

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

新規アルツハイマー病病理モデルマウスを用いた A β 蓄積依存的変動遺伝子の網羅的解析

研究代表者 橋本 唯史¹⁾

研究分担者 宮下 哲典²⁾, 山田 薫³⁾, 内上 寛一^{1) 3)}, 間野 達雄¹⁾, 原 範和²⁾, 池内 健²⁾

1) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部

2) 新潟大学脳研究所 遺伝子機能解析学分野

3) 東京大学大学院医学系研究科 神経病理学分野

研究要旨

本研究では、アルツハイマー病の中核病態である老人斑蓄積が脳内の細胞群に与える影響を網羅的に解明し、アルツハイマー病発症の遺伝的危険因子 *APOE ϵ 4* が老人斑蓄積に与える影響を明らかにすることを目的とする。これまでに同定した A β 蓄積によって特異的に発現変動する 32 遺伝子を公知の AD 患者脳 single-cell 解析データと比較することで、A β 蓄積依存的に変動する遺伝子群を見出した。また *in vivo* で A β 蓄積誘導能を持つ peak 1 A β と相互作用する分子を高感度 IP-MS 法で探索することで apoE や clusterin、C1q と相互作用することを見出した。apoE 欠損マウスでは peak 1 A β の A β 蓄積誘導能が喪失した。さらに peak 1 A β をマウス大槽に注入することで髄膜下や血管周囲に cerebral amyloid angiopathy を誘導する新規モデルを開発した。

A. 研究目的

アルツハイマー病患者脳ではアミロイド β ペプチド (A β) からなるアミロイド線維がニューロピルに老人斑として、また脳髄膜下や血管周囲に cerebral amyloid angiopathy (CAA) として蓄積することが病理学的特徴である。近年、抗 A β 抗体を用いて A β 蓄積を除去する A β ワクチン療法の臨床試験において、軽度認知症患者の認知機能低下が軽減されたことから、A β 蓄積はアルツハイマー病の有効な治療標的と考えられる。しかし A β 蓄積がどのようにして神経変性を招来し、認知症に至るかは未だ不明である。さらに、A β ワクチン療法において抗 A β 抗体が CAA に作用すること起因する脳出血や脳浮腫などの副作用が生じ、CAA の形成機序解明は喫緊の課題である。

我々はアルツハイマー病患者脳や、加齢と共に

脳内に A β 蓄積を呈する APP トランスジェニック (tg) マウス脳に分子量 100 kDa 以上の高分子量 A β 分子種 (peak 1 A β) が出現することを見出し、peak 1 A β が “蓄積核 (seed)” として老人斑の蓄積と拡大に関与することを明らかにした。そこで本研究では老人斑の出現が脳内に及ぼす病的変化を網羅的に解明するため、peak 1 A β を APP tg マウス脳海馬へ接種する *in vivo* seeding 実験を行い、A β 蓄積に伴って変動する遺伝子群を明らかにする。また *APOE ϵ 4* アレルはアルツハイマー病発症最大の遺伝的リスクファクターであり、また CAA が増加することが知られている。そこで *APOE ϵ 4* がアルツハイマー病発症に与える影響についても特に A β 蓄積過程と CAA 形成に注目して検討する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

本研究では、特に以下の3点について研究を行う。なお、本研究では APP tg マウスとして *Swedish* 及び *Austrian* 二重変異を持つヒト APP を神経細胞に過剰発現することで 11 ヶ月齢より A β 蓄積を呈する A7 系統を利用する (Yamada et al., *J Neurosci*, 2009)。また、peak 1 A β の粗精製は、脳組織より TBS 可溶画分を抽出し、さらに Superdex75 Increase を用いたゲル濾過カラム分離により行った。

(I) *In vivo* seeding 実験における A β 蓄積に伴い変動する遺伝子群の網羅的解析

18 ヶ月齢 APP tg マウス脳から粗精製した peak1 A β を、脳定位固定装置を用いて 6 ヶ月齢の若齢 APP tg マウス左海馬へ注入し、注入 1, 3, 6 ヶ月後に左右脳を採脳する。得られた脳組織より total RNA を抽出して RNA-seq 解析を行い、A β 蓄積依存的に変動する遺伝子群を解析する。

(II) *APOE* $\epsilon 4$ が A β 蓄積誘導に与える影響とその分子機序解析

APOE を欠損させた APP tg マウスを作成し、18 ヶ月齢 APP tg マウス脳より抽出した TBS 可溶画分を 5 ヶ月齢マウス左海馬へ脳定位固定装置を用いて注入し、3 ヶ月後に左右海馬の A β 蓄積を免疫組織化学的に評価する。さらにアストロサイト特異的にヒト apoE を発現させるアデノ随伴ウイルス (AAV-apoE) を作成し、4 ヶ月齢の *APOE* を欠損させた APP tg マウス脳に感染させることで、A β 蓄積に対するアイソフォーム特異的な apoE の作用を検討する。

(III) cerebral amyloid angiopathy 形成機序の解明

18 ヶ月齢 APP tg マウス脳から粗精製した peak 1 A β を 4 ヶ月齢の APP tg マウス脳大槽へ注入し、3 ヶ月後に採脳し、免疫組織化学的に解析する。また CAA が豊富なアルツハイマー病脳 (n=10) と CAA が乏しいアルツハイマー病脳

(n=8)において peak 1 A β 量とその seed 能について比較評価する。

C. 研究結果

(I) *In vivo* seeding 実験における A β 蓄積に伴い変動する遺伝子群の網羅的解析

これまでに peak 1 A β 、及びコントロールとして PBS を 6 か月齢 APP tg マウス脳に注入し、1, 3 ヶ月後に採脳した。得られた脳は新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野において total RNA を抽出して RNA-seq ライブラリーを作成し、NextSeq500 次世代シーケンサーを用いてシーケンシングし、発現解析を行った。その結果、A β 蓄積が生じない注入後

up- or down-regulated genes in the peak 1 injected hemisphere between 1-month and 3-month		
up-regulated		down-regulated
Acer3	Nufip2	Gib6
Amer2	Plakhh3	Gm10925
Cry2	Romc	Gm29216
Cux2	Pou2f1	Lamp5
Dadd2	Ppp1cb	Nptx2
Eif5	Rnf40	Sgms2
Gm10221	Skap2	Set
Gm10288	Tbc1d9	Tmprss7
Gm10359	Tmem184b	Uba1
Gm14440	Usp2	Zfr
Hmcr1		

表 1 *In vivo* seeding 実験における発現変動遺伝子

1 ヶ月では有意な遺伝子発現変化は認められなかったが、A β 蓄積が生じた 3 ヶ月後には peak 1 A β 注入群と PBS 注入群間で 32 遺伝子の発現が変動していることがわかった (表 1)。そこで発現変動遺伝子群をアルツハイマー病脳の single-cell RNA-seq 解析データ (Mathys H, Nature, 2019) にマッピングし、Braak stage 依存的な変化を比較したところ、32 遺伝子のうち *TMEM184B*, *POU2F1* は astrocyte において、*AMER2*, *ACER3* は oligodendrocyte において、*SKAP2* は microglia において発現上昇していた。一方 *NPTX2* は inhibitory neuron において発現低下していた (図 1)。

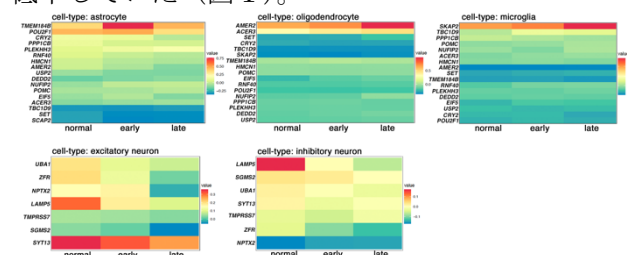


図 1 A β 蓄積依存的発現変動遺伝子のアルツハイマー病患者脳における発現解析 (表 1) で示した遺伝子を公知のアルツハイマー病患者脳 single-cell データベースにマッピングした結果

(II) *APOE* $\epsilon 4$ が A β 蓄積誘導に与える影響とその分子機序解析

APOE を欠損させた APP tg マウス脳左海馬に蓄積核として 18 ヶ月齢 APP tg マウス脳より抽出した TBS 可溶画分を注入したところ、A β 蓄積を呈しないことがわかった。そこで、このマウスに、

gfa2 プロモーターを利用して予めアストロサイトに EGFP、ヒト apoE3、あるいは apoE4 を発現させるアデノ随伴ウイルス (AAV-apoE) を感染させ、A β 蓄積を評価したところ、apoE3、apoE4 いずれも A β 蓄積を回復させたが、その程度に有意な差は認められなかった (図 2)。

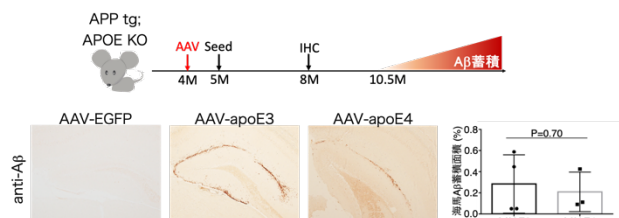


図2 APPtg; apoEKOマウスへのAAV、peak 1 A β 接種実験

(上) APP tg; APOE KOマウス海馬へ、4ヶ月齢にウイルスを5ヶ月齢にpeak 1 A β を接種し、8ヶ月齢に免疫組織化学的に解析した。(下) 代表的結果、EGFPを発現発現させてもA β 蓄積は認められないが、ヒトapoE3、あるいはapoE4を発現させるとA β 蓄積が回復した。両者に統計学的有意差は認められなかった。

(III) cerebral amyloid angiopathy 形成機序の解明

Peak 1 A β を APP tg マウス脳大槽へ注入し、3ヶ月後免疫組織化学的にマウス脳を解析したところ、主に髄膜下や血管周囲腔に A β 蓄積が認められた(図 3)。そこで、CAA が豊富なアルツハイマー病脳 (CAA-rich) と CAA が乏しいアルツハイマー病脳 (CAA-minimal) において peak 1 A β 量を定量したところ、CAA-rich 群が有意に peak 1 A β 量が多いことがわかった。一方、アミロイド線維が含まれる SDS 不溶・70% ギ酸画分に おいて A β 濃度を測定したところ両群に有意な差は認められなかった (図 4)。

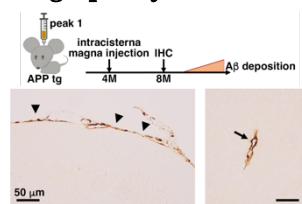


図3 peak 1 A β の脳大槽注入実験

(上) 4ヶ月齢APP tg脳大槽にpeak 1 A β を注入し、8ヶ月齢に免疫組織化学的に解析した。(下) 代表的結果、A β は髄膜下(矢頭)、あるいは血管周囲(矢印)に蓄積が認められた。

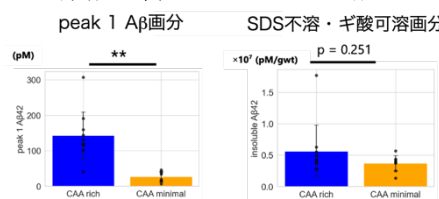


図4 アルツハイマー病患者脳のA β 42濃度

CAA rich、CAA minimal群それぞれから抽出した peak 1 A β 画分 (左)、SDS不溶・ギ酸可溶画分 (右) 中のA β 42濃度。peak 1 A β 量はCAA-rich 群で有意に高い。

D. 考察

本研究において、A β 蓄積に伴う遺伝子変動のうち、アルツハイマー病脳においても変動している遺伝子群を同定した。これらの遺伝子は、A β 蓄積に伴う神経細胞内リン酸化タウ蓄積、や神経変性、グリオシスに与える可能性が示唆され、今後

さらに詳細な解析が必要である。また本研究において *APOE* はA β の蓄積過程に必須な因子であることがわかった。AAV-apoE 発現実験において *APOE* ジェノタイプ依存的な変動が認められなかったが、これは apoE の発現量が一定でなかった可能性が考えられ、発現量との相関性を検討する必要がある。さらに本研究では peak 1 A β をマウス大槽に注入することで、CAA が形成されること、CAA-rich なアルツハイマー病患者脳では peak 1 A β 量が多いことがわかった。この結果は、脳脊髄液中や間質液中を拡がる peak 1 A β は CAA 形成に関与し、さらに CAA は peak 1 A β の reservoir として働く可能性が示唆された。

E. 結論

A β 蓄積依存的に変動する遺伝子群において、アルツハイマー病患者脳においても変動する遺伝子を明らかにした。本結果は、病理依存的な AD バイオマーカー同定の端緒となる可能性がある。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

2. 学会発表

1. Uchigami H, Kashiwagi-Hakozaki M, Matsubara T, Murayama S, Saito Y, Toda T, Hashimoto T, Iwatsubo T: Seed-competent, high-molecular-weight A β species is abundantly extracted in the cerebrovasculature in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Association International Conference*, 2023/7/16m Amsterdam
2. Tanaka M, Kokawa A, Uchigami H, Hashimoto T, Iwatsubo T: The isoform-dependent effect of apolipoprotein E on the deposition of A β . *Neuroscience2023*, 2023/11/13, Washington DC
3. 橋本唯史: アミロイド病理を誘発し分布 (脳実質/脳血管) を決定する因子. 第 64 回日本神経病理学会学術研究会/第 66 回日本神経化学学会大会合同大会, 2023/7/8, 神戸