

長寿医療研究開発費 2019年度 総括研究報告

ショウジョウバエモデルを利用したアルツハイマー病発症機序の解明
並びに創薬標的の探索（19-49）

主任研究者 関谷 倫子 国立長寿医療研究センター 室長

研究要旨

高齢化の進む我が国において、認知症患者数の急増は深刻な社会問題であり、その原因であるアルツハイマー病（AD）の発症メカニズムの解明、治療薬標的の同定は急務である。近年の次世代シーケンサー等の技術革新に伴い、網羅的なゲノム解析、トランスクリプトーム解析等が行われ、多くのオミクスデータが集積している。しかしながら、未だADの発症機序解明には至っていない。

本研究では、これまでに得られた多くのオミクスデータから最もAD発症と関連あると予測される遺伝子を、機能や発現別に整理しスクリーニングを行う。スクリーニングには、整理した遺伝子の特徴を考慮し、最も適すると考えられるショウジョウバエモデルを作製・使用する。次に、スクリーニングで得られた遺伝子について、遺伝子の機能解析を行うとともに、AD発症への関与を明らかにする。

これまでのオミクスデータから、ADの発症・進展には、ニューロンを取り巻くグリア細胞機能の変化が大きな影響を与えると考えられるが、実際にどのグリア細胞種の、どの遺伝子が担う機能変化が病態の形成に重要であるかは不明である。まず最初に、AD発症におけるグリア細胞機能および血液脳関門（血管）機能に着目し、グリア細胞に発現する遺伝子群について検討を行う。本年度は、グリア細胞関連遺伝子をスクリーニングするために新規に作製したADモデルショウジョウバエについての表現型解析を実施し、その後、ADの発症・進展に影響を与えるグリア細胞機能に関連する遺伝子および血管関連遺伝子（ショウジョウバエグリア細胞は、脳血管機能も兼ねるため）のスクリーニングを開始した。

主任研究者

関谷 倫子 国立長寿医療研究センター 室長

分担研究者

飯島 浩一 国立長寿医療研究センター 部長

赤木 一考 国立長寿医療研究センター プロジェクトリーダー

A. 研究目的

高齢化の進む我が国では、認知症患者数が急増しており深刻な社会問題となっている。この老年性認知症の最大の原因となる疾患が、アルツハイマー病 (AD) である。AD の 90% 以上は孤発性であるが、その原因は不明である。第 1 の危険因子は加齢であるが、2 番目の危険因子は家族歴であり、複数の遺伝的要因と環境要因が複雑に相互作用していると考えられる。

これまで、AD の遺伝的要因を明らかにするために多くのゲノムワイド関連解析が行われ、2019 年の報告では 30 近くのリスク遺伝子が同定されている。しかしながら、これらの遺伝子変異 (あるいは近傍の変異) がどのように AD の発症に寄与しているのかは、ほとんど解明されていない。また同様の理由から、AD 患者や AD モデル動物のオミクスデータによる研究も進んでおり、多くのデータはデータベースに登録され、他の研究者も共有が可能となっている。

本研究では、現在までに得られている多くのオミクスデータを利用し、これらのデータを整理、*in vivo* にてスクリーニング、AD 発症に関与すると思われる遺伝子を絞り込み、AD モデルマウスや培養細胞を用いた実験系により AD の発症機序解明を目指す。*in vivo* でのスクリーニングにはショウジョウバエを用いる。ショウジョウバエは、ヒト疾患関連遺伝子の 70% 以上を有しており、世代時間が短く、遺伝子操作が簡便であるとともに、すべての RNAi 系統が入手可能で、また倫理面での制約も少ない。つまり、オミクスデータから遺伝子を予想される機能ごとに整理し、そのスクリーニングに最も適するショウジョウバエモデルを作製し、スクリーニングを行う。この“*in vivo* でのスクリーニング”を迅速に行えることは、疾患メカニズム解明における大きな利点である。

この方法を利用し、最初にグリア細胞機能および血液脳関門 (血管) 機能関連遺伝子のスクリーニングから開始する。2019 年度は、グリアおよび血管機能の遺伝子スクリーニングを行うために新規に作製した AD モデルショウジョウバエについて、その表現型解析を実施し、その後、AD の発症・進展に影響を与えるグリア細胞機能に関連する遺伝子および血管関連遺伝子 (ショウジョウバエグリア細胞は、脳血管機能も兼ねるため) のスクリーニングを開始した。

B. 研究方法

本研究では、1) オミクスデータから遺伝子を整理・抽出し、2) それら遺伝子群の効果的なスクリーニングを行うための AD モデルショウジョウバエの確立、および遺伝子スクリーニングの実施、3) AD モデルマウスへの外挿と培養細胞での検証、のステップを繰り返す、AD 発症に関わる遺伝子並びに創薬標的の同定を行う。

2019 年度は、グリア細胞機能に関連する遺伝子のスクリーニングを行うために開発した新規 AD モデルショウジョウバエの表現型の解析、およびスクリーニング用に適した遺伝子組換えショウジョウバエへの改変を行った。また、ゲノムワイド関連解析により同定され

たADのリスク遺伝子、その他種々の遺伝子 RNAi 系統を用い、スクリーニングをスタートした。

新規遺伝子組換えショウジョウバエは、pUASTattb, pVALIUM20等のショウジョウバエ発現ベクターを用い、PhiC31 integrase-mediated transgenesis systemsにより作製した (Bestgene社)。その他入手可能なショウジョウバエ系統については、Bloomington *Drosophila* Stock Centerならびに KYOTO Stock Centerより分譲を受けた。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え生物等の使用については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律 (平成15年法律第97号 平成19年3月30日改正)」に従って行なった。

C. 研究結果

新規ADモデルショウジョウバエの表現型解析

本研究でスクリーニングに用いるADモデル (ショウジョウバエ) は、ADの発症に関係すると考えられているアミロイドβペプチド (Aβ42) が神経細胞から分泌され、1) 脳内の様々な細胞 (神経細胞, グリア細胞, 血管細胞) に直接影響する, 2) 影響を受けた細胞が相互に作用しあう, という2つの作用を総合した結果を見ることができると想定して作製した。そのため、新規作製したADモデルショウジョウバエ (図中では、New Aβ42 fly と記載) では、神経細胞から分泌された Aβ42 が様々な細胞種に作用するよう、Aβ42の細胞外への分泌効率向上を考慮し遺伝子組換えショウジョウバエ

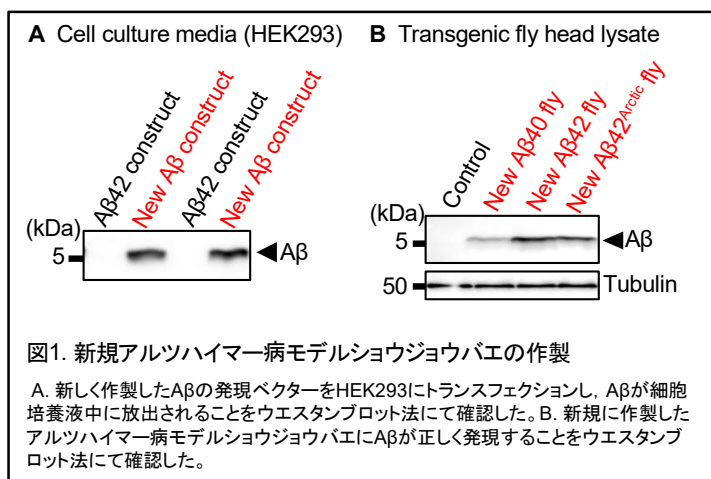


図1. 新規アルツハイマー病モデルショウジョウバエの作製

A. 新しく作製したAβの発現ベクターをHEK293Iにトランスフェクションし、Aβが細胞培養液中に放出されることをウエスタンブロット法にて確認した。B. 新規に作製したアルツハイマー病モデルショウジョウバエにAβが正しく発現することをウエスタンブロット法にて確認した。

作製用のベクターの構築を行った。これまで用いてきたADモデルショウジョウバエ用のベクター (Aβ42 construct と記載) は、培養細胞を用いた実験では、細胞外 (培地中) への Aβ42の分泌がほとんど認められなかった (図 1A)。それに対して、新規に作製したベクターでは (New Aβ42 construct), Aβ42 が効率よく細胞外へ分泌されることを確認した (図 1A)。また、このベクターを用いて作製した遺伝子組換えショウジョウバエにおいて (実際には、Aβ40, Aβ42, Aβ42 Arctic mutation および Control 系統を作製), Aβ が確実に発現していることも確認した (図 1B)。

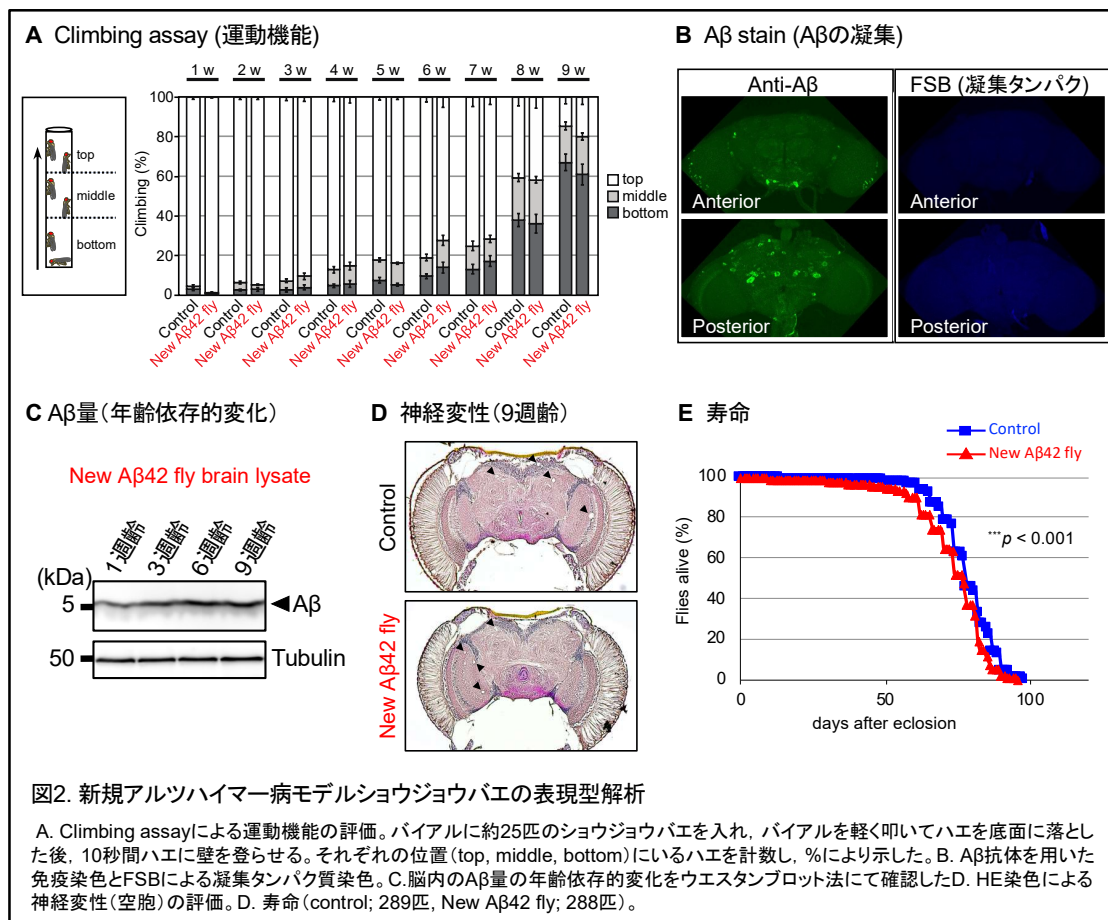


図2. 新規アルツハイマー病モデルショウジョウバエの表現型解析

A. Climbing assayによる運動機能の評価。バイアルに約25匹のショウジョウバエを入れ、バイアルを軽く叩いてハエを底面に落とした後、10秒間ハエに壁を登らせる。それぞれの位置(top, middle, bottom)にいるハエを計数し、%により示した。B. Aβ抗体を用いた免疫染色とFSBによる凝集タンパク質染色。C. 脳内のAβ量の年齢依存的変化をウエスタンブロット法にて確認した。D. HE染色による神経変性(空胞)の評価。E. 寿命(control; 289匹, New Aβ42 fly; 288匹)。

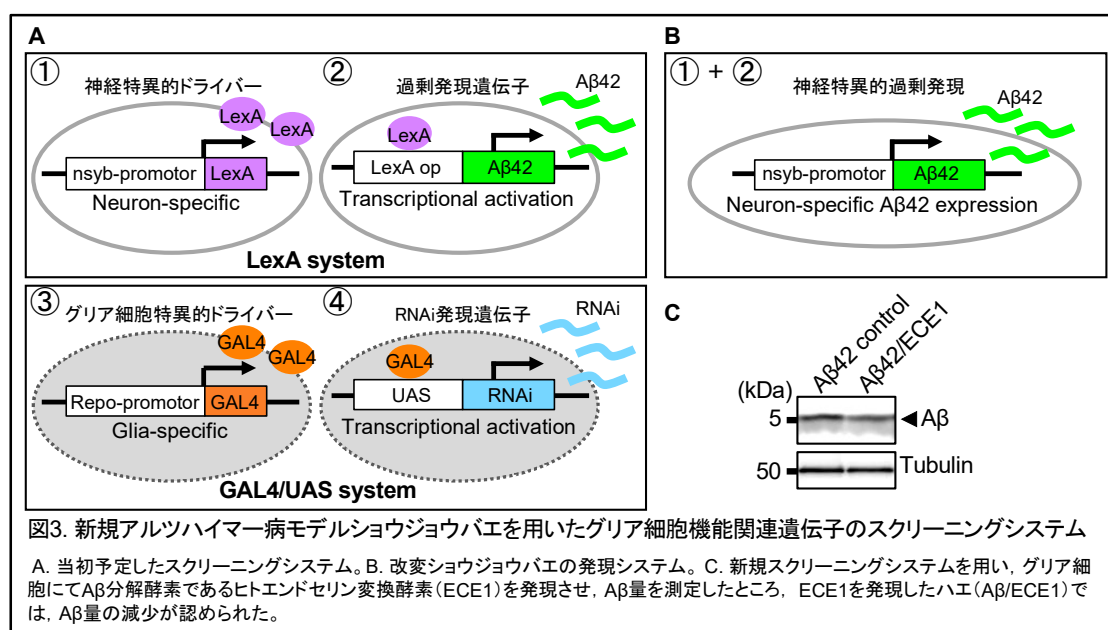
その後、作製した新規 AD モデルショウジョウバエの表現型解析として、加齢依存的な運動機能 (climbing assay), Aβ の凝集, 神経変性, 寿命について検討を行った。運動機能については、9 週齢まで測定を行なったが、Control 系統と比較して顕著な変化は認められなかった (図 2A)。また、脳内の Aβ42 量は加齢依存的に増加の傾向が認められたが (図 2C)、脳内で凝集を形成することはなかった (図 2B)。同様の 9 週齢において、神経変性も認められなかった (図 2D)。寿命は、Kaplan-Meier 生存分析の結果、有意な寿命の減少が認められたが、現在広く AD モデルとして用いられている細胞内に Aβ42 が蓄積するタイプの AD モデルショウジョウバエ (Iijima K. *et al.*, *PNAS*, 2004) の寿命減少と比較すると、著しく効果は弱く、今回のモデルの特徴的な表現型とは言い難かった (図 2E)。

ヒトでは、Aβ42 は神経細胞内で Aβ 前駆体タンパク質 (APP) から産生され、細胞外へと放出され凝集して老人斑を形成する。そのため、今回作製した、神経細胞から細胞外へ Aβ42 を効率よく分泌する AD モデルショウジョウバエは、現在広く用いられている細胞内に Aβ42 が蓄積するタイプの AD モデルと比較し、よりヒトの AD を模したモデルであると言える。また、新しい AD モデルマウスとして理研で開発され、現在頻用されている APP ノックインマウスを用いた研究から、脳内に Aβ42 を多量に発現させるだけでは、AD 病理を再現することが出来ないということが分かったが、この知見は、今回新規に作製した AD モデルショウジョウバエの表現型解析の結果と良く一致する。つまり、通常の状態

では、ショウジョウバエ脳内においても A β 42 を多量に発現しているだけでは特徴的な表現型は示さない。本研究では、この新規に作製した AD モデルショウジョウバエを用い、グリア細胞機能（あるいは血管系機能）に異常をきたした場合（実際には、RNAi にて候補遺伝子をノックダウン）に、A β 42 の凝集や神経変性といった表現型を示すことを期待し、スクリーニングを行うこととした。

スクリーニング用ショウジョウバエの作製

スクリーニングでは、図 3A に示したように、神経細胞特異的に A β 42 を発現し、かつグリア細胞特異的に任意の遺伝子をノックダウンする (RNAi) ために①～④までの 4 つの組換え遺伝子を持つショウジョウバエの作製が必要になる。当初の予定では、スクリーニングを効率的に遂行するために、①～③ 3 つの組換え遺伝子を持つトリプルトランスジェニックショウジョウバエ作製し、任意の RNAi 系統 (④) と交配する予定であった。しかし、実際に①～③トリプルトランスジェニックショウジョウバエを作製したところ、生育状況が悪く、スクリーニングを効率があまり良くないと判断した。そのため、効率化をはかる解決策として、(1) あらかじめ①+②を合わせたトランスジェニックショウジョウバエを作製する (図 3B)、(2) ①～④それぞれの遺伝子挿入部位の変更を検討する、の 2 つを追加で考えることとした。①+②を合わせたトランスジェニックショウジョウバエは、作製には成功したものの、想定していた A β 42 の発現が認められなかった。そこで、②について、遺伝子挿入部位を変更してトランスジェニックショウジョウバエを作製し、③については遺伝子挿入部位の異なる系統を入手し、トリプルトランスジェニックショウジョウバエ (①+②+③) を作製した。新しく作製したトリプルトランスジェニックショウジョウバエは、表現型解析で用いた系統よりも若干 A β 42 の発現量が少ない傾向が見られたが、生育状況の改善が認められたため、このトリプルトランスジェニックを用いることにした。スクリーニン



グを開始するにあたり、 $A\beta$ を分解することが知られているヒトのエンドセリン変換酵素 (Endothelin converting enzyme 1, ECE1) をショウジョウバエグリア細胞に過剰発現し、神経細胞から分泌された $A\beta$ 量が増加するかどうかを確認したところ、図 3A に示したようにウエスタンブロットにて $A\beta$ 量の減少が認められ、新規ショウジョウバエモデル系が機能することを確認することが出来た。

候補遺伝子のスクリーニング

スクリーニングは、図 3 に記載の (①+②+③) の遺伝子を持つトリプルトランスジェニックショウジョウバエと、種々の RNAi 系統 (④) のショウジョウバエを交配の後、①~④の遺伝子すべてを有するショウジョウバエを回収し、ウエスタンブロットにて $A\beta_{42}$ 量を測定するという方法で行った。

1) AD のリスク遺伝子

AD では、ゲノムワイド関連解析により 30 以上のリスク遺伝子が報告されているが、それぞれの遺伝子が、どのようなメカニズムで AD の発症リスクの増加に関わっているのかについては、ほとんど分かっていない。そこで、報告されている AD のリスク遺伝子のうちグリア細胞で発現しており、ショウジョウバエに相同遺伝子あるいは機能を代替するような遺伝子の存在する、*APOE*, *CRI1*, *PICALM*, *ABCA7*, *BIN1*, *CD2AP*, *CD33*, *EPHA1*, *CASS4*, *CELF1*, *FERMT2*, *HLA-DRB1*, *INPD5*, *MEF2C*, *PTK2B*, *SORL1*, *TREM2*, *ABI3*, *PLCG2* 等、計 25 遺伝子について、ショウジョウバエ相同遺伝子のノックダウン系統 (計 44 系統) を用い、 $A\beta_{42}$ 量の変化 ($A\beta_{42}$ の代謝や凝集性) に変化を及ぼすかどうかスクリーニングを行った。候補遺伝子の RNAi 系統とトリプルトランスジェニックを交配し、羽化後 1 週間目で測定をおこなったが、結果として、いずれの遺伝子も $A\beta_{42}$ 量に変化を与えることはなかった。

2) AD 関連アストロサイト 遺伝子

分担研究者の飯島浩一博士と共同で、AD モデルマウス (APP ノックインマウス) のトランスクリプトーム解析を行っている。そこで得られた AD モデルマウスでの変動遺伝子や、神経変性を生じる既存の AD モデルショウジョウバエの変動遺伝子を AD 患者由来の遺伝子ネットワークと重ね合わせ、グリア細胞および血管細胞に発現する遺伝子を抽出している。本年度は、AD 患者脳から構築された遺伝子ネットワークと AD モデルマウスでの変動遺伝子のエンリッチメント解析で、上位に位置するアストロサイト 関連遺伝子のネットワークについて、その構成遺伝子のスクリーニングを行った。現在までに、18 遺伝子についてスクリーニングを行ったが、今のところ $A\beta_{42}$ 量に変化を与える遺伝子は見つかっていない。

3) 神経損傷ならびに老化関連遺伝子

ショウジョウバエを用いた研究から、神経損傷時に発現の増加するグリア関連遺伝子、また加齢に伴い発現変動の見られる遺伝子が網羅的に調べられている。神経損傷時や加齢により発現が変動する遺伝子を過剰発現、あるいはノックダウンすることは、病態時の脳

内炎症や、急速な加齢を模倣すると予想され、それらの遺伝子産物が A β の代謝や凝集に影響を与えることが考えられる。そこで、それらのデータから発現変動の大きい遺伝子を抽出し、現在スクリーニングを行っている。

D. 考察と結論

アルツハイマー病 (AD) のリスク遺伝子として *TREM2* が報告されて以降、AD におけるグリア細胞機能の関与について多くの報告がなされているが、疾患発症・進行のメカニズムは未だ不明のままである。本研究のスクリーニングから得られる遺伝子は、AD の発症メカニズム解明につながるとともに、直接創薬標的として機能する可能性も考えられる。また、AD モデルマウスや培養細胞から、AD 発症メカニズムの一端でも解明することができれば、さらに様々な角度から (特定の遺伝子から AD 患者のトランスクリプトームデータを逆に検索するなど)、AD 発症メカニズムに迫ることかでき、発症メカニズムに基づいた創薬開発を行うことも可能である。

本年度、新規に作製したモデルショウジョウバエを用いて初めてスクリーニングを開始し、多くの改善点があることが判明した。今回の結果では、残念ながら A β 42 を変化させるようなグリア細胞関連遺伝子は見つからなかったが、AD モデルの A β 42 の発現量の増加、発現する A β 42 (野生型、家族性の変異体) の種類、RNAi のノックダウン効率の向上、などいくつかの点を改善することで、より良いスクリーニングをできる可能性が見えてきた。さらに、グリア細胞関連遺伝子の中には、発達時に重要な役割を持つものも多く、それら遺伝子のノックダウンではショウジョウバエが致死となりスクリーニングを行うことができなかった。これらの点についても、AD モデルを改善し、さらに新しいスクリーニングシステム (薬剤誘導性:GeneSwitch) を導入することで対応することが可能である。さらに、ノックダウン系統のみでなく、入手可能な過剰発現系統も加えてスクリーニングを行うことで、より効率的に遺伝子スクリーニングを進めることが可能となる。

今回作製した新規の AD モデルショウジョウバエは、既存のモデルと比較し、A β 42 発現システムにおいてより AD を模していると考えられる。残念ながら A β 42 を過剰発現するだけでは A β 42 の蓄積 (老人斑) や神経変性を誘導することは無かったが、結果的にこれらの結果は APP ノックインマウスで報告されている知見と一致し、モデルとして正しいことが証明された。今後、この新規 AD モデルショウジョウバエのシステムにてスクリーニングを行い、グリア細胞機能 (あるいは血管系機能) に関係する遺伝子の欠損 (あるいは過剰発現) が A β 42 の蓄積や神経変性を引き起こすことが分かれば、その遺伝子変異をモデルショウジョウバエに組み込むことで、より確実に AD 病態を再現する AD モデルショウジョウバエを確立することも可能となる。

現在、AD の最新の汎用モデル動物として APP ノックインマウスが用いられているが、野生型の A β 42 を多量に発現するだけでは、マウスの寿命である 2 年を超えても、老人斑が形成されないことが報告されている。また、マウスモデルは、その寿命の長さや倫理的問

題から、多くの遺伝子や薬物のスクリーニングには不向きである。一方、ショウジョウバエは、倫理的問題も少なく遺伝子操作も簡便であり、薬物のスクリーニングを行うことも可能である。栄養補助食品や健康補助食品開発の現場では、倫理的問題からマウスを用いた実験が難しく、すでに代替モデルへの移行が考えられている。ショウジョウバエでより忠実に AD 病態を模すようなモデルを作製することは、アルツハイマー病の発症メカニズムの解明に役立つとともに、その後の創薬ターゲットの同定、創薬への第一次スクリーニング系として、また先制医療開発の一助になると考える。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表（主任研究者および分担研究者）

1) Disruption of a *RAC1*-centred network is associated with Alzheimer's disease pathology and causes age-dependent neurodegeneration, Masataka Kikuchi^{*†}, Michiko Sekiya^{*}, Norikazu Hara^{*}, Akinori Miyashita, Ryozo Kuwano, Takeshi Ikeuchi, Koichi M. Iijima[†], Akihiro Nakaya, *Human Molecular Genetics.*, 2020, 29: 817-833. ^{*}Co-first authors, [†]Co-corresponding authors.

2. 学会発表（主任研究者および分担研究者）

1) A *Drosophila* model of Alzheimer's disease, Michiko Sekiya, The 5th NCGG-ICAH symposium, 2019 年 4 月 12 日（シンポジウム），大府市

2) A novel *Drosophila* model of Alzheimer's disease, Michiko Sekiya, Yasufumi Sakakibara, Sachie Chikamatsu, Koichi M. Iijima, AAIC2019, 2019 年 7 月 17 日（ポスター），ロサンゼルス（アメリカ）

3) Amyloid- β plaque formation and reactive gliosis are required for induction of cognitive deficits and synaptic degeneration in *App* knock-in mouse models of Alzheimer's disease, Yasufumi Sakakibara, Michiko Sekiya, Takashi Saito, Takaomi C. Saido, Koichi M. Iijima, AAIC2019, 2019 年 7 月 17 日（ポスター），ロサンゼルス（アメリカ）

4) Amyloid- β plaque formation and reactive gliosis are required for induction of cognitive deficits in *App* knock-in mouse models of Alzheimer's disease, アルツハイマー病モデルである *App* ノックインマウスにおける認知機能障害はアミロイド β 斑の形成とグリオシスに起因する, 榊原泰史, 関谷倫子, 斉藤貴志, 西道隆臣, 飯島浩一, NEURO2019（第 42 回日本神経科学大会, 第 62 回日本神経化学学会大会）, 2019 年 7 月 25 日（ポスター）, 新潟市

5) スルフォニル尿素受容体欠損がもたらす老年性神経変性への脆弱性, *Sur* deficiency increases vulnerability to age-related neurodegeneration in *Drosophila*, 権秀明, 関谷倫子, 榊原泰史, 飯島浩一, 第 92 回日本生化学会大会, 2019 年 9 月 18 日（口頭）, 横浜市

6) Amyloid- β plaque formation and reactive gliosis are required for induction of cognitive deficits in *App* knock-in mouse models of Alzheimer's disease, Yasufumi Sakakibara, Michiko Sekiya, Takashi Saito, Takaomi C. Saido, Koichi M. Iijima, 第6回アジア神経精神薬理学会 (AsCNP2019), 2019年10月13日 (ポスター), 福岡市

7) *Sur* deficiency increases vulnerability to age-related neurodegeneration in *Drosophila*, Xiuming Quan, Michiko Sekiya, Yasufumi Sakakibara, Koichi M. Iijima, Neuroscience 2019, 2019年10月19日 (口頭), シカゴ (アメリカ)

8) 新規アルツハイマー病モデルショウジョウバエの作製, 関谷倫子, 榊原泰史, 近松幸枝, 飯島浩一, 第38回日本認知症学会学術集会, 2019年11月8日 (ポスター), 東京

9) Cognitive deficits and synaptic degeneration in *App* knock-in mouse models of AD, 飯島浩一, 榊原泰史, 齊藤貴志, 西道隆臣, 関谷倫子, 第38回日本認知症学会学術集会, 2019年11月8日 (ポスター), 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし