

新潟大学脳研究所
「病理リソースを活用した脳神経病態共同研究拠点」
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 150 kDa 以上の A β 分子種 (peak 1 A β) が *in vivo* で A β 蓄積誘導能を持つことを明らかにした。本年度はアルツハイマー病脳の cerebral amyloid angiopathy (CAA) に注目し、CAA を豊富に呈した患者剖検脳では、CAA が乏しい剖検脳に比べ peak 1 A β 量が多いこと、さらに CAA を豊富に呈した患者脳由来 peak 1 A β をマウス脳に接種すると、CAA が乏しい患者脳由来 peak 1 A β に比べ、より血管・髄膜周囲への A β 蓄積を誘引することを明らかにした。また、APP を過剰発現せず A β 配列のみをヒト化したノックインマウス (hA β -KI) を用い、A β seed を hA β -KI 脳に接種すると A β 42 蓄積から始まる A β 病理を呈することを明らかにした。

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。しかし加齢と共にどのようにして A β 蓄積が開始し、神経変性を招来して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 に作用することに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、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 150 kDa 以上の A β 分子種 (peak 1 A β) が出現することを見出し、peak 1 A β が脳内で“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。そこで本研究は peak 1 A β に焦点をあて、老人斑や CAA など多様な β -amyloidosis が生じる機序解明を目的に研究を行う。また、これまで A β 病理を呈するアルツハイマー病モデルとして家族性アルツハイマー病の病因変異を持つヒト APP の tg マウスやノックイン (KI) マウスが使用されている。本研究では A β 病理に伴う脳内変容をより正確に捉えるため、家族性アルツハイマー病に伴う遺伝子変異をもたない新たなアルツハイマー病モデルの作製を行い、網羅的な遺伝子発現解析を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

本研究では、以下の2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)。アルツハイマー病患者剖検脳の使用にあたって、国立精神・神経医療研究センターの倫理委員会から承認を得 (B2024-033)、倫理的配慮を怠らないよう努めた。

(I) アルツハイマー病脳 β -amyloidosis 形成機序の解明

APOE $\epsilon 3/\epsilon 3$ で病理学的に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)、及び*APOE* $\epsilon 4/\epsilon 4$ アルツハイマー病脳 (n=12)において脳実質あるいは脳表面より剥離した髄膜組織からTBS可溶画分、2%SDS不溶 70%ギ酸可溶なアミロイド画分を生化学的に抽出し、TBS可溶画分は次いでSuperdex75 Increaseを用いたゲル濾過カラム分離によりpeak 1 A β 画分を粗精製した。得られた画分中のA β 42濃度はELISAを用いて測定した。粗精製したpeak 1 A β 画分は速やかに3-4ヶ月齢APP tgマウス脳海馬に接種し、4ヶ月後採脳して抗A β 抗体 (82E1)を用いた免疫組織化学的解析によりA β 蓄積を評価した。

(II) 新規アルツハイマー病モデル開発とA β 蓄積依存的な遺伝子発現解析

マウス *App* 遺伝子のA β 配列を遺伝子編集によりヒト化 (G5R, F10Y, R13H)したノックインマウス (hA β -KI)に対し、APP tgマウス脳より生化学的に抽出したTBS可溶画分を左海馬に接種し、3, 6, 9, 12ヶ月後に採脳して抗A β 抗体を用いた免疫組織化学的解析によりA β 蓄積を評価した。さらに、接種後9ヶ月の左右海馬を摘出し、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した。また3ヶ月齢のC57BL6/Jマウス (WT)、APP tgマウス、及

びhA β -KIマウス脳を摘出し、APP及びその代謝産物量を生化学的に評価した。

C. 研究結果

(I) アルツハイマー病脳 β -amyloidosis 形成機序の解明

APOE $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotypeで病理学的にCAAが豊富なアルツハイマー病剖検脳 (CAA-rich)とCAAが乏しいアルツハイマー病剖検脳 (CAA-minimal)を選び、peak 1 A β 画分、及び不溶画分中のA β 42量を測定したところ、CAA-rich剖検脳で有意にA β 42量が高いことがわかった (Fig.1)。そこで、CAA-rich ケース4例から脳髄膜を剥離し、髄膜組織のpeak 1 A β 画分、及び不溶画分中のA β 42量を測定したところ、peak 1 A β 画分中のA β 42量は

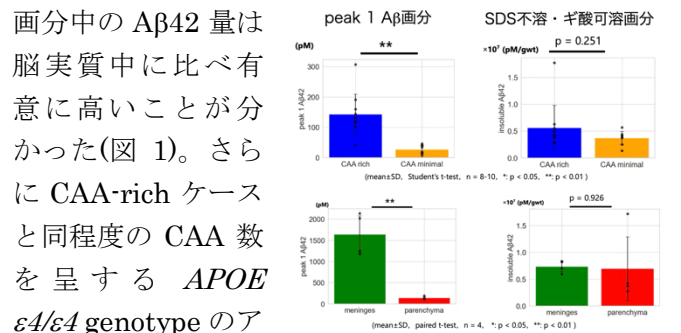


図1 アルツハイマー病患者脳のア β 42濃度 (上段) CAA-rich、CAA-minimal群それぞれから抽出したpeak 1 A β 画分 (左)、SDS不溶・ギ酸可溶画分 (右) 中のA β 42濃度。peak 1 A β 量はCAA-rich群で有意に高い。
(下段) CAA-rich群の髄膜 (meninges)、あるいは脳実質 (parenchyma)から抽出したpeak 1 A β 画分 (左)、SDS不溶・ギ酸可溶画分 (右) 中のA β 42濃度。peak 1 A β 量は髄膜組織で有意に高い。
CAA-rich ケースよりも peak 1 A β 画分中のA β 42量は有意に高いことが分かった (図2)。

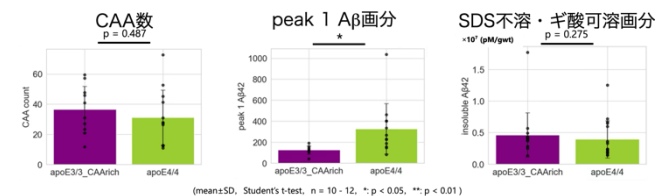


図2 APOEアレルによるpeak 1 A β 画分A β 42濃度の違い
APOE $\epsilon 3/\epsilon 3$ のCAA-richアルツハイマー病、及びAPOE $\epsilon 4/\epsilon 4$ アルツハイマー病剖検脳におけるCAA数 (左)、peak 1 A β 画分中A β 42濃度 (中)、及びSDS不溶・ギ酸可溶画分中A β 42濃度 (右)。APOE $\epsilon 4/\epsilon 4$ アルツハイマー病脳ではpeak 1 A β 画分中のA β 42濃度が統計学的有意に高い。

次にCAA-rich ケース及びCAA-minimal ケース脳由来 peak 1 A β 画分を若齢のAPP tgマウス脳に接種してそのA β 蓄積誘導能を評価したところ、CAA-rich ケース脳由来 peak 1 A β は

CAA-minimal ケースに比べ、より CAA を誘導することが分かった (図 3)。

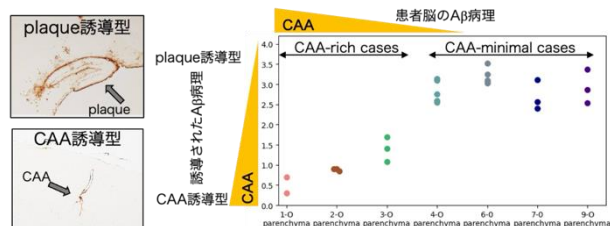


図3 アルツハイマー病患者脳Aβ病理とそのpeak 1 Aβによって誘導されたAβ病理の指向性

AD患者脳7例のAβ病理をX軸に、それぞれの脳由来peak 1 Aβによって誘導されたAβ病理におけるCAA/plaque比率をY軸にプロットした。CAAを多く呈するCAA-rich群由来peak 1 Aβは、CAAを誘導する傾向が認められた。

(II) 新規アルツハイマー病モデル開発と Aβ蓄積依存的な遺伝子発現解析

3ヶ月齢の WT、APP tg マウス、及び hAβ-KI マウス脳を生化学的に解析したところ、hAβ-KI マウスは WT と同程度のヒト Aβ配列を含む APP を発現しており、Aβ量、及び Aβ42/Aβ40 比はいずれも WT と同程度であることが分かった (図 4)。

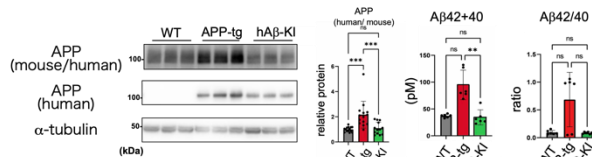


図4 WT、APP tg、hAβ-KIマウス脳のAPP及びAβ量

WT、APP tg、hAβ-KIマウス脳中の全APP量 (22C11)、ヒトAPP量 (6E10)、α-tubulin量、Aβ40量、Aβ42量をimmunoblot法及びELISAで比較した。hAβ-KIマウスはヒトAβ配列を含むAPPをWTマウスと同程度発現しており、また全Aβ量、Aβ42/Aβ40比も同程度であった。

そこで、3ヶ月齢の hAβ-KI マウス脳左海馬に peak 1 Aβ画分を含む TBS 可溶画分を、右海馬に PBS を接種し、3, 6, 9, 12ヶ月後に採脳して免疫組織化学的に Aβ蓄積を評価したところ、6ヶ月齢から左海馬歯状回に分子層に沿った Aβ蓄積が認められ、これらは抗 Aβ42 抗体陽性であった。さらに、Aβ seed 接種 12ヶ月後の左右海馬それぞれから RNA を抽出し、bulk RNA-seq 解析を行なったところ、*Dnah6* や *Itpr1* 遺伝子など、複数遺伝子の発現変動が認められた (図 5)。

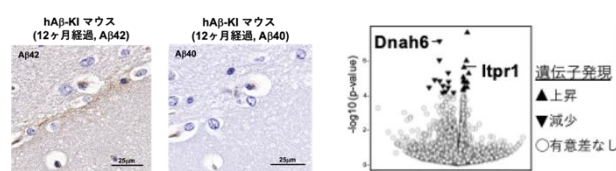
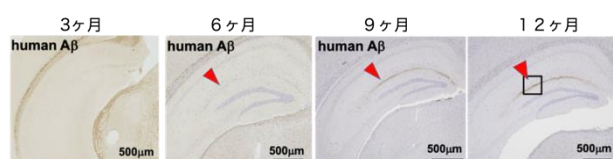


図5 Aβ seedを接種したhAβ-KIマウスのAβ病理像

(上段) hAβ-KIマウス左海馬にAβ seedを接種3, 6, 9, 12ヶ月後の抗Aβ抗体 (82E1)を用いた代表的免疫染色像。

(下段左) Aβ seedを接種12ヶ月後のhAβ-KIマウス脳のアβ42、Aβ40特異抗体を用いた免疫染色像。(下段右) 接種12ヶ月後の左右海馬におけるbulk RNA-seq解析結果。

D. 考察

本研究において、Aβ蓄積誘導能を持つ peak 1 Aβは脳髄膜や血管組織に豊富に存在することが分かった。このことから CAA が peak 1 Aβの”貯留池”としての役割を果たしている可能性が示唆された。また *APOE ε4/ε4* アルツハイマー病患者では *APOE ε3/ε3* アルツハイマー病患者に比べより peak 1 Aβを多く保持することが示され、*APOE ε4* アレルがアルツハイマー病発症のリスクとなる要因である可能性が示唆された。

本研究において CAA-rich ケース由来の peak 1 Aβは、CAA-minimal ケース由来の peak 1 Aβに比べ、より CAA を誘引する傾向があることが分かった。このことから peak 1 Aβ には CAA 誘引型と plaque 誘引型の指向性の異なる種類がある可能性が示唆された。両者の違いが、peak 1 Aβに含まれる Aβの分子種 (Aβの長さ、翻訳後修飾、オリゴマーの高次構造)に起因するか、或いは相互作用分子の違いに起因するのか、さらに詳細なタンパク質解析が必要である。

本研究で hAβ-KI 脳に peak 1 Aβを接種することによって、家族性アルツハイマー病に連鎖する遺伝子変異を持たずに Aβ病理を呈するモデルマウスの作出に成功した。hAβ-KI 脳では、Aβ42量は Aβ40 に比べ 1/10 にも関わらず、出現した Aβ蓄積は Aβ42 陽性であり、Aβ42 から蓄積するアルツハイマー病患者脳と同様の病理経過を経る可能性が示唆された。このマウスモデル脳では、*App* 遺伝子の過剰発現や *Swedish* 変異に伴う sAPPβの過剰産生が生じないことから、Aβ蓄積に起因する脳内変容解析や、アルツハイマー病治療薬開発に有用なモデルであると期待される。

E. 結論

アルツハイマー病脳において、老人斑と CAA の形成に異なる機序が存在する可能性を見出し、 $A\beta$ seed の保持という新たな CAA の役割を明らかにした。また、*App* 遺伝子の過剰発現や家族性アルツハイマー病変異を持たない新たなアルツハイマー病モデルマウスを作出した。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. Hashimoto T, Uchigami H, Kashiwagi-Hakozaki M, Murayama S, Saito Y, Toda T, Iwatsubo T: The role of cerebrovasculature as the reservoir of seed-competent amyloid β species. *Neuroscience2024*, 2024/10/7, Chicago
2. Hashimoto T, Tanaka M, Kokawa A, Uchigami H, Komaki Y, Iwatsubo T: The influence of apoE on the seeding properties of amyloid β peptide. *Alzheimer's Association International Conference Advancements: APOE& Lipid biology*, 2025/3/17-18, Miami (online)
3. 橋本唯史: ApoE と β アミロイド凝集・蓄積・伝播, 第 43 回日本認知症学会学術集会, 2024/11/21-23, 郡山
4. 小牧之泰、内上寛一、橋本唯史: ヒト amyloid β ($A\beta$)ノックインマウスを用いた新規 $A\beta$ 病態モデルマウスの開発, 第 43 回日本認知症学会学術集会, 2024/11/21-23, 郡山

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし