

200922018A  
200922018B

厚生労働科学研究費補助金  
長寿科学総合研究事業

孤発性アルツハイマー病の病態機序解明を目的とする、  
神経系軸索輸送の加齢性変化および障害メカニズムの解明

平成20～21年度 総合研究報告書  
平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 木村展之

平成22（2010）年3月

# 目次

## I. 総合研究報告

- 孤発性アルツハイマー病の病態機序解明を目的とする、神経系軸索輸送の  
加齢性変化および障害メカニズムの解明 ----- 1

木村 展之 (医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター)

## II. 総括研究報告

- 孤発性アルツハイマー病の病態機序解明を目的とする、神経系軸索輸送の  
加齢性変化および障害メカニズムの解明 ----- 7

木村 展之 (医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター)

## III. 分担研究報告

1. Dynein機能障害による細胞内A $\beta$ 蓄積とエキソソーム放出阻害 ----- 13

木村 展之 (医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター)

2. shRNA発現ウイルスベクターの評価検討に関する研究 ----- 19

井上 誠 (ディナベック株式会社)

3. タンパク質リン酸化亢進による軸索輸送障害メカニズムに関する研究  
----- 21

根岸 隆之 (青山学院大学)

## IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 25

## V. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 27

# I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）

総合研究報告書

孤発性アルツハイマー病の病態機序解明を目的とする、神経系軸索輸送の加齢性変化および障害メカニズムの解明

研究代表者 木村 展之 医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター

研究要旨：

認知症の代表格であるアルツハイマー病（AD）は、原因遺伝子の変異に起因する家族性アルツハイマー病（FAD）と、加齢性に発症する孤発性アルツハイマー病（SAD）の2つに大別され、実に8割以上もの患者が後者に属する。しかしながら、SAD発症メカニズムの全容は未だ解明されておらず、加齢との関係性についても不明な部分が多い。

カニクイザルはヒトに近縁な霊長類であり、AD主病変の1つである老人斑が加齢性に再現されることから、加齢とAD発症メカニズムとの関係を検索するモデル動物として非常に高いポテンシャルを有している。そして我々は、カニクイザル脳組織を用いた過去の検索において、老人斑が確認される老齢カニクイザルの脳組織では、軸索輸送と呼ばれる細胞内輸送機能が加齢性に低下または障害を受けている可能性を示唆する研究成果を得た。

そこで本研究では、SAD発症メカニズムの全容解明とその病態に応じた治療法の開発を目指し、軸索輸送の低下・障害がもたらす神経細胞への影響とAD病態との関係を検索するとともに、その障害メカニズムを明らかにすることを目的とする研究活動を行った。

その結果、軸索輸送モーター蛋白の1つである dynein の機能障害は、エンドソームと呼ばれる輸送小胞の停滞と肥大化を引き起こし、同部位におけるアミロイド前駆体蛋白(APP)の有意な蓄積と、アミロイドβ蛋白 (Aβ) の細胞内蓄積を誘導することが明らかとなった。

また、カニクイザル脳組織を用いた検索により、それらエンドソームの肥大化病変は老人斑形成に先立って生じていることが明らかとなった。近年、Aβの産生・蓄積がAD発症の重要な因子であるという「Aβカスケード仮説」が大いに支持されているが、遺伝子変異を伴わないSAD患者の脳内において、何故Aβが加齢に伴い蓄積するのかは不明であった。

これらのことから、加齢に伴う軸索輸送の障害が細胞内でのAβ蓄積を引き起こし、その結果としてAD発症に至るのではないかという新たな病態メカニズムの存在が示唆された。

そこでこのメカニズムを、細胞内での輸送停滞がAD発症に関与するという観点から「Traffic Jam 仮説」と名付け、今後さらにAD病態メカニズムの全容解明を目指して研究活動を発展させたい。さらに神経化学的検索により、軸索輸送の障害には脱リン酸化酵素PP2Aの活性低下が関与している可能性が示唆された。

分担研究者

井上 誠 デイナベック株式会社 部長

根岸 隆之 青山学院大学理工学部 助教

#### A. 研究目的：

女性人口の4人に1人が高齢者という、他に類をみない高齢化社会に突入した我が国において、アルツハイマー病（AD）を代表とする認知症の克服は急務である。

ADは原因遺伝子の変異によって発症する家族性アルツハイマー病（FAD）と、加齢性に発症する孤発性アルツハイマー病（SAD）の2つに大別されるが、AD患者の実に8割以上がSADに属することや、SAD発症に関与する最大の危険因子は「加齢」であると考えられていることから、この両者の発症メカニズムには何らかの差異が存在する可能性が指摘されている。

これらのことから、加齢によって神経系にどのような変化が生じているのかを解明することは、SAD発症メカニズムの全容解明に必須のアプローチであると考えられる。

我々はこれまで、ヒトに近縁な霊長類であり、AD主病変の1つである老人斑が加齢性に再現されるカニクイザルの脳組織を用いて、AD病変形成メカニズムの解明を目的とした様々な加齢性変化の検索を行ってきた。その結果、老人斑の主要構成蛋白であり、AD発症メカニズムにおける重要病因蛋白の1つであるアミロイドβ蛋白（Aβ）は、老人斑が形成される時期よりも早期に細胞内での蓄積が顕著に生じており、カニクイザル脳組織では加齢に伴い、軸索輸送と呼ばれる細胞内輸送機能が低下している可能性を示唆する結果が得られた。

軸索輸送は神経細胞の細胞体ーシナプス間の輸送のみならず、細胞内の様々な輸送機能を担当していることが知られている。そして近年、細胞内輸送機能の障害とAD病態との関係に非常に注目が高まってきており、FAD関連遺伝子変異もまた、細胞内輸送機能の障害に関与しているという可能性を示唆する報告も寄せられている。

そこで本研究ではSAD発症メカニズムの全容解明を目指し、軸索輸送の低下・障害がSAD発症メカニズムにどのように関与しているのか、また、何故加齢によって軸索輸送が低下・障害を受けるのかを明らかにすることを目的とする。

#### B. 研究対象および方法

##### ①軸索輸送障害とAD病態との関係

AD患者脳組織では、エンドソームと呼ばれる輸送小胞の肥大化と同所におけるアミロイド前駆体蛋白（APP）の蓄積が確認されており、エンドサイトーシスとAD発症メカニズムとの関連性が示唆されている。そこで若齢から老齢までのカニクイザル脳組織を用いて、加齢に伴うエンドサイトーシス関連蛋白群の変化を免疫組織科学および生化学的手法を用いて検索する。

現在、不要なAβの産生・蓄積がAD発症メカニズムの鍵を握るとするアミロイドカスケードが大いに支持されている。しかしながら、遺伝子変異を伴わないSAD患者におけるAβの蓄積メカニズムは依然として不明である。そこで、RNA干渉法を応用して軸索輸送障害の*in vitro*モデルを作成し、軸索輸送の障害とAβ蓄積との関係を明らかにするための検索を行う。（木村）

## ②shRNA 発現ベクターの開発と評価

軸索輸送障害による神経系への影響を *in vivo* レベルで検索を行うため、脳内で shRNA を持続的に発現可能なベクターの開発を行い、その効果を評価する。(井上)

## ③軸索輸送障害のメカニズム検索

AD 患者の脳組織では脱リン酸化酵素の活性が顕著に低下していることが知られており、老人斑と並ぶ AD 主病変である神経原線維変化の形成にもリン酸化の亢進が大きく関与していることが広く知られている。

そこで本研究では、加齢に伴うリン酸化・脱リン酸化バランスの異常が軸索輸送の障害を引き起こすのではないかと仮定し、神経系培養細胞を用いてリン酸化亢進による軸索輸送の障害を検索する。(根岸)

## C. 研究結果：

### ①軸索輸送障害と AD 病態との関係

各種エンドソーム認識抗体を用いた検索の結果、老齡カニクイザルの脳組織では AD 患者と同様に各種エンドソームの肥大化が確認された。また、それらエンドソームの肥大化病変は、老人斑形成に先立って生じていることが明らかとなった。

*In vitro* 軸索輸送障害モデルを用いた検索の結果、軸索輸送の障害は各種 Rab GTPase の発現亢進を伴うエンドソームの肥大化を再現することが確認された。さらに、軸索輸送の障害は細胞内における APP の有意な蓄積を引き起こし、A $\beta$ を含む $\beta$ 切断産物が有意に蓄積することが明らかとなった。また、軸索輸送の障害により、APP は初期エンドソームのみならず神経突起の先端部においても蓄積することが明らかとなった。

培養上清から回収した膜画分を生化学的に検索したところ、軸索輸送の障害はエキソソームの放出量を低下させることが明らかとなった。さらに、トランスフェリンレセプターの膜へのリサイクル低下と、APP のエンドサイトーシス亢進が確認された。

## ②shRNA 発現ベクターの開発

VSVG シュードタイプ shRNA(ヒトダイニン)搭載 SIV ベクターの開発に成功し、そのノックダウン効果が確認されたことから、同ベクターを用いて *in vivo* 軸索輸送障害モデル動物を作出する可能性が大いに示唆された。しかしその一方で、siRNA 導入細胞ほどのノックダウン効果が得られなかったことから、より効果的な shRNA 配列の再検討が必要であると考えられる。

## ③軸索輸送障害のメカニズム検索

オカダ酸処理によって脱リン酸化酵素の活性が阻害された細胞では、dynein および dynactin に大きな変化はみられなかったが、late endosome のマーカーでもある Rab7 GTPase のタンパク量が有意に増加しており、Rab7 陽性エンドソームの肥大化が確認された。また、この Rab7 の発現亢進は PP2A 特異的阻害剤によってのみ確認された。

## D. 考察：

カニクイザル脳組織でも AD 初期病変であると考えられている各種エンドソームの肥大化病変が確認されたことから、カニクイザルが老人斑の形成という「結果」のみならず、同病変形性へ至る「経路」を検索する上でも非常に有用なモデル動物であることが実証された。また、*In vitro* 軸索輸送

障害モデルを用いた成果によって、軸索輸送の障害はエンドサイトーシス機構全体の障害を介して A $\beta$ の細胞内蓄積を引き起こし、AD 発症の一因となっている可能性が示唆された。

カニクイザル脳組織を用いた前年度の研究成果により、軸索輸送の障害やエンドソームの肥大化病変は老人斑形成に先立って生じることが明らかとなっている。そして、軸索輸送の障害は A $\beta$ の細胞内蓄積を引き起こすことが確認されたことから、加齢に伴う軸索輸送の障害が細胞内での輸送停滞を引き起こし、その結果として細胞内に不要な A $\beta$ が蓄積して A $\beta$ カスケードが動き出すという新たな病態メカニズムの存在が示唆された。そこで、この仮説を「Traffic Jam 仮説」と名付け、SAD 病態メカニズムの全容解明と、輸送機能の回復・機能低下阻止をターゲットとする新規予防・治療法開発に向けた応用研究への発展を目指したい。

#### E. 結論：

本研究によって、加齢性神経変性疾患のサロゲートモデルとしてのカニクイザルの有用性・信頼性が再確認されたとともに、加齢に伴う軸索輸送の障害が A $\beta$ の蓄積を介して、AD 発症の一因となっている可能性が示唆された。

今後さらに本研究系を発展させ、in vivo での軸索輸送障害モデルを確立し、AD 発症メカニズムの解明に向けた更なる検索とともに、診断・治療法の開発に向けた王予研究を目指したい。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kimura N, Inoue M, Okabayashi S, Ono F and Negishi T. Dynein dysfunction induces endocytic pathology accompanied by an increase in Rab GTPases: a potential mechanism underlying age-dependent endocytic dysfunction. *JBC*. 284(45): 31291-31302. 2009.

Kimura N. Endocytic dysfunction and Alzheimer's disease. *Endocytosis (Book)*. In Press. Asakawa H, Tsunoda M, Kaido T, Hosokawa M, Sugaya C, Inoue Y, Kudo Y, Satoh T, Katagiri H, Akita H, Saji M, Wakasa M, Negishi T, Tashiro T, Aizawa Y. Enhanced Inhibitory Effects of TBT Chloride on the Development of F(1) Rats. *Arch Environ Contam Toxicol*. In Press.

Nakagami A, Negishi T, Kawasaki K, Imai N, Nishida Y, Ihara T, Kuroda Y, Yoshikawa Y, Koyama T. Alterations in male infant behaviors towards its mother by prenatal exposure to bisphenol A in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) during early suckling period. *Psychoneuroendocrinology*. 34: 1189-1197. 2009.

Okabayashi S and Kimura N. Leucine-rich glioma inactivated 3 is involved in amyloid  $\beta$  peptide uptake by astrocytes and endocytosis itself. *Neuroreport*. 19(12): 1175-1179. 2008.

Kimura N. Nonhuman Primates as the Animal Model for Age-Dependent Diseases. *Wom*

*en and Aging: New Research (Book). In Press.*

Takahashi M, Negishi T, Imamura M, Sawano E, Kuroda Y, Yoshikawa Y, Tashiro T.

Alterations in gene expression of glutamate receptors and exocytosis-related factors by a hydroxylated-polychlorinated biphenyl in the developing rat brain.

*Toxicology*. 257(1-2): 17-24. 2009.

Kobayashi Y, Negishi T, Mizumura A, Watanabe T, Hirano S. Distribution and excretion of arsenic in cynomolgus monkey following repeated administration of diphenylarsinic acid. *Arch Toxicol*. 82(8): 553-61. 2008

## 2. 学会発表

Kimura N and Yanagisawa K. Immunohistochemical analyses of GM1-ganglioside-bound amyloid  $\beta$ -protein in various aged cynomolgus monkey brains. 2009. Vienna (Austria). July 11th - 16th, 2009.

木村展之, 井上誠, 岡林佐知, 小野文子, 根岸隆之. Dynein dysfunction induces endocytic pathology accompanied by increased Rab GTPases. 第28回日本認知症学会. 宮城県仙台市. 2009年11月20日~22日.

岡林佐知, 木村展之. LIG3 is involved in A $\beta$  uptake by astrocytes and endocytosis in neural cells. 第28回日本認知症学会. 宮城県仙台市. 2009年11月20日~22日.

根岸隆之, 高橋理貴, 小柳洸志, 大西大空,

平野靖史郎, 田代朋子. 小脳顆粒細胞におけるジフェニルアルシン酸による酸化ストレスと細胞死. 第52回日本神経化学会. 群馬県伊香保. 2009年6月22日.

小柳洸志, 高橋理貴, 根岸隆之, 田代朋子. 培養小脳顆粒細胞における低カリウム誘発細胞死に対する甲状腺ホルモンT4の細胞保護作用. 第52回日本神経化学会. 群馬県伊香保. 2009年6月22日.

角田正史, 若佐美佳, 浅川秀雄, 高橋理貴, 根岸隆之, 峽戸孝也, 細川まゆ子, 菅谷ちえ美, 井上葉子, 相澤好治, 田代朋子. ラット脳の発達に対するトリブチルスズ曝露の影響に関する二世世代トキシコジェノミク研究. 第52回日本神経化学会. 群馬県伊香保. 2009年6月24日.

澤野恵梨香, 高橋理貴, 船津尚子, 木村洋人, 根岸隆之, 田代朋子. GABA神経伝達機構の発達における甲状腺ホルモンの役割. 第52回日本神経化学会. 群馬県伊香保. 2009年6月22日.

宇野健史, 石橋瑛, 高橋理貴, 根岸隆之, 田代朋子. 2型糖尿病モデル・GKラットの脳におけるホモシステイン代謝の変化. 第52回日本神経化学会. 群馬県伊香保. 2009年6月22日.

根岸隆之. サル類の行動を指標とした胎生期化学物質曝露による神経発達毒性の評価. 日本先天異常学会 (DNT講演). 鹿児島県鹿児島市. 2009年6月25日.

Kimura N, Imamura O, Ono F, Terao K.  
Age-related changes of axonal transport motor  
proteins: siRNA-induced down-regulation  
causes accumulation of tau and APP.  
International Conference of Alzheimer's  
Disease and Related Disorders 2008. Chicago  
(U.S.A.). July 26th -Aug 1st, 2008.

11-13 日

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

木村展之, 柳澤勝彦. カニクイザル脳組織  
を用いた GM1 ガングリオシド結合型  
A $\beta$ (GAB)の免疫組織化学的検索. 第 27 回日  
本認知症学会. 群馬県前橋市. 2008 年 10 月  
9 日～11 日.

及川尚人, 木村展之, 柳澤勝彦. カニクイ  
ザル脳におけるアルツハイマー病関連蛋白  
(A $\beta$ 、タウ) の解析. 第 27 回日本認知症学  
会. 群馬県前橋市. 2008 年 10 月 9 日～11  
日.

小柳 洸志, 高橋 理貴, 根岸 隆之, 田  
代 朋子. 初代培養ラット小脳顆粒細胞に  
おける低カリウム誘発細胞死に対する内因  
性グルタミン酸の役割. 第 51 回日本神経化  
学会大会. 富山県. 2008 年 9 月 11-13 日

若佐 美佳, 今村 誠, 吉岡 良祐, 高橋  
理貴, 根岸 隆之, 角田 正史, 相澤 好  
治, 田代 英夫, 田代 朋子. トリブチル  
スズ経世代曝露による発達期脳の遺伝子発  
現変化. 第 51 回日本神経化学学会大会. 富山  
県. 2008 年 9 月 11-13 日

高橋 理貴, 根岸 隆之, 澤野 恵梨香,  
田代 朋子. LPS 誘導末梢性炎症による脳  
内甲状腺ホルモンシステムの変化. 第 51 回  
日本神経化学学会大会. 富山県. 2008 年 9 月

