

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07739

研究課題名(和文) 分子モーターKIF13BによるLRP1を介した アミロイドの脳からの排出機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the LRP1-mediated export of beta-amyloid from brain by molecular motor KIF13B

研究代表者

金井 克光 (Kanai, Yoshimitsu)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80214427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳毛細血管に注目したアルツハイマー病(AD)の基礎研究を行った。はじめに脳毛細血管が アミロイドの脳から血中に排出する機構の解明を試みたが、技術的に困難であることが判明した。女性は閉経を迎えると血中脂肪が上昇し動脈硬化やADのリスクが高くなる。そこで本教室前任教授が発見した胃由来のエストロゲンについて検討したところ、血中脂肪が増えると胃エストロゲンの分泌が増えて血中脂肪を低下させることを見出した。さらにエストロゲンが傷害された脳毛細血管の修復を促進することも分かった。以上の結果から、胃エストロゲンが血中脂肪濃度を調節し、毛細血管の修復を支えることでADに対する抑制効果があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エストロゲンは食欲、脂肪の合成・血中への放出を抑制し、脂肪の蓄積・消費を促進することが知られている。私達は今回の結果と合わせて「血中脂肪値が上がると胃から分泌されるエストロゲンが増えて下げる」というモデルを提唱した。エストロゲンには傷害された脳毛細血管の修復を支える機能があることもわかり、閉経後にADリスクが上がるのは「血中エストロゲンの低下が血中脂肪を高めて動脈硬化を引き起こすとともに毛細血管の修復機能を低下させ、脳毛細血管を介した アミロイドの脳から血中への排出の低下の原因となり、ADのリスクを増大させる」ことが示唆された。今後、胃エストロゲンを活用したAD予防の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：We conducted basic research on Alzheimer's disease (AD) focusing on brain capillaries. Initially, we attempted to elucidate the mechanism by which brain capillaries export -amyloid from the brain into the blood, but this proved to be technically difficult. When women reach menopause, blood fat rises and the risk of arteriosclerosis and AD increases. Therefore, we examined gastric estrogen, which was discovered by the previous professor, and found that gastric estrogen has the effect of lowering the elevated blood fat. Furthermore, we found that brain capillaries deficient in estrogen receptors showed reduced repair capacity when damaged, suggesting that gastric estrogen has an inhibitory effect on AD by regulating blood fat concentration and supporting capillary repair.

研究分野：内分泌

キーワード：アルツハイマー病 毛細血管 高脂血症 動脈硬化 エストロゲン 中性脂肪 胃 アミロイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)の原因としてアミロイド(A $\beta$ )の脳への蓄積がある。A $\beta$ を脳から除去する機構の一つに脳毛細血管内皮細胞(brain endothelial cell, BEC)がLDL-receptor-related protein 1(LRP1)を介してA $\beta$ を脳間質側から取り込んで血液側に排出するものがある<sup>1</sup>。そのため、BECの損傷やその修復能低下はADの危険因子となる。

LRP1のリガンドの一つであるLDLはLDL-LRP1-hDLG1-KIF13B-utorphin-カベオラ複合体(LRP1/KIF13B複合体)を介して細胞に取り込まれるが<sup>2</sup>、BECがLRP1を介してA $\beta$ を取り込む際の分子メカニズムは不明であった。脳の毛細血管にLRP1/KIF13B複合体の構成タンパクが発現することは蛍光抗体法やウエスタンブロット法で確認している(未発表)。しかし、BECを初代培養するとLRP1/KIF13B複合体を構成するタンパクが大きく減少し、タンパク間の結合状態を評価することは困難であった(未発表)。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、単離脳毛細血管を用いてBECが脳間質を取り込む際に起こるLRP1/KIF13B複合体構成タンパク間の結合状態やリン酸化状態の変化を明らかにし、BECによるA $\beta$ の排出機構を解明するとともにBECに視点を置いたADの予防・治療法の端緒を得ることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 単離脳毛細血管におけるBECの表面露出状態の検討

単離した脳毛細血管は外表面が脳間質側にあたるため、A $\beta$ の取り込み実験に好都合である。この実験を行うにあたり、BECがどれほど単離毛細血管の表面に露出しているかをBECの表面マーカーであるレクチンを用いて検討した。

#### (2) BECの保護因子として胃エストロゲンの検討

上記(1)において、BECが単離毛細血管の10%ほどしか表面に露出していないことがわかり、BECの表面の大半を覆うグリア細胞やペリサイトにもLRP1が発現していることから、申請時に目指した単離毛細血管を用いたBECにおけるLRP1/KIF13B複合体解析は困難であると判断し研究方針を変更した。

女性は血中エストロゲンが低下する閉経後に血中中性脂肪値が上がり、ADの危険因子でありBECが損傷される動脈硬化になりやすいこと、申請者が着任した研究室では以前から胃由来のエストロゲンの研究を行っていたがその生理的意味が長年不明であったこと<sup>3-5</sup>、から胃エストロゲンと血中中性脂肪との関係について検討した<sup>6</sup>。

### 4. 研究成果

#### (1) 単離脳毛細血管におけるBECの表面露出状態の検討

成獣マウス脳から毛細血管を単離し、4%パラホルムアルデヒド/0.1Mリン酸バッファーで固定後、血管内皮細胞のマーカーであるDayLight488-トマトレクチンで染色することでBECが単離毛細血管の表面にどの程度露出しているかを検討した。その結果BECは10%程度しか毛細血管の表面に露出していないことがわかった(図1)。BECの表面はアストロサイトの一部やペリサイトによって覆われていることが知られており、これらとともにLRP1を発現するため、単離脳毛細血管を用いたLRP1/KIF13B複合体解析は困難であると判断した。

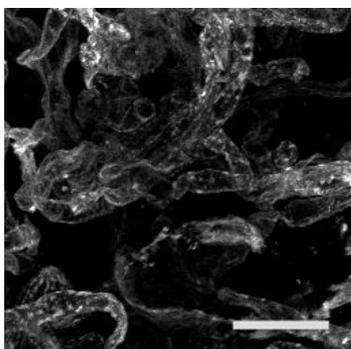


図1. 単離脳毛細血管のレクチンを用いた染色像

マウス由来の単離脳毛細血管を血管内皮細胞の表面マーカーであるDayLight 488-トマトレクチンを用いて染色した。BECは単離毛細血管の表面の10%程度しか表面に露出していない。Bar: 20  $\mu$ m。(未発表)

#### (2) BECの保護因子として胃エストロゲンの検討

##### 胃エストロゲン合成に用いられるエネルギー源の検討

胃エストロゲンは分泌後に門脈を介して直接肝臓に入るが、エストロゲンは肝臓で糖、脂質を含んだエネルギー代謝に関与する。また、アロマターゼによるエストロゲン合成にはNADPHを3個も使う(ほとんどのエネルギーを必要とする酵素反応では1個のNADPHやATPで賄われる)。そ

ここで、胃壁細胞が大量の NADPH を得るためにグルコースと脂肪のどちらをエネルギー源として使うかを調べたところ脂肪であることがわかった (図 2)。

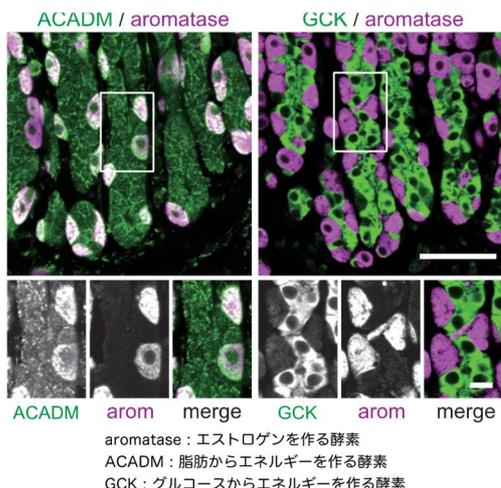


図 2. 胃は脂肪酸をエネルギー源としてエストロゲンを産生する  
エストロゲン合成酵素であるアロマトラーゼを発現する細胞 (壁細胞) はグルコース (GCK) ではなく脂肪酸を分解酵素 (ACADM) に富んでいる。(引用文献 6 を改変)

### 血中脂肪濃度の胃エストロゲン産生への影響

胃壁細胞は組織学的に脂肪滴を内包しないため、脂肪は細胞外から供給される必要があるが、摂食した脂肪の分解・吸収は十二指腸以降で行われるため、胃壁細胞への脂肪供給は (膵臓へのグルコース供給と同様に) 動脈血を介したものとなる。そこで血中脂肪濃度が胃エストロゲン合成に影響するかを調べるためにラットにオリーブオイルを経口投与したところ、血中中性脂肪値の上昇に伴い血中エストロゲン値の上昇が見られた (図 3 a)。さらに、胃切除モデルラットにオリーブオイルを経口投与したところ、この血中中性脂肪値の上昇に伴う血中エストロゲン値の上昇は消失したため、血中中性脂肪値の上昇に伴う血中エストロゲン値の上昇が胃エストロゲンの分泌増加によるものであることが明らかになった (図 3 b)。

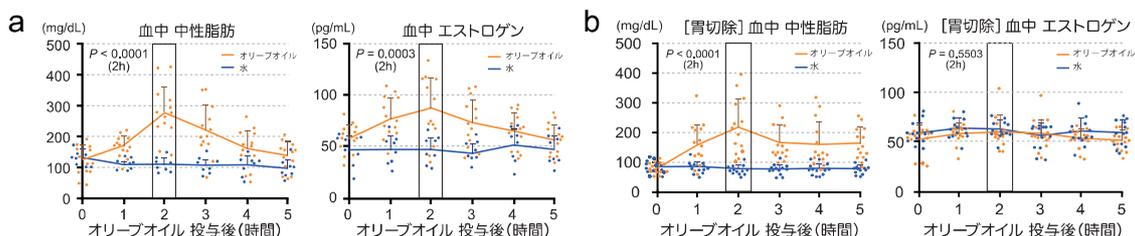


図 3. 血中エストロゲン濃度は胃依存的に血中中性脂肪濃度に応じて増減する

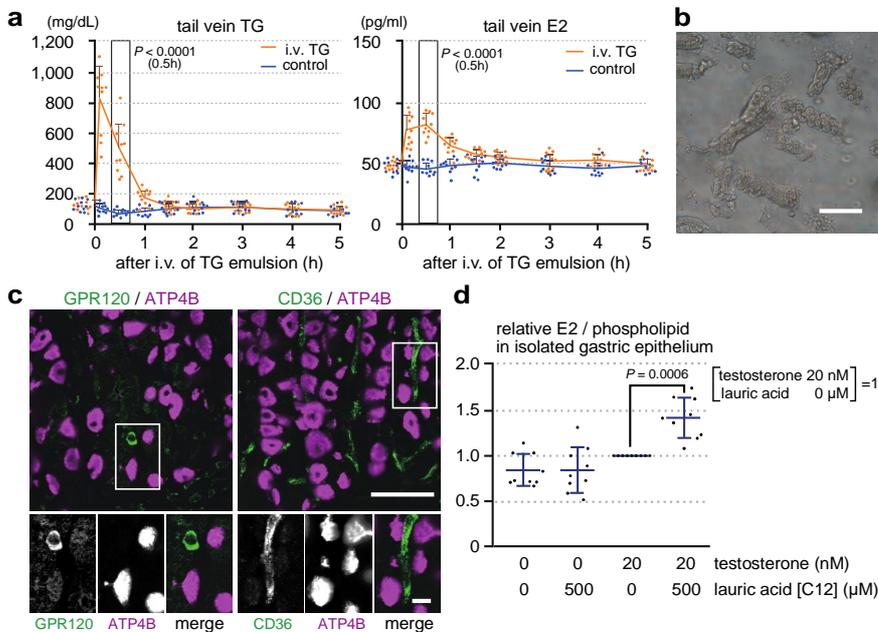
a. 4 時間絶食させたラットにオリーブオイルを経口投与すると血中中性脂肪の増加に伴って血中エストロゲンが増加する。b. 4 時間絶食させた胃切除ラットにオリーブオイルを経口投与して血中中性脂肪を増加させても、血中エストロゲンは増加しない。(引用文献 6 を改変)

### 血中脂肪濃度は直接胃壁細胞に作用して胃エストロゲン産生に影響するのか

オリーブオイルの経口投与ではその吸収過程で様々なホルモンが動くことが知られている。そこでこれらのホルモンの影響を除外するために中性脂肪エマルジョンを静脈注射することで血中中性脂肪値を上昇させたところ、血中エストロゲン値も上昇し、消化管ホルモンの影響を排除しても血中中性脂肪が増加すると胃エストロゲン分泌が増加することが示された (図 4 a)。さらに、胃以外からのホルモンや神経の影響を排除するための単離胃粘膜を用いた実験ではテストステロンと脂肪酸 (C12 脂肪酸を使って C14 以上に反応する GPR120 や C18 以上に反応する CD36 の影響を除外した) 依存的に胃粘膜がエストロゲンを産生することが示された (図 4 b-d)。

図 4. 胃は血中脂肪濃度に直接対応してエストロゲンを分泌する

a. 4 時間絶食させたラットに中性脂肪エマルジョンを静注すると血中中性脂肪の増減に伴って血中エストロゲンが増減する。b. 単離したラット胃粘膜。b. ラット胃に対する脂肪酸レセプターである GPR120 と CD36 の局在。ATP4B はエストロゲン産生細胞である胃壁細胞のマーカーである。b. 単離した胃粘膜はエストロゲンの前駆物質であるテストステロンと C12 脂肪酸 (ラウリン酸) が共にあるときにエストロゲン産生する。(引用文献 6)

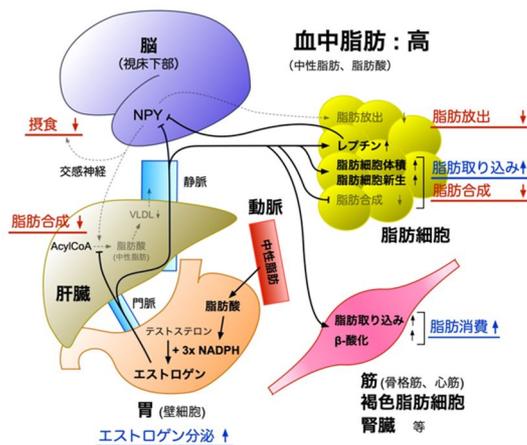


以上はオスラットを用いた実験だが、卵巣切除メスラットを用いた実験でも同等の結果を確認した。これらの結果から「胃は血中脂肪濃度依存的にエストロゲンを分泌する」と結論付けた。

### 胃エストロゲンによる血中脂肪調節機構

エストロゲンは肝臓に作用すると脂肪酸の新規合成を抑制し、脳に作用すると NPY 神経(摂食活動、肝臓での脂肪酸の新規合成、脂肪組織からの脂肪酸放出を活性化する神経)を抑制し、脂肪細胞に作用すると脂肪の合成を抑制するとともに脂肪の蓄積を促進し、筋、褐色脂肪細胞、腎臓などに作用すると脂肪酸の取り込みや酸化を促進することが知られている<sup>7</sup>。これらは全て血中脂肪値を下げる効果を持ち、今回の実験結果と合わせて、「血中脂肪値が上がると胃からエストロゲンが分泌されて血中脂肪値を下げる」というモデルを提唱した(図5)。

図5. 胃エストロゲンによる血中脂肪調節機構  
血中中性脂肪(脂肪酸)が増加すると胃からのエストロゲン合成・分泌が増える。その結果、摂食、脂肪合成(肝臓、脂肪組織)、脂肪放出(脂肪組織)が抑制され、脂肪貯蔵(脂肪組織)や脂肪取り込み・消費(筋、褐色脂肪細胞、腎臓、等)が亢進することで血中中性脂肪(脂肪酸)が低下する。(引用文献6を改変)



### 今後の展望

女性は男性よりも血中中性脂肪値が低く動脈硬化になりにくい、閉経後は血中中性脂肪値が上昇して AD の危険因子である動脈硬化になりやすくなり、脂肪の利用効率低下による腎不全のリスクも高くなる。他方、妊娠するとつわりが起これ、拒食症が重症になると生理が止まる。今まではなんとなく納得させられてきたこれらの病態も、エストロゲンを「高くなった血中脂肪値を下げる」ホルモンと見ることで科学的な説明が可能となる。さらに、インスリン分泌異常が糖尿病の原因となるように、胃エストロゲン分泌低下が高脂血症の原因の一つになりえるため、今後「高脂血症」に「胃エストロゲン分泌低下性高脂血症」という新しいカテゴリーが追加されるのではないかと考えている。また、東京大学医学部循環器内科教室との共同研究であるが、膜型エストロゲンレセプターを欠損させた BEC では傷害からの修復能が低下することが明らかになり、エストロゲンが血中中性脂肪値を下げることによる間接的な BEC の保護作用以外にも BEC そのものに作用して AD のリスクを下げる可能性が示された<sup>8</sup>。

インスリンやグルカゴンによる血糖値の調節機構は広く知られていたが、血中脂肪値を監視し、これを適正な範囲に調節するための臓器やホルモンは今まで知られていなかった。本研究代

表者は奇しくもインスリン発見（1921年）から100年の節目に当たる2021年に「胃エストロゲンによる血中脂肪の調節メカニズム」を提唱した。胃エストロゲンは血中脂肪値の変化により直接分泌量が変化することが示された初のホルモンであり、今後この研究を発展させることで脂質代謝調節の理解が飛躍的に前進し、血中脂肪を適切に調節ことでADの予防や治療の一助になることが期待される。

< 引用文献 >

1. Kanekiyo, T. & Bu, G. LRP1 and amyloid- $\beta$  clearance in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* (2014). doi:10.3389/fnagi.2014.00093/abstract
2. **Kanai, Y.**, Wang, D. & Hirokawa, N. KIF13B enhances the endocytosis of LRP1 by recruiting LRP1 to caveolae. *J Cell Biol* 204, 395–408 (2014).
3. Ueyama, T., Shirasawa, N., Ito, T. & Tsuruo, Y. Estrogen-producing steroidogenic pathways in parietal cells of the rat gastric mucosa. *Life Sci* 74, 2327–2337 (2004).
4. Ueyama, T., Shirasawa, N., Numazawa, M., Yamada, K., Shelangouski, M., Ito, T. & Tsuruo, Y. Gastric parietal cells: potent endocrine role in secreting estrogen as a possible regulator of gastro-hepatic axis. *Endocrinology* 143, 3162–3170 (2002).
5. Kobayashi, H. Estrogen synthesis in gastric parietal cells and secretion into portal vein. *Anat Sci Int* 95, 22–30 (2020).
6. Ito, T., Yamamoto, Y., Yamagishi, N. & **Kanai, Y.** Stomach secretes estrogen in response to the blood triglyceride levels. *Commun Biology* 4, 1364 (2021).
7. Clegg, D. J. Minireview: The Year in Review of Estrogen Regulation of Metabolism. *Mol Endocrinol* 26, 1957–1960 (2012).
8. Liu, P.-Y., Fukuma, N., Hiroi, Y., Kunita, A., Tokiwa, H., Ueda, K., Kariya, T., Numata, G., Adachi, Y., Tajima, M., Toyoda, M., Li, Y., Noma, K., Harada, M., Toko, H., Ushiku, T., **Kanai, Y.**, Takimoto, E., Liao, J. K. & Komuro, I. Tie2-Cre-Induced Inactivation of Non-Nuclear Estrogen Receptor- $\alpha$  Signaling Abrogates Estrogen Protection Against Vascular Injury. *Jacc Basic Transl Sci* (2022). doi:10.1016/j.jacbts.2022.07.001

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ito Takao, Yamamoto Yuta, Yamagishi Naoko, Kanai Yoshimitsu	4. 巻 4
2. 論文標題 Stomach secretes estrogen in response to the blood triglyceride levels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02901-9	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 Liu Pang-Yen, Fukuma Nobuaki, Hiroi Yukio, Kunita Akiko, Tokiwa Hiroyuki, Ueda Kazutaka, Kariya Taro, Numata Genri, Adachi Yusuke, Tajima Miyu, Toyoda Masayuki, Li Yuxin, Noma Kensuke, Harada Mutsuo, Toko Haruhiro, Ushiku Tetsuo, Kanai Yoshimitsu, Takimoto Eiki, Liao James K., Komuro Issei	4. 巻 8
2. 論文標題 Tie2-Cre?Induced Inactivation of Non-Nuclear Estrogen Receptor- Signaling Abrogates Estrogen Protection?Against Vascular Injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 55 ~ 67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacbts.2022.07.001	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 Tonami Kazuo, Hayashi Tatsuya, Uchijima Yasunobu, Kanai Masahiro, Yura Fumitaka, Mada Jun, Sugahara Kei, Kurihara Yukiko, Kominami Yuri, Ushijima Toshiyuki, Takubo Naoko, Liu Xiaoxiao, Tozawa Hideto, Kanai Yoshimitsu, Tokihiro Tetsuji, Kurihara Hiroki	4. 巻 未定
2. 論文標題 Coordinated Linear and Rotational Movements of Endothelial Cells Compartmentalized by VE-cadherin Drive Angiogenic Sprouting	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 107051 ~ 107051
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2023.107051	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 金井克光	4. 巻 74(5)
2. 論文標題 胃から分泌されるエストロゲンによる血中脂肪調節	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 未定
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊藤隆雄、山本悠太、山岸直子、金井克光
2. 発表標題 胃の壁細胞は血中トリグリセリド濃度の上昇に応じてエストロゲンを分泌する
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yamamoto Y, Ito T, Yamagishi N, Kanai Y
2. 発表標題 Stomach secretes estrogen in response to the blood triglyceride levels.
3. 学会等名 The 20th Congress of the International Federation of Associations of Anatomists. Istanbul, Turkey (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤隆雄、山本悠太、山岸直子、金井克光
2. 発表標題 血中トリグリセリド濃度による胃由来エストロゲン分泌への影響
3. 学会等名 第98回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤隆雄、山本悠太、山岸直子、金井克光
2. 発表標題 血中トリグリセリド濃度の上昇は直接胃エストロゲンの分泌や血中エストロゲン濃度を上昇させる
3. 学会等名 第90回和歌山医学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤 隆雄、山本悠太、山岸直子、金井克光
2. 発表標題 胃の壁細胞は血中トリグリセリド濃度に応じてエストロゲンを分泌する
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤 隆雄、山本悠太、山岸直子、金井克光
2. 発表標題 胃エストロゲンは血中トリグリセリドレベルを伝えるホルモンか？
3. 学会等名 第97回 日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤 隆雄、山本悠太、山岸直子、金井克光
2. 発表標題 胃の壁細胞は血中トリグリセリド濃度依存的にエストロゲンを分泌する
3. 学会等名 第89回 和歌山医学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 胃エストロゲン分泌能を評価するための検査	発明者 金井克光、山本悠太、伊藤隆雄	権利者 公立大学法人和歌山県立医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2023-003241	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

血中中性脂肪値を調節するメカニズムを解明  
<https://www.wakayama-med.ac.jp/intro/press/2021/12-03.html>  
解剖学第一講座 和歌山県立医科大学  
<https://www.wakayama-med.ac.jp/dept/igakubu/160411/index.html>  
ResearchMap  
<https://researchmap.jp/read0056906/>

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
---------	---------