

令和4年12月22日

<研究課題> 糖尿病による認知症促進機構の分子・細胞生物学的解明

代表研究者 国立研究開発法人国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部

部長 里 直行

共同研究者 国立研究開発法人国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部

副部長 篠原 充

【抄録】

高齢化社会において認知症のメカニズム解明は必須である。認知症を修飾する因子として遺伝因子、後天的危険因子、ライフスタイルが知られている。後天的危険因子として、糖尿病や中年期の肥満が注目されている。しかし、その修飾の詳細やメカニズムについては十分明らかになっていない。我々は臨床データベースおよびマウスモデルを用いてこれらについて明らかにすることを目指した。まず、臨床データベースを用いて、糖尿病や肥満による認知機能の促進はAPOE 遺伝子型に依存することを見出した。さらに糖尿病や肥満は老人斑の低下と相関していた。さらに肥満は認知症発症に抑制的であった。一方、肥満合併アルツハイマー病モデルマウスでは肥満を合併しないマウスに比べ、老人斑が減少していた。このメカニズムを探るため、一細胞解析を行い、興味深い結果を得つつある。

1. 研究の目的

1-1 肥満・糖尿病による認知機能低下および認知症発症への修飾

高齢化社会において認知症は根本的治療薬がないことから、解決が迫られている重要な課題である。アルツハイマー病(AD)は認知症の半分以上を占めており、肥満・糖尿病が認知症の後天的危険因子であることが注目されている。これまで我々は糖尿病が認知機能低下や寿命に与える影響がAPOE 遺伝子型によって異なることを報告してきた(論文1, 2)。本研究では肥満が認知機能低下に与える影響を明らかにする。

1. Shinohara M.*, Sato N.* et al. Interaction between APOE genotype and diabetes in cognitive decline. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*. 12(1):e12006, 2020.
2. Shinohara M.*, Sato N.* et al. Interaction between APOE genotype and diabetes in longevity, *Journal of Alzheimer's Disease*, 2021, 82(2)719-726

1-2 肥満・糖尿病による認知症促進メカニズムの解明

また本研究では、従来のAD治療薬開発のターゲットであるβアミロイドやタウを踏まえながら、疾患の後天的危険因子である肥満・糖尿病に

よる認知症促進メカニズムを多角的に明らかにする。さらにそれらに基づく認知症の新規治療薬の標的分子を同定することを目標とする。我々は従来より肥満・糖尿病マウスを作成し、認知機能障害(論文3)、寿命の短縮(論文4)を報告した。本研究では、肥満・糖尿病合併マウスの脳における一細胞解析を行い、認知症の新規治療標的の発見を目指す。また肥満・糖尿病とADの合併で初めて発現増加する遺伝子欠損マウスの作製を行う。肥満・糖尿病合併肥満・糖尿病ADマウスAPP; ob/obマウスの解析により、肥満・糖尿病とADの合併で初めて発現増加する遺伝子として Btg2(B cell translocation gene 2), Cyr61(cysteine-rich angiogenic inducer 61), LSS(Lanosterol Synthase), DUSP1(Dual specificity phosphatase 1)を含むクラスター10を同定し、このクラスター10を制御する転写因子として Serum Response Factor (SRF)を見出した(論文5)。SRFは、海外のグループにより、AD剖検脳を用いた一細胞解析で同定されたAD発症に関わる重要な因子の一つであった(Grubman A, et al. *Nature Neuroscience* 2019, 22:2087-2097)。Btg2に関してはすでにその欠損マウスを作成し、Btg2が脳虚血時のグリア細胞増殖抑制に重要な遺伝子であることを報告した(論文6)。本研究では他の遺伝子3つに関しても欠損マウスを作成したので病態における各遺伝子の役割を明らかに

する。

3. Takeda, S., Sato, N., et al. Diabetes accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and A β deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A, 13, 107, 7036-41, 2010.
4. Shinohara M, Sato N*, et al. Increased levels of A β 42 decrease the lifespan of ob/ob mice with dysregulation of microglia and astrocytes. The FASEB Journal. 34(2):2425-2435, 2020.
5. Shinohara M., Sato N.* et al. Upregulated expression of a subset of genes in APP;ob/ob mice: Evidence of an interaction between diabetes-linked obesity and Alzheimer's disease, FASEB BioAdvances. 3(5)323-333, 2021.
6. Suzuki K, Sato N*, et al. Deletion of B-cell translocation gene 2 (BTG2) alters the responses of glial cells in white matter to chronic cerebral hypoperfusion. J Neuroinflammation. 18(1):86, 2021.

2. 研究方法と経過

2-1 肥満・糖尿病による認知機能低下および認知症発症への修飾

我々がこれまで糖尿病と APOE 遺伝子多型の認知機能や寿命における交互作用を報告してきた米国データベース(論文1, 2)を用い、肥満が認知機能低下や認知症は発症に与える影響を検討した。

2-2 肥満・糖尿病による認知症促進メカニズムの解明

我々は肥満と AD の関係を明らかにするため、APP(Amyloid Precursor Protein);ob/ob マウス (APP トランスジェニックマウスと肥満を呈する ob/ob マウスの掛け合わせ)を作製し報告してきた(論文3)。このマウスでは β アミロイドが顕著に低下することを観察した(論文5)。しかし、本マウスでは APP の mRNA も低下していたので過剰発現系のアーチファクトである可能性も否定出来なかった。そこで、シングルコピーの APP を発現する APP ノックインマウスを用いることとした。

この寿命短縮におけるグリア系細胞の役割を検討するため、最新の技術である一細胞解析を用いて、脳を構成する単一細胞の遺伝子発現解析を行う。

肥満糖尿病合併アルツハイマー病モデルの回収を終えた(18か月齢、6群、合計約 160 匹)。その中かた4群各 n=3~4 のマウス脳について一細胞解析を行った。

肥満・糖尿病合併モデルで発現が増加する Btg2 遺伝子について、その遺伝子欠損マウスと APP 過剰発現マウスを交配し、6か月齢で回収、解析した。行動実験では特に有意差はなかった。脳内の β アミロイドが Btg2 遺伝子欠損マウスで増加する傾向はあったが、有意差はなかった(解析法によっては有意差あり)。今回の検討では「マウスの絶対数が少ない」、「APP 過剰発現マウスのため、想定よりも死亡マウスが多い」、「脳内に十分蓄積する前の早期の解析であった」という複合的な理由で Btg2 遺伝子欠損の影響が十分に検討できなかった可能性がある。そこで今後は、解析数を多くするとともに、より早期で解析できかつ死亡マウスの少ない 5XFAD マウスに切り替えて、交配し解析を進めている。また凝集タウを播種することによる神経原線維変化進展モデルを導入し、Btg2 遺伝子欠損マウスでタウの凝集伝搬がどう変化するか、現在解析を進めている。肥満・糖尿病合併 AD モデルで発現が増加する Cyr61 と LSS 遺伝子について作製したコンディショナル遺伝子欠損マウスと家族性変異 APP ノックインマウスとの交配をすすめた。肥満・糖尿病合併 AD モデルで発現が増加する DUSP1 遺伝子についてその遺伝子欠損マウスと 5XFAD マウスとの交配をすすめた。

3. 研究の成果

3-1 肥満・糖尿病による認知機能低下および認知症発症への修飾

米国データベース(Shinohara, Sato, 2020, 2021)を用い、同様の解析を糖尿病による補正を加えながら肥満に着目して、解析すると若年では肥満は認知機能を増悪する方向に働くが、認知症発症には逆に抑制的に働くことを、すなわち加齢依存的な Obesity Paradox を見出した(論文執筆中)。Obesity Paradox は2000年台初頭に循環器領域ではじめて報告されていた。

病理データを解析すると、肥満は血管病変の増悪と相関する一方で、AD 関連病理は低下しており、そこから、認知機能増悪のメカニズムは血管病変の増悪を介して、認知症保護については AD 関連病理の抑制を介しているとも考えられた。

3-2 肥満・糖尿病による認知症促進メカニズム

メカニズムの解明

18 か月齢の肥満・糖尿病合併 APP ノックイン (ホモ) マウスにおいて、 β アミロイドの顕著な減少を観察した(未発表データ)。肥満・糖尿病合併 APP ノックイン (ホモ) マウスの減少した老人斑の周囲にはグリア細胞の変容が観察された(未発表データ)。そのメカニズムを探るため、脳から核を抽出し、細胞一つ一つの遺伝子発現を検討できる単一細胞解析を行っている。これによって、老人斑の周りに集積しているグリア細胞の遺伝子発現の変化を捉えることが出来、肥満による老人斑の低下に至るメカニズムの一端が判明すると考えている。

最近、アミロイド PET を用いて脳内の老人斑 (アミロイド蓄積) の検出が可能となっている。興味深いことに認知機能が正常な方において Body Mass Index が高いとアミロイド蓄積が少ないこと(Thirunavu V, et al. J Alzheimers Dis, 2019, 69, 817-827)、逆に Body Mass Index が低いとアミロイドが多いこと(Hsu DC, et al. J Alzheimers Dis, 2016, 53, 1097-105) が示されている。我々が観察した臨床データベースの解析およびマウスの解析において見出した「肥満による β アミロイドの低下」と矛盾しない結果と考えられる。

4. 今後の課題

我々の臨床データベースの解析から「若年では肥満は認知機能を増悪する方向に働くが、認知症発症には逆に抑制的に働くこと、すなわち加齢依存的な Obesity Paradox」を見出した。一方、肥満合併 APP マウスの解析から「老人斑の出来るモデルでは肥満は β アミロイドを低下させる」ことを見出した。我々の仮説はこれらの臨床データの解析とマウスを用いた基礎実験の結果を結びつけることが出来るのではないか、というものである。すなわち、AD で見られる Obesity Paradox は肥満によって誘導される「 β アミロイドの減少」と神経保護的な「特異的な遺伝子発現変化」によるのではないかと考えて

いる。さらに、糖尿病と APOE 遺伝子型の認知機能や寿命における交互作用もこの現象に関連しているのではないかと推察される。

肥満による β アミロイド低下や神経保護への関与を含め、さらなるクラスター10遺伝子の機能解明が必要であるが、この AD における Obesity Paradox のメカニズムを解明することが AD の予防・治療法の確立に結び付くであろうと期待される。

さらに思考を発展させれば、AD における Obesity Paradox のメカニズム解明は、これまで循環器や腎臓疾患で報告されてきた Obesity Paradox のメカニズムに関しても示唆を与えることが出来るのではないかと考えられる。すなわち、我々が考えている Obesity Paradox のメカニズムの仮説は以下である。病態は Obesity による血管変化 (Obesity-induced Vascular Changes) と Obesity によって誘導される臓器保護 (Obesity-induced Organ Protection) のバランスで決定する。加齢によってこのバランスが変わるため、Obesity Paradox という現象が起こる。AD の場合、「肥満による臓器保護」は遺伝子発現変化による β アミロイド減少と神経保護である。この現象のメカニズム解明による新たな AD の予防・治療法の開発が期待される。今後、さらなる探求が必要であろう。

5. 研究成果の公表方法

認知症における肥満パラドックスに関する臨床データの解析、肥満・糖尿病と AD の合併で初めて発現増加する遺伝子群の機能解析に関する論文、肥満・糖尿病合併 AD マウス脳における β アミロイド低下とその脳における一細胞解析の論文をそれぞれ、学術論文および国内・国際学会において公表する。

Analysis of the molecular and cellular mechanism of dementia modified by diabetes

Primary Researcher: Naoyuki Sato, MD, PhD
Professor, Department of Aging Neurobiology,
National Center for Geriatrics and Gerontology

Co-Researcher: Mitsuru Shinohara, PhD
Associate Professor, Department of Aging Neurobiology,
National Center for Geriatrics and Gerontology

It is essential to elucidate the mechanism of dementia in an aging society. Genetic factors, nongenetic risk factors, and lifestyle are known as factors that modify dementia. Nongenetic risk factors for dementia, diabetes, and obesity in mid-life are well known. However, the details and mechanism of its modification need to be sufficiently clear. We aimed to clarify these using clinical databases and mouse models. First, using a clinical database, we found that the promotion of cognitive dysfunction by diabetes and obesity depends on the APOE genotype. Interestingly, diabetes and obesity correlated with reduced senile plaques. Furthermore, obesity suppresses the onset of dementia. On the other hand, senile plaques were reduced in Alzheimer's disease mice model with obesity compared to mice without obesity. We are conducting a single-cell analysis to explore this mechanism.