

アルツハイマー病発症機序に関わる遺伝子ネットワークの同定と実験的検証（19-7）

主任研究者 飯島 浩一 国立長寿医療研究センター アルツハイマー病研究部（部長）

#### 研究要旨

アルツハイマー病（AD）に対する予防・治療法の確立は急務の課題である。脳内でのアミロイドβペプチド（Aβ）の蓄積が、AD発症の原因と考えられており、“抗Aβ医薬”が予防・先制治療薬として位置付けられ、AD発症前から臨床試験を行うための体制作りが進められている。このような状況の下、AD治療薬開発の標的は、Aβそのものから、“Aβ蓄積が惹起する脳病態”へと急速に展開している。当研究部では、“抗Aβ医薬”の保護効果を正確に判定するための病態マーカーや、シナプス変性、神経炎症、脳血管系障害、Tau病理拡大、神経変性といったADの進行に介入する治療法の開発を目標に、Aβの蓄積がどのように脳内恒常性を破綻させるのか、その分子機序の解明に取り組んでいる。

近年、網羅的なゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム等のオミクスデータを利用したデータ駆動型研究が、AD研究にも新たな展開をもたらしている。本研究では、AD患者由来の臨床・病理・ゲノム・遺伝子発現データを統合した遺伝子共発現ネットワーク解析と、Aβ病理を呈するモデル動物を用いた実験検証を組み合わせ、“Aβ蓄積が引き起こす脳内環境の変化”を“遺伝子ネットワークの変化”として、網羅的かつ包括的に捉え、AD発症機序の理解に基づいた、新たな脳病態マーカーと治療薬の標的遺伝子を探索する。

当該年度は、候補遺伝子ネットワークの網羅的同定から、アストロサイト・脳血管系細胞遺伝子ネットワークに着目した機能解析、さらにアデノ随伴ウイルスを用いて、青斑核でTau病理を呈する新規モデルマウスの作製を進めた。

#### 主任研究者

飯島 浩一 国立長寿医療研究センター アルツハイマー病研究部（部長）

#### 分担研究者

関谷 倫子 国立長寿医療研究センター アルツハイマー病研究部（室長）

木村 展之 国立長寿医療研究センター アルツハイマー病研究部（室長）

木村 泰之 国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部（室長）

## A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) 発症機序の全容解明には、AD 患者脳内で生じている変化を包括的に捉える必要があり、その一つ的手段として遺伝子ネットワーク解析の有用性が示されている。本研究では、AD 患者由来の臨床・病理・ゲノム・遺伝子発現データを統合した遺伝子ネットワークと、重篤な A $\beta$  病理を呈するモデルマウスから得たトランスクリプトームデータを融合させ、AD 発症機序の開始点である A $\beta$  病理の増悪に伴い生じる脳内変化を、遺伝子ネットワークの変化として検出する。この方法により、AD 発症機序の根幹を遺伝子レベルで包括的に捉えることが可能になり、新たな角度から AD 病態解明に迫ることができると。さらにこれらのネットワークに含まれる遺伝子群の中から、新たな病態マーカーや治療薬の標的 (候補遺伝子) を、AD モデル動物を用いた検証実験を通して探索する。

**研究計画 1** では、重篤な A $\beta$  病理を呈する理研 AD モデルマウス脳における RNA シーケンス解析を行い、1) A $\beta$  病理の増悪が前頭皮質、側頭皮質、海馬の各領域で惹起する遺伝子発現変化、2) それら変化への性差の影響、さらに 3) 脳幹に存在し、AD 発症機序において最初に Tau 病理の形成と神経脱落が認められる青斑核における遺伝子発現変化、についてデータを取得する。**研究計画 2** では、研究目的 1 で得た遺伝子発現データの集積度を指標に、AD 患者由来の遺伝子共発現ネットワークの中から、AD 患者脳内で A $\beta$  病理の増悪に伴い変化する遺伝子ネットワークを網羅的に同定し、さらに脳病態マーカーや新規治療薬の標的となりうる、細胞種、機能、分子標的を遺伝子レベルで絞り込む。**研究計画 3** では、アストロサイト・脳血管系細胞遺伝子ネットワークが AD 病理形成の過程で果たす役割を、ショウジョウバエ、マウス、細胞モデルを用いて検証する。また新たな検証実験系として、AD 発症機序の初期に見られる中核病理 (脳皮質での A $\beta$  病理と青斑核での Tau 病理) を呈する新規モデルマウスや、新規 AD モデルショウジョウバエの作製を行う。

## B. 研究方法

### 研究計画 1 : 網羅的情報解析に向けた AD モデルマウス脳における遺伝子発現解析

#### 1-1) A $\beta$ 病理の増悪が惹起する遺伝子発現変化

理研より導入した APP ノックインマウスモデル (A $\beta$  病理、情動系変化、認知機能低下が見られる APP<sup>NL-G-F</sup>マウス)、及びコントロールマウスについて、6、15、24 ヶ月齢、雄の前脳皮質、海馬領域、側頭皮質における RNA シーケンスを行い、発現変動遺伝子を抽出する。

#### 1-2) A $\beta$ 蓄積が惹起する遺伝子発現変化における性差の検出

AD の有病率は女性において高いことが知られているが、その背景にある因子や機序は不明である。そこで、雌 APP<sup>NL-G-F</sup>マウス及びコントロールマウスについて、24 ヶ月齢の前脳皮質、海馬領域、側頭皮質における RNA シーケンスを行い、発現変動遺伝子を抽出する。

#### 1-3) A $\beta$ 蓄積が青斑核で惹起する遺伝子発現変化

AD 発症機序において、最初に神経脱落が起こり、さらに大脳皮質下から大脳皮質へのタウ病理進展の起点となる可能性がある青斑核について、24ヶ月齢 *APP<sup>DL-G-F</sup>* マウスの RNA シーケンスデータを取得する。

### **研究計画 2 : A $\beta$ 病理の増悪化と相関して変化する遺伝子ネットワークの網羅的同定**

“抗 A $\beta$  医薬” の保護効果を正確に評価するための病態マーカーや、シナプス変性、タウ病理の拡大、神経変性といった AD の進行に介入する治療法を開発するためには、A $\beta$  の蓄積がどのようにヒト脳内の恒常性を破綻させるのか、その分子機序の解明が必須である。本研究計画では、マウス脳内において A $\beta$  病理の増悪化が惹起する遺伝子発現変化を（研究計画 1）、AD 患者由来の遺伝子共発現ネットワークと重ね合わせ、発現変動遺伝子の集積度を指標に、A $\beta$  病理の増悪化に伴い変化すると予想される遺伝子ネットワーク（機能的に繋がった遺伝子群）を同定する。なお本解析は、研究協力者である米国マウントサイ医科大学との国際共同研究である。

### **研究計画 3 : AD モデル動物、培養細胞を用いた検証実験**

本研究計画では、研究計画 2 で同定したアストロサイト遺伝子ネットワークが、脳病態形成の過程で果たす役割を、AD モデル動物を用いて調べた。この遺伝子ネットワークには Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) 等の反応性アストロサイトマーカー、微小血管周囲のアストロサイト終足で発現する水チャネル Aquaporin 4 (AQP4)、さらに *ABCA1*, *MERTK*, *TLR4* をはじめ、アストロサイト貪食機能に関わる遺伝子が含まれる。従って、A $\beta$  病理の増悪化に伴い、脳内の恒常性を維持するアストロサイト機能に変化が生じ、その機能不全は AD 発症リスクを高める可能性が高いと考えられる。そこで本研究計画では、AD モデル動物を用いて、アストロサイト遺伝子ネットワークの機能解析、ならびにネットワークを構成する遺伝子の中から新規病態マーカーや治療薬標的遺伝子を探索する。加えて、検証実験に資する、培養グリア細胞実験系の確立と新規タウ病理モデルマウスの開発を行う。

#### **3-1) ショウジョウバエモデルによる検証実験**

A $\beta$ 、Tau 毒性モデル、さらに傷害神経貪食モデルを用い、アストロサイト遺伝子ネットワークに含まれる候補遺伝子のノックダウンが、各モデルの神経変性に及ぼす影響を調べる。

#### **3-2) マウスモデルでの検証実験とバイオマーカー探索**

活性化型アストロサイトには、神経毒性作用を有する A1 型と神経保護的作用を有する A2 型が存在することが報告されている。しかし、これらは *in vitro* の条件下における分類であり、AD 病態脳に出現する反応性アストロサイトを明確に A1 型、A2 型に分類できるのかは不明である。また、脳内には未知の反応性アストロサイトが存在する可能性も示されつつある。実際、本研究で着目しているアストロサイトの遺伝子ネットワークには、反応性

アストロサイトのマーカーである GFAP が含まれるものの、A1 型、A2 型に特異的な遺伝子の多くは存在しない。従って、このアストロサイトネットワークを脳内で可視化できれば、新規の活性化型アストロサイトのサブタイプの同定、ならびに AD 患者脳における新たな病態マーカー開発や治療薬開発につながる可能性がある。

そこで、 $APP^{NL-G-F}$  ノックインマウス脳で免疫染色を行い、新規アストロサイト病態マーカーの探索を行う。さらに、アストロサイト遺伝子ネットワークに含まれる創薬候補遺伝子のノックダウンが脳病理、認知機能、遺伝子発現に及ぼす影響を解析する。

### 3-3) 培養グリア細胞検証実験系の確立

培養グリア細胞実験系を確立し、同定したグリア遺伝子ネットワークに含まれる候補遺伝子群の機能解析を行う。

### 3-4) AD の神経変性過程を再現する新規アルツハイマー病モデルの創出

新皮質での  $A\beta$  病理の増悪化が、老化に伴い皮質下の青斑核や臭内野で形成された Tau 病理の新皮質への拡大や広範な神経細胞脱落を惹起し、AD 発症に至ると考えられている。しかしその機序は明らかではなく、その過程を再現するモデル動物も存在しない。本研究では、新皮質に  $A\beta$  病理を呈するヒト化 APP/Tau ダブルノックインマウスを作出し、その青斑核にアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いてヒト Tau 病理を創出する。また新規 AD モデルショウジョウバエの作製も行う。

(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」に従い、マウスを用いた実験は「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に従う。

## C. 研究結果

### 研究計画 1：網羅的情報解析に向けた AD モデルマウス脳における遺伝子発現解析

#### 1-1) $A\beta$ 病理の増悪化が惹起する遺伝子発現変化

理研より導入した APP ノックインマウスモデル (重篤な  $A\beta$  病理、情動系変化、認知機能低下が見られる  $APP^{NL-G-F}$  マウスと、 $A\beta$  を産生するものの  $A\beta$  病理を呈さない  $APP^{NL}$  マウス)、及び野生型マウス (C57BL/6J) について、6, 15, 24 ヶ月齢・雄の前頭皮質、側頭皮質、海馬における RNA シーケンスを統合し (嗅内皮質は 15, 24 ヶ月齢のみ)、研究計画 2 での解析へ進めた (研究計画 2, 図 2 参照)。

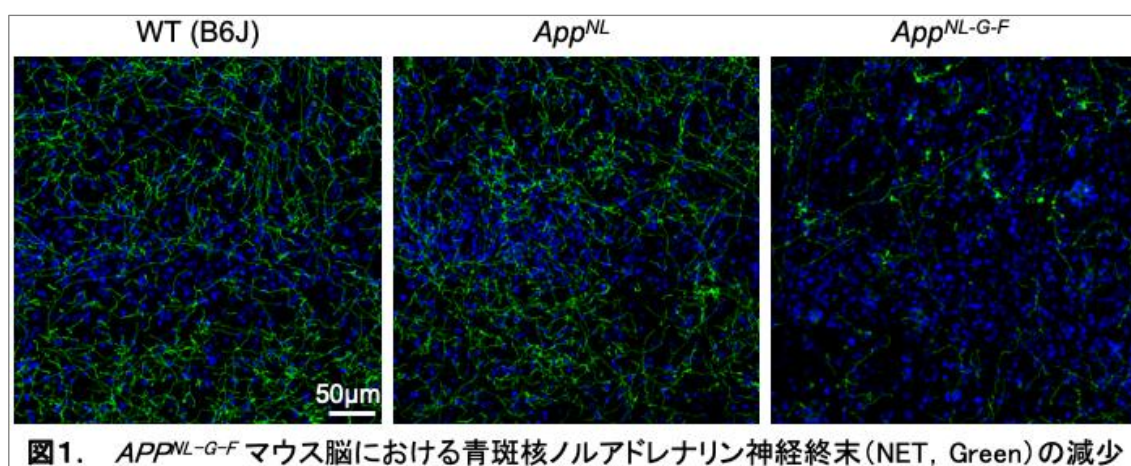
#### 1-2) $A\beta$ 蓄積が惹起する遺伝子発現変化における性差の検出

これまでに、24 ヶ月齢・雌の APP ノックインマウスモデル ( $APP^{NL-G-F}$  マウスと  $APP^{NL}$  マウス)、

及び野生型マウスについて、前頭皮質、側頭皮質、海馬における RNA シーケンスを完了した。得られたデータを、上記1-1) で取得した 24 ヶ月齢・雄のデータと統合し、解析を進めた (研究計画 2 参照)。

### 1-3) $A\beta$ 蓄積が青斑核で惹起する遺伝子発現変化

AD 発症機序において、脳幹に存在する青斑核で最初に Tau 病理が認められる。また、 $A\beta$  病理の増悪に伴い皮質下から大脳皮質へと Tau 病理が進展する際に、青斑核の Tau 病理が起点となっている可能性も示唆され、病態マーカーや治療薬開発の重要な標的と考えられている。しかし、その分子機序の詳細は不明である。これまでに、24 ヶ月齢・雄  $APP^{NL-G-F}$  マウスの大脳皮質において、青斑核ノルアドレナリン神経の神経終末が著しく減少していることを見出している (図 1)。



そこで、 $A\beta$  病理の蓄積が青斑核神経細胞の軸索変性を惹起するメカニズムを解明するために、24 ヶ月齢  $APP$  ノックインマウス ( $APP^{NL-G-F}$  マウス) と野生型マウスの青斑核での RNA シーケンス解析の準備を進めた。当初は、レーザーマイクロダイセクション法により青斑核を摘出し RNA を抽出する予定であった。しかし、より神経細胞へのダメージが低くし、かつ高純度の RNA を調整するために、アデノ随伴ウイルスを用いて青斑核神経細胞特異的に Ribo-Tag 遺伝子を発現させ、リボソームに結合した RNA を抽出することにした。現在加齢飼育中のマウスが 24 ヶ月齢に達する 2021 年 3 月以降に順次実験を進める。

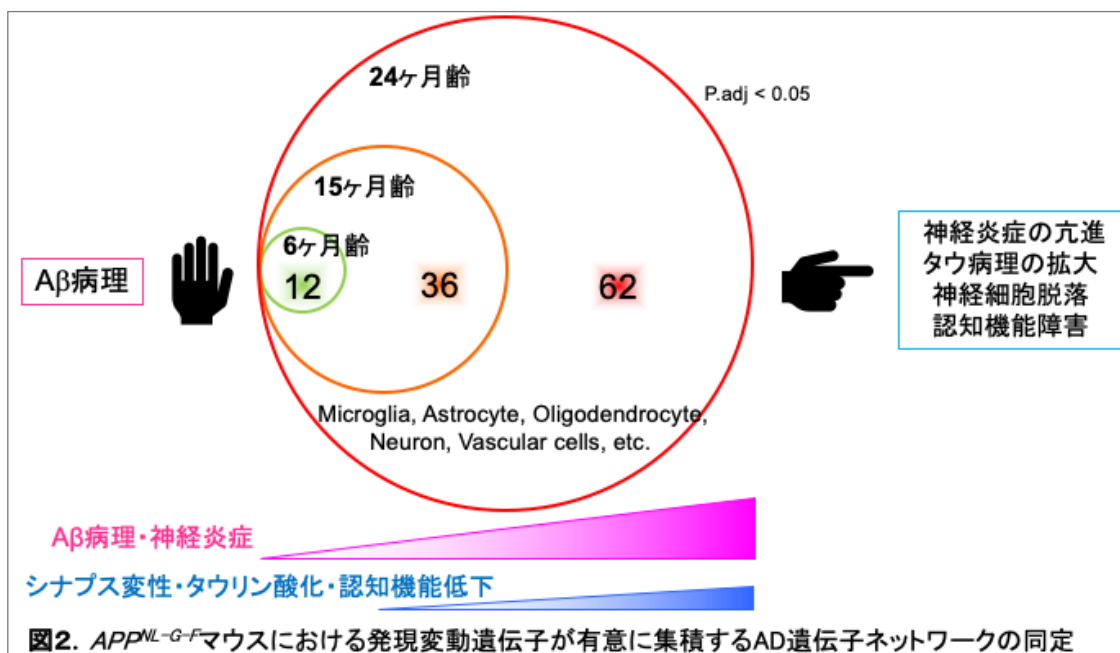
### 研究計画 2 : $A\beta$ 病理の増悪化と相関して変化する遺伝子ネットワークの網羅的同定

本研究計画では、マウス脳内において  $A\beta$  病理の増悪化が惹起する遺伝子発現変化を (研究計画 1)、臨床・病理・ゲノム・遺伝子発現データを統合した AD 患者由来の遺伝子共発現ネットワークと重ね合わせ、その集積度を指標として、 $A\beta$  病理の増悪化に伴い変化する遺伝子ネットワークを網羅的に同定した。なお解析は、国際共同研究者であり、遺伝子共発現ネットワーク解析の開発者である、米国マウントサイ医科大学の Bin Zhang 教授らと

進めた。

現在までに、6, 15, 24ヶ月齢の  $APP^{NL-G-F}$  雄マウスの前頭皮質、側頭皮質、海馬由来の RNA シーケンスデータについて、各月齢での一次解析を行った。その結果、加齢依存的な  $A\beta$  病理の増悪化に伴い、1) 前頭皮質、側頭皮質、海馬全ての領域で、発現変動遺伝子数が増加する、2) 発現変動遺伝子中に含まれる AD リスク遺伝子の数も増加する、3) 発現変動遺伝子の内容は、前頭皮質と側頭皮質で類似しており、海馬領域では異なる、4)  $A\beta$  病理が出現する6ヶ月齢において、まずミクログリアで機能する遺伝子の発現が上昇し、 $A\beta$  病理が増悪化していく15ヶ月齢、24ヶ月齢においては、ミクログリア遺伝子群に加え、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、脳血管系細胞の遺伝子発現が上昇する、5) シナプス機能・神経活動に関わる遺伝子の発現は低下する、さらに6)  $APP^{NL-G-F}$  マウス脳で検出された遺伝子発現変化と、これまでに報告されている AD 患者脳での遺伝子発現変化の間には類似性が見られる、等が明らかとなった (論文準備中)。

次に、 $A\beta$  病理の増悪化がマウス脳内で惹起する遺伝子発現変化の機能的な意義を理解するために、研究計画1で取得した発現変動遺伝子を、AD 患者由来の遺伝子共発現ネットワーク (AD 患者脳内で機能的な繋がりを持つことが予測される遺伝子群) と重ね合わせ、その集積度合いを調べた。遺伝子共発現ネットワークとしては、1) ハーバード大学脳組織バンクコホート、2) Religious Orders Study and Rush Memory and Aging Projects バンクコホート、3) マウントサイ大学脳組織バンク、の3つの独立の AD 患者コホート由来の遺伝子ネットワークを用いた。一例として、ハーバード大学脳組織バンクコホート由来の遺伝子ネットワークを用いた解析を示す (図2)。6ヶ月齢  $APP^{NL-G-F}$  雄マウスの前頭皮質、側頭皮質、海馬で検出された発現変動遺伝子は、12 遺伝子共発現ネットワークで有意に集積し、その多くはミクログリアでの機能が予想された。また、 $A\beta$  病理が増悪化していく



15ヶ月齢での発現変動遺伝子は36遺伝子ネットワーク、さらに24ヶ月齢では62遺伝子ネットワークにおいて有意な集積が見られた。これらの解析により、A $\beta$ 病理の増悪に伴いマウス脳内で経時的に起こる変化を、AD患者脳で検出される遺伝子ネットワーク数の増加として捉えることができたと考えられる。またその内容が、ミクログリアネットワークの上昇から、オリゴデンドロサイトネットワークの上昇、神経活動・シナプス機能ネットワークの低下、さらにアストロサイト・脳血管系細胞ネットワークの上昇、と質的に変化していくことも捉えることができた（論文準備中）。以上の結果はAD患者における脳病変とも良く一致し、本解析によりAD病変形成に関わる遺伝子群を網羅的に同定できたと考えている。研究計画3では、アストロサイト・脳血管系細胞遺伝子ネットワークに着目し、モデル動物を用いた検証実験を進めた。また24ヶ月齢雌マウスと24ヶ月齢雄マウスのRNAシーケンスデータを統合し、A $\beta$ 病理に対する脳の反応の性差について遺伝子ネットワークレベルでの検出を進めている。

### **研究計画3：ADモデル動物，培養細胞を用いた検証実験**

研究計画2で同定したアストロサイト・脳血管系細胞遺伝子ネットワークには、Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)等の反応性アストロサイトマーカー、アストロサイト貪食機能に関わる遺伝子群、微小血管周囲のアストロサイト終足で発現する水チャネルAquaporin 4 (AQP4)、アストロサイト・血管系細胞で発現し、エネルギー状態に応じて細胞活性を調節することで細胞傷害を軽減するカリウムチャネル、さらに抑制性神経細胞の生存に関わる転写因子等が含まれている。従ってこの遺伝子ネットワークの変化は、A $\beta$ 病理の増悪に伴う慢性的な反応性アストロサイトの増加により、神経細胞への栄養供給、脳内デブリクリアランス、さらに脳血管系の機能調節等、脳内恒常性の維持が破綻していく様子を反映している可能性が高い。そこで本研究計画では、ネットワーク構成遺伝子群が、AD脳病態形成の過程で果たす役割について、ADモデルマウスおよびショウジョウバエを用いて調べ、ADの新規病態マーカーや治療薬標的の探索を進めた。また新たな検証実験系として、培養ヒトグリア細胞実験系の導入、並びにAD発症機序において最初にTau病理が認められるノルアドレナリン神経系でTau病変を呈する、新規モデル動物の開発を進めた。

#### **3-1) ショウジョウバエモデルによる検証実験**

当研究部で確立したA $\beta$ 神経毒性ショウジョウバエ、ならびにTau神経毒性ショウジョウバエを用い、アストロサイト・脳血管系細胞遺伝子ネットワークの中から、神経保護作用をもつ遺伝子を探索・同定した。それらの中でも、創薬標的となりうる候補遺伝子として、遺伝子Xに着目した。遺伝子Xは、細胞内のエネルギー状態に応じて開閉し、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の調節による細胞活性の制御や、細胞・生体レベルでの糖・エネルギー代謝に関わることが知られている。また遺伝子Xの変異は、ADの危険因子である糖尿病や心血管系疾患

の原因となり、また加齢性海馬硬化症への関与も示唆されている。これまでに遺伝子 X のヘテロ欠失により、 $A\beta$  神経毒性モデルショウジョウバエで見られる神経失調や神経変性が増悪化することを見出した。また Tau 神経毒性ショウジョウバエにおいては、遺伝子 X のヘテロ欠失により Tau タンパク質のリン酸化レベルが上昇し、神経変性が増悪化した。これらの原因として、遺伝子 X 欠失により、エネルギー産生能の低下や、酸化ストレスの上昇が関わる可能性を見出している。遺伝子 X は神経細胞やグリア細胞を含む様々な細胞で発現することが知られている。そこで現在、遺伝子 X の発現をグリア細胞、または神経細胞で特異的に抑制し、遺伝子 X による神経保護作用の責任細胞の同定を試みている（論文準備中）。

近年、グリア細胞による脳内デブリクリアランスの低下が AD 発症リスクに関わる可能性が示され、その働きを正常化することが、治療薬の標的として注目されている。本遺伝子ネットワークにはアストロサイト貪食機能に関わる遺伝子群が含まれる。そこでショウジョウバエ軸索変性モデルを用い、グリア細胞が傷害神経軸索を貪食する活性を制御する遺伝子を探した。これまでに 16 遺伝子についてスクリーニングを完了し、グリア細胞特異的な発現抑制により、傷害神経軸索の貪食作用が低下する新規遺伝子を同定した。現在、詳細な解析を進めている。

### 3-2) マウスモデルでの検証実験と病態マーカー探索

同定したアストロサイト・脳血管系細胞遺伝子ネットワークが AD 脳病態の形成にどのように寄与するのかを理解するために、まずその変化を脳組織内で可視化することを試みた。24 ヶ月齢・雄  $APP^{NL-G-F}$  マウスの凍結脳切片を作製し、アストロサイト・脳血管系細胞遺伝子ネットワークの上流で働き、その活性を制御すると考えられる Key Driver 遺伝子産物に対する特異的抗体を用いて免疫染色を行った。図 3 は、 $A\beta$  病理を呈さない野生型マウスと  $App^{NL}$  マウス、ならびに重篤な  $A\beta$  病理を呈する  $App^{NL-G-F}$  マウスの大脳皮質を、反応性アストロサイトマーカーの GFAP と、Key Driver 遺伝子の一つである AQP4 の抗体で染色した

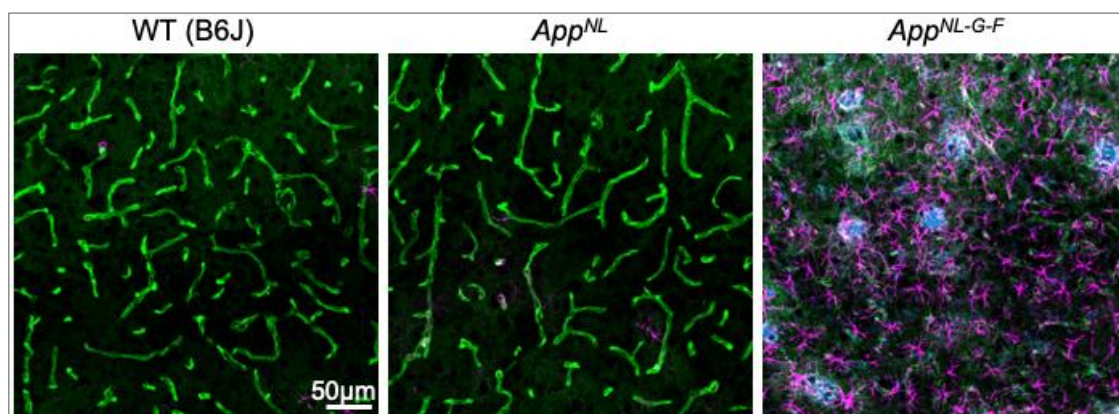
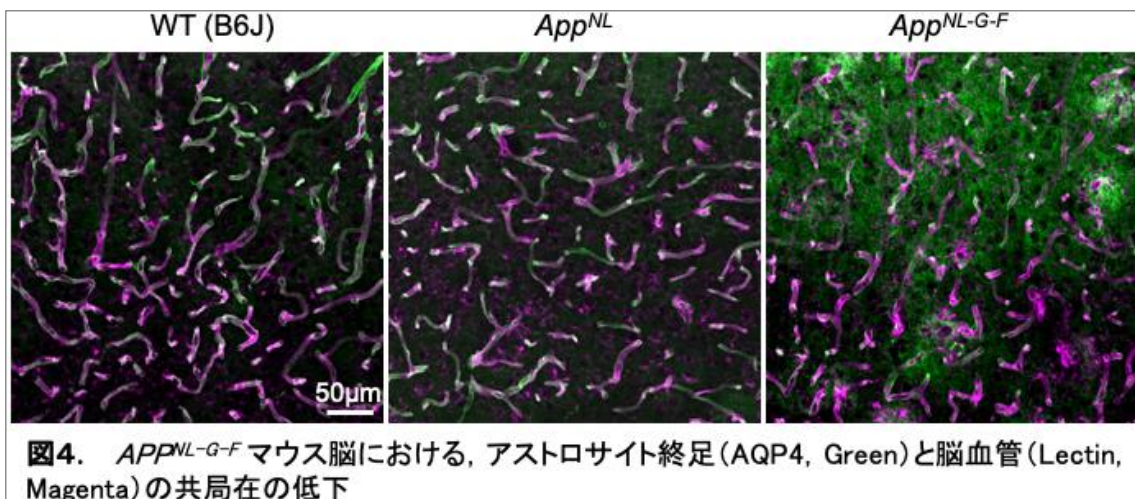


図3.  $APP^{NL-G-F}$  マウス脳における反応性アストロサイト(GFAP, Magenta), アストロサイト終足(AQP4, Green),  $A\beta$ 病理( $A\beta$ , Blue)の分布



画像である。野生型マウス (WT) や  $App^{NL}$  マウスと比較して、 $App^{NL-G-F}$  マウスの大脳皮質では GFAP 陽性の反応性アストロサイトが増加し (Magenta), さらに通常は血管周囲を被覆しているためチューブ状に見えるアストロサイト終足の AQP4 の局在 (Green) が失われ、 $A\beta$  斑 (Blue) 周囲へと AQP4 のシグナルが拡大する様子が観察された。さらに図 4 は、レクチンで標識された脳血管周囲から (Magenta), AQP4 陽性のアストロサイト終足 (Green) が離れ、 $A\beta$  斑を包み込む様子を捉えている。



以上の結果より、 $A\beta$  病理の増悪化による反応性アストロサイトの増加に伴い、本来は脳微小血管の周囲にあるアストロサイト終足が  $A\beta$  斑を覆うようになり、微小血管が暴露される様子が明らかとなった。この病理変化の時期は、 $APP^{NL-G-F}$  マウスで見られる認知機能低下の時期とも重なることから AD 発症初期の機序に関わると考えている。現在、 $App^{NL-G-F}$  マウスにおける脳血管系の構造変化について詳細な解析を進めており、また認知機能低下を予見するための脳病態マーカー開発の可能性について議論を進めている。

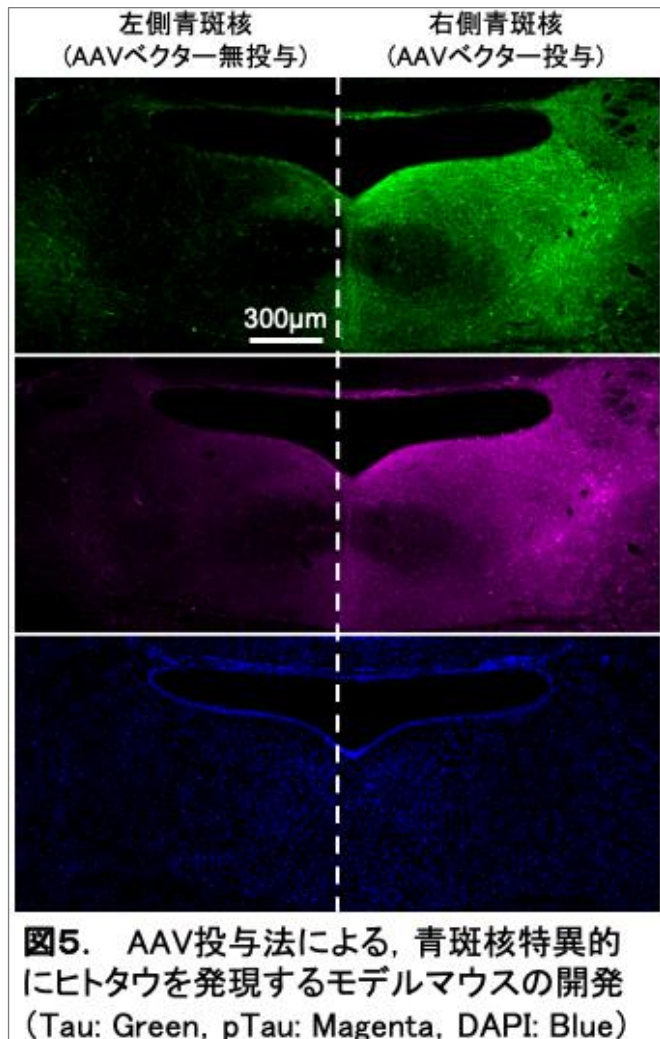
興味深いことに、上記 3-1) のショウジョウバエモデルで検証した遺伝子 X は、Neurovascular Unit を構成するアストロサイトや血管系細胞で高発現することが知られており、その活性の違いは、 $A\beta$  病理が惹起するアストロサイト・脳血管系傷害への脆弱性や頑強性に関わる可能性がある。本年度は、遺伝子 X のノックアウトマウスと  $App^{NL-G-F}$  マウスを交配し、産子について加齢飼育を進め、水迷路を用いた空間認知機能、脳病理、ならびに遺伝子発現変化について詳細な解析を行った (論文準備中)。

### 3-3) 培養グリア細胞検証実験系の確立

遺伝子ネットワーク構成遺伝子のうち、アストロサイトの食食活性を制御する新規遺伝子の機能解析と薬物探索を行う目的で、既知のアストロサイト食食レセプターを発現し、*in vitro* で食食活性測定を行うことができる、ヒトグリア芽腫・アストロサイトーマ、U-251 細胞を導入し、候補遺伝子の発現確認、ならびに遺伝子導入実験の条件検討を行なった。

### 3-4) ADの神経変性過程を再現する新規アルツハイマー病モデルの創出

老化に伴い大脳皮質下の青斑核で形成された Tau 病理が、大脳皮質での A $\beta$  病理の増悪化に伴い海馬や大脳皮質へと拡大し、広範な神経細胞脱落を惹起することで AD 発症に至ると考えられている。この過程は有力な創薬標的と考えられるが、その分子機序は未だ不明であり、その過程を再現するモデル動物も存在しない。そこで本研究では、大脳皮質に重篤な A $\beta$  病理を呈するヒト化 APP/Tau ダブルノックインマウスの青斑核に、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いてヒト Tau 病理を創出する。これまでに、ヒト化 Tau ノックインマウスを、APP ノックインマウス ( $APP^{NL-G-F}$  マウス、および  $APP^{NL-F}$  マウス) と交配し、ダブルノックインマウス系統を作製した。さらに、青斑核においてヒト Tau を高発現するために、ノルアドレナリン作動性神経細胞特異的に発現する PRS $\times$ 8 プロモーター (筑波大学・櫻井武博士より供与) 下にヒト Tau (ON4R 型) の配列を挿入したベクターコンストラクトを作製した (生理学研究所ウイルスベクター開発室・小林憲太博士に調製依頼)。予備検討として、調製した AAV ベクターを野生型マウス (C57BL/6J マウス) の青斑核に投与し、投与から 6 ヶ月後に脳組織を摘出してヒト Tau の発現パターンを観察したところ、青斑核ノルアドレナリン作動性神経細胞の細胞体でヒト Tau の発現が観察された (図 5)。また細胞体、および投射線維において AD 関連 Tau リン酸化エピトープを検出する AT8 のシグナルも確認できた (図 5)。以上より、AAV ベクター投与法を用いて、青斑核で Tau 病理を創出するシステムを確立できたと考えている。今後、ヒト化 APP/Tau ダブルノックインマウスの青斑核にヒト Tau 発現 AAV ベクターの投与を進め、A $\beta$  病理の増悪化に伴う Tau 病理の拡大という AD 発症初期の中核病理を再現する新規モデルマウスを創出する。また並行して、ショウジョウバエのノルアドレナリン神経に相当するオクトパミン神経細胞にヒト Tau を発現する、新規 Tau モデルショウジョウバエの作成と解析を進めた。



なお、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」に従い、マウスを用いた実験は「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に従って遂行した。

#### D. 考察と結論

AD 発症機序の中でも A $\beta$  蓄積から神経細胞死に至る過程は未だ不明な点が多い。本研究により、AD 発症機序を遺伝子ネットワークの変化として包括的に捉えることが可能となり、全く新たな角度から AD 病態解明に迫ることができると考えている。また本研究で同定する遺伝子ネットワークには、AD 発症への感受性に関わる遺伝子群が含まれると予想されるため、AD の新たな治療薬標的や病態バイオマーカーを同定できる可能性が高い。

研究目的 1, 2 では、AD 患者由来の臨床・病理・ゲノム・遺伝子発現データを統合した遺伝子共発現ネットワークと、A $\beta$  病理を呈する AD モデルマウスから得たトランスクリプトームデータを融合させ、A $\beta$  病理の増悪化に伴い変化する遺伝子ネットワークを網羅的に同定した。さらに研究目的 3 では、アストロサイト・脳血管系細胞遺伝子ネットワークに着目し、AD モデルショウジョウバエと AD モデルマウスを用いて解析を進めた。これまでに、大脳皮質での A $\beta$  病理の増悪化が反応性アストロサイトを慢性的に活性化し、アストロサイト終足が脳血管周囲から退縮する等の Neurovascular Unit に顕著な病変を引き起こすこと、この病変と空間認知機能低下の時期が一致することを見出した。今後、その詳細な分子メカニズムについて遺伝子ネットワークを構成する遺伝子群の情報をもとに解析し、さらにヒト剖検脳を用いた検証を進めることで、AD の新たな脳病態マーカーや治療薬の標的の同定に繋げる。また AD 発症機序の初期においては、青斑核ノルアドレナリン神経細胞に Tau 病理が出現し、A $\beta$  病理の増悪化に伴う脳全域への Tau 病理進展の起点となる可能性が示唆されている。しかしその機序は明らかではなく、研究に資するモデル動物も確立されていない。本研究では、これら AD 発症機序初期に見られる中核病理（脳皮質での A $\beta$  病理と青斑核での Tau 病理）を呈する新規モデルマウス・ショウジョウバエの開発を進め、その機序解明を進める予定である。

本研究により、AD 発症リスクを予見する早期診断法から、抗 A $\beta$  医薬の治療効果を機能的に評価できる病態マーカー、さらに神経変性の進行を抑止する治療薬の標的を同定できれば、国民の保険・医療・福祉の向上等、大きな社会的成果が挙げられると期待できる。

#### E. 健康危険情報

「なし」

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

論文発表（主任研究者，および分担研究者・関谷）

1) Wang, M.\* , Li, A.\* , Sekiya, M.\*, (35 著者略) , Iijima, KM.#, Schadt, E.#, Brenndand, KJ.# and Zhang, B.# (2020) Transformative Network Modeling of Multi-Omics Data Reveals Detailed Circuits, Key Regulators, and Potential Therapeutics for Alzheimer's Disease. *Neuron*, doi.10.1016/j.neuron.2020.11.002.,

**\*First author, #Senior author.**

2) Oka, M., Suzuki, E., Asada, A., Saito, T., Iijima, KM., Ando, K. (2020) Increasing neuronal glucose uptake attenuates brain aging and promotes lifespan in *Drosophila*. *iScience*, *in press*

3) Oba, T., Saito, T., Asada, A., Shimizu, S., Iijima, KM., Ando, K. (2020) Microtubule Affinity Regulating Kinase 4 with an Alzheimer disease-related mutation promotes tau accumulation and exacerbates neurodegeneration. *J Biol Chem*. 2020 Oct 5:jbc.RA120.014420. doi: 10.1074/jbc.RA120.014420.

4) Kikuchi, M\*.#, Sekiya, M\*, Hara, N\*, Miyashita, A, Kuwano, R, Ikeuchi, T, Iijima, KM# & Nakaya, A, (2020) Disruption of a *RAC1*-centred network is associated with Alzheimer's disease pathology and causes age-dependent neurodegeneration. *Hum Mol Genet.*, 2020, 29(5): 817-833. **\*First author, #Corresponding author**

5) Saito, T, Oba, T, Shimizu, S, Asada, A, Iijima, KM & Ando, K, (2020) Cdk5 increases MARK4 activity and augments pathological tau accumulation and toxicity through tau phosphorylation at Ser262. *Hum Mol Genet.*, 2019, 28(18):3062-3071.

6) 飯島浩一, アルツハイマー病の治療法確立に向けた基礎研究の展望. (総説)

日本医事新報 No. 4958 2019.5.4 特集18 医療の近未来予想図 page 24

### 2. 学会発表

1) Sulfonylurea receptor/Sur deficiency increased vulnerability to neurodegeneration in *Drosophila* models of Alzheimer's disease, Michiko Sekiya, Xiuming Quan, Yasufumi Sakakibara, Sachie Chikamatsu, Koichi M Iijima, ADPD 2021, 2021年3月9~14日, WEB開催

2) Loss of locus coeruleus-noradrenergic afferents in the *App* knock-in mouse model of A $\beta$  amyloidosis, Koichi M Iijima, Yasufumi Sakakibara, Kyoko Ibaraki, Yu Hirota, Kimi Takei, Takashi Saito, Takaomi C Saido, Michiko Sekiya, ADPD 2021, 2021年3月9~14日, WEB開催

3) ネットワーク解析から解き明かすA $\beta$ 病態（シンポジウム9, A $\beta$  仮説再考: A $\beta$  はAD治療のメインターゲットとなり得るか), 飯島浩一, Wang Minghui, 榊原泰史, Zhang Bin,

- 関谷倫子, 第 39 回日本認知症学会学術集会, 2020 年 11 月 26~28 日, 名古屋 & WEB 開催
- 4) アルツハイマー病における ATP 感受性 K<sup>+</sup>チャンネル機能の役割, 関谷倫子, 権 秀明, 榊原泰史, 近松幸枝, 飯島浩一, 第 39 回日本認知症学会学術集会, 2020 年 11 月 26~28 日, Zoom 開催
- 5) *App* ノックインマウスにおける青斑核神経投射と neurovascular coupling の変化の解析, 榊原泰史, 茨木京子, 竹井喜美, 斉藤 貴志, 西道 隆臣, 関谷倫子, 飯島浩一, 第 39 回日本認知症学会学術集会, 2020 年 11 月 26~28 日, Zoom 開催
- 6) 遺伝子ネットワーク解析を用いたアルツハイマー病の発症機序解明と創薬標的の探索 (シンポジウム: データ駆動型科学で切り開く認知症研究), 関谷倫子, Wang Minghui, 榊原泰史, 近松幸枝, Zhang Bin, 飯島浩一, 第 93 回日本生化学会大会, 2020 年 9 月 15 日, Zoom 開催
- 7) ショウジョウバエへの食餌制限がグリア細胞による変性軸索除去に及ぼす影響, 山城梨沙, 関谷倫子, 飯島浩一, 第 93 回日本生化学会大会, 2020 年 9 月 14-16 日, WEB 開催
- 8) *App* ノックインマウスでは青斑核で神経細胞脱落, またタウ病理は起こらないが, ノルアドレナリン投射線維が減少する, 榊原泰史, 茨木京子, 竹井喜美, 斉藤貴志, 西道隆臣, 関谷倫子, 飯島浩一, 第 43 回日本神経科学大会, 2020 年 7 月 29 日, WEB 開催
- 9) Deficiency in a fly ortholog of HS-Aging related gene, sulfonyleurea receptor/*Sur*, increased vulnerability to neurodegeneration in *Drosophila* models of Alzheimer's disease, Michiko Sekiya, Xiuming Quan, Yasufumi Sakakibara, Sachie Chikamatsu, Koichi M. Iijima, AAIC 2020, 2020 年 7 月 27 日 (ポスター), WEB 開催
- 10) Reduced density of noradrenergic fibers without prominent neuron loss or tau pathology in the locus coeruleus in *App* knock-in mouse models of A $\beta$  amyloidosis, Koichi M. Iijima, Yasufumi Sakakibara, Kyoko Ibaraki, Kimi Takei, Takashi Saito, Takaomi C. Saido, Michiko Sekiya, AAIC 2020, 2020 年 7 月 27 日 (ポスター), WEB 開催
- 11) ショウジョウバエへの食餌制限がグリア細胞による変性軸索除去に及ぼす影響, 山城梨沙, 関谷倫子, 飯島浩一, 第 84 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム, 2020 年 5 月 23 日, WEB 開催

## 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