

## 【トピックス】

# アルツハイマー病態におけるエンドサイトーシス障害の重要性

木村 展之

国立研究開発法人 国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター  
アルツハイマー病研究部 病因遺伝子研究室

### はじめに

アルツハイマー病 (AD) の罹患者数は年々増加しており、もはや世界規模での社会問題となりつつある。家族性変異遺伝子の発見とその解析により、現在では  $\beta$  アミロイド蛋白 ( $A\beta$ ) の蓄積が AD 発症の鍵を握ると考えられているが、AD 発症の最大リスク因子が老化であることは疑いようもない事実である。しかしその一方で、何故老化によって AD を発症するのかについては未だに不明な部分が多い。筆者はこれまで、ヒトに近縁な霊長類の脳組織を用いて老化と AD 病変形成メカニズムとの関係を検索してきた。その結果、エンドサイトーシスと呼ばれる膜輸送系の障害が老化に伴う  $A\beta$  の蓄積を促す要因となることを見いだしたが、近年、AD 患者を対象とした大規模なゲノムワイド関連解析 (GWAS) からもエンドサイトーシス関連因子が次々と見つかったことから、エンドサイトーシスは一躍、世界中の AD 研究者から大きな注目を浴びるようになった。そこで本稿ではエンドサイトーシスと AD との関係を紹介するとともに、AD 病態におけるエンドサイトーシス障害の意義について、筆者自身の研究成果も交えながら考察を行いたい。

### エンドサイトーシスと AD との関係

エンドサイトーシスは細胞膜を起点とする小胞輸送系 (メンブレントラフィック) の 1 つであり、エンドソームと呼ばれる輸送小胞が様々な細胞内小器官へと膜蛋白質や細胞外基質等を輸送している。尚、“エンドサイトーシス” という語彙は細胞膜が陥入して膜蛋白質等を取り込む現象自体を指すこともあるが、本稿では細胞膜を起点とするメンブレントラフィック全体を指すものとして進めさせていただきたい。エンドサイトーシスは、陥入した細胞膜から形成された小胞が初期エンドソームと融合することで始まり、初期エンドソームはその後、ライソゾームや細胞膜、ゴルジ体等の様々な目的地へと向かうことになる (図 1)。ライソゾームでは主に内容物の分解・代謝が行われるが、細胞膜へと向かう場合はその

目的が 2 つ存在する。1 つはレセプター等の膜蛋白質を再び細胞膜へと局在させることであり、もう 1 つは初期エンドソームが lumen 側に膜陥入を起こして多胞体 (multivesicular body; MVB) に成熟したものが、細胞膜と融合することで内包する小胞をエクソソームとして細胞外へと放出することである。ゴルジ体への輸送は retromer complex と呼ばれる蛋白複合体の働きによって仲介されており、主に膜蛋白質をトランスゴルジネットワーク (TGN) へと逆行輸送 (注: retromer 輸送とも呼ばれる) して再利用することが目的と考えられている。尚、これらの輸送経路は完全に独立しているわけではなく、実際には互いに入り交じって複雑な輸送網を作り上げている。例えば、MVB が細胞膜ではなくライソゾームと融合して内包物を代謝することもある。

では、エンドサイトーシスと AD にはどのような関係があるのだろうか? 実は、初期 AD 患者の脳組織では老人斑 ( $A\beta$  の凝集沈着病変) や神経原線維変化 (リン酸化 tau の凝集蓄積病変) といった AD 主病変の形成に先駆けて、肥大化したエンドソームやライソゾームが神経細胞内に多数蓄積する (以下、エンドサイトーシス病変) ことが報告されている [1-3]。このエンドサイトーシス病変は当初、主にライソゾームの代謝機能障害として焦点が当てられていたが、 $A\beta$  産生がアミロイド前駆体蛋白 (APP) のエンドサイトーシス過程で生じているという報告が成されてからは (図 1)、より多くの AD 研究者がエンドサイトーシスというシステムそのものに注目するようになった [4-6]。もちろん、それ以前に提唱されていた TGN 等の分泌経路における  $A\beta$  産生 [7-9] を完全に否定するものではないが、 $A\beta$  産生に欠かせない切断酵素 BACE1 の酵素活性が酸性環境下において高いことから、現在では後期エンドソームや多胞体が  $A\beta$  産生の場合であると考えられている [10] (図 1)。一方、一部の APP は細胞膜へとリサイクルされるか、retromer 輸送を受けて TGN へと回収されることで切断を免れることが報告されており [11-14]、エンドサイトーシスが  $A\beta$  産生と密接な関係があることを支持する結果が次々と報告された。そして、GWAS に代表される大規模遺伝子解析によってエンドサイトーシス関連因子と AD 発症リスクとの関係性が指摘されたことにより、現在では世界中の AD 研究者がエンドサイトーシスに注目するようになってきている [15-17]。ここで興味深いのは、遺伝子解析で見つかった因子の多くが APP の retromer 輸送に関与するものであり、数あるエンドサイトーシス

連絡先: 木村展之 〒 474-8511

愛知県大府市森岡町 7-430

TEL: 0562-44-5651 内線 6404 or 6406

FAX: 0562-46-8569

E-mail: kimura@ncgg.go.jp

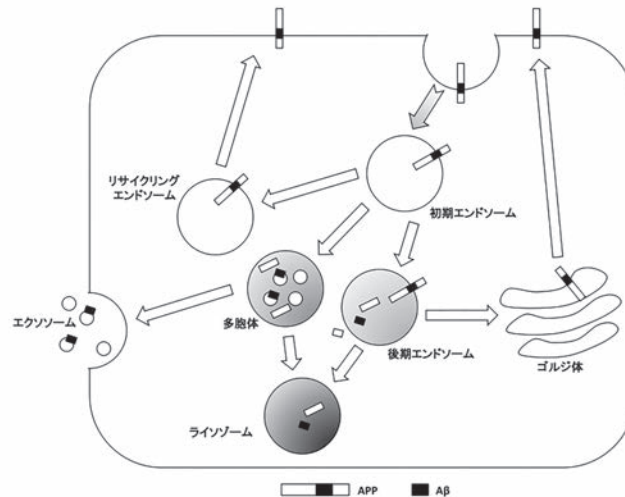


図1：エンドサイトーシスとAβ産生（APPトラフィック）の関係

経路の中でも、retromer 輸送の障害がAD発症リスクとより強い相関性を有しているのかもしれない [14, 18-21]。その一方で、retromer 関連因子はパーキンソン病など他の神経変性疾患との関連性も指摘されていることから [22-24]、エンドサイトーシス障害は特定の疾患特異的な現象というよりもむしろ、老化に伴う普遍的ストレス因子の1つと考えた方が良いのかもしれない。エンドサイトーシスは多種多様な細胞機能に欠かせないシステムであり、ADが非常に長い時間をかけて進行する疾患であることから、微弱なエンドサイトーシス障害が慢性的に続くことにより加齢性神経変性疾患の発症リスクを高めると考える方が現実的ではないだろうか。

さて、ここまではAβとの関係について考察してきたが、tauもまたオートファジーを介してライソゾームで分解されることが知られている [25, 26]。エンドサイトーシス障害はオートファゴソームとライソゾームとの融合を妨げてしまうため [27-29]、当然ながら不要なtauの細胞内蓄積を誘導する可能性が高い。また、これらAβやtauの老化に伴う蓄積が、時間の経過とともにエンドサイトーシス障害を更に増悪させる可能性も存在することから、今後の更なる研究展開が大いに期待される場所である。

#### AD病態におけるエンドサイトーシス障害の意義

初期AD患者の神経細胞で顕著なエンドサイトーシス病変が確認されることを前項で紹介したが、エンドサイトーシス病変そのものは脳神経系における老年性変化の1つでもある。筆者はこれまで、カニクイザルというヒトに近縁なサル類の脳組織を用いて老化に伴うAD病変形成メカニズムを検索してきた。そして、カニクイザルの神経系細胞でも老化に伴いエンドサイトーシス病変が確認され、肥大化したエンドソームにAPPやAβが蓄積していることを明らかにした [29-31]。つまり、年を取れば誰でも、たとえサルであっても、神経細胞にある程度のエンドサイトーシス障害は生じるわけである。

では、何故老化によってエンドサイトーシス障害は生じるのだろうか？ 筆者自身の研究活動から言えることは、少なくとも老化に伴う軸索輸送機能の低下がエンドサイトーシス障害の一因となるということである [30, 32]。軸索輸送はエンドソームを目的地へと運搬するためには欠かせない細胞内輸送システムであり、一般的な実験動物であるラットの神経細胞においても軸索輸送が老化とともに低下することが知られている [33, 34]。また、ライソゾームの機能低下もエンドサイトーシス病変を再現することが知られており [35-37]、初期エンドソームからライソゾームへと向かう経路の輸送障害がエンドサイトーシス障害の原因となることは間違いないと思われる。では、AD病態におけるエンドサイトーシス障害の病理学的意義とは何だろうか？ エンドサイトーシス障害はエンドソームとライソゾームとの融合を阻害するため、代謝効率が低下してAPPやAβ、tauの細胞内蓄積が誘導される [30, 31, 38]。また、エンドサイトーシス障害はMVBの輸送を妨げてエクソソームの放出を低下させるが [30]、エクソソームはAβをミクログリアに貪食してもらうための“運び屋”として働くことが明らかとなっており [39-41]、神経細胞からのAβ排出機構が阻害される可能性が高い。更に、老齢カニクイザルの脳組織ではアストログリアにおいてもエンドサイトーシス病変が確認され、脳内Aβクリアランスの低下を示唆する病理所見が得られている [31]。そして、これらAβやtauの蓄積云々によらず、エンドサイトーシス障害が直接的に脳神経系の生理学的機能を障害する可能性もまた存在する (図2)。例えば、エンドサイトーシス障害がポストシナプスにおける神経伝達物質の取込に影響を及ぼすのは自明の理であるが、実はプレシナプスにおける伝達物質の放出時にもエンドサイトーシスは重要な働きをしている。シナプス小胞がプレシナプス膜と融合して内包する神経伝達物質を放出するためには、前段階としてシナプス膜近傍の初期エンドソームと融合することが必要とされている [42, 43]。ところが、エンドサイ

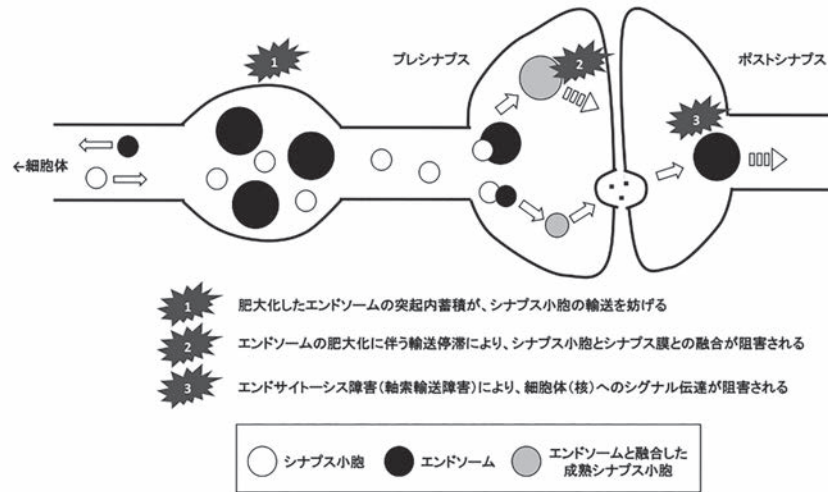


図2：エンドサイトーシス障害が神経伝達にもたらす影響

トーシス障害は初期エンドソームの肥大化を引き起こして輸送を妨げるため、最終的なシナプス膜との融合が低下してしまう [44]。また、エンドサイトーシス病変は神経突起内においても老化に伴い出現し、肥大化したエンドソームやライソゾームの異所局在が物理的障害物となってシナプス小胞の輸送そのものを妨げる原因ともなる [44]。つまり、エンドソームの“交通渋滞 (Traffic Jam)”は、それだけでも十分に神経伝達機能を阻害する可能性があるわけである (図2)。残念ながらこれらの研究報告は大部分が *in vitro* におけるものであるが、*in vivo* での検証に向け、筆者自身も鋭意、研究活動に勤しんでいるところである。

#### おわりに

繰り返しになるが、エンドサイトーシス障害そのものは老年性変化の1つであり、問題は“何故AD患者ではエンドサイトーシス障害が健常人に比べて増悪しているのか”ということである。近年、II型糖尿病に代表される生活習慣病が老年期のAD発症率を高めることに注目が集まっているが、II型糖尿病を発症したカニクイザルの脳内ではエンドサイトーシス障害が顕著に増悪しており、それに伴ってA $\beta$ 病理が加速化していることを筆者らは見いだした [45]。この結果から1つ言えることは、血液脳関門による特殊な隔離環境下にあるにもかかわらず、エンドサイトーシス障害=脳の老化もまた代謝系環境因子によって影響を受けるということである。今後は、これら環境因子による老年性エンドサイトーシス障害の増悪メカニズムを明らかにするため、より一層研究活動に励みたい。

#### 文献

1. Cataldo AM and Nixon RA. Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain. Proc Natl Acad Sci

USA 87: 3861-3865, 1990.

2. Cataldo AM, Hamilton DJ, Barnett JL, et al. Properties of the endosomal lysosomal system in the human central nervous system: disturbances mark most neurons in populations at risk to degenerate in Alzheimer's disease. J Neurosci 16:186-199, 1996.
3. Cataldo AM, Barnett JL, Pieroni C, et al. Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: Neuropathologic evidence for a mechanism of increased  $\beta$ -amyloidogenesis. J Neurosci 17: 6142-6151, 1997.
4. Haass C, Koo EH, Mellon A, et al. Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. Nature 357: 500-503, 1992.
5. Koo EH and Squazzo SL. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. J Biol Chem 269: 17386-17389, 1994.
6. Soriano S, Chyung AS, Chen X, et al. Expression of beta-amyloid precursor protein-CD3 gamma chimeras to demonstrate the selective generation of amyloid beta (1-40) and amyloid beta (1-42) peptides within secretory and endocytic compartments. J Biol Chem 274: 32295-300, 1999.
7. Peraus GC, Masters CL and Beyreuther K. Late compartments of amyloid precursor protein transport in SY5Y cells are involved in beta-amyloid secretion. J Neurosci 17: 7714-7724, 1997.
8. Xu H, Sweeney D, Wang R, et al. Generation of Alzheimer beta-amyloid in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation. Proc Natl Acad Sci USA 94: 3748-3752,

- 1997.
9. Tomita S, Kirino Y and Suzuki T. Cleavage of Alzheimer beta-amyloid protein in the protein secretory pathway. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism. *J Biol Chem* 272:6277-6284, 1998.
  10. Vassar R, Kovacs DM, Yan R, et al. The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci* 29: 12787-12794, 2009.
  11. Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, et al. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13461-13466, 2005.
  12. Small SA, Kent K, Pierce A, et al. Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 58:909-919, 2005.
  13. Small SA and Gandy S. Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis. *Neuron* 52:15-31, 2006.
  14. Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, et al. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 39: 168-177, 2007.
  15. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41:1088-1093, 2009.
  16. Lambert JC, Heath S, Even G, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease *Nat Genet* 41:1094-1099, 2009.
  17. Naj AC, Jun G, Beecham GW, et al. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43: 436-441, 2011.
  18. Lee JH, Cheng R, Schupf N, et al. The association between genetic variants in SORL1 and Alzheimer disease in an urban, multiethnic, community-based cohort. *Arch Neurol* 64: 501-506, 2007.
  19. Reitz C, Cheng R, Rogaeva E, et al. Metaanalysis of the association between variants in SORL1 and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 68:99-106, 2011.
  20. Okada H, Zhang W, Peterhoff C, et al. Proteomic identification of sorting nexin 6 as a negative regulator of BACE1-mediated APP processing. *FASEB J* 24: 2783-2794, 2010.
  21. Wen L, Tang FL, Hong Y, et al. VPS35 haploinsufficiency increases Alzheimer's disease neuropathology. *J Cell Biol* 195: 765-779, 2011.
  22. Vilariño-Güell C, Wider C, Ross OA, et al. VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 89:162-167, 2011.
  23. Zimprich A, Benet-Pagès A, Struhal W, et al. A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 89:168-175, 2011.
  24. Small SA and Petsko GA. Retromer in Alzheimer disease, Parkinson disease and other neurological disorders. *Nat Rev Neurosci* 16:126-132, 2015.
  25. Murakami N, Oyama F, Gu Y, et al. Accumulation of tau in autophagic vacuoles in chloroquine myopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:664-673, 1998.
  26. Hamano T, Gendron TF, Causevic E, et al. Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression. *Eur J Neurosci* 27:1119-1130, 2008.
  27. Ravikumar B, Acevedo-Arozena A, Imarisio S, et al. Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat Genet* 37: 771-776, 2005.
  28. Rubinsztein DC, Ravikumar B, Acevedo-Arozena A, et al. Dyneins, autophagy, aggregation and neurodegeneration. *Autophagy* 1:177-178, 2005.
  29. Kimura N and Yanagisawa K. Endosomal accumulation of GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein in neurons of aged monkey brains. *Neuroreport* 18:1669-1673, 2007.
  30. Kimura N, Inoue M, Okabayashi S, et al. Dynein dysfunction induces endocytic pathology accompanied by an increase in Rab GTPases: a potential mechanism underlying age-dependent endocytic dysfunction. *J Biol Chem* 284: 31291-31302, 2009.
  31. Kimura N, Okabayashi S and Ono F. Dynein dysfunction disrupts  $\beta$ -amyloid clearance in astrocytes through endocytic disturbances. *Neuroreport*. 25: 514-520, 2014.
  32. Kimura N, Imamura O, Ono F, et al. Aging attenuates dynactin-dynein interaction: down-regulation of dynein causes accumulation of endogenous tau and APP in human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 85 (13) :2909-2916, 2007.
  33. Niewiadomska G and Baksalerska-Pazera M. Age-dependent changes in axonal transport and cellular distribution of Tau 1 in the rat basal forebrain neurons. *Neuroreport* 14:1701-1706, 2003.
  34. Niewiadomska G, Baksalerska-Pazera M and Riedel G. Altered cellular distribution of phospho-

- tau proteins coincides with impaired retrograde axonal transport in neurons of aged rats. *Ann N Y Acad Sci* 1048:287-295, 2005.
35. Lippincott-Schwartz J and Fambrough DM. Cycling of the integral membrane glycoprotein, LEP100, between plasma membrane and lysosomes: kinetic and morphological analysis. *Cell* 49:669-677, 1987.
  36. Yuyama K, Yamamoto N and Yanagisawa K. Chloroquine-induced endocytic pathway abnormalities: Cellular model of GM1 ganglioside-induced Abeta fibrillogenesis in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* 580:6972-6976, 2006.
  37. Morissette G, Ammoury A, Rusu D, et al. Intracellular sequestration of amiodarone: role of vacuolar ATPase and macroautophagic transition of the resulting vacuolar cytopathology. *Br J Pharmacol* 157:1531-1540, 2009.
  38. Moreau K, Fleming A, Imarisio S, et al. PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation. *Nat Comm* 5:4998, 2014.
  39. Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, et al. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11172-11177, 2006.
  40. Yuyama K, Sun H, Sakai S, et al. Decreased amyloid- $\beta$  pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice. *J Biol Chem* 289:24488-24498, 2014.
  41. Yuyama K, Sun H, Usuki S, et al. A potential function for neuronal exosomes: sequestering intracerebral amyloid- $\beta$  peptide. *FEBS Lett* 589:84-88, 2015.
  42. Rizzoli SO, Bethani I, Zwilling D, et al. Evidence for early endosome-like fusion of recently endocytosed synaptic vesicles. *Traffic* 7:1163-1176, 2006.
  43. Fei H, Grygoruk A, Brooks ES, et al. Trafficking of vesicular neurotransmitter transporters. *Traffic* 9:1425-1436, 2008.
  44. Kimura N, Okabayashi S and Ono F. Dynein dysfunction disrupts intracellular vesicle trafficking bidirectionally and perturbs synaptic vesicle docking via endocytic disturbances a potential mechanism underlying age-dependent impairment of cognitive function. *Am J Pathol* 180:550-561, 2012.
  45. Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y, et al. Diabetes mellitus accelerates A $\beta$  pathology in brain accompanied by enhanced GA $\beta$  generation in nonhuman primates. *PLoS One* 10:e0117362, 2015.