

長寿医療研究開発費 平成28年度 総括研究報告

統合生物学的手法による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
(28-26)

主任研究者 飯島 浩一 国立長寿医療研究センター 室長

研究要旨

これまでにアルツハイマー病 (AD) の予防・治療法の開発を目指した数多くの研究が展開されてきたが、未だ有効な治療薬は存在せず、その発症機序にも不明な点が多い。近年、次世代シーケンサー等の技術革新により網羅的なゲノム解析と遺伝子発現解析が可能となった。患者から収集したビックデータを世界中から集積し、分析・活用する基盤も整えられ、AD 発症機序の過程を遺伝子ネットワークの変化として再構築する試みがなされている。

本研究では、最新のシステム生物学の手法と AD モデル動物を用いた実験的検証を組み合わせ、AD 患者脳の中で機能的なつながりを持つと考えられる遺伝子群 (遺伝子共発現ネットワーク) の中から、AD 型神経変性への感受性に関わる遺伝子ネットワークの同定を目指す。このような神経変性の感受性を規定する遺伝子ネットワークの中には、これまでの方法では同定されなかった AD 病態修飾因子や危険遺伝子が含まれる可能性がある。本研究の成果は、それらの発見を通じて、AD における神経細胞死を抑止する、次世代の治療法開発につながると考えられる。

主任研究者

飯島 浩一 国立長寿医療研究センター
アルツハイマー病研究部・発症機序解析研究室 室長

分担研究者

木村 哲也 国立長寿医療研究センター
アルツハイマー病研究部・病態モデル動物解析室 室長

A. 研究目的

アルツハイマー病は老年性認知症の最大の原因であり、患者数は増大の一途を辿っている。しかしその発症機序には不明な点が多く、有効な治療法は未だ存在しない。アルツハイマー病の症状の進行を食い止めるためには、脳内で進行中の神経細胞死を抑止する必要がある。従って、アルツハイマー病発症機序の階層性を理解し、神経変性の分子メカニズムの詳細を解明することが、そのような治療薬の開発のために必須であると考えられる。

近年、次世代シーケンサー等の技術革新により網羅的なゲノム解析と遺伝子発現解析が可能となった。アルツハイマー病においても、多数の患者脳から収集された遺伝子データが集積しつつあり、システム生物学によりそれらを分析することで、アルツハイマー病発症の過程で起こる変化を遺伝子ネットワークの変化として再構築できると考えられる。この手法を用いることで、データ主導でアルツハイマー病の発症機序に関する仮説を立案・検証することができ、そこから得られる結果は新たなブレークスルーをもたらすと考えられる。本研究課題では、システム生物学を駆使して、アルツハイマー病における神経変性への脆弱性に関わる候補遺伝子ネットワークを同定し、さらにネットワーク構成遺伝子の中でも特に重要な役割を持つ候補遺伝子群を絞り込み、それらが神経細胞死への脆弱性や耐性に与える影響を、アルツハイマー病モデル動物等（ショウジョウバエ・マウス・マウス初代神経細胞）を用いて網羅的に検証する。この手法により、神経細胞死への脆弱性や耐性に関わる遺伝子群を網羅的に明らかにすることで、症状の進行を遅らせる全く新たな創薬標的の同定に繋がる可能性がある。

また、ADのような一般的な病気においては、個々では発症リスクに及ぼす影響が小さいものの、頻度の高い遺伝子多型が複数組み合わせることで、加算的にADの発症リスクを上昇させていることが考えられる。しかし、発症リスクに及ぼす影響が小さい遺伝子多型を、現在行われているGWASにより個別に同定していくことは、検出感度の限界により困難であることも示唆されている。AD発症に到る各過程で重要な働きをする遺伝子群をネットワークとして同定することができれば、その遺伝子ネットワークを形成する遺伝子群の中に、アルツハイマー病の発症リスクの組み合わせが含まれる可能性も考えられる。

平成28年度は、以下の目的に従い研究を進めた。

目的1. システム生物学を用いた情報解析による候補遺伝子ネットワークの同定

目的2. 候補遺伝子の抽出とモデル動物を用いた実験的検証

B. 研究方法

一年目にあたる平成28年度は、Aβ神経毒性モデルショウジョウバエ脳に加え、新たにADモデルマウス脳における遺伝子発現解析を行った。これらをAD患者脳由来の遺伝子共発現ネットワークと重ね合わせることで、Aβ蓄積の下流で発現の変動する遺伝子群の集積が有意に見られる遺伝子ネットワークを絞り込んだ。また同定した遺伝子ネットワークがAD型神経変性への感

受性に関わるかを、A β 神経毒性モデルショウジョウバエを用いて検証した。さらに有力候補遺伝子については、AD モデルマウスを用いて検証実験を行うため、その準備を進めた。

(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。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(基本指針(平成 18 年 6 月 1 日施行))」に従って行なった。

C. 研究結果

目的 1. システム生物学を用いた情報解析による候補遺伝子ネットワークの同定

これまでに研究協力者である米国マウントサイナイ医科大学の Zhang 博士らは、AD 患者脳でその発現変動に相関性が見られる遺伝子群をグループ化し、さらに eSNP の情報を用いることで階層性を持たせた 62 個の遺伝子共発現ネットワークを構築していた(Zhang, B. et al., *Cell*, 2013)。主任研究者・飯島はこの中から、AD 型神経変性への感受性を規定する遺伝子ネットワークの同定を以下の方法で試みた。

AD 型認知症においては、脳内での A β 蓄積が神経細胞死の引き金となると考えられている。従って、AD 患者脳から構築された遺伝子ネットワークの中でも、A β 蓄積によって変動する遺伝子をより多く含むネットワークは、AD における神経変性の過程に関与している可能性が高い。

そこで、A β 蓄積の下流で起こる神経変性と相関して発現変動する遺伝子を同定するために、まず主任研究者の確立した A β 神経毒性モデルショウジョウバエを用いた(Iijima, K. et al., *PNAS*, 2004)。このモデルでは、脳中枢神経系でヒト A β 42 を特異的に高発現させることで、加齢依存的に神経細胞死を誘導することが出来る。この A β 神経毒性モデルショウジョウバエ脳において継時的にトランスクリプトーム解析を行い、A β 蓄積による神経細胞死と相関して発現が変動するヒト相同遺伝子群を同定した。この情報を用い enrichment 解析を行ったところ、AD 患者脳由来の 12 個の遺伝子ネットワークでこれらの遺伝子の有意な集積が見られた(図 1)。

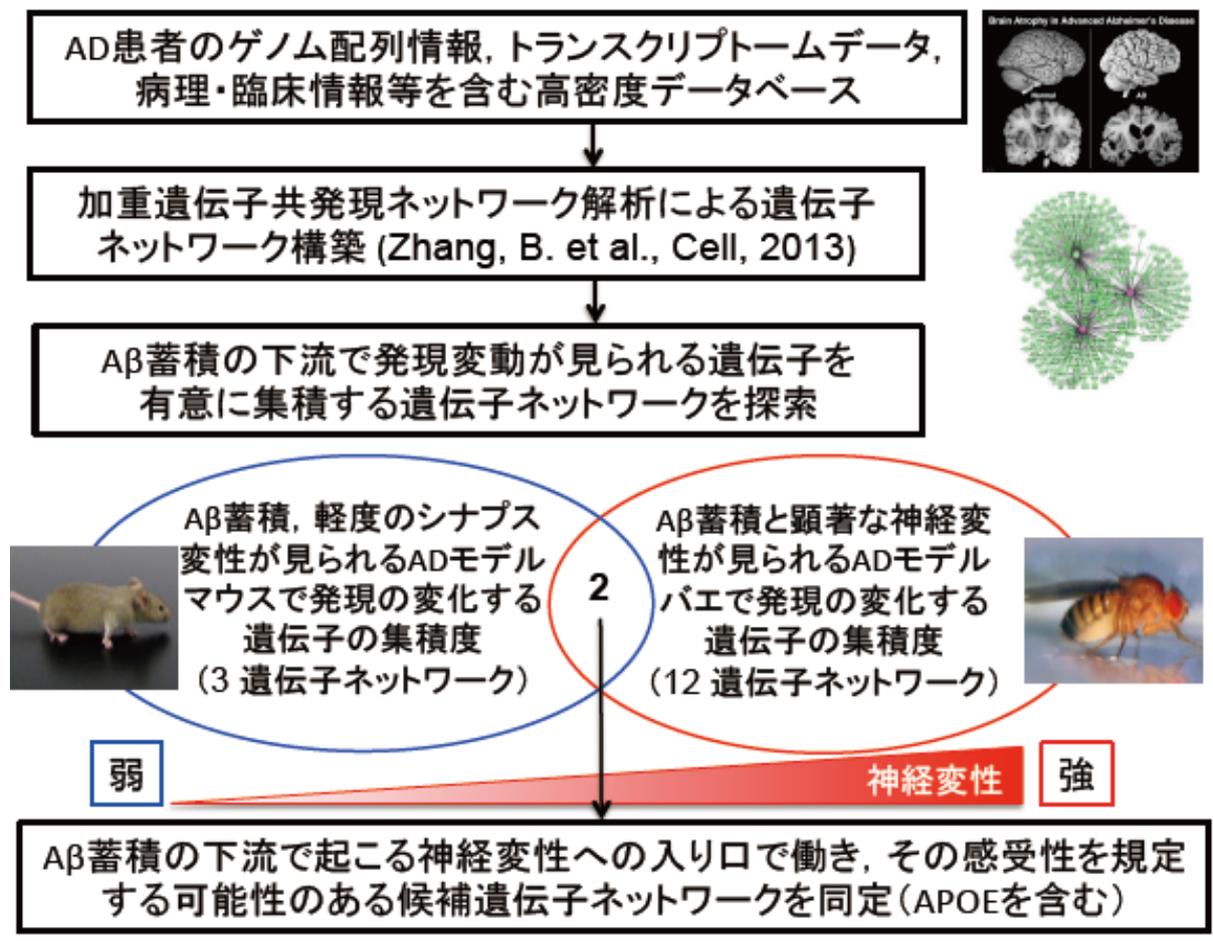


図1. AD型神経変性への感受性を規定する遺伝子ネットワークの同定

さらに平成 28 年度は, 本提案課題の検証実験でも用いる APP ノックインマウスモデル (Saito, T. et al., *Nat Neurosci*, 2014) においてトランスクリプトーム解析を行った。このモデルでは, APP の過剰発現なしに Aβ の蓄積, シナプス障害, また認知機能の低下が観察される。しかし顕著な神経変性は見られないことから, AD 発症の初期の段階を模していると考えられている。6 ヶ月齢マウスの前脳皮質, 及び海馬領域においてトランスクリプトーム解析を行い, Aβ の蓄積に伴い発現変動が見られる遺伝子を同定した。この情報を用いて enrichment 解析を行ったところ, AD 患者脳由来の 3 個の遺伝子ネットワークでこれらの遺伝子の有意な集積が見られた (図 1)。また, これら 3 個の遺伝子ネットワークを Aβ 神経毒性モデルショウジョウバエから同定した 12 個の遺伝子ネットワークと比較したところ, 2 つの遺伝子ネットワークが共通して検出されることが分かった (図 1)。

AD 患者脳由来遺伝子ネットワークは神経変性の進んだ死後脳から構築されたため, そこには Aβ の蓄積から神経変性に至る様々な変化 (神経変性が惹起される原因, 神経変性の過程, さらに神経変性の結果) が含まれると考えられる。上記の解析から, AD 患者脳由来遺伝子ネットワークへの発現変動遺伝子の集積は, マウスモデルよりもショウジョウバエモデルで多い事が明らかとなった (マウス 3 個, ショウジョウバエ 12 個)。遺伝子ネットワークは, 神経変性の進んだ AD 患者脳から構築したことを考えると, AD 発症の初期段階を模しているマウスモデルよりも, 神

経細胞死が強く起こるショウジョウバエモデルから得られた遺伝子の集積が多いという結果は合理的であると考えられる。また、両者に共通して検出された2遺伝子ネットワークは、A β 蓄積が神経変性を惹起する初期の段階で働いている可能性がある。

以上の結果・考察を踏まえ、マウス及びショウジョウバエモデルの両方で共通して検出された遺伝子ネットワークが、A β 蓄積が惹起する神経変性の開始点で働き、その感受性を規定しているという仮説を立て、その検証実験を行うこととした。また来年度の平成29年度には、15ヶ月齢マウス脳において遺伝子発現解析を行い、同様の enrichment 解析を行うことで、さらなる遺伝子ネットワークの同定を行う予定である。

目的2.候補遺伝子の抽出とモデル動物を用いた実験的検証

目的2-1) A β 神経毒性モデルショウジョウバエを用い、各候補遺伝子のショウジョウバエホモログ遺伝子をハエ脳中枢神経細胞で発現抑制 (RNA 干渉法) した際に、神経変性を増悪させるか (または抑制するか) を調べる。変化の見られた遺伝子については、それらの発現上昇が神経変性に与える効果を調べる。

上記のデータ主導での解析により同定した遺伝子ネットワークには、神経再生、神経活動、細胞接着、脂質代謝に関わる遺伝子が多く含まれ、ネットワークの持つ機能的側面からも神経細胞死への感受性に関わっている可能性が高いと予想された。また遺伝子ネットワーク内には、ADの最大の危険因子であるAPOE遺伝子も含まれており、AD発症機序への関与も強く示唆された。そこで、この遺伝子ネットワークが実際にAD型神経変性に影響を与えるか否かを調べる目的で、まずA β 神経毒性モデルショウジョウバエを用いた検証を開始した。

本検証実験の目的は、同定した遺伝子ネットワークが神経保護機能を有するか、を検証することである。ショウジョウバエを用いる一番の利点は、ほぼすべての遺伝子に対してその発現を組織特異的に抑制するための shRNA 発現トランスジェニック系統が樹立されており、各候補遺伝子がA β 神経毒性に及ぼす影響を網羅的に調べることができる点にある。しかし、同定した遺伝子ネットワークには1,388遺伝子が含まれているため、比較的实验操作が簡便なショウジョウバエモデルといえども、その全てを検証することは容易ではない。そこで検証実験に進める遺伝子の絞り込みを行うこととした。

この絞り込み作業もあくまでデータ主導で行うために、遺伝子ネットワークを構成する遺伝子の中でも 1)これまでのGWAS解析等でADへの関与が示唆されている遺伝子(GWAS関連遺伝子)、及び 2)AD患者脳とA β 神経毒性モデルショウジョウバエ脳の両方で発現の変動が見られた遺伝子(発現変動遺伝子)、という基準を指標に候補遺伝子の抽出を行った。その結果、GWAS関連遺伝子として31遺伝子、発現変動遺伝子として34遺伝子を同定した。また、そのうち3遺伝子は両方で検出されたことから、これら遺伝子は特に重要である可能性が示唆された。現在までに、この3遺伝子に加えて、GWAS関連遺伝子の中から4遺伝子、発現変動遺伝子の中から2遺伝子

を加えた計9遺伝子について解析を終了した。その結果、選定した9遺伝子全てについて、それらの発現抑制が A β 神経毒性モデルショウジョウバエの運動機能低下や神経変性を増悪化することを見出した (data not shown)。以上の結果より、少なくとも A β 神経毒性モデルショウジョウバエにおいては、選定したネットワーク構成遺伝子群が神経保護機能を持つことが強く示唆された。

目的2-2) 2-1で神経変性を増悪させた候補遺伝子について、マウス初代培養神経細胞 (In vitro)、または脳スライス培養 (Ex vivo) を用い、各候補遺伝子をノックアウト (CRISPR) あるいはノックダウン (shRNA) が、A β 神経毒性の下流、または各種ストレス (興奮毒性、酸化ストレス、リソソーム障害等) により誘起される神経活動の変化、神経変性、及び遺伝子発現へ与える影響を調べる。

これまでの A β 神経毒性モデルショウジョウバエを用いた解析から、ネットワークを構成する9遺伝子が神経保護作用を示すことを見いだした。そこで、AD との関連が特に興味深い3遺伝子について、AD マウスモデルを用いた解析を行うための shRNA または CRISPR コンストラクトを作成した。現在、研究分担者である木村哲也博士とともに、海馬領域を中心とする脳スライス culture を用いた電気生理学的解析のための実験系構築を進めている。

目的2-3) AD モデルマウスを用い、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) の脳室内投与による RNA 干渉法、またはノックアウトマウスを用いた各遺伝子の発現抑制が、認知機能障害、神経変性、また遺伝子発現ネットワークへ与える影響を調べる。

上記3遺伝子の中でも、特に遺伝子 X に着目している。遺伝子 X は AD のリスク因子としても知られる心血管疾患の原因遺伝子であり、さらに最近その遺伝子多型がアルツハイマー病と非常に類似した臨床症状を呈する加齢性神経変性疾患と関連していることも報告されている。これらの事実は、遺伝子 X を取り巻く遺伝子ネットワークが、AD における神経変性の重要な病態修飾因子である可能性を示唆している。

そこで遺伝子 X に対する2種類の shRNA を脳内投与するための AVV9 ウイルスを自治医科大学の村松慎一博士との共同研究により作成した。現在マウス脳内への投与を行い、発現抑制効率の確認を行っている。また遺伝子 X を含む3候補遺伝子全てについてノックアウトマウスが既に樹立されており、それらの導入も進めている。遺伝子 X については、米国 North Western 大学より凍結精子の分与を受け、現在実験動物施設の小木曾博士により個体化を行った。現在ノックアウトマウスの繁殖を進めており、安定したコロニーが確立され次第、AD モデルマウスと交配し、遺伝子 X の機能低下 (ヘテロ変異体) が AD モデルマウスの記憶障害、神経変性、AD 病理さらに遺伝子発現ネットワークに及ぼす影響を詳細に解析する。

D. 考察と結論

本研究で同定・検証を進めている、AD型神経変性の感受性を規定する遺伝子ネットワークは、AD患者脳由来の遺伝子情報にモデル動物から得たトランスクリプトームデータをフィードバックすることで、先入観なしに遺伝子データ主導で導き出したものである。従って、アミロイドやタウを中心とする病態解析とは異なる角度から、AD型神経変性の機序を明らかにできると考えている。

また本研究の結果、アルツハイマー病発症機序の中でも不明な点の多いA β 蓄積から細胞死に至る過程で重要な働きをする遺伝子群を網羅的に同定できると期待でき、その成果はアルツハイマー病の病態修飾因子や危険因子の発見、さらにアルツハイマー病へのリスクの診断や治療法の選択といった将来のオーダメイドメディシンに貢献できる可能性がある。

さらにこの研究からは、AD脳で進行中の神経細胞死を抑止するための創薬標的遺伝子も同定できる可能性がある。例えば、同定した神経変性への感受性を規定する遺伝子ネットワークを標的とし、その活性を上昇させることで神経変性を遅延、また抑止できないかと考え、ネットワーク全体を制御するような遺伝子を創薬標的遺伝子として抽出することを考えている。これまでに、研究協力者のBin Zhang博士の協力により、ベイジアンモデルを用いた因果関係の推論から当該ネットワーク全体の活性を制御する可能性が高い遺伝子12個を同定しており、その検証も本研究と並行する形で進めている。

本研究により、AD発病後にも病態の進行を遅延させ寛解させる治療薬標的が同定できれば、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される。

E. 健康危険情報
なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 統合生物学的手法を用いて遺伝子ネットワークの変化からアルツハイマー病発症機序に迫る (総説) 関谷倫子, 飯島浩一 (2016) *Dementia Japan*, Vol. 30 No. 2.

2) Tau phosphorylation at Alzheimer's disease-related Ser356 contributes to tau stabilization when PAR-1/MARK activity is elevated. Ando, K., Oka, M., Ohtake, M., Hayashishita, M., Shimizu, S., Hisanaga, S. & Iijima, K.M. (2016) *BBRC*, 478(2):929-34. doi:10.1016/j.bbrc.2016.08.053. Epub 2016 Aug 9

3) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II promotes neurodegeneration caused by tau phosphorylated at Ser262/356 in a transgenic *Drosophila* model of tauopathy. Oka, M., Fujisaki, N., Maruko-Otake, A., Ohtake, Y., Shimizu, S., Hisanaga, S., Iijima, K.M. & Ando, K. (2017) *J. Biochem.* (Tokyo), in press

4) EDEM function in ERAD protects against chronic ER proteinopathy and age-related physiological

decline in *Drosophila*. Sekiya, M., Maruko-Otake, A., Hearn, S., Fujisaki, N., Sakakibara, Y., Suzuki, E., Ando, K. & Iijima, K.M. (2017) *Developmental Cell*, in press

2. 学会発表

国内学会発表

1) The mechanism underlying neurodegeneration in a *Drosophila* model of Wolfram syndrome, 榎原泰史, 藤崎尚規, 関谷倫子, 飯島浩一, 発表形式 : ポスター, 発表日 : 2016年7月20日, 日本神経化学会, 2016年7月20日~7月22日, パシフィコ横浜

2) Ribosomal protein S6 kinase はアルツハイマー病関連 Ser262 サイトのリン酸化を介してタウタンパク質を安定化し毒性を悪化させる。Ribosomal protein S6 kinase stabilizes tau via tau phosphorylation at Ser262 and enhances tau toxicity, 林下 幹輝, 齋藤 太郎 1, 久永 眞市, 飯島浩一, 安藤 香奈絵, 発表形式 : 口演, 発表日 : 2016年9月8日, 日本神経化学会, 2016年9月8日~9月10日, 福岡国際会議場

3) 軸索での加齢依存的な ATP 量減少とミトコンドリア分布の関係, 岡 未来子, 鈴木えみ子, 久永 眞市, 飯島浩一, 安藤 香奈絵, 発表形式 : 口演, 発表日 : 2016年9月10日, 日本神経化学会, 2016年9月8日~9月10日, 福岡国際会議場

4) The mechanism underlying neurodegeneration in a *Drosophila* model of Wolfram syndrome, 藤崎尚規, 榎原泰史, 関谷倫子, 飯島浩一, 発表形式 : ポスター, 発表日 : 2016年11月30日, 日本分子生物学会, 2016年11月30日~12月2日, パシフィコ横浜

国際学会発表

1) Sustained activation of CaMKII caused by depletion of mitochondria from the axons enhances tau toxicity. Ando, K., Maruko-Otake, A., Hayashishita, M., Oka, M., Ohtake, Y., Sekiya, M., Saito, T., Hisanaga, S.I. & Iijima, K.M., 発表形式 : 口演, 発表日 : 2016年11月13日, Neuroscience 2016, 2016年11月12日~11月16日, San Diego, USA

2) Reduction in ATP levels in the axon during aging and the role of mitochondrial distribution. Oka, M., Suzuki, E., Hisanaga, S.I., Iijima, K.M. & Ando, K., 発表形式 : 口演, 発表日 : 2016年11月13日, Neuroscience 2016, 2016年11月12日~11月16日, San Diego, USA

3) ENHANCED ER PROTEIN QUALITY CONTROL SELECTIVELY TARGETS APP SUBJECTED TO ETA-SITE PROCESSING PATHWAYS AND REDUCES AMYLOID-ETA AND AMYLOID-BETA. Sekiya, M. & Iijima, K.M. 発表日 : 2017年3月31日, AD/PD2017, 2017年3月29日~4月2日, Vienna, Austria

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