「アルツハイマー病連続体」が米国 NIA-AA から提案された。これは、本症の根治的克服には無症候性 A $\beta$  蓄積に対する早期介入が不可欠との考えに呼応するものである。従来の臨床治験において、認知症発症後では脳 A $\beta$  蓄積が除去できても認知症の進行には効果がなかった結果を踏まえたものであるが、治療反応性が失われる臨界時期がどこなのかは今なお不明である。その点、分子病態をトリガーする脳 A $\beta$  蓄積のリスクを分子レベルで評価し、リスク制御により発症を予防ないし遅延することが出来れば理想的である。この観点からは、脳 A $\beta$  蓄積開始のリスクに関する理解を深め、分子メカニズムの解明からリスク制御を可能にする方策を開発することが重要となる。

現在まで、アルツハイマー病に連鎖する遺伝子座に関しては分子遺伝学的解析が網羅的に進められる一方、各遺伝子産物が発症リスクに影響するメカニズムの解析は遅れている。脳 A $\beta$  蓄積のリスク遺伝子に限定すると知見はさらに乏しい。また、トランスクリプトーム解析により、本症脳で特異的に発現変化する分子も精力的に探索されているが、臓器としての脳は内因性因子による機能制御に限らず、循環因子などを介して全身臓器とクロストークすることも知られてきた。ことに、細胞間隙で進む A $\beta$  蓄積に循環因子が関与する可能性は高い。また、最大の発症リスクは加齢であるとされるものの、老化に伴うリスク増加の分子メカニズムは明らかでない。個体や臓器の老化にも全身性循環因子が関与することは多くの研究が示唆するが、脳老化やアルツハイマー病に関する知見は断片的に留まる。

### 2. 研究の目的

このような中、本課題では、脳 A $\beta$  蓄積を促進ないし抑制する加齢依存的循環因子を探索し、脳 A $\beta$  蓄積のリスクないし防御因子を同定することを目的とする。このような因子は、本症の一次的原因ないし病態の促進/抑制因子である可能性が高く、リスクに予防的介入する標的分子としても有望である。

### 3. 研究の方法

脳 A $\beta$  蓄積をきたすモデルマウスを用い、老若個体から A $\beta$  蓄積のリスクに関与する循環因子を探索する。並体結合は2個体の全身循環系を共有させる手法であり、老若ペアを用い並体結合によれば、加齢依存的全身性因子の評価が可能になる(図1)。

本課題では、脳 A $\beta$  蓄積の開始月齢が明らかにされているヒト化変異型 A $\beta$  前駆体ノックインマウスと相手マウスに移行した細胞成分(免疫系細胞など)が同定可能な緑色蛍光全身発現(GFP-Tg)マウスを用いた並体結合を行った。

APP-KI マウスは強制的な過剰発現を介さずに脳 A $\beta$  蓄積をきたす優れたモデルであり、変異型による *App*<sup>NL-F</sup> 及び *App*<sup>NL-G-F</sup> マウスはそれぞれ 12 ヶ月齢(12 m.o.)、3 m.o. で脳 A $\beta$  蓄積が始まる。なお、本計画は本学動物実験委員会承認済である。

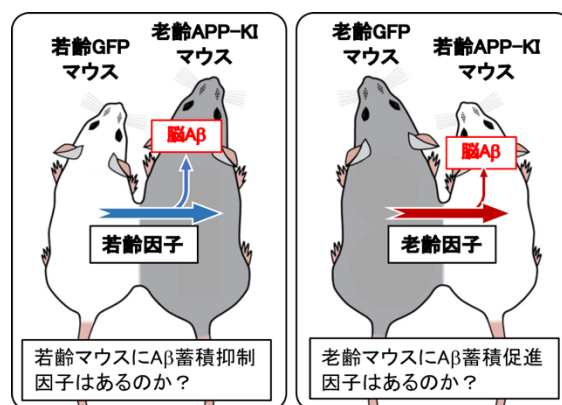


図1: Heterochronic parabiosis

#### (1) 老齡 APP-KI マウスと若齡マウスの並体結合

AB 沈着前 *App*<sup>NL-F</sup> マウス(12 m.o.)と GFP-Tg マウス(1.5 m.o.)を麻酔下で腹側部を切開し、両マウスの皮膚を縫合した後、オートクリップで固定した。対照実験として *App*<sup>NL-F</sup> マウス(12 m.o.)と GFP-Tg マウス(12 m.o.)の並体結合を行った。

#### (2) 若齡 APP-KI マウスと老齡マウスの並体結合

AB 沈着前 *App*<sup>NL-F</sup> マウス(12 m.o.)と GFP-Tg マウス(18 m.o.)を[1]と同様に施術した。対照として *App*<sup>NL-F</sup> マウス(12 m.o.)と GFP-Tg マウス(12 m.o.)の並体結合を行った。

#### (3) 並体結合マウスの脳 Aβ蓄積の評価

並体結合施術後 8 週間飼育した APP-KI マウスの大脳 Aβ 蓄積を免疫組織化学及び ELISA で定量的に評価し、各対照マウスと比較することから、Aβ 蓄積が促進ないし抑制されているかを検討した。また、APP-KI マウス脳内への GFP 陽性細胞の侵入を組織学的に判定した。

#### (4) 網羅的解析による目的因子の同定

並体結合により脳内で発現が変化する候補分子を同定するため、若齡、同齡または老齡マウスと並体結合した *App*<sup>NL-F</sup> マウスの大脳皮質組織から mRNA を抽出し、網羅的 RNA-seq 解析を行った。また、血清を採取し、タンパク質の分子サイズ等による分画化の後、APP-KI マウスの大脳 Aβ 蓄積に対する効果を評価し、候補因子を絞り込んだ。この際、加齢によって発現変化する血清中タンパク質のデータベースも併用した。一方で、若齡と老齡の野生型マウス血清を採取し、分子間結合の解離と多量タンパク質の除去を行った上で、それぞれの血清に含まれる全ペプチドの N 末端およびリジン残基を安定同位体標識し、LC-MS/MS 解析することで発現に差のあるタンパク質の同定と相対および絶対定量を行っている。

#### (5) 目的因子の機能解析

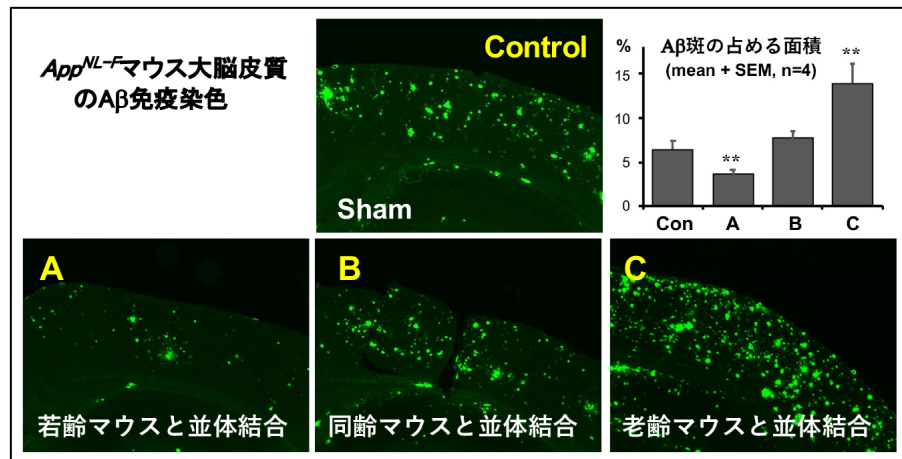
マウス個体を用いて(4)の候補因子が Aβ 産生系及び Aβ 分解系、Aβ 排出系に与える効果を評価し、そのメカニズムを解析する。また、ヒト剖検脳組織あるいは患者血清を用いた解析から、各候補因子の発現レベルと脳 Aβ 蓄積ないし認知機能との関連を評価する。

### 4. 研究成果

#### (1-3) マウス並体結合と APP-KI マウス脳 Aβ蓄積

マウス並体結合を(i) Aβ 蓄積前 *App*<sup>NL-F</sup> マウス (12 m.o.)と若齡マウス (2 m.o.)、(ii) Aβ 蓄積前 *App*<sup>NL-F</sup> マウス (12 m.o.)と同齡マウス (12 m.o.)、(iii) Aβ 蓄積前 *App*<sup>NL-F</sup> マウス (12 m.o.)と老齡マウス (18 m.o.)の各ペアで行った。終了後、*App*<sup>NL-F</sup> マウスの大脳を用い Aβ 免疫染色及び Aβ-ELISA にて定量的に評価した結果、Aβ 蓄積は若齡個体との並体結合により抑制される一方、老齡

個体との並体結合では促進されていた(右図)。この結果は並体結合の期間が3ヶ月でも6ヶ月でも同様であり、脳内 Aβ 蓄積を制御する加齢依存的全身性因子が存在することを示唆



していた。また、GFP マウスとの並体結合における *App*<sup>NL-F</sup> 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。

#### (4) 網羅的解析による目的因子の同定

##### ① 脳 RNA-seq による脳内候補分子の同定

若齢、同齢または老齢マウスと並体結合した *App*<sup>NL-F</sup> マウスの大脳皮質組織から mRNA を抽出し、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 (i) < (ii) < (iii) ないし (i) > (ii) > (iii) を満たす発現レベルを示した分子を探索した結果、14 分子が該当した。これらの発現レベルを定量的リアルタイム PCR 法で確認すると 10 候補が残った。そのうち、5 候補は脳 A $\beta$  蓄積レベルと正の相関が、5 候補は脳 A $\beta$  蓄積レベルと負の相関があった。さらに、培養細胞を用いて A $\beta$  産生への機能を評価するとともに、各候補のトランスジェニックマウスを作出して *App*<sup>NL-F</sup> マウスと掛け合わせることにより、脳内 A $\beta$  蓄積への作用を確認する実験を継続している。

##### ② 血漿サンプルのプロテオーム解析

並体結合した *App*<sup>NL-F</sup> マウスの血清サンプルを採取し、プロテオーム解析を行っている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6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 Nakano M, Mitsuishi Y, Liu L, Watanabe N, Hibino E, Hata S, Saito T, Saido TC, Murayama S, Kasuga K, Ikeuchi T, Suzuki T, Nishimura M	4. 巻 80
2. 論文標題 Extracellular release of ILEI/FAM3C and amyloid-beta 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-20117410.3233/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 Morimune T, Tano A, Tanaka Y, Yukiue H, Yamamoto T, Maruo Y, Nishimura M, Tooyama I, Mori M	4. 巻 16
2. 論文標題 Gm14230 controls Tbc1d24-cytoophidia and neuronal cellular juvenescence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0248517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0248517	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 Shahnur A, Nakano M, Ishihara S, Kakuda N, Miyasaka T, Uchiyama H, Shirai Y, Moniruzzaman M, Saito T, Saido TC, 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 am FA, Morimune T, Tsukamura A, Tano A, Tanaka Y, Mori Y, Yamamoto T, Nishimura M, Tooyama I, Mori M	4. 巻 10
2. 論文標題 Neuroepithelial cell competition triggers loss of cellular juvenescence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74874-4	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 Seita Y, Morimura T, Watanabe N, Iwatani C, Tsuchiya H, Nakamura S, Suzuki T, Yanagisawa D, Tsukiyama T, Nakaya M, Okamura E, Muto M, Ema M, Nishimura M, Tooyama I	4. 巻 75
2. 論文標題 Generation of transgenic cynomolgus monkeys overexpressing the gene for amyloid-beta precursor protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 45-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-191081	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 Kawatsuki A, Morita S-Y, Watanabe N, Hibino E, Mitsuishi Y, Sugi T, Murayama S, Nishimura M.	4. 巻 20
2. 論文標題 Lipid class composition of membrane and raft fractions from brains of individuals with Alzheimer's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2019.100704	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 Hata S, Hu A, Piao Y, Nakaya T, Taru H, Morishima-Kawashima M, Murayama S, Nishimura M, Suzuki T.	4. 巻 29
2. 論文標題 Enhanced amyloid- generation by -secretase complex in detergent-resistant membrane microdomains with reduced cholesterol levels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 382-393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddz297	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 Hata S, Omori C, Kimura A, Saito H, Kimura N, Gupta V, Pedrini F, Hone E, Chatterjee P, Taddei K, Kasuga K, Ikeuchi T, Waragai M, Nishimura M, Hu A, Nakaya T, Meijer L, Maeda M, Yamamoto T, Master CL, Rowe C, Ames D, Yamamoto K, Martins RN, Gandy S, Suzuki T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Decrease in p3-A $\beta$ 37 and p3-A $\beta$ 40, products of A $\beta$ secretase generated by -secretase cleavages, in aged monkeys and Alzheimer's disease patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions	6. 最初と最後の頁 740-750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.trci.2019.09.015	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 Seita Y, Morimura T, Watanabe N, Iwatani C, Tsuchiya H, Nakamura S, Suzuki T, Yanagisawa D, Tsukiyama T, Nakaya M, Okamura E, Muto M, Ema M, Nishimura M, Tooyama I.	4. 巻 -
2. 論文標題 Generation of transgenic cynomolgus monkeys overexpressing the gene for amyloid- precursor protein	5. 発行年 2020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-191081	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11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

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 $\beta$ 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 渡邊直希、村山繁雄、西村正樹
2. 発表標題 A $\beta$ 産生抑制分子 ILE1/FAM3Cの発現制御機構
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 Nakano M, Mitsuishi Y, Watanabe N, Saito T, Saido TC, Suzuki T, Nishimura M
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 AAIC 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野将希、杉拓磨、西村正樹
2. 発表標題 A 産生を抑制するFAM3C/ILE1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 渡邊直希、中野将希、西村正樹
2. 発表標題 産生を抑制するILE1/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 羽田沙緒里、胡安琪、村山繁雄、森島真帆、西村正樹、鈴木利治
2. 発表標題 アルツハイマー脳におけるラフトの脂質変化と セクレターゼの局在・機能変化
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、西村正樹、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 Nakano M, Mitsuishi Y, Watanabe N, Hibino E, Saito T, Saido TC, Suzuki T, Nishimura M.
2. 発表標題 Synaptic activity-dependent release of presynaptic ILE1/FAM3C.
3. 学会等名 AAIC 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村正樹
2. 発表標題 脳A 産生の制御にはたらく分子の探索と解析
3. 学会等名 第46回日本脳科学会 (招待講演)
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

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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Nishimura M, Watanabe N, Mitsuishi Y, Hibino E, Nakano M, Liu L, Sugi T	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 -
3. 書名 The Neuroscience of Dementia	

〔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
---------	---------