

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11622

研究課題名(和文)小胞体ストレス制御に基づく認知症発症遅延法の開発

研究課題名(英文)Therapeutic targeting the endoplasmic reticulum stress to delay onset of Alzheimer's disease

研究代表者

中川 敏幸 (Nakagawa, Toshiyuki)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00271502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：急速に高齢化が進んでいる日本では、高齢化に伴う認知症の増加は喫緊な課題とされています。運動の習慣、肥満や糖尿病等の生活習慣病の予防、社会的孤立の解消等が、認知症発症を遅らせる可能性が示唆されていますが、科学的根拠となるエビデンスは不明のままです。本研究では、アルツハイマー病および肥満モデルマウスを用い、肥満の長期化に伴い海馬において小胞体ストレス(注1)が活性化すること、認知機能に重要な海馬神経新生細胞に発現するダブルコルチン(注2)mRNAが小胞体ストレス誘導性マイクロRNA(注3)により分解されることを確認しました。本研究成果は、自然科学領域を対象とした国際誌に公開されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、長期肥満マウスの海馬において、小胞体ストレスの活性化を神経新生細胞に確認し、その神経細胞に特異的に発現するダブルコルチン陽性細胞の神経突起が長期肥満マウスにおいて短く、その発現が減少することを確認しました。さらに、小胞体ストレスにより誘導され、ダブルコルチンを標的とするマイクロRNAを同定しました。今回の成果に基づき、「海馬神経新生 - 小胞体ストレスの活性化、マイクロRNAの発現 - ダブルコルチンmRNAの分解」が潜在的に予防可能な認知症発症危険因子の病態の一つと考えられ、認知症発症の病態解明への一助になることが期待されることから学術的・社会的意義である。

研究成果の概要(英文)：The growing prevalence of dementia owing to aging is considered an urgent issue in Japan because the aging population is extraordinarily expanding. Although it has been suggested that habits for example, regular exercise, preventing lifestyle diseases such as obesity and diabetes, and alleviating social isolation may delay the onset and exacerbation of dementia, scientific evidences supporting these declaration remains obscure. In this study, Alzheimer's disease and obesity model mice were used. We confirmed that prolonged obesity activates the endoplasmic reticulum stress in the neural stem cells of hippocampus and that doublecortin mRNA, which is important for hippocampal neurogenesis and cognitive function, is degraded by the endoplasmic reticulum stress-induced microRNAs. These research findings have been published in an international journal focused on the natural sciences.

研究分野：脳神経内科、神経科学

キーワード：アルツハイマー病 小胞体ストレス 統合的ストレス応答 海馬神経幹細胞 ダブルコルチン マイクロRNA 長期肥満

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病脳では神経原線維変化と  $\beta$ -アミロイドが特徴である。特に、 $\beta$ -アミロイドは発症の数十年前から沈着することから原因のひとつと考えられている<sup>1</sup>。申請者らは、 $\beta$ -アミロイドによる神経細胞死に小胞体ストレスが関与することを発見し<sup>2</sup>、アルツハイマー病における小胞体ストレスの役割について研究を進めてきた<sup>3-5</sup>。最近、小胞体ストレスがアルツハイマー病脳で活性化していることが示され<sup>6</sup>、小胞体ストレス経路のひとつである翻訳制御機構(統合的ストレス応答)がアルツハイマー病発症の要因のひとつとして注目されている<sup>7,8</sup>。

高齢者の認知症発症に、運動不足(寄与率:3%)や糖尿病(寄与率:1%)が関与する<sup>9</sup>。申請者らは、糖尿病モデルマウスにおいて、小胞体ストレスが海馬歯状回の神経新生を抑制することを示唆する結果を得た(米国神経科学会 2019 年)。一方、認知症に対する運動の効果として、マウス海馬歯状回の神経新生と脳由来神経栄養因子の誘導が示唆されている<sup>10</sup>。しかしながら、小胞体ストレス制御に対する運動の役割は不明のままであり、運動効果を模倣する機能性食品も知られていない。

## 2. 研究の目的

現在日本では、高齢者の 25%が認知症またはその予備群とされ、有病率は 85 歳以上で年齢とともに 40%から 80%に増加する。超高齢化社会を迎える日本において、認知症との共生および発症を遅らせ進行を緩やかにする予防法の開発が課題である。認知症発症に肥満や糖尿病の関与が示唆され、肥満や糖尿病の病態である小胞体ストレスがその要因のひとつとして注目されている。しかしながらその要因の機構の全容は未だ明らかでなく、認知症発症予防や重症化遅延法は確立されていない。

本研究では、認知症発症予防や重症化遅延法の開発を目指し、肥満や糖尿病 - 小胞体ストレス - 認知症における関連性を解明することを到達目標とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、アルツハイマー病モデルマウスと野生型マウスに高脂肪食を長期間(各 43 週間、67 週間)与え、長期間継続する肥満・糖尿病マウスを作製した。レプチン受容体欠損マウスは 6 週齢で肥満を認め 60 週齢までのマウスを解析した。長期肥満マウスの認知障害を物体位置認識試験にて解析した。長期肥満マウスの海馬において、小胞体ストレスシグナルの活性化をウエスタンブロットと免疫組織染色にて解析した。マウス海馬から神経幹細胞を培養し、分化中の細胞に小胞体ストレス刺激を行い、ダブルコルチンの発現を検討した。また、小胞体ストレス刺激後に RNA 抽出を行い、マイクロ RNA シークエンシングにてコントロールと発現比較を行った。

## 4. 研究成果

(1) 長期肥満マウスの作製: 肥満・糖尿病モデルマウスであるレプチン受容体欠損マウス(*db/db*)は、6 週齢で肥満を認め 60 週齢までのマウスを解析した(図 1 上、左)。野生型マウス(C57BL/6)とアルツハイマー病モデルマウス(APP23: Swedish 変異を持つヒトアミロイド前駆体タンパク質遺伝子のトランスジェニックマウス)に高脂肪食(HFD: high fat diet, 60%脂肪)を長期間(各 43 週間、67 週間)与え、長期間継続する肥満・糖尿病マウスを作製した(各図 1 上、中、右)。

(2) 海馬における小胞体ストレス関連タンパク質の発現解析(ウエスタンブロット): 転写因子 ATF4 及びその下流の転写因子 CHOP の発現増加を認めた(図 1 下段)。

(3) 長期肥満マウスの認知機能を物体位置認識試験にて解析した。標準食の APP23 マウスでは、移動前の物体(P)に比し移動させた物体(N)の探索時間(Index)が増加傾向にあったが、長期肥満 APP23 マウスでは有意に短くなり、行動の異常を確認した(図 2)。

(4) 長期肥満 APP23 マウスの海馬におけるウエスタンブロット解析にて、未分化海馬神経細胞に発現するダブルコルチンタンパク質の減少を認めた。そこで、*db* マウスと長期肥満 APP23 マウス海馬の免疫染色を行い、共焦点顕微鏡にて解析した。長期肥満に伴いダブルコルチン陽性の神経突起が短いことを確認した(図 3)。さらに、ダブルコルチン陽性の神経突起が短い細胞に CHOP が共局在していることが分かった(図 3)。

(5) マウス海馬から神経幹細胞を培養し、小胞体ストレス刺激によるダブルコルチンの発現解析を行った(図 4)。ウエスタンブロット解析にてダブルコルチンタンパク質の減少を認めたため、mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR にて解析した。小胞体ストレス刺激によるダブルコルチン mRNA の減少を認めた(図 5)。

(6) マウス海馬神経幹細胞の Dicer をノックダウン後に、小胞体ストレス刺激によるダブルコルチン mRNA の減少が改善されたため、マウス海馬神経幹細胞をタブシガルギン及び DMSO 処理し、マイクロ RNA シークエンシングを行った。マイクロ RNA シークエンシングにより、小胞体ストレス刺激をした海馬未分化神経細胞にて、miR-148a-5p, miR-129b-3p, miR-135a-2-3p の発現増加と miR-1247-3p の減少を認めた(図 6)。

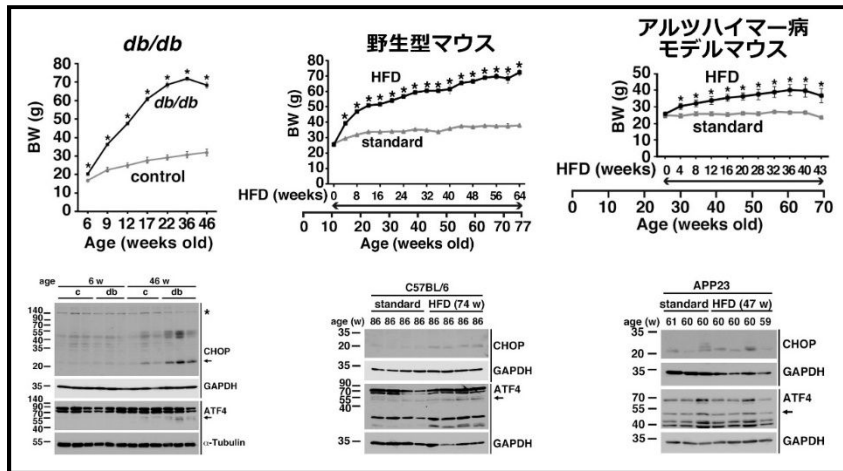


図1 長期肥満マウスの作製  
*db/db* マウスは標準飼(CE2) 野生型マウスとアルツハイマー病モデルマウスは60%高脂肪食(HFD)を投与した。上段:年齢及びHFD 投与後における体重変化を示す。下段:海馬組織におけるウエスタンプロット。

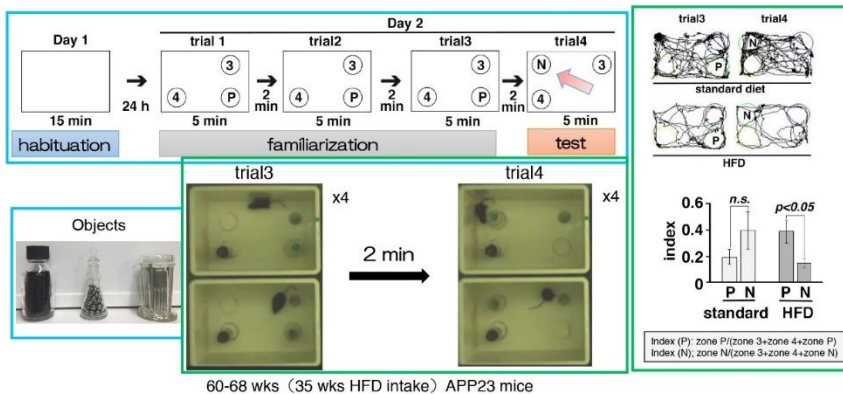


図2 標準体重及び長期の肥満を伴ったアルツハイマー病モデルマウスマウスの物体位置認識試験による行動解析  
 左上段: 実験プロトコル; 下段左: 三物体; 下段中: 1つの物体の移動前 (trial3) と移動後 (trial4) のビデオ静止画像; 右: 標準食 (standard diet) のマウスと高脂肪食 (HFD) のマウスの trial3 と trial4 の移動の代表的な軌跡の例 (マウスの中心部を認識)。SMART ビデオ解析ソフトウェアを用い、物体の探索時間を解析した (グラフ)。移動する物体の探索時間を三物体合計の探索時間で割り Index を求め比較した。

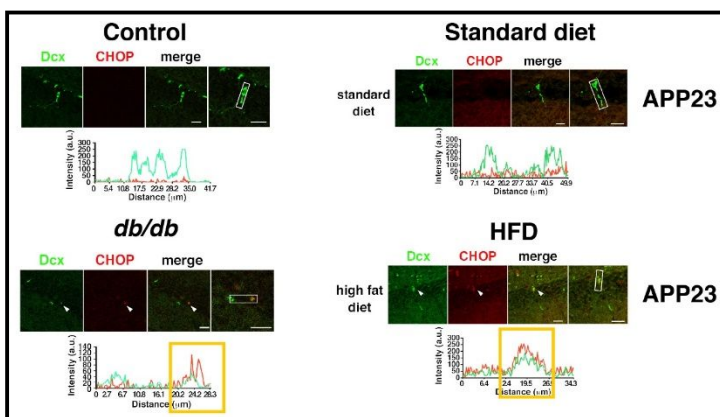


図3 共焦点顕微鏡像 (左) コントロールマウス(上)と *db* マウス(下); (右) 標準食(上)と高脂肪食(下)を摂取したアルツハイマー病モデルマウス海馬歯状回の免疫染色。Dcx: ダブルコルチン; CHOP。各右端の白枠の染色性の強さのプロファイルをそれぞれ下段に示す。黄色枠はダブルコルチンとCHOPが同じ細胞で発現していることを示す。

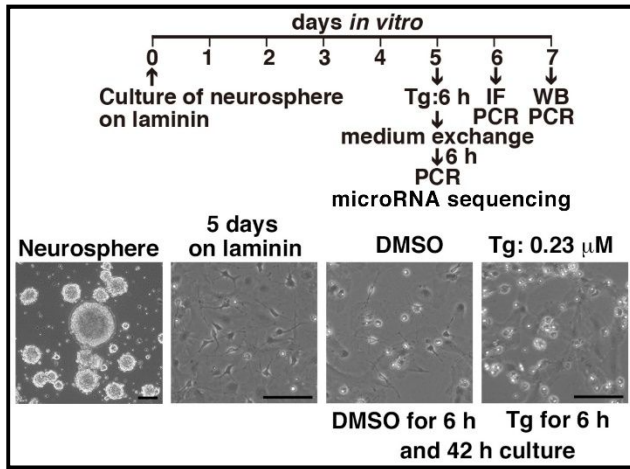


図4 マウス海馬神経幹細胞をラミニン処理培養皿にて分化誘導し、タブシガルギン (Tg) 処理を6時間行った。

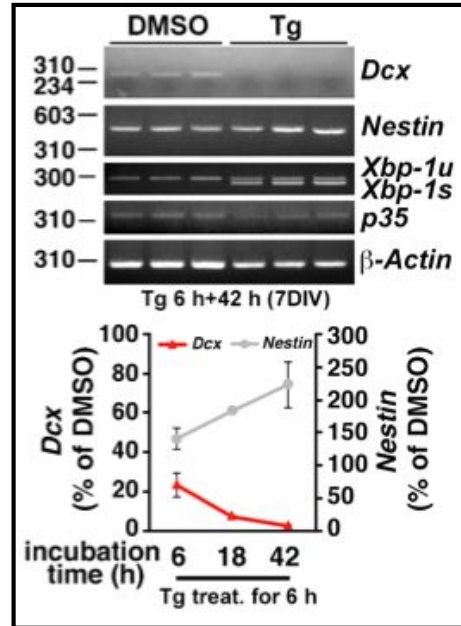


図5 RT-PCR にてダブルコルチン mRNA の減少を認めた。

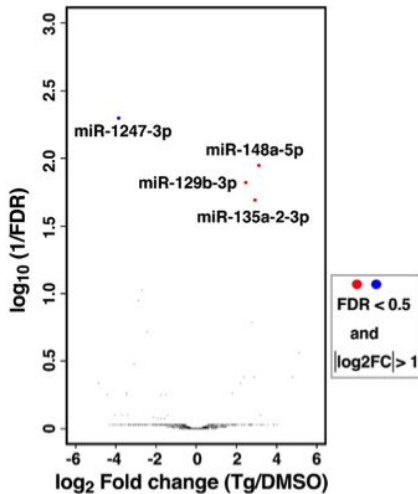


図6 小胞体ストレス刺激をした海馬未分化神経細胞におけるマイクロRNAの発現比較

#### 用語の解説 >

##### 注1 小胞体ストレス:

小胞体は細胞内に存在する小器官の一つで、細胞質内カルシウム濃度の調節、タンパク質の翻訳や糖鎖修飾に関与しています。合成されたタンパク質は高次構造をとり折りたたまれますが、折りたたみに異常が起こると細胞はシグナルを発信(小胞体ストレス)します。そのシグナルには、PERK、ATF6、IRE1 タンパク質が関与し、翻訳抑制と小胞体シャペロン遺伝子等の発現により細胞には正常に戻す反応(小胞体ストレス応答)がみられます。

##### 注2 ダブルコルチン:

X連鎖滑脳症・二層皮質症候群(X-linked lissencephaly and double cortex syndrome)の原因遺伝子として同定され、微小管結合タンパク質で細胞移動に関与することが示唆されています。

##### 注3 マイクロRNA:

ゲノムにあり、多段階で生成されたタンパク質をコードしない20-25塩基のRNAで、メッセンジャーRNAに結合し、その分解・翻訳抑制・ポリA鎖分解等により、標的遺伝子の発現を抑制します。

<引用文献>

- 1 Selkoe, D. J. & Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8, 595-608, doi:10.15252/emmm.201606210 (2016).
- 2 Nakagawa, T. *et al.* Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103 (2000).
- 3 Nakagawa, K. *et al.* Dietary Quercetin Ameliorates Memory Impairment in a Murine Model of Alzheimer ' s Disease with Obesity and Diabetes, Suppressing ATF4 Expression. *J Neurol Neurosci* 8, 234, doi:10.21767/2171-6625.1000234 (2017).
- 4 Hayakawa, M. *et al.* Quercetin reduces eIF2alpha phosphorylation by GADD34 induction. *Neurobiol Aging* 36, 2509-2518, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.05.006 (2015).
- 5 Ohta, K. *et al.* Autophagy impairment stimulates PS1 expression and gamma-secretase activity. *Autophagy* 6, 345-352 (2010).
- 6 Hoozemans, J. J. *et al.* The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. *The American journal of pathology* 174, 1241-1251, doi:10.2353/ajpath.2009.080814 (2009).
- 7 Nakagawa, T. & Ohta, K. Quercetin Regulates the Integrated Stress Response to Improve Memory. *Int J Mol Sci* 20, doi:10.3390/ijms20112761 (2019).
- 8 Lourenco, M. V., Ferreira, S. T. & De Felice, F. G. Neuronal stress signaling and eIF2alpha phosphorylation as molecular links between Alzheimer's disease and diabetes. *Prog Neurobiol* 129, 37-57, doi:10.1016/j.pneurobio.2015.03.003 (2015).
- 9 Livingston, G. *et al.* Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet* 396, 413-446, doi:10.1016/S0140-6736(20)30367-6 (2020).
- 10 Choi, S. H. *et al.* Combined adult neurogenesis and BDNF mimic exercise effects on cognition in an Alzheimer's mouse model. *Science* 361, doi:10.1126/science.aan8821 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 1件）

1. 著者名 Nakagawa Kiyomi, Islam Saiful, Ueda Masashi, Nakagawa Toshiyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Endoplasmic reticulum stress contributes to the decline in doublecortin expression in the immature neurons of mice with long-term obesity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-05012-5	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 Tana, Nakagawa Toshiyuki	4. 巻 588
2. 論文標題 Luteolin ameliorates depression-like behaviors by suppressing ER stress in a mouse model of Alzheimer's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 168 ~ 174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.12.074	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 Hayakawa-Ogura Miki, Tana, Nakagawa Toshiyuki, Itoh Masanori	4. 巻 654
2. 論文標題 GADD34 suppresses eIF2 phosphorylation and improves cognitive function in Alzheimer's disease-model mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 112 ~ 119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.02.077	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 K. Nakagawa, S. Islam, M. Ueda, T. Nakagawa
2. 発表標題 Endoplasmic reticulum stress decreases the expression of doublecortin in the immature neurons of mice with long-term obesity
3. 学会等名 Society for Neuroscience meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

1) プレスリリース 長期肥満に基づく認知機能障害に小胞体ストレスが関与する <a href="https://www.gifu-u.ac.jp/news/research/2022/01/entry26-11278.html">https://www.gifu-u.ac.jp/news/research/2022/01/entry26-11278.html</a>
2) JST Science Japanのwebページによる研究紹介 Cognitive dysfunction in chronic obesity involves endoplasmic reticulum stress: Confirmed in a mice model by Gifu University research group <a href="https://sj.jst.go.jp/news/202206/n0602-02k.html">https://sj.jst.go.jp/news/202206/n0602-02k.html</a>

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