

長寿医療研究開発費 2021年度 総括研究報告

アルツハイマー病発症初期の病態メカニズム解明と早期介入法確立に向けた治療標的探索 (21-13)

主任研究者 飯島 浩一 国立長寿医療研究センター 神経遺伝学研究部（部長）

研究要旨

アルツハイマー病（AD）は老年性認知症の最大の原因であり、予防・治療法の確立は社会的要請が極めて高い課題である。ADは、脳内にアミロイド β ペプチド（A β ）が蓄積し、数十年をかけて神経細胞が脱落して発症に至ると考えられているが、A β の蓄積が神経細胞死を惹起するメカニズムは未だに明らかではなく、有効な予防・治療法も存在しない。本研究では、AD発症の前・初期に、A β の蓄積がシナプス脱落、神経炎症、脳血管障害、タウ病理拡大、神経変性を引き起こす分子機序の解明に取り組み、AD初期の脳病態を反映する新規バイオマーカー、ならびに早期診断後に介入するための治療薬標的の探索を行う。

これまでに、AD患者の臨床・病理・ゲノム・脳由来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に、ADの初期病態を模すA β 病理モデルマウス（APPノックインマウス：APPNLGF-KIマウス）の脳から取得した遺伝子発現データを重ね合わせ、その集積度を指標に、A β 病理の増悪化を反映する遺伝子ネットワークを網羅的に同定した。本研究ではアストロサイト・神経血管ユニット遺伝子ネットワークに着目し、モデル動物を用いた検証から、AD初期の病態メカニズムの解明、ならびに脳病態マーカーと治療薬標的の探索を行った。また、AD発症の前・初期に見られる臨床症状の背景にある神経変性を抑止する方法を開発するために、抑制性介在神経、ならびに青斑核ノルアドレナリン神経に着目し、神経変性の機序解明から抑止法の探索を行った。さらに、ADの初期病態を標的としたトランスレーショナル研究への利用や、A β やタウ病理の形成に関わる因子を効率的に探索するための新規モデル動物の確立を進めた。本研究によりAD発症機序を遺伝子レベルで包括的に捉えることが可能となり、新たな角度から病態解明と病態マーカーや治療薬標的の同定が可能になると考えられる。

主任研究者

飯島 浩一 国立長寿医療研究センター 神経遺伝学研究部（部長）

分担研究者

関谷 倫子 国立長寿医療研究センター 神経遺伝学研究部（副部長）

A. 研究目的

老年性認知症の最大の原因であるアルツハイマー病（AD）患者数は増加の一途を辿り、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”は予防・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。このような現状の下、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”等の治療効果を判定するための脳病態マーカーや、早期診断後の治療薬開発を目標に、Aβの蓄積がシナプス変性、神経炎症、脳血管系障害、タウ病理拡大、神経変性を引き起こす分子機序の解明に取り組んでいる。本研究の目的は、AD発症機序の理解、危険因子の発見、さらに病態バイオマーカーと治療薬標的の探索であり、社会的要請が高く迅速な研究開発を継続的に行う必要がある。

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、ADの病態初期を再現するAβ病理モデルマウス（理研APP-KIマウス）脳由来の遺伝子発現データを融合させ、“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る点に特色・独創性がある。さらに、遺伝子ネットワークの変化がAD病態に及ぼす影響を、モデル動物を用いて検証することで、従来のAβやタウに着目した研究とは異なる角度から、AD発症メカニズムの全体像を解明できると考えている。また本研究では、ADの発症前・初期病態を模す、新規モデルマウス、モデルショウジョウバエの開発を並行して行い、それらを用いた脳病態マーカーや創薬標的の探索から、治療法の開発に向けたトランスレーショナル研究を展開する。

B. 研究方法

本研究では、アストロサイト・神経血管ユニット遺伝子ネットワークに着目し、モデル動物を用いた検証を行い、AD初期の病態メカニズム解明、ならびに脳病態マーカーと治療薬標的の探索を行う（研究計画1）。また、AD初期に見られる臨床症状への治療法を開発するために、AD発症の初期に傷害される抑制性介在神経（研究計画2）、ならびに青斑核ノルアドレナリン神経（研究計画3）に着目し、神経変性の機序解明から抑止法の探索を行う。さらに、Aβやタウ病理形成に関わる因子の探索や、トランスレーショナル研究に利用するために、AD初期病態模す新規モデル動物を作製する（研究計画4）。

研究計画 1：AD 初期の病態形成にアストロサイト・脳血管系細胞の変化が果たす役割の解明と新たな病態マーカー・治療薬標的の探索（飯島，関谷）

A β 病理マウスを用い，AD 初期の病態形成にアストロサイト・脳血管系機能の変化が果たす役割を調べ，新たな病態マーカー・治療薬標的の探索を行う。

1-1) A β 病理マウス脳のアストロサイト・脳血管系病変の解析（飯島/関谷/廣田）

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のハブ（Causal regulator）遺伝子群に着目し，免疫染色によりそれら遺伝子産物の局在を A β 病理マウス脳内で可視化する。24 ヶ月齢まで加齢飼育した，野生型，APP^{NL}-KI マウス（APP ノックインコントロールマウス），APP^{NL}GF-KI マウス（A β 病理マウス）の脳の凍結切片を作製し，免疫染色後，皮質，海馬での遺伝子産物の発現，局在を観察し，A β 病理の有無による遺伝子産物の変化を解析する。顕著な変化が見られた遺伝子は，病態マーカーや治療薬の標的候補と考えられる。

1-2) 治療薬標的としてのスルホニル尿素受容体の検討（飯島/関谷/榊原）

上記遺伝子ネットワークの構成遺伝子の中から，治療薬標的の候補遺伝子として遺伝子 A に着目し解析を行う。遺伝子 A は，海馬の萎縮と TAR-DNA binding protein 43（TARDBP/TDP-43）の蓄積を特徴的な脳病理とする加齢性海馬硬化症のリスク因子であることが報告されているため，まず，遺伝子 A のヘテロ欠損マウスの加齢による脳病変（免疫染色），認知機能低下（モリス水迷路試験），遺伝子発現変化（RNA シーケンス解析）に及ぼす影響を解析する。さらに，創薬候補遺伝子をアストロサイトや脳血管系細胞で特異的に発現誘導するための実験系の確立，ショウジョウバエモデルを用いた相同遺伝子遺伝子 B の機能解析を行う。

1-3) 周皮細胞の活性化を可視化する新規 PET プローブの開発（飯島/榊原/木村）

A β 病理マウス脳において，アストロサイト終足が脳血管から解離し，それに伴い脳血管上で周皮細胞が顕著に肥大化する様子を見出したことから，周皮細胞は新たな病態マーカーや治療薬標的となる可能性がある。そこで，AD 患者脳検体を用いた検討とともに，木村泰之副部長と協力して，肥大化した周皮細胞表面に特異的に発現することを見出した標的候補タンパク質に結合する新規 PET プローブの開発を進める。

研究計画 2：AD 初期の抑制性介在神経変性の機序解明（関谷，飯島）

遺伝子ネットワーク解析から，病態を制御し創薬標的の候補となるネットワークとして，抑制性介在神経の遺伝子ネットワークを同定した（Neuron, 2020）。そこで，A β 病理マウス脳で脱落する抑制性介在神経のサブタイプ，変性機序の解明，さらに抑制性介在神経の生存に関わる転写因子遺伝子 C の欠損マウスを用いて，抑制性介在神経の減少が，A

β 病理マウスの脳病変形成および認知機能の低下に及ぼす影響を調べる。

研究計画 3：青斑核神経軸索変性の機序解明と保護法の探索（飯島，関谷）

AD 発症過程の初期に認められる青斑核ノルアドレナリン神経でのタウ病理形成と変性脱落が，大脳皮質へのタウ病理と神経細胞脱落への起点となっている可能性がある。これまでに， $A\beta$ 病理マウスの大脳皮質において青斑核神経の投射軸索が脱落すること，さらに青斑核神経の維持に関わるソマトスタチンが低下していることを見出している。計画 3 では青斑核神経の RNA シーケンス解析により，変性機序の解明を行うとともに，ソマトスタチンならびに神経栄養因子の関与も調べ，軸索変性の抑止法を探索する。

本年度は，まず青斑核神経の RNA シーケンスを行う。そのために，ノルアドレナリン神経特異的にタグ付リボソームタンパク質（RiboTag）を発現するアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを作成する。作製した AAV は，マウス脳内，青斑核の部位に投与し，一定期間飼育後，青斑核を摘出，タグ抗体にて免疫沈降後 RNA を精製，RNA シーケンスを実施する。野生型マウスと $A\beta$ 病理マウスを用いて RNA シーケンス解析を行うことにより， $A\beta$ 病理存在下の青斑核神経特異的な発現変動遺伝子を得る。

研究計画 4：AD 初期の中核病理を模す新規モデル動物開発（関谷，飯島）

AD の中核病変である $A\beta$ やタウ病理形成を抑止する予防法確立に向け，遺伝学的・薬理学的手法を用いて病理形成の修飾因子を効率的に探索するために，以下 3 つの新規 AD モデル動物を確立する。

4-1) 青斑核ノルアドレナリン神経タウ病理モデルマウスの開発（飯島/榊原/廣田/関谷）

APPNLGF-KI マウスは大脳皮質に $A\beta$ 病理を呈するが，AD の初期に見られる皮質下青斑核のタウ病理を呈さない。そこで，ヒトタウ（0N4R 型）をマウス青斑核に特異的に発現できる AAV ベクターを作製し，マウス青斑核に投与する。タウの投与を行うマウスは，ヒトのタウ病理をより忠実に創出するために，APPNLGF-KI マウスの内在性タウをヒト化した，ダブルノックインマウス（APPNLGF-KI，hTau-KI マウス）を用いる。まず，ダブルノックインマウスの作製を行い，その後，hTau-KI マウス，ならびに APPNLGF-KI，hTau-KI マウスの青斑核に，ヒトタウ発現 AAV ベクターを投与する。投与から 3 ヶ月ごとに脳組織を摘出し，青斑核でのタウ病理が， $A\beta$ 病理の存在下で大脳皮質や海馬へと伝播するかを検討する。

4-2) オクトパミン神経タウ病理モデルショウジョウバエの開発（関谷/近松/飯島）

タウ蓄積に関わる因子を効率的に探索するために，タウ病理モデルショウジョウバエの作製を行う。ショウジョウバエには，ノルアドレナリン神経に相当する神経としてオクトパミン神経が存在する。そこで，ショウジョウバエオクトパミン神経特異的にヒトタウを

発現し、表現型解析と加齢依存的な変化を解析した。

4-3) 新規 A β 病理モデルシヨウジョウバエの開発 (関谷/近松/飯島)

これまでに、脳神経細胞でヒト A β を産生・分泌する新規モデルシヨウジョウバエを作製している。この系を用いる利点は、A β 斑形成前の単量体 A β の産生、分解、排出に関わる遺伝子群を効率的に同定できることにある。RNAi 法を用いて神経細胞特異的あるいはグリア細胞特異的に任意の遺伝子発現を抑制し、脳内の A β 量を変化させる遺伝子を同定する。同定した遺伝子については、培養細胞を用いた哺乳類相同遺伝子の解析を行う。

(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」に従って実施した。

C. 研究結果

研究計画 1: AD 初期の病態形成にアストロサイト・神経血管ユニットの変化が果たす役割の解明と新たな病態マーカー・治療薬標的の探索

1-1) A β 病理マウス脳のアストロサイト・神経血管ユニット病変の解析 (飯島/関谷/廣田)

A β 病理マウスと AD 患者脳との遺伝子ネットワーク解析から同定したアストロサイト・神経血管ユニット遺伝子ネットワークには、Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) などの反応性アストロサイトマーカー、アストロサイトの食食機能に関わる遺伝子、水チャネル Aquaporin 4 (AQP4) など血管周囲のアストロサイト終足で発現する遺伝子、細胞傷害の軽減や血流量の調節に関わるカリウムチャネル、さらに抑制性神経細胞の生存や神経軸索の保護に関わる因子などが含まれている。このネットワークを構成する遺伝子群の中から、病態マーカーや創薬標的の候補として、Key Driver 遺伝子 (遺伝子ネットワークの発現制御の階層で最上位に位置し、多くの遺伝子発現に影響を与えると推定される遺伝子) 群を選定した。次に、それらの遺伝子産物が A β 病理モデルマウス脳内で、どのような局在様式を取るのかを調べた。老齢 (24 ヶ月齢) の野生型マウスと A β 病理 (APPNLGF-KI) マウスの凍結脳切片を作製し、これまでに 14 の Key Driver 遺伝子産物に対する特異的抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、Key Driver 遺伝子産物の多くが野生型マウス脳のアストロサイトで発現し、そのうちのいくつかは A β 病理を呈する APPNLGF-KI マウス脳内で、大きく局在変化していることを見出した。この遺伝子産物の局在変化は、大きく以下の 4 つのグループに分けられた。1) 反応性アストロサイト全般で発現する (図 1A, GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein, 他), 2) A β 斑周囲の反応性アストロサイトに特異的に発現す

る (図 1A, 遺伝子 *D*, 他), 3) 血管周囲のアストロサイト終足から $A\beta$ 斑周囲へと局在が変化する (図 1B AQP4: Aquaporin 4 図 1C 遺伝子 *E*, 他), 4) 野生型, APPNLGF-KI マウスのアストロサイトに発現し, $A\beta$ 病理下で局在が変化しない (遺伝子 *F*, 他)。

水チャネルの AQP4 は, 神経血管ユニットや血管周囲排出路 (Glymphatic システム) の周囲を覆うアストロサイト終足に分布するが, AD 患者の脳において $A\beta$ 斑の周囲へ集積し, $A\beta$ やタウの排出に関わることが示唆されている。本研究で新たに見出した遺伝子 *E* は, AQP4 同様に野生型マウスのアストロサイト終足に分布する

るが, $A\beta$ 病理下では $A\beta$ 斑の中心部分へと局在変化が認められた。また, $Na^+/K^+-ATPase$ 等のイオンポンプの調節機能が知られる遺伝子 *D* も, $A\beta$ 斑周囲に強く集積することを見出した。これらの結果は, 遺伝子 *E* や遺伝子 *D* が $A\beta$ の排出や分解, または $A\beta$ 斑の形成に関わる可能性を示唆している。また一方で, 反応性アストロサイトの活性化が慢性化すると, 神経血管ユニットを構成するアストロサイト終足やシナプス機能の低下など, アストロサイトが維持する脳内恒常性が破綻し, 神経変性が惹起される可能性もある。実際, 遺伝子 *E* は白質脳症の原因遺伝子であり, 遺伝子 *E* の機能喪失は白質変性を引き起こすことが知られている。従って, 本研究で同定した遺伝子群は, $A\beta$ 斑の形成メカニズム解明の手がかりであると同時に, AD 発症前・初期の病態マーカー, また神経変性を抑止するための治療標的になる可能性がある。今後, アストロサイト特異的に遺伝子 *E* や遺伝子 *D* 等の Key driver の発現を変化させ (発現抑制と過剰発現), 脳病理への影響を解析し, アストロサイト・神経血管ユニットの変化が AD 発症の前・初期に果たす役割を明らかにする。また, Key Driver 遺伝子産物が脳脊髄液や血液中で検出できるかを調べ, AD 前・初期の脳病態を反映するバイオマーカーとなりうるかについても検討する。

1-2) 治療薬標的としての遺伝子 *A* の検討 (飯島/関谷/榊原)

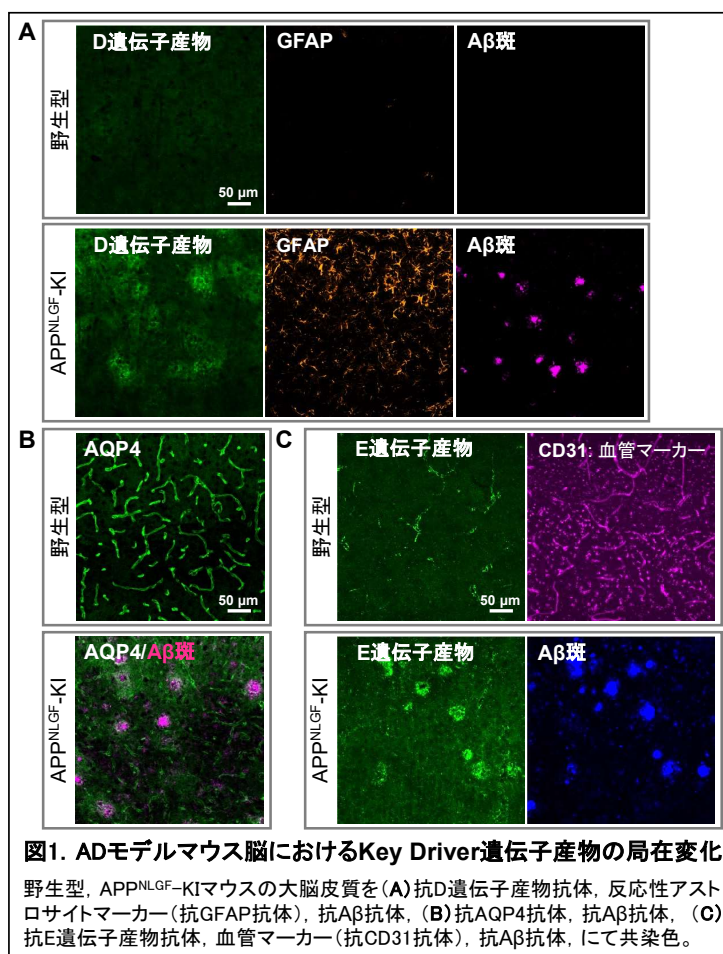
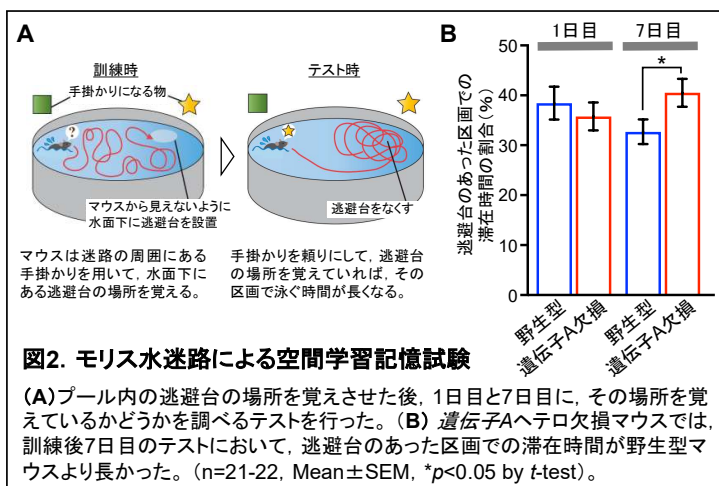


図1. ADモデルマウス脳におけるKey Driver遺伝子産物の局在変化
野生型, APPNLGF-KIマウスの大脳皮質を(A)抗D遺伝子産物抗体, 反応性アストロサイトマーカー(抗GFAP抗体), 抗 $A\beta$ 抗体, (B)抗AQP4抗体, 抗 $A\beta$ 抗体, (C)抗E遺伝子産物抗体, 血管マーカー(抗CD31抗体), 抗 $A\beta$ 抗体, にて共染色。

上記で Key driver として解析を進める遺伝子群とは別に、ネットワークの構成遺伝子の中から、治療薬標的の候補として遺伝子 A に着目した。遺伝子 A は、ATP 感受性カリウムチャネルの活性を調節する受容体をコードし、糖尿病治療薬や血管拡張薬の標的として知られている。また遺伝子 A は、細胞をストレスから保護する機能を持ち、その発現が AD 患者脳、ならびに A β 病理 (APP^{NLGF-KI}) マウスの脳内で上昇していることから、AD 病態に対して保護的に働く可能性が考えられる。

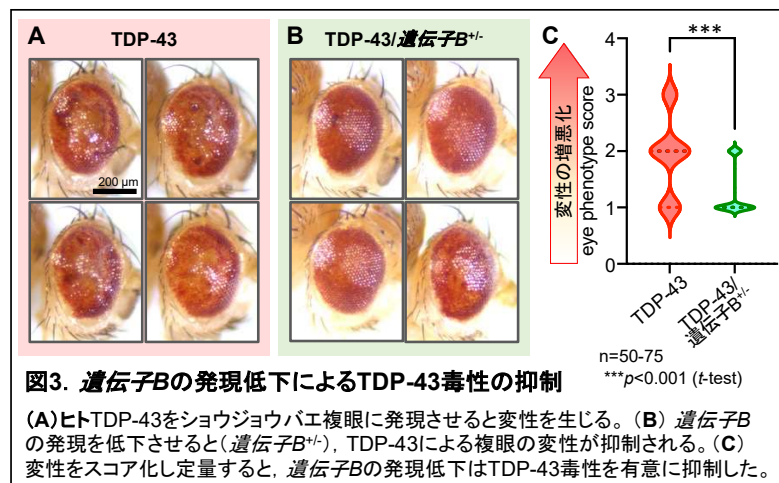
その一方で、遺伝子 A の脳組織での発現量を上昇させる single nucleotide variations (SNVs) が、海馬の萎縮と TAR-DNA binding protein 43 (*TARDBP*/TDP-43) の蓄積を特徴的な脳病理とする、加齢性海馬硬化症 (Hippocampal sclerosis of Aging : HS-Aging) のリスク因子である可能性が報告されている (Nelson et al. 2014, Nelson et al. 2015, Katsumata et al. 2017)。ごく最近、HS-Aging は limbic-predominant age-related TDP-43 encephalopathy neuropathologic change (LATE-NC) と高い頻度で併存する病態として定義され (Dugan et al. 2021)、遺伝子 A の SNVs は LATE-NC ではなく HS-Aging と関連することから、遺伝子 A の機能変化は *TARDBP*/TDP-43 の病理形成ではなく、それらが惹起する神経変性を増悪する可能性も示された (Dugan et al. 2021)。TDP-43 病理は筋萎縮性側索硬化症に特徴的な病理として知られるが、AD 患者の約半数で見られ、遺伝子 A の発現上昇は、TDP-43 病理を呈する認知症に対しては、増悪因子として働く可能性が考えられる。このような背景の下、まず遺伝子 A の機能低下が、老化脳に及ぼす影響について調べた。老齢 (24 ヶ月齢) 遺伝子 A ヘテロ欠損マウスを用いて脳病理ならびに認知機能の解析を行ったが、野生型マウスに比べて顕著な変化 (神経細胞数、神経炎症、脳血管構造、タウ病理、TDP-43 病理等) は検出されなかった。一方、興味深いことに 遺伝子 A ヘテロ欠損マウスでは野生型マウスと比べ、モリス水迷路試験における空間記憶の保持・想起能力が向上していることを見出した (図 2)。この背景にある分子機序を理解するために、遺伝子 A ヘテロ欠損マウスの海馬と大脳皮質の側頭葉で RNA シーケンス解析を行ったところ、mRNA からタンパク質への翻訳に関わる遺伝子群の発現が上昇し、さらにオートファジー関連遺伝子の発現の低下も見られ、栄養センサーの mTOR 経路の活性が変化している可能性が示された。mTOR 経路と記憶学習の関係については多くの報告があり興味深い。一方、側頭葉では、神経やシナプス関連経路の遺伝子の発現が低下している傾向が見られた。これら遺伝子発現解析の結果をタンパク質レベルでも検証するため、免疫組織染色やウェスタンブロット法にて解析を



進めている。

以上の結果から、脳病理のない健常な脳老化では、*遺伝子 A* のヘテロ欠損による脳組織への顕著な影響は見られず、むしろ長期記憶の保持能力が高まる可能性が示された。

次に、*遺伝子 A* と TDP-43 が引き起こす神経毒性の関係を調べた。*遺伝子 A* の脳組織での発現を上昇させる SNP は、TDP-43 病理が惹起する神経変性を増悪することが示唆されている (Dugan et al. 2021)。そこで、*遺伝子 A* のヘテロ欠損により TDP-43 が引き起こす神経毒性が抑制されるかを、ショウジョウバエモデルを用いて検討した。ヒト TDP-43 をショウジョウバエの複眼で発現すると、複眼表面の色素の脱落やネクロシスなどの細胞変性が観察される (図 3A)。このモデルを用い、*遺伝子 A* のショウジョウバエ相同遺伝子である *遺伝子 B* を欠損させたところ、複眼の変性が顕著に抑制されることを見出した (図 3B, 3C)。*遺伝子 A* の欠損マウスでは、糖の取り込み上昇による低血糖などの糖代謝異常が報告されており、また本研究で行った *遺伝子 A* のヘテロ欠損マウス脳における遺伝子発現解析からは、RNA 代謝やオートファジー、またシナプスに関わる遺伝子の発現変化が示唆された。現在、ショウジョウバエの利点である遺伝学的手法を用いて、*遺伝子 B* の欠損による TDP-43 毒性の抑制作用のメカニズムの解明に取り組んでいる。以上の結果から、*遺伝子 A* は、AD をはじめ TDP-43 病理に関わる神経変性疾患の病態修飾因子である可能性が示された (論文準備中)。来年度は TDP-43 病理モデルマウスを導入し、トランスレーショナル研究への準備を進める予定である。



さらに、*遺伝子 A* のヘテロ欠損が A β 病理マウス (APPNLGF-KI) の脳病態に及ぼす影響についても解析を進めた。これまでに、*遺伝子 A* のヘテロ欠損は A β 斑の形成や神経炎症を顕著に変化させないが、周皮細胞を肥大化させ、また神経血管ユニットのインテグリティを低下させる可能性を見出している。より詳細な解析を今後進める予定である。

遺伝子 A や Key driver 遺伝子は、アストロサイトや脳血管系細胞で高い発現を示す。そこで、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて、これらの細胞で特異的に遺伝子発現を操作する実験系を確立した。脳への物理的なダメージによる神経炎症の影響を避けるために、血液脳関門透過性の高い AAV-PHP.eB 型を用いて、アストロサイト特異的な GFAP

プロモーター下で蛍光タンパク質 (mCherry) を発現する AAV ベクターを作製し、マウスの眼窩静脈叢に投与した (図 4A)。脳への直接投与に比べ、眼窩静脈叢への投与は脳への侵襲性が低く、脳領域に AAV ベクターを感染させることができると考えられる。投与から 3 週間後に脳組織を摘出し、mCherry タンパク質の発現を確認したところ、大脳皮質の前頭葉にお

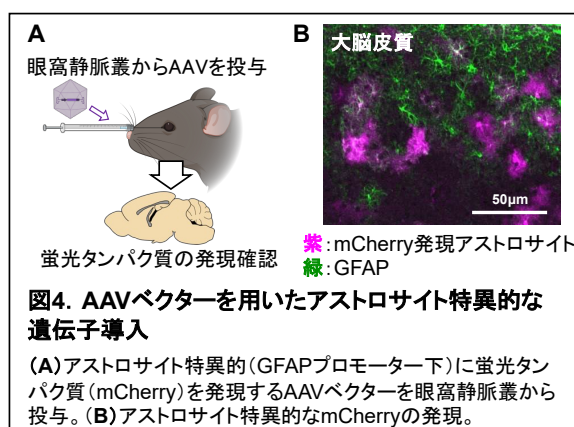


図4. AAVベクターを用いたアストロサイト特異的な遺伝子導入

(A)アストロサイト特異的(GFAPプロモーター下)に蛍光タンパク質(mCherry)を発現するAAVベクターを眼窩静脈叢から投与。(B)アストロサイト特異的なmCherryの発現。

いて特に高い感染が見られ、mCherry 陽性アストロサイトが認められた (図 4B)。現在、アストロサイト特異的に遺伝子 A や Key driver 遺伝子の発現を操作する AAV ベクターを作製している。また、脳血管系細胞の周皮細胞等で特異的に遺伝子発現を操作するための AAV ベクターの構築も行なった。周皮細胞のマーカーとして用いられる CD13 (ANPEP) のプロモーター領域を利用し、AAV ベクターを作成したが、現在のところ周皮細胞特異的な発現を示す結果が得られておらず、更なる検討が必要であることが分かった。

1-3) 周皮細胞の活性化を可視化する新規 PET プローブの開発 (飯島/榊原/木村)

本研究は、A β 病理マウス脳において ANPEP (Alanyl aminopeptidase) 陽性の周皮細胞が顕著に肥大化すること、また ANPEP を標的とした抗癌剤が存在することから、木村泰之博士と PET プローブ開発の可能性について検討を重ねた。しかし、想定していた化合物の化学合成が困難である等の理由から、PET プローブとしての開発は中止した。

そこで、当センターのバイオバンクを活用した研究開発を進めたいと考え、反応性アストロサイトの活性化や神経血管ユニットの変化を検出する血液バイオマーカーを探索することとした。まず、研究計画 1 の 1-1) で同定した A β 病理の周囲に集積する反応性アストロサイト特異的な因子が、A β 病理マウスの血中で特異的に検出されるかを調べる予定である。また新潟大学、大阪大学と進めている AMED 研究では、新潟大学の AD 患者死後脳のトランスクリプトーム解析と、当センターでの A β 病理マウスの脳組織解析から、AD 初期の A β 病理と相関して変化し、神経炎症や脳血管障害に関わる遺伝子群を同定した。これらについても、血液バイオマーカーとしての可能性を検討する予定である。

研究計画 2 : AD 初期の抑制性介在神経変性の機序解明 (関谷/廣田/榊原/飯島)

AD 患者脳のトランスクリプトームデータを用いた遺伝子ネットワーク解析から、AD 初期の病態を制御し創薬標的の候補となるネットワークとして、抑制性介在神経の遺伝子ネットワークを同定し報告した (Wang, Li, Sekiya et al. Neuron, 2021)。そこでまず、A β 病理マウスが抑制性介在神経脱落の機序解明の研究に資するモデルであるかを検討した。老齢 (24 ヶ月齢) の APPNLGF-KI マウスの凍結脳切片を作製し、fast-spiking neuron であ

る parvalbumin (PV) 陽性神経、
 ならびに non fast-spiking
 neuron である somatostatin
 (Sst) 陽性神経、の2つの主要
 な抑制性介在神経を免疫染色に
 より同定し、細胞数の測定をお
 こなった。その結果、いずれの介
 在神経も老齢期 A β 病理マウス
 の大脳皮質において細胞数の有
 意な減少が認められた (図 5)。

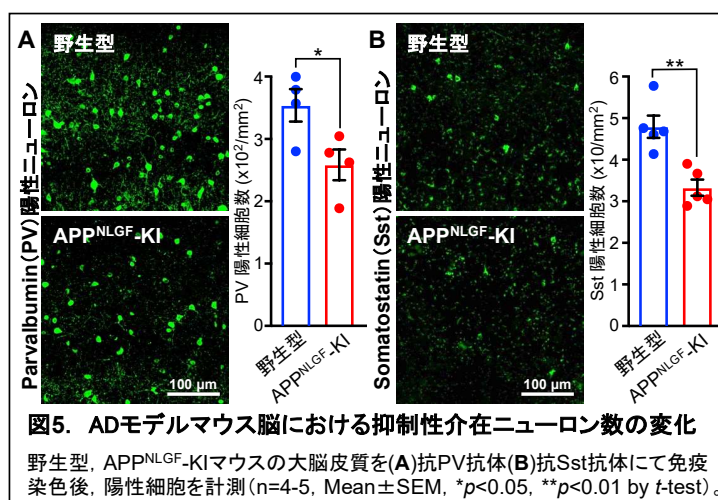
現在、A β 病理マウス脳で特異

的に変性脱落する抑制性介在神経のサブタイプ解析、ならびに神経変性機序の解明を進め
 ている。

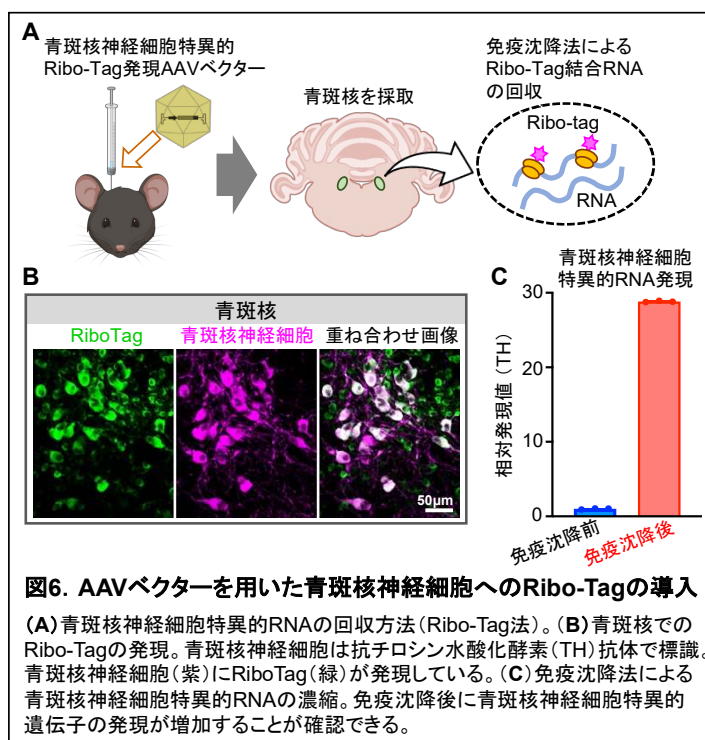
また、抑制性介在神経の脆弱性が、AD 初期の脳病態や認知機能低下にどういった影響を
 及ぼすかを調べるため、抑制性介在神経の生存に関わり、統合失調症の原因遺伝子としても
 知られる転写因子遺伝子 *C* に着目した。現在、遺伝子 *C* 欠損マウスと A β 病理 (APPNLGF-
 KI) マウスを交配し、得られたヘテロ接合体マウスを用いて、抑制性介在神経の脱落、A β
 病理、神経変性、神経炎症、脳血管障害、タウ病理などの病理解析、認知機能解析、および
 遺伝子発現解析を進めている。

研究計画 3：青斑核神経軸索変性の機序解明と保護法の探索 (飯島/榊原/廣田/関谷)

青斑核ノルアドレナリン神経細胞は脳幹に位置し、長い神経軸索を広範な脳領域に投射
 し、情動や認知機能、睡眠の制御に関わっている。AD 発症の前・初期から青斑核ノルアド
 レナリン神経でのタウ病理形成と変性脱落が始まり、その後に起こる大脳皮質へのタウ病
 理の伝播や広範な脳領域での神経細胞脱落の起点となる可能性が指摘されている。これま
 でに、AD 発症の前・初期の A β 病理 (APPNLGF-KI) マウスにおいて、大脳皮質や海馬で
 青斑核神経細胞の軸索が変性脱落することを見出し報告した (論文発表 1)。AD 患者の死
 後脳では、顕著な青斑核神経細胞の脱落が報告されていることから、加齢やその他の要因に
 よりタウを蓄積した青斑核神経細胞の軸索が、大脳皮質や海馬領域での A β 病理により傷
 害されることで、青斑核神経細胞死に繋がる可能性がある。本研究計画では、青斑核神経細
 胞軸索が A β 病理の蓄積により傷害されるメカニズムを明らかにするため、APPNLGF-KI マ
 ウスの青斑核神経細胞での遺伝子発現解析を行うことにした。そこで、AAV ベクターを用
 いてタグ付リボソームタンパク質 (Ribo-Tag) を青斑核に発現させ、青斑核神経細胞特異的
 な RNA を回収する実験系を確立した。まず、青斑核神経細胞特異的な PRS $\times$ 8 プロモータ
 ー下で Ribo-Tag を発現する AAV ベクターを、マウス青斑核へ直接投与し、青斑核神経細
 胞で Ribo-Tag が発現することを確認した (図 6A, B)。さらに、青斑核を含む脳組織を摘出



し、Ribo-Tag 沈降法により、青斑核神経細胞特異的な RNA を高効率で回収できることを確認した。効率の確認は、ノルアドレナリン神経細胞特異的なノルアドレナリン合成酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) やドーパミン β 水酸化酵素などの遺伝子を標的とした qPCR にて行った(図 6C)。本実験として、6 ヶ月齢の野生型マウスと A β 病理マウスの青斑核に Ribo-Tag 発現 AAV ベクターの投与を行い、3 週間後に青斑核を摘出、青斑核神経細胞特異的 RNA を回収し RNA シークエンス解析を行った。



解析の結果、変動遺伝子として 991 遺伝子 ($p < 0.05$, GeneID で 920 遺伝子) を得た。そのうち、発現上昇する遺伝子が 328 遺伝子、発現低下する遺伝子が 592 遺伝子であった。現在、データ解析を進めており、青斑核神経軸索変性の機序の解明と治療標的の同定に進める予定である。

計画 4： AD 初期の中核病理を模す新規モデル動物開発（飯島/榊原/廣田/関谷）

AD 発症の前・初期に見られる脳病態を標的としたトランスレーショナル研究への利用や、AD の中核病変である A β 斑やタウ病理の形成を未然に防ぐ方法を効率的に探索するために、以下 3 つの新規 AD モデル動物の開発を進めている。

4-1) 青斑核ノルアドレナリン神経タウ病理モデルマウスの開発

APPNLGF-KI マウスは大腦皮質に A β 病理を呈するが、AD の初期に見られる皮質下青斑核のタウ病理を呈さない。そこで、ヒトタウ (0N4R 型) をマウス青斑核に特異的に発現できる AAV ベクターを作製した。さらに、ヒトのタウ病理をより忠実に創出するために、APPNLGF-KI マウスの内在性タウをヒト化した、ダブルノックインマウス (APPNLGF-KI, hTau-KI マウス) を作製した。現在、hTau-KI マウス、ならびに APPNLGF-KI, hTau-KI ダブルノックインマウスの青斑核に、ヒトタウ発現 AAV ベクターの投与を開始した。投与から 3 ヶ月ごとに脳組織を摘出し、青斑核でのタウ病理が、A β 病理の存在下で大腦皮質や海馬へと伝播するかを検討する予定である。

4-2) ノルアドレナリン・オクトパミン神経タウ病理モデルショウジョウバエの開発

青斑核ノルアドレナリン神経に最初期にタウ病理が出現し、脳全体に伝播する可能性が指摘されており、有力な予防・治療標的と考えられる。しかし、なぜノルアドレナリン神経にタウが蓄積するのは不明である。そこで本年度、タウ蓄積に関わる因子を効率的に探索するために、ノルアドレナリン神経でヒトタウを発現するショウジョウバエを作製した。これまでに、昆虫のノルアドレナリン神経に相当するオクトパミン神経特異的にヒトタウを発現させたところ、加齢依存的にタウやリン酸化タウが蓄積し、生存率が有意に減少した。また、このオクトパミン神経特異的にヒトタウを発現したモデルショウジョウバエでは、加齢飼育後に夜間睡眠時間の低下傾向が認められた。そこで、このモデルを用い、タウの蓄積量を変化させる因子の探索や、オクトパミン神経の活性化との関係について研究を進める予定である。

4-3) 新規 A β 病理モデルショウジョウバエの開発

これまでに、脳神経細胞でヒト A β を産生・分泌する新規モデルショウジョウバエを作製した。この系を用いる利点は、A β 斑形成前の単量体 A β の産生、分解、排出に関わる遺伝子群を効率的に同定できることにある。RNAi 法を用いて神経細胞特異的あるいはグリア細胞特異的に任意の遺伝子発現を抑制し、脳内の A β 量を変化させる遺伝子を同定した。哺乳類相同遺伝子の解析も進め、AD のリスク因子の発見や予防法開発に繋げる予定である。

D. 考察と結論

AD 発症機序の中でも A β 蓄積から神経細胞死に至る過程に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 の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。今後は、ヒト剖検脳を用いた検証も進め（東京都健康長寿医療センターより供与を受ける）、疾患メカニズムの解明と治療法の開発を進めていく予定である。

本年度は、遺伝子ネットワーク解析と実験検証から、大脳皮質への A β の蓄積が引き起こす AD 発症初期の脳病態の 1 つとして、A β 病理への反応性アストロサイトの活性化により神経血管ユニットのインテグリティが低下する可能性を見出した。さらに、反応性アストロサイトの活性化と神経血管ユニットの破綻に関わる候補分子を遺伝子ネットワーク解析から同定し、A β 病理モデルマウスを用いてそれらの脳内局在の変化を詳細に調べた。神経血管ユニットの破綻は、ノルアドレナリン作動性神経や、セロトニン作動性神経の軸索変性を引き起こす原因となる可能性もあり、アルツハイマー病の中核症状に加え

て、アルツハイマー病の初期に認められる抑うつや無気力、不安といった周辺症状との関連も考えられる。今回見出した神経血管ユニットの破綻と神経軸索の変性の抑止、修復は、アルツハイマー病初期の周辺症状、中核症状両方の治療標的となる可能性がある。

また、治療標的として研究を進めてきた遺伝子 *A* に関してはショウジョウバエモデルを用いて、遺伝子 *A* のホモログである遺伝子 *B* の発現抑制により、TDP-43 の凝集や TDP-43 が引き起こす神経変性を抑止することを明らかにした。この結果は、遺伝子 *A* がアルツハイマー病や加齢性海馬硬化症のみならず、TDP-43 病理を有する様々な神経変性疾患の治療標的となる可能性を示唆しており、今後マウスモデルを用いた検証、メカニズムの解明を進める予定である。

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、AD 発症初期に見られる中核病理である、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動物の開発も進めた。

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) **Sekiya, M., Iijima, K.M.** Phenotypic analysis of a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's amyloid- β toxicity. *STAR Protoc.* 2021, 2(2):100501. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100501.
- 2) Sakakibara, Y., Hirota, Y., Ibaraki, K., Takei, K., Chikamatsu, S., Tsubokawa, Y., Saito, T., Saido, T.C., **Sekiya M., Iijima K.M.** Widespread Reduced Density of Noradrenergic Locus Coeruleus Axons in the *App* Knock-In Mouse Model of

Amyloid- β Amyloidosis. *J Alzheimers Dis.* 2021, 82(4):1513-1530. doi: 10.3233/JAD-210385.

3) Nozawa, N., Noguchi, M., Shinno, K., Tajima, M., Aizawa, S., Saito, T., Asada, A., Ishii, T., Ishizuka, M., Iijima, K.M., Ando, K. 5-aminolevulinic acid and sodium ferrous citrate ameliorate muscle aging and extend healthspan in *Drosophila*. *FEBS Open Bio.* 2022, 12(1):295-305. doi: 10.1002/2211-5463.13338.

4) 関谷倫子, 飯島浩一, 治療戦略から考えるアルツハイマー病の神経炎症, 生体の化学, 72 (5) 446-449. 2021 年 10 月 15 日発行

5) 関谷倫子, アルツハイマー病の新たな遺伝子変異 (実験医学ミニレビュー), 実験医学, 40(1) 61-62, 2022 年 1 月号

2. 学会発表

1) 山城梨沙, 関谷倫子, 飯島浩一, ショウジョウバエの食餌制限によるグリア貪食能低下と貪食能への必須アミノ酸の役割, 第 85 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム 2021 年 5 月 22 日, オンライン開催

2) Sakakibara, Y., Hirota, Y., Chikamatsu, S., Ibaraki, K., Takei, K., Zhou, M., Abe, H., Sekiya, M., Iijima, K.M. Cognitive function and brain pathology in mice with a heterozygous deficiency in *ABCC9/SUR2*, a gene associated with hippocampal sclerosis of aging., Alzheimer's Association International Conference (AAIC 2021) 7/26-30, 2021, WEB 開催

3) Hirota, Y., Sakakibara, Y., Ibaraki, K., Takei, K., Iijima, K.M., Sekiya, M. Localization of AD biomarker phospho-tau proteins in the brains of *App* knock-in mouse model of A β amyloidosis. Alzheimer's Association International Conference (AAIC 2021) 7/26-30, 2021, WEB 開催

4) 山城梨沙, 関谷倫子, 飯島浩一, ショウジョウバエの食餌制限によるグリア貪食能低下に寄与する食餌因子の探索, 第 94 回日本生化学会大会, 2021 年 11 月 3-5 日, WEB 開催

5) 関谷倫子, Wang Minghui, 権秀明, Schadt Eric, Brennand Kristen, Zhang Bin, 飯島浩一, 遺伝子ネットワーク解析によるアルツハイマー病の治療薬探索, 第 94 回日本生化学会大会, 2021 年 11 月 3 日, WEB 開催, シンポジウム: 認知症発症のリスクとメカニズムの多様性, アルツハイマー病の高精度診断法と治療法開発に向けて

6) 榊原泰史, 廣田湧, 近松幸枝, 茨木京子, 竹井喜美, 周明, 阿部寛, 関谷倫子, 飯

飯島浩一，加齢性海馬硬化症関連遺伝子 *ABCC9* のヘテロ欠損マウスにおける認知機能と脳病理の解析，第 40 回日本認知症学会学術集会，2021 年 11 月 26-28 日，ハイブリッド開催

7) 廣田 湧，榊原泰史，茨木京子，竹井喜美，飯島浩一，関谷倫子，*App* ノックインマウスにおける AD バイオマーカー関連リン酸化タウの脳内局在解析，第 40 回日本認知症学会学術集会，11/26-28, 2021，ハイブリッド開催，ポスター発表

8) 近松幸枝，坪川陽子，西島里咲，桑和彦，飯島浩一，関谷倫子，ノルアドレナリン／オクトパミン神経細胞タウ毒性モデルショウジョウバエの作製と解析，第 40 回日本認知症学会学術集会，11/26-28, 2021，ハイブリッド開催，ポスター発表

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