

脳アミロイドーシス関連候補遺伝子 *X* の機能解析 (20-28)

主任研究者 下田 修義 国立長寿医療研究センター 再生再建医学研究部 (室長)

研究要旨

脳内老人斑はアルツハイマー型認知症 (以下、AD) の原因とされ、AD を特徴付ける病理像であるが、その蓄積に関わる遺伝子は、脳画像診断情報を有するゲノムサンプルの不足から、ほとんど明らかになっていない。本プロジェクトでは、少ないサンプル数ながらも、PiB-PET 陽性アルツハイマー型認知症 (以下、AD) と PiB-PET 陰性の健常者とのゲノムを比較することで見出された、老人斑蓄積に関連する遺伝子 *X* について、その機能阻害を培養細胞で行い、*X* の発現量低下が A $\beta$  40, 42 の細胞外への分泌を 2 割程度促進させることを見出した。また *X* のイントロン内にある構造多型を初めて明らかにし、老人斑蓄積と特定のハプロタイプの連鎖を見出した。最後に、将来的な *X* のマウスでの機能解析を想定し、ゲノム編集技術を利用した簡便な時期および組織特異的ノックアウトマウスの作製を試みた。

主任研究者

下田 修義 国立長寿医療研究センター 再生再建医学研究部 (室長)

A. 研究目的

現在、アルツハイマー型認知症を説明するうえで支配的なアミロイド  $\beta$  仮説によれば、A $\beta$  を主体とする老人斑が神経細胞の周辺に溜まり、それが神経細胞内にタウタンパク質の過剰リン酸化による神経原繊維をもたらし、最終的に細胞死へと繋がるとされる。この仮説の礎になったのが、家族性早期認知症患者から見出された変異遺伝子である。しかし家族性アルツハイマー型認知症はアルツハイマー型認知症のごくわずかを占めるに過ぎない。ほぼすべてのアルツハイマー型認知症は晩発型で、それら原因遺伝子に変異は見られず、また家族歴に乏しいなど、明瞭な違いが存在する。ただし晩発型のアルツハイマー型認知症でも脳アミロイドーシスは発症と明らかに関連が見られるため、レアケースである家族性早期認知症の原因遺伝子から組み立てられたアミロイド  $\beta$  仮説が晩発性アルツハイマー病の発症を説明する上でも有効であるとされてきた。そのため、最初の段階である細胞外

で蓄積された A $\beta$  を除去するための、A $\beta$  に対する抗体治療薬の開発が続けられてきた。そして少なくともいくつかのモノクローナル抗体は脳内アミロイドーシス除去の効果が認められており、認知症に対する有効性が期待されている。ただしこれらはあくまで対症療法であり、異常集積を未然に防ぐという予防医療に結びつく、A $\beta$  の細胞外への分泌に関わる分子については、これまでのところ家族性認知症の原因遺伝子に限られている。

私は共同研究者達とともに、PiB-PET 陽性、すなわち老人斑の高蓄積と関連 ( $p < 0.05$ ) する遺伝的多型を機能未知の X 遺伝子内に見出した。私が見出したヒトの X 多型は、センターの臨床診断 AD とは関連せず、また欧米のゲノムワイド関連解析でも AD との関連が報告されていないことから AD 発症には関与しないと考えられた。一般に老人斑は神経細胞死をもたらすそれが AD 発症に繋がるとされるが、X 多型によりもたらされる老人斑が AD と関連しないのであれば、X 多型は、AD 病因とはなりにくい老人斑のサブタイプの形成との関連が疑われる。本研究課題では、マウスを用いて細胞及び個体レベルでこの X の機能阻害がそれぞれ、A $\beta$  の細胞外への分泌及び A $\beta$  の脳内の蓄積や形態、さらに行動に与える影響を解析することを目指した。また、そのためにゲノム編集技術を利用したマウス個体で、時期及び組織特異的な遺伝子破壊（コンディショナルノックアウト; cKO）を迅速かつ安価に行える手法の開発も目指した。

## B. 研究方法

### 1) X 遺伝子の細胞レベルでの機能解析

X 遺伝子に対する siRNA を 2 種類デザイン・合成し、それらをマウスの神経培養細胞 Neuro2a にリバーストランスフェクション法により導入した。導入二日後の培養細胞から RNA を抽出し、逆転写酵素処理した後、リアルタイム PCR により X の転写産物量をコントロールと比較した。siRNA のよるノックダウンの A $\beta$  分泌量に対する効果は、培養上清を回収し、A $\beta$  40, 42 に対する ELISA により行った。

### 2) X 遺伝子座の構造解析

老人斑蓄積と関連する X 多型はイントロン内に見つかった一つの一塩基多型(SNP)であった。ヒトのレファレンスゲノムを調べるとこの SNP 周辺には複数の縦列型反復配列(variable number of tandem repeats; VNTR)に囲まれていることが判明した。そこでロングレンジの PCR を使用することで、それらの VNTR を個別に増幅し、サンガーシーケンス法によりその構造（配列並びにリピート数）を決定した。

### 3) X を個体レベルで解析するための新規 cKO 法の開発

従来の cKO マウスは作製に相当な労力、時間、そしてコストを必要とする。そこで、マウスにおける X 産物の神経細胞における機能を知るために、ゲノム編集技術を利用し

た新規 cKO 法の開発を並行して進めた。これは以下の (1) ~ (3) の三つのトランスジーンを同時に有するマウスを構築により実現するというアイデアであった。すわわち、(1) U6 プロモーターからユビキタスにガイド RNA を発現するトランスジーン、(2) Cre 依存的に Cas9 を発現するトランスジーン(flox 型 Cas9)、(3) Syn1 プロモーターから神経組織特異的に Cre-ERT2 を発現するトランスジーン(この Cre はタモキシフェン依存的に核内に移行することが期待された)。具体的にはこれらトランスジーンを個々に持つトランスジェニック(Tg)マウスを作製(1)、あるいは外部より導入(2, 3)し交配を重ねることでトリプル Tg マウスを作製した。U6- XgRNA DNA は Tg 作製用のトランスポゾンベクター-piggy Bac を利用してマウスゲノムに顕微注入により導入した(実験動物管理室の協力による)。産仔(F1)のテールチップから RNA と DNA を抽出し、まず PCR により U6- XgRNA Tg 個体を同定し、同定した U6- XgRNA Tg 個体の RNA を逆転写することにより、X を発現する個体を選んだ。

(倫理面への配慮)

本研究にはヒト遺伝子解析研究が含まれる。したがって本研究は国立長寿医療研究センターの倫理・利益相反委員会での承認を得たうえで実施した。組み換え DNA 実験については同機関の遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を受けた上で実施した。

## C. 研究結果

### 1) CFAP74 の機能阻害と A $\beta$ 代謝

マウス培養細胞 Neuro2a において、X を標的とした siRNA によるノックダウンを試みた。デザインした二種類の siRNA はともに X の転写産物の存在量をコントロールの 2 ~ 3 割まで低下させることが明らかになった。そこでこれらの siRNA を Neuro2a にトランスフェクトしたのち、ELISA により細胞外 A $\beta$  分泌量、ウエスタンブロット法により細胞内 APP 量、細胞内 A $\beta$  量、およびリソソームの変化を解析した。その結果、細胞内 APP 量、細胞内 A $\beta$  量やリソソームには変化が見られなかったが、細胞外 A $\beta$  分泌量が 2 割ほど増加することが明らかになった。これにより X の活性低下が A $\beta$  代謝の分泌の過程を促進することが判明した。

一方、ヒトの遺伝的多型と遺伝子発現の関連情報を入手できる公共データベース GTeX を調べたところ、アミロイドーシスと関連する X 多型を持つヒトでは X 転写量が低くなることが示された。この結果は、マウス X のノックダウンが細胞外 A $\beta$  分泌量を増加させる結果と合わせて、X の転写量の低下が A $\beta$  分泌量を増加させ、最終的にアミロイドーシスの促進に繋がり得ることを示唆した。

### 2) X 遺伝子の構造解析

今回私が見出した、老人斑蓄積と関連する*X*多型はイントロン内に見つかった一つの一塩基多型(SNP)であった。この場合、*X*の発現について二つの可能性が考えられた。当該SNP単独で発現に影響する可能性と、その周辺にはさらなるSNPや構造多型が存在し、それがセットとして発現に影響する、という可能性である。そこで当該SNP周辺の塩基配列を解析したところ、そのSNPを挟む形で複雑な構造多型が存在していることがわかった。その構造多型のタイプはいわゆるVNTR(variable number of tandem repeat)と呼ばれるもので、数十bpの配列が一つの単位としてそれが縦列に繰り返される構造をしていた。*X*第イントロン内には3つのVNTRが存在し、それぞれ特定の繰り返し数を持つ3つのVNTRが当該SNPとハプロタイプを形成していた。またそのハプロタイプは大きく3つに分類できることが明らかになった。

### 3) 新規コンディショナルノックアウトマウスの作製法の開発

*X*のマウス個体における機能解析を進めるため、新規コンディショナルノックアウトマウス(cKO)の作製法の開発を開始した。これは個体内で時期・組織特異的にゲノム編集技術であるCRSPR/Cas9系を働かせることで、*de novo*の変異を標的とする遺伝子に導入するというアイデアに基づく。まず*X*遺伝子に効率よく変異を導入できるガイドRNAの配列を培養細胞Neuro2aに導入することにより決定した。3種類のガイドRNAをデザインし、これをDNAベクターにクローニングした後、Neuro2aにトランスフェクトした。72時間後にDNAを回収し、標的領域における変異導入効率を算出したところ、そのうちの 하나가高効率に変異を導入することが明らかになった。そこでそのガイドRNAを*in vivo*で使用するガイドRNAの配列とした。このガイドRNAをCAGプロモーター直下にクローニングしたプラスミド(CAG-gRNA)を構築後、トランスポゾンベクターを利用して独立した複数のTg(1)を作製した。続いてそのTgマウスの中から、ガイドRNAを体細胞(テールチップ)で高発現するマウスを選抜した。このマウスに、Cre依存的にCas9を発現するCAG-LSL-Cas9 Tg(2)マウスと中枢神経系特異的なCre活性をタモキシフェンで誘導できるSyn1-CreERT2 Tg(3)マウスを順番にと交配し、Tg(1)(2)(3)をそれぞれヘテロでもつトリプルTgの作製をした。このトリプルTg5匹に対し、1個体あたり2mgのタモキシフェンを五日間連続で腹腔内投与した。またコントロールとして同トリプルTgマウス3匹にタモキシフェンの溶媒であるコーンオイルを同じく腹腔内投与した。6日後に脳と肝臓のサンプリングを行った。

CAG-LSL-Cas9 TgマウスではGFPタンパク質がCas9と共発現するように両者が同一の転写産物として発現するようにTgコンストラクトが設計されている。したがってトリプルTgマウスでタモキシフェンが期待通りに働けば神経細胞でGFPが発現し、そのことが同時にCas9による*CFAP74*の破壊を示唆するはずであった。しかしサンプリングした脳と肝臓では実態顕微鏡下でGFPが観察されなかった。そこ

で次に CreによるLSLの欠損を調べるため、それぞれの組織（脳は嗅球）からDNAを抽出し、LSLの外側に設計したプライマーでPCRを行ったが、LSLのループアウトは検出できなかった。

#### D. 考察と結論

今回の研究でXの機能阻害によりA $\beta$ の細胞外への分泌量が上昇したことにより、Xの多型と脳アミロイドシスの関連を示した遺伝学的データが実験的に支持された。このことからXタンパク質が脳アミロイドシスの形成機序解明に役立つ貴重な因子になると期待される。具体的には、X遺伝子の構造多型はその転写量を低下させると予想されるが、Xタンパク質量の低下は具体的にどのような機能に影響を与えるのか、たとえばそれはA $\beta$ 分泌の細胞外への過程なのか、あるいはAPPの代謝（ $\beta$ あるいは $\gamma$ 部位での切断活性やエンドサイトーシスを介したリサイクリングなど）なのか、などA $\beta$ 分泌におけるXの役割が初めて明らかになると期待される。

本研究ではまた、Xの*in vivo*での解析を進めるために、ゲノム編集技術を応用したコンディショナルノックアウト(cKO)マウス作製法の開発も目指した。この方法は、従来の手間暇と予算のかかるcKO作製法とは異なり、きわめて安価かつ迅速なcKOを実現しようという試みであり、成功すれば本研究のみならずセンター内の他のプロジェクトにおいても有益なリソースとして使用されると期待された。そして第一のステップである、gRNA発現ベクターの個体への高効率の導入およびgRNAの発現については期待通りの結果を得ることができた。また第二のステップである3種類のTgラインを樹立することもできた。しかし最終段階のタモキシフェンによる標的遺伝子の破壊は、タモキシフェンによるloxPのループアウトが誘導されず、達成することができなかった。この原因として以下の3つの可能性が考えられた。第一に、Syn1プロモーターからのCreERT2発現レベルが十分ではなかったのではということ。第二に、タモキシフェンによるCreERT2の核内移行への効率が低いのではないかということ。第三に核に移行したCreERT2によるloxPの切り出し効率が低いのではないかということ。ここで第二と第三については自ら改善することは本プロジェクトの範疇外であるので、今後は脳でのCreERT2の発現量を確認し、もし発現量が想定よりも低ければ、よりプロモーター活性の高い神経発言系のラインを使用することで今回の問題を克服できるのではないかと考えている。

#### E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lower DNA methylation levels in CpG island shores of *CRI*, *CLU*, and *PICALM* genes in the blood of Japanese Alzheimer's disease patients. Risa Mitsumori, Kazuya Sakaguchi, Daichi Shigemizu, Taiki Mori, Shintaro Akiyama, Kouichi Ozaki, Shumpei Niida, and Nobuyoshi Shimoda. Sep 29;15(9):e0239196. *PLoS ONE*

2. 学会発表

- 1) Shirai M, Nara T, Takahashi H, Yuan C, Takayama K, Hirose Y, Awazu A, Fujii M, Shimoda N, Kikuchi Y (再生再建医学研究部) Transcription termination is associated with DNA methylation level by Dnmt3a in transcriptional termination site. 第43回日本分子生物学会、2020年12月3日、オンライン

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