

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：35302

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19762

研究課題名（和文）膜の質的变化に着目した個体老化を反映する血液バイオマーカーの確立

研究課題名（英文）Establishment of blood-based biomarkers to reflect age-related changes in biological membrane

研究代表者

木村 展之（Kimura, Nobuyuki）

岡山理科大学・獣医学部・教授

研究者番号：80392330

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）：本研究の成果により、カニクイザルでは老化に伴い血漿中に存在する細胞外微小胞（EV）が増加することが判明した。また、血漿由来EVのプロテオーム解析によりApolipoprotein A-I（ApoA-I）の有意な上昇が確認された。ヒトでは血中ApoA-Iの上昇と認知機能低下との相関が指摘されていることから、ApoA-Iは脂質代謝のみならず脳老化の新たな指標となる可能性が示唆された。一方、Pregnancy zone proteinといった性腺由来蛋白質の減少が確認されたことから、血漿由来EVは老化に伴う生殖機能の新たな評価系として利用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、個体老化を簡便且つ客観的に評価できる血液由来バイオマーカーの開発が実現できる可能性が大きく高まった。また、膜の質的变化に着目したプロテオミクス解析によって加齢性変化を示す様々な膜蛋白質の同定に成功したことから、生体膜そのもののオミクス解析＝メンブレノミクスという新たな生化学的解析手法の有効性が示された。さらに、本研究によって同定された血漿由来細胞外微小胞の膜蛋白質をターゲットとすることで、老化に伴う認知機能や生殖機能の低下を評価するための新たな検索性の開発も期待できる。

研究成果の概要（英文）：In cynomolgus monkeys, the levels of extracellular vesicles (EVs) secreted in plasma increased with aging. Proteomic analysis of plasma-derived EVs showed a significant increase in Apolipoprotein A-I (ApoA-I) levels. Since the levels of ApoA-I in blood are considered to correlate with cognitive decline in humans, the levels of ApoA-I in plasma-derived EVs may be a new indicator of brain aging as well as lipid metabolism. On the other hand, a decrease in gonad-derived proteins such as Pregnancy zone protein was observed. This finding suggests that plasma-derived EVs could be used as a new evaluation system for reproductive functions associated with aging.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：実験病理学

キーワード：老化 バイオマーカー 細胞外微小胞

## 1. 研究開始当初の背景

かつてない超高齢化社会に突入した我が国ではフレイルを含む老年性疾患の予防・対応が喫緊の課題となっているが、老化の進行スピードや程度には大きな個体差が存在するため、各個人の老化の程度を客観的に評価できるバイオマーカーの確立が不可欠である。近年、炎症と老化との関係性に注目が集まっているが、炎症は癌や感染症への罹患の他、肥満による影響も受けるため、必ずしも純粋に老化現象を反映しているとは言えない。このため、各種疾患やストレス、肥満といった様々な交絡因子による影響を可能な限り排除した新たな個体老化の評価法を確立する必要がある。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまで、ヒトに近縁な霊長類であり一切の遺伝子操作を必要とせずアルツハイマー病 (AD) 主病変が老年性に再現されるカニクイザルをモデル動物として、老化に伴う AD 発症機序の解明を目的とする研究を行ってきた。その結果、脳内では老化に伴いエンドサイトーシスと呼ばれる小胞輸送系の機能が低下し (Kimura et al., J Neurosci Res 2007; Kimura et al J Biol Chem 2009)、エンドソームのみならずエクソソームを主とする細胞外微小胞 (EV) の膜に局在する蛋白質の組成が大きく変化することを発見した (Kimura et al., 2016; Koinuma et al., 2021)。これらの結果から、個体の老化は生体膜の質的な変化を引き起こす可能性が高いと考えられる。また、全身の各種細胞から分泌された EV は血液から回収できるため、バイオマーカーとして理想的なターゲットである。そこで本研究では、ヒト代替モデルである実験用カニクイザルを用いて、個体の老化度を反映する新たなバイオマーカーの確立を目指す。

## 3. 研究の方法

まず、性成熟を終えた健康な若齢 (3 歳以上 10 歳未満) 成熟齢 (10 歳以上 20 歳未満)・型糖尿病や高脂血症等の老年性疾患 (変化) が確認される中高齢 (20 歳以上 30 歳未満)・AD 病変の形成が確認される老齢 (30 歳以上) の合計 4 群からなるカニクイザルから血液を採取する。

続いて、各群のカニクイザル個体から採取した血液から血漿を分離した後、超遠心分離法によって EV を回収して western blot 法による検証を行う。さらに、各群のカニクイザルから回収した血漿由来 EV のプロテオーム解析を行い、個体老化と相関する蛋白質を同定する。

## 4. 研究成果

Western blot 法による検証実験により、カニクイザルでは老化に伴い血漿中に分泌される EV 量が顕著に増加することが明らかとなった。このため、血中 EV の存在量自体が個体老化を示すバイオマーカーとなる可能性が示唆された。さらに、ビーズ法を用いて血中由来蛋白質を除去したカニクイザル血漿由来 EV のプロテオーム解析を実施した結果、老齢カニクイザルの血漿から回収した EV では Apolipoprotein A-I (ApoA-I) の有意な上昇が確認された。

ApoA-I は主に肝臓や小腸で産生されるアポリポ蛋白質であり、HDL の主要構成因子として知られている。このため、霊長類の体内では老化に伴い脂質代謝系の変化が生じている可能性が極めて高いと考えられる。また、ヒトでは血中 ApoA-I の上昇が認知機能低下と相関するという報告があるため (Ma et al., Biomed Res Int. 2015)、ApoA-I は全身性の老化のみならず脳神経の老化とも関連性が高いと考えられる。ApoA-I と同様に HDL を構成し、脳内のコレステロール輸送と代謝を担う ApoE がアルツハイマー病の強力なリスク因子であるという事実を鑑みると、老化メカニズムにおける脂質代謝の重要性が強く示唆された。

一方、老齢カニクイザルの血漿由来 EV では Pregnancy zone protein をはじめとする性腺由来蛋白質の有意な減少が確認された。このため、血漿由来 EV は生殖機能の低下を評価するための新たな検索系としても利用できる可能性が示唆された。

## <引用文献>

Kimura N, Imamura O, Ono F, Terao K. Aging attenuates dynactin-dynein interaction: down-regulation of dynein causes accumulation of endogenous tau and amyloid precursor protein in human neuroblastoma cells. J Neurosci Res 2007, 85, 2909-2916.

Kimura N, Inoue M, Okabayashi S, Ono F, Negishi T. Dynein dysfunction induces endocytic pathology accompanied by an increase in Rab GTPases: a potential mechanism underlying age-dependent endocytic dysfunction. J Biol Chem 2009, 284, 31291-31302.

Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y. Dynein Dysfunction Reproduces Age-Dependent Retromer Deficiency: Concomitant Disruption of Retrograde Trafficking Is Required for Alteration in  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Metabolism. Am J Pathol 2016, 186, 1952-1966.

Koinuma S, Shimozawa N, Yasutomi Y, Kimura N. Aging induces abnormal accumulation

of A in extracellular vesicle and/or intraluminal membrane vesicle-rich fractions in nonhuman primate brain. *Neurobiol Aging* 2021, 106, 268-281.

Ma C, Li J, Bao Z, Ruan Q, Yu Z. Serum Levels of ApoA1 and ApoA2 Are Associated with Cognitive Status in Older Men. *Biomed Res Int* 2015, 48, 481621.

## 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 Ando Sana, Sakurai Masashi, Shibutani Shusaku, Kimura Nobuyuki, Shimozawa Nobuhiro, Yasutomi Yasuhiro, Yabe Ryotaro, Ohama Takashi, Sato Koichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Age-related alterations in protein phosphatase 2A methylation levels in brains of cynomolgus monkeys: a pilot study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	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） 10.1093/jb/mvad006	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 Munesue Yoshiko, Ageyama Naohide, Kimura Nobuyuki, Takahashi Ichiro, Nakayama Shunya, Okabayashi Sachi, Katakai Yuko, Koie Hiroshi, Yagami Ken-ichi, Ishii Kazuhiro, Tamaoka Akira, Yasutomi Yasuhiro, Shimozawa Nobuhiro	4. 巻 363
2. 論文標題 Cynomolgus macaque model of neuronal ceroid lipofuscinosis type 2 disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 114381 ~ 114381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.expneurol.2023.114381	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 Ueda Tetsuhiro, Takeuchi Toshihide, Fujikake Nobuhiro, Suzuki Mari, Minakawa Eiko N., Ueyama Morio, Fujino Yuzo, Kimura Nobuyuki, Nagano Seiichi, Yokoseki Akio, Onodera Osamu, Mochizuki Hideki, Mizuno Toshiki, Wada Keiji, Nagai Yoshitaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Dysregulation of stress granule dynamics by DCTN1 deficiency exacerbates TDP-43 pathology in Drosophila models of ALS/FTD	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	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） 10.1186/s40478-024-01729-8	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村展之	
2. 発表標題 アルツハイマー病のZoobiquity研究：ヒトサロゲートモデルとしてのカニクイザル	
3. 学会等名 第30回サル疾病ワークショップ（招待講演）	
4. 発表年 2022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
---------	---------