

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 アルツハイマー病研究部 部長

研究要旨

3年間全体について

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病態修飾因子やリスク因子が含まれる可能性がある。

これまでに、AD患者脳由来の遺伝子ネットワークの中から、A $\beta$ 蓄積の下流で惹起される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試みた（目的1）。手法としては、A $\beta$ 神経毒性モデルショウジョウバエ脳、および理研で開発されたADモデルマウス (APPノックインマウス) 脳における加齢依存的な遺伝子発現変化を調べ、それらを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、A $\beta$ 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 (Sekiya, M., *et al.*, 論文準備中)。次に、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 $\beta$ 神経毒性モデルショウジョウバエを用いて検証を進め、神経炎症遺伝子ネットワークに含まれるTREM2/TYROBPの慢性的な活性化が神経変性を増悪化させることを見出した

(Sekiya, M., *et al.*, *Genome Med*, 2018) (目的2)。さらに、非炎症系のネットワークについても解析を進め、新たなAD病態修飾候補遺伝子を見出し (Sakakibara, Y., *et al.*, *PLOS Genet*, 2018; Quan, X., *et al.*, 論文投稿準備中)、加えてADモデルマウスを用いた検証実験も進めた (Sakakibara, Y., *et al.*, *BMC Neurosci*, 2018; Sakakibara, Y., *et al.*, *BMC Neurosci*, 2019) (目的2)。本研究の成果は、ADの発症メカニズムの理解に基づいた、新たな治療法開発につながると期待される。

平成30年度について

ADモデルマウス脳（APPノックインマウス：24ヶ月齢）における遺伝子発現解析を行い、それらをAD患者脳由来の遺伝子ネットワークと重ね合わせ、 $A\beta$ 蓄積が引き起こす発現変動遺伝子を有意に集積する遺伝子ネットワークを同定した（目的1）。さらに、候補遺伝子の一つである遺伝子Xと神経変性との関係について、 $A\beta$ 神経毒性モデルショウジョウバエを用いた検証実験を行なった（Quan, X., *et al.*, 論文投稿準備中）（目的2）。一方で、ADモデルマウスを用い、その情動・認知機能の加齢変化に関する基礎データを論文として発表し（Sakakibara, Y., *et al.*, *BMC Neurosci*, 2018; Sakakibara, Y., *et al.*, *BMC Neurosci*, 2019）、遺伝子Xノックアウトマウスと交配し24ヶ月齢まで加齢させた後、認知機能への影響等の検討を進めた（Sakakibara, Y., Sekiya, M., *et al.*, 論文準備中）（目的2）。

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

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

研究期間 平成28年4月1日～平成31年3月31日

#### A. 研究目的

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、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。ADの症状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、AD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。AD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、AD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AD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イ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、AD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、AD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つながる可能性がある。

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、現在行われているゲノムワイド関連解析(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、AD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。

## B. 研究方法

### 年間全体について

本研究では、AD患者脳由来の遺伝子ネットワークの中から、 $A\beta$ 蓄積の下流で惹起される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試みた(目的1)。まず、 $A\beta$ 神経毒性モデルショウジョウバエ脳、および理研で開発されたADモデルマウス(APPノックインマウス)脳における加齢依存的な遺伝子発現変化を調べた。一年目の平成28年度は、 $A\beta$ 神経毒性モデルショウジョウバエ脳に加え、6ヶ月齢のADモデルマウス脳、二年目の平成29年度は15ヶ月齢のマウス脳、三年目の平成30年度は24ヶ月齢のマウス脳における遺伝子発現解析を行なった。次にそれらを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、 $A\beta$ 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(Sekiya, M., *et al.*, 論文準備中)。次に、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、 $A\beta$ 神経毒性モデルショウジョウバエを用いて検証を進めた(Sakakibara, Y., *et al.*, *PLOS Genet*, 2018; Sekiya, M., *et al.*, *Genome Med*, 2018)(目的2)。さらに、ADモデルマウスを用いた検証実験も開始し、加齢依存的な脳病理像と認知機能の変化について基礎データを収集しつつ、有力な候補遺伝子と考えられる遺伝子Xのノックアウトマウスを導入し、検証実験を進めた。

### 平成30年度について

平成30年度は、ADモデルマウス(APPノックインマウス:24ヶ月齢)脳における遺伝子発現解析を行い、それらをAD患者脳由来の遺伝子ネットワークと重ね合わせ、 $A\beta$ 蓄積が引き起こす発現変動遺伝子を有意に集積する遺伝子ネットワークを複数同定した(目的1)。さらに、有力な候補遺伝子として同定した遺伝子Xと神経変性との関係について、 $A\beta$ 神経毒性モデルショウジョウバエを用いた検証実験を進めた(Quan, X., *et al.*, 論文投稿準備中)(目的2)。さらにADモデルマウスを用い、その情動・認知機能の加齢変化の基礎

データを論文としてまとめつつ (Sakakibara, Y., *et al.*, *BMC Neurosci*, 2018; Sakakibara, Y., *et al.*, *BMC Neurosci*, 2019), 遺伝子Xノックアウトマウスと交配し24ヶ月齢まで加齢させ、認知機能への影響等の検討を進めた (Sakakibara, Y., Sekiya, M., *et al.*, 論文準備中) (目的2)。

(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

3年間全体について

### 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

#### 1-1) Aβ神経毒性モデルショウジョウバエ脳における遺伝子発現情報を用いた解析

脳内でのAβ蓄積が、ADで見られる神経変性の引き金になると考えられている。従って、Aβ蓄積に反応して発現が変動する遺伝子群は、Aβ蓄積とその下流で起こる神経障害の過程に関与する可能性が高い。そこでまず、Aβ蓄積と神経変性に相関して発現が変動する遺伝子を同定するために、主任研究者の確立したAβ神経毒性モデルショウジョウバエを用いた。このモデルでは、脳中枢神経系でヒトAβ42を高発現させ、加齢依存的に神経細胞死を誘導することが出来る。このAβ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、Aβ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。次にこれら遺伝子群がAD患者脳由来の遺伝子共発現ネットワークのどこに集積するかを調べたところ、62個の遺伝子ネットワークのうち12個で有意な集積が見られた。これらのうち6個の遺伝子ネットワークには、これまでのGWAS等でADへの関係が示唆されている遺伝子が有意に集積していた (平成28年度)。

#### 1-2) ADモデルマウス脳における遺伝子発現情報を用いた解析

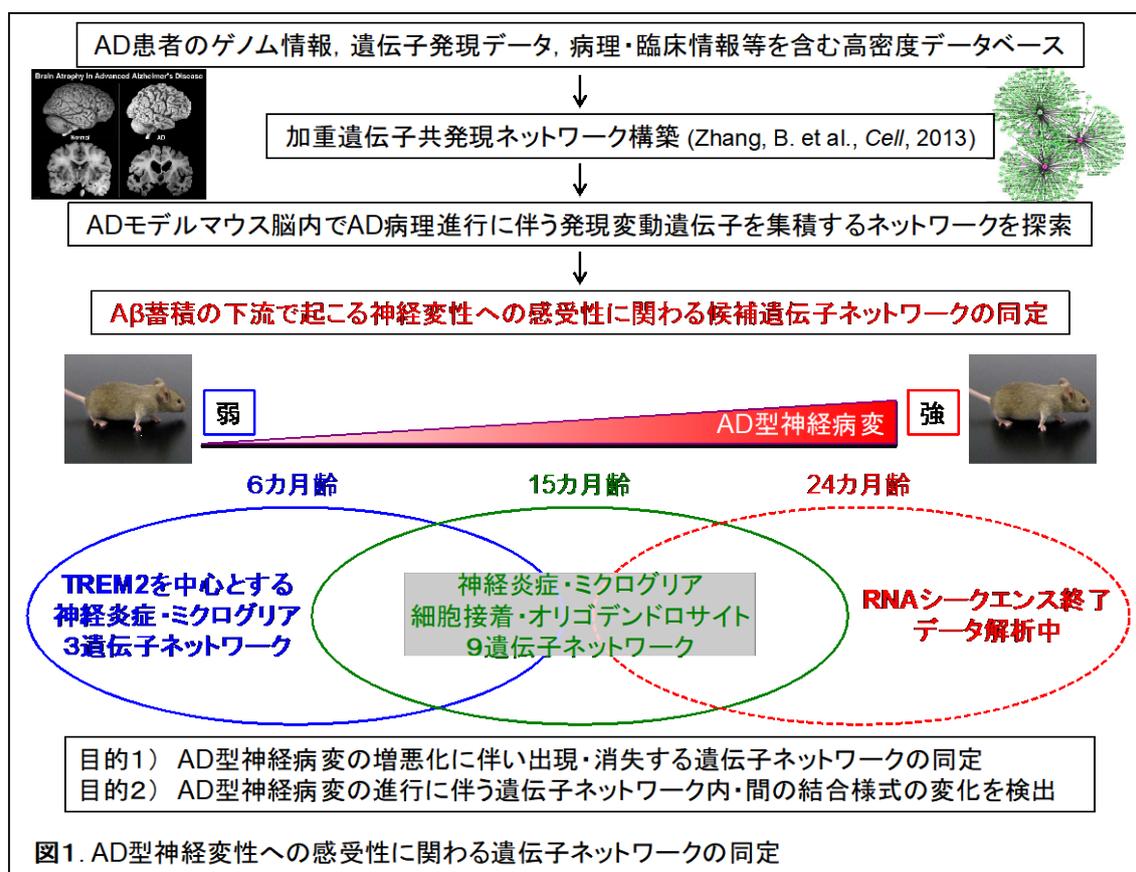
理研より導入したAPPノックインマウス ( $App^{NL-G-F}$  と  $App^{NL}$  マウス; Saito, T., *et al.*, *Nat Neurosci*, 2014) の脳において、Aβ蓄積に伴う遺伝子発現変化を6ヶ月齢、15ヶ月齢、24ヶ月齢で調べた。このモデルマウス脳では、Aβの蓄積、神経炎症、シナプス障害は観察されるものの、顕著な神経変性は見られないことから、AD発症の前～初期段階を模していると考えられている。

平成28年度は、6ヶ月齢マウスの前脳皮質、及び海馬領域においてRNAシーケンス解析を行い、Aβ蓄積に伴い発現が変動する遺伝子を同定した。次にこれら遺伝子群が62個のAD患者脳由来遺伝子共発現ネットワークに集積するかを調べたところ、3個のネットワー

クで有意な集積が見られた (図 1)。興味深いことに、そのうちの 2 個のネットワークは Aβ 神経毒性モデルショウジョウバエを用いた解析でも検出され、新規 AD リスク因子として注目を集めている *TREM2*, *TYROBP* を中心とするミクログリア関連遺伝子群で構成されていた (以下の考察を参照)。

平成 29 年度は、さらに病理の進行した 15 ヶ月齢マウスの前脳皮質、海馬領域、さらに嗅内皮質において RNA シーケンス解析を行い、Aβ 蓄積に伴い発現が変動する遺伝子を同定した。次にこれら遺伝子群が 62 個の AD 患者脳由来遺伝子共発現ネットワークに集積するかを調べたところ、6 ヶ月齢マウスで検出された 3 個のネットワーク (全て神経炎症・ミクログリア関係) に加え、新たに 6 個のネットワーク (神経炎症・ミクログリアに加え、細胞接着やオリゴドンドロサイト関係) で有意な集積が見られた (図 1)。

平成 30 年度は、24 ヶ月齢マウスの前脳皮質、海馬領域、さらに嗅内皮質における RNA シーケンス解析を終了した。次にこれら遺伝子群が 62 個の AD 患者脳由来遺伝子共発現ネットワークに集積するかを調べたところ、6 ヶ月齢、15 か月齢で同定された上記のネットワークに加え、さらに多数の新たなネットワークで有意な集積が見られた (図 1)。



以上の結果から、APP ノックインマウス脳内において、Aβ 蓄積に伴う病態進行を遺伝子

ネットワークの変化として捉えられることが明らかとなった。

## 考察

AD 患者脳由来の遺伝子ネットワーク情報を用い、申請者が開発し、A $\beta$  蓄積に伴う神経細胞死が見られる A $\beta$  神経毒性モデルショウジョウバエ脳サンプルから、12 個の遺伝子ネットワークを抽出した。さらに、A $\beta$  蓄積が引き起こす AD の前～初期段階に見られる病態を模していると考えられる APP ノックインマウスを理研より導入し、6 ヶ月齢脳サンプルから 3 個（全て神経炎症・ミクログリア関係）、15 ヶ月齢脳サンプルから 9 個（神経炎症・ミクログリアに加え、細胞接着やオリゴデンドロサイト関係）、重篤な A $\beta$  病態と神経炎症が見られる 24 ヶ月齢脳サンプルからさらに多数の遺伝子ネットワークを抽出した（図 1）。これらの結果は、A $\beta$  蓄積から神経変性へ向かう過程で、AD 患者脳で検出された遺伝子ネットワークが AD モデル動物の脳内で段階的に惹起されていることを強く示唆している。

今回解析したすべてのタイムポイントで二つの遺伝子ネットワークが共通して検出された。これらの遺伝子ネットワークは *TREM2*, *TYROBP* を中心とするミクログリア関連遺伝子で構成されており、AD 発症過程で見られる A $\beta$  病理像ともよく一致していることから、A $\beta$  蓄積が神経変性を惹起する入り口で働いている可能性が考えられる。これらのネットワークについては、*TREM2*/*TYROBP* の活性化が A $\beta$  またはタウ神経毒性に及ぼす影響を、表現系および遺伝子発現変化の両側面から網羅的に解析した。その結果、A $\beta$  蓄積に対して保護的に働くと考えられる *TREM2*/*TYROBP* シグナルであるが、その慢性的な活性化はシナプスの消失やタウ病理を増悪化させ、結果的に AD 病態を進行させている可能性を見出した (Sekiya, M., et al., *Genome Med*, 2018)。

以下の目的 2 では、1-1) の A $\beta$  神経毒性モデルショウジョウバエ脳の遺伝子発現解析から同定した候補遺伝子ネットワークに着目した。この遺伝子ネットワークには、アストロサイト、神経細胞、血管上皮細胞で働き、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る。また、AD の最大の危険因子である *APOE* 遺伝子も含まれており、予想される生理機能、および AD への関連という両側面から有力な候補と考えた。そこで一次スクリーニングとして、A $\beta$  神経毒性モデルショウジョウバエを用いた検証実験を行った。

### 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 $\beta$  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。

A $\beta$  神経毒性モデルショウジョウバエの遺伝子発現解析情報を用いて同定した複数の候補遺伝子ネットワークのうち、まず神経炎症遺伝子ネットワークについて解析を進め、

TREM2/TYROBP の慢性的な活性化が神経変性を増悪化させることを見出し、論文発表した (Sekiya, M., *et al.*, *Genome Med*, 2018)。次に、非炎症系のネットワークに着目し解析を進めた。この遺伝子ネットワークには、アストロサイト、神経細胞、血管上皮細胞で働き、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る。また、AD の最大の危険因子である *APOE* 遺伝子が含まれることから、AD 発症リスクの側面からも有力な候補遺伝子ネットワークと考えた。

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 $\beta$  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、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 等で AD への関与が示唆されている遺伝子 (AD 関連遺伝子)、及び 2) AD 患者脳と A $\beta$  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検証実験を進める候補遺伝子の抽出を行った。その結果、AD 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。そのうち 3 遺伝子は両者で検出され、これらの遺伝子は特に重要である可能性が示唆された。これまでに、この 3 遺伝子に加えて、AD 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 $\beta$  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、論文発表した (Sakakibara, Y., Sekiya, M., *et al.*, *PLOS Genet*, 2018)。

さらに上記候補遺伝子の中から、ヒト遺伝子 X のショウジョウバエホモログである遺伝子 Y に焦点を当てて解析を進めた。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、最近、その遺伝子多型が AD と非常に類似した臨床症状を呈する加齢性海馬硬化症に関連していることが報告された。また、遺伝子 X のノックアウトマウスでは、心血管系の異常に加え、低血糖症状を呈することが知られている。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病態修飾因子である可能性を示唆している。

これまでに、遺伝子 Y の発現レベルが 10%程度にまで低下しているショウジョウバエ変異体を用いた解析から、1) 寿命の短縮、2) 脳でのグルコース・グリコーゲン量の低下、3) 脳でのエネルギー代謝シグナル経路の変化、4) A $\beta$  神経毒性の顕著な増悪化、5) 加齢性海馬硬化症、および AD で共通して見られる TDP-43 病理の責任遺伝子である *TARDBP* のショウジョウバエの相同遺伝子 *TBPH* の mRNA 発現量上昇、等の結果を得ている (Quan, X., Sekiya, M., *et al.*, 論文投稿準備中, 平成 30 年の研究結果を参照)。以上の結果より、同定した候補遺伝子ネットワークには、遺伝子 Y を含む新たな AD 病態修飾遺伝子が含まれ、さらに創薬標的の候補となる可能性が示唆された。

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) して, A $\beta$  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 $\beta$  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。そのなかでも注目した *遺伝子 X* について shRNA コンストラクトを作成し, 分担研究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培養を用いた電気生理学的解析の準備を進めた。しかし以下に記載したように, shRNA の発現抑制効率が低かったこと, さらに *遺伝子 X* ノックアウトマウスを導入することができたことから, そちらを用いた *in vivo* の解析を優先することとした。

目的 2-3) AD モデルマウスを用い, アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター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との交配による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 遺伝子の中で注目している遺伝子の一つに *遺伝子 X* がある。*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, 最近その遺伝子多型が AD と非常に類似した臨床症状を呈する加齢性海馬硬化症に関連していることが報告された。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病態修飾因子である可能性を示唆している。そこで自治医科大学の村松慎一博士との共同研究により *遺伝子 X* に対する 2 種類の shRNA を脳内投与するための AAV ベクターを作製した。海馬の神経細胞にて *遺伝子 X* をノックダウンするため, 作製した *遺伝子 X* shRNA-AAV ベクターを 8 ヶ月齢マウスの両側脳室に投与し, 投与後 2 ヶ月で脳を採取した。この組織を用い, shRNA の発現抑制効率を確認するために, 海馬から mRNA を抽出し qPCR を行なったところ, 2 種の shRNA のうち 1 系統で弱いものの有意な発現抑制効率が認められた。しかし, 当初の予想よりも効率が低かったためウイルスベクターの脳内投与実験は一時中断した。

一方で, 米国 North Western 大学の McNally 博士より *遺伝子 X* ノックアウトマウス凍結精子を譲渡いただき, そこから個体化と繁殖を行った。このマウスを用い, *遺伝子 X* の機能低下が, 神経炎症, シナプス障害, 神経変性, A $\beta$ ・タウ病理, 行動などにどのような影響を与えるか検討するため, APP ノックインマウスと交配した。得られた APP ノックイン/*遺伝子 X* ノックダウンマウスについて, 予備検討を行いながら, 24 か月齢まで加齢飼育を行うこととした。

平成 29 年度よりこれらマウスの解析を開始した。12 ヶ月齢のマウス脳を用いて免疫染

色を行った結果, APP ノックインマウスでは遺伝子X ノックダウンにより A $\beta$  の蓄積が増加傾向にあったが, グリオーシスともにいずれも差は有意ではなかった。

また, 15 ヶ月齢で予備的に行った水迷路試験において, APP ノックインマウスと比較し遺伝子X ノックダウンで顕著な変化が認められなかったため, 24 ヶ月齢での試験を行うこととした。2019 年 2 月以降から順次, APP ノックイン/遺伝子X ノックダウンマウス, およびコントロールマウスの認知機能評価 (モリス水迷路試験) を開始した。さらに, 行動実験後に採取した脳組織を用いて組織学的解析や遺伝子発現解析を進める。

## 平成 30 年度について

### **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**

#### 1-2) AD モデルマウス脳における遺伝子発現情報を用いた解析

平成 30 年度は, 24 ヶ月齢マウスの前脳皮質, 海馬領域, さらに嗅内皮質における RNA シーケンス解析を終了した。次にこれら遺伝子群が 62 個の AD 患者脳由来遺伝子共発現ネットワークに集積するかを調べた。その結果, 6 ヶ月齢, 15 か月齢で同定された上記のネットワークに加え, さらに多数の新たなネットワークで有意な集積が見られた (図 1)。以上の結果は, APP ノックインマウス脳内において, A $\beta$  蓄積に伴う病態進行を遺伝子ネットワークの変化として捉えられることを強く示唆している。現在, 6, 15, 24 ヶ月齢におけるデータを全て統合し詳細な解析を進め, 論文としてまとめている (Sekiya, M., *et al.*, 論文準備中)。今後は, 遺伝子発現の結果をタンパク質レベルで確認し, ネットワークの脳内での変動を免疫染色法により可視化しつつ, 検証実験を行う遺伝子を絞り込む。

### **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 $\beta$ 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。

平成 30 年度は, ヒト遺伝子X のショウジョウバエホモログである遺伝子Y に着目し解析を進めた。遺伝子Y の発現レベルが 10%程度にまで低下しているショウジョウバエ変異体を用いた解析から, 1) 寿命の短縮, 2) 脳でのグルコース・グリコーゲン量の低下, 3) 脳でのエネルギー代謝シグナル経路の変化, 4) A $\beta$  神経毒性の顕著な増悪化, 5) 加齢性海馬硬化症および AD で共通して見られる TDP-43 病理形成の責任遺伝子 *TARDBP* のショウジョウバエ相同遺伝子 *TBPH* の mRNA 発現量の上昇, 6) *TBPH* 発現量の上昇は, A $\beta$  神経毒性や遺伝子Y 欠損によるストレス等に対する神経保護機能を持つ生理的反応の可能性, 等を見出している (Quan, X., Sekiya, M., Sakakibara, Y., *et al.*, 論文投稿準備中)。以上の

結果より、*遺伝子X*が新たなAD病態修飾遺伝子、また創薬標的の候補となることが示唆された。

目的2-3) ADモデルマウスを用い、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター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との交配による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。

現在までに、米国North Western大学のMcNally博士より譲渡された*遺伝子X*ノックアウトマウスを用い、*遺伝子X*の機能低下が、神経炎症、シナプス障害、神経変性、 $A\beta$ ・タウ病理、行動などにどのような影響を与えるか検討するため、APPノックインマウスと交配し24ヶ月齢まで加齢飼育をしてきた。平成30年度の2月以降から順次、APPノックイン/*遺伝子X*ノックダウンマウス、およびコントロールマウスの認知機能評価(モリス水迷路試験)を開始し、現在実験を進めている。行動実験後に採取した脳組織を用いて組織学的解析や遺伝子発現解析を進める。

加えてAPPノックインマウスの情動・認知機能の加齢変化も解析し、1) これらマウスでは情動系の変化が認知機能低下に先立って出現すること(Sakakibara, Y., *et al.*, *BMC Neurosci*, 2018), さらに2) 24ヶ月齢の時点で明らかな認知機能低下が見られ、それには $A\beta$ 病理の形成と慢性的な神経炎症が関わることを確認し(Sakakibara, Y., *et al.*, *BMC Neurosci*, 2019), 2報の論文にまとめた。

#### D. 考察と結論

本研究で同定を進めている、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は、従来の $A\beta$ やタウを中心とする病態解析とは異なる角度から、AD型神経変性の病態機序を明らかにできると考えている。この手法により、AD発症機序の中でも不明な点の多い、 $A\beta$ 蓄積から細胞死に至る過程に関わ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ADの病態修飾因子やリスク因子の発見、さらにバイオマーカー開発に貢献できると考えられる。

また本研究の結果は、神経細胞死の過程に介入できる全く新たな治療法開発につながる可能性もある。具体的には、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、その活性を調節することで神経変性を遅延、また抑止できないかと考えており、システム生物学の手法を利用して、ネットワーク全体を制御する創薬標的遺伝子の同定を試みている。本研究期間は、 $A\beta$ 神経毒性モデルショウジョウバエの遺伝子発現情報を用いて同定した遺伝子ネットワークの検証を進めつつ、ADモデルマウスからの情報を用いて有力な遺伝子ネットワークを同定した。今後、それらの遺伝ネットワークの検証作業を進め、バイオマーカーと創薬標的の同定につなげる。

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

(主任研究者・飯島)

平成28年度

- 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) **Biochem Biophys Res Commun**, 478 (2):929-34, doi:10.1016/j.bbrc.2016.08.053.

平成29年度

- 1) Ca<sup>2+</sup>/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**, 162 (5): 335-342
- 2) 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) **Dev Cell**, 41 (6) 652-664.
- 3) Knockdown of *wfs1*, a fly homolog of Wolfram syndrome 1, in the nervous system increases susceptibility to age- and stress-induced neuronal dysfunction and degeneration in *Drosophila*. Sakakibara, Y., Sekiya, M., Fujisaki, N., Quan, X., & Iijima, K.M. (2018) **PLOS Genet**, 14 (1):e1007196. doi:10.1371/journal.pgen.1007196.
- 4) Integrated biology approach reveals molecular and pathological interactions among Alzheimer's A $\beta$ 42, Tau, TREM2, and TYROBP in *Drosophila* models. Sekiya, M., Wang, M., Fujisaki, N., Sakakibara, Y., Quan, X., Ehrlich, M.E., De Jager, P.L., Bennett, D.A., Schadt,

E.E., Gandy, S., Ando, K., Zhang, B., & Iijima, K.M. (2018) **Genome Med**, 10 :26. doi: 10.1186/s13073-018-0530-9.

- 5) Roles of tau pathology in the locus coeruleus (LC) in age-associated pathophysiology and Alzheimer's disease pathogenesis. (Review), Satoh, A. & Iijima, K.M. (2019) **Brain Res**, 1702 :17-28, pii: S0006-8993 (17)30562-0, doi: 10.1016/j.brainres.2017.12.027.
- 6) 神経細胞内のミトコンドリア局在異常と認知症 (総説) 岡未来子, 飯島浩一, 安藤香奈絵, **実験医学**, 認知症: 発症前治療のために解明すべき分子病態は何か? Vol. 35 No.12 p182-p185.

平成30年度

- 1) Cognitive and emotional alterations in *App* knock-in mouse models of A $\beta$  amyloidosis. Sakakibara, Y., Sekiya, M., Saito, T., Saido, T.C. & Iijima, K.M. (2018) **BMC Neurosci**, 19 :46, doi: 10.1186/s12868-018-0446-8.
- 2) S6K/p70S6K1 protects against tau-mediated neurodegeneration by decreasing the level of tau phosphorylated at Ser262 in a *Drosophila* model of tauopathy. Chiku, T., Hayashishita, M., Saito, T., Oka, M., Shinno, K., Ohtake, Y., Shimizu, S., Asada, A., Hisanaga, S., Iijima, K.M., & Ando, K. (2018) **Neurobiol Aging**, 71 :255-264, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.07.021.
- 3) Amyloid- $\beta$  plaque formation and reactive gliosis are required for induction of cognitive deficits in *App* knock-in mouse models of Alzheimer's disease. Sakakibara, Y., Sekiya, M., Saito, T., Saido, T.C. & Iijima, K.M. (2019) **BMC Neurosci**, 20 :13, doi: 10.1186/s12868-019-0496-6.
- 4) 飯島浩一, 関谷倫子 (2018) アルツハイマー病の発症機序研究～TREM2/TYROBP から見えてきたアルツハイマー病発症機序～ **Animus** 2018 No.96 p.13-17

(分担研究者・木村)

平成29年度

- 1) Age-dependent changes in synaptic plasticity enhance tau oligomerization in the mouse hippocampus. Kimura, T., Suzuki, M. & Akagi, T. (2017) **Acta Neuropathol Commun**, 5 :67, doi: 10.1186/s40478-017-0469-x.
- 2) Polyunsaturated fatty acid deficiency during neurodevelopment in mice models the prodromal state of schizophrenia through epigenetic changes in nuclear receptor genes. Maekawa, M.,

Watanabe, A., Iwayama, Y., Kimura, T., Hamazaki, K., Balance, S., Oba, H., Hisano, Y., Nozaki, Y., Onishi, T., Toyoshima, M., Shimamoto, C., Iwamoto, K., Bundo, M., Osumi, N., Takahashi, Y., Takashima, A. & Yoshikawa, T. (2017) **Transl Psychiatry**, 7 :e1229, doi: 10.1038/tp.2017.182.

- 3) Mutation-induced loss of APP function causes GABAergic depletion in recessive familial Alzheimer's disease: analysis of Osaka mutation-knockin mice. Umeda, T., Kimura, T., Yoshida, K., Matsuyama, S., Takao, K., Sakai, A., Yamashita, Y., Fujita, Y., Suzuki, M., Miyakawa, T., Takashima, A., Morita, T., Mori, H. & Tomiyama, T. (2017) **Acta Neuropathol Commun**, 5 :59, doi: 10.1186/s40478-017-0461-5.
- 4) Microtubule-associated tau contributes to intra-dendritic trafficking of AMPA receptors in multiple ways. Suzuki, M. and Kimura, T. (2017) **Neurosci Lett**, 653 :276–282, doi: 10.1016/j.neulet.2017.05.056.

## 2. 学会発表 (主任研究者)

平成28年度

### 国際学会発表

- 1) Enhanced ER protein quality control selectively targets subjected to  $\eta$ -site processing pathways and reduces amyloid- $\eta$  and amyloid- $\beta$ . Sekiya, M. & Iijima, K.M., 発表形式：ポスター，発表日：2017年3月31日，AD/PD2017，2017年3月29日～4月2日，Vienna, Austria

### 国内学会発表

- 1) The mechanism underlying neurodegeneration in a *Drosophila* model of Wolfram syndrome，榊原 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) The mechanism underlying neurodegeneration in a *Drosophila* model of Wolfram syndrome，藤崎 尚規，榊原 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

平成29年度

### 国際学会発表

- 1) Ectopic expression of Human TREM2/TYROBP in *Drosophila* glial cells negatively affects transcriptional programs induced by A $\beta$ 42 and worsens Tau-mediated neurodegeneration. Sekiya, M., Wang, M., Fujisaki, N., Sakakibara, Y., Erhrich, M., Schadt, E., Gandy, S., Ando, K., Zhang, B. & Iijima, K.M., 発表形式：ポスター，発表日：2017年4月1日，AD/PD2017,

2017年3月29日～4月2日, Vienna, Austria

- 2) Iijima, K.M. Deciphering Alzheimer's Disease Pathogenesis from Gene Co-expression Network\_Cutting Edge of Aging Research, The 13th International Symposium on Geriatrics and Gerontology, 2018年2月3日, Obu, Aichi, Japan

#### 国内学会発表

- 1) システム生物学による A $\beta$ , tau, TREM2/TYROBP の遺伝子相互作用解析, Sekiya, M., Wang, M., Fujisaki, N., Sakakibara, Y., Zhang, B. & Iijima, K.M., 発表形式: ポスター, 発表日: 2017年11月24日, 第36回日本認知症学会学術集会, 2017年11月24日～11月26日, 金沢市
- 2) 転写因子 *NPAS3/trh* の欠損が AD 型神経変性を増悪化させるメカニズムの解析, Fujisaki, N., Sakakibara, Y., Sekiya, M. & Iijima, K.M., 発表形式: ポスター, 発表日: 2017年11月24日, 第36回日本認知症学会学術集会, 2017年11月24日～11月26日, 金沢市
- 3) Neuroprotective roles of Toll-like receptors in glial cells during aging in *Drosophila*, Sakakibara, Y., Sekiya, M. & Iijima, K.M., 発表形式: ポスター, 発表日: 2017年12月8日, 第40回日本分子生物学会年会, 2017年12月6日～12月9日, 神戸市
- 4) Protective roles of *SUR*, a fly homologue of Sulfonylurea receptors, *ABCC8/SUR1* and *ABCC9/SUR2*, against age-associated neurodegeneration in *Drosophila*, Quan, X., Fujisaki, N., Sakakibara, Y., Sekiya, M. & Iijima, K.M., 発表形式: ポスター, 発表日: 2017年12月8日, 第40回日本分子生物学会年会, 2017年12月6日～12月9日, 神戸市

#### 平成30年度

#### 国際学会発表

- 1) Studying mechanisms underlying hippocampal sclerosis of aging in *Drosophila*, Iijima, KM Quan, X Sakakibara, Y Sekiya, M, ADPD2019, 2019/3/27-28, Lisbon, Portugal
- 2) Roles of EDEM family proteins in APP metabolism, Sekiya, M Iijima, KM, ADPD2019, 2019/3/27-28, Lisbon, Portugal

#### 国内学会発表

- 1) 生物学的手法を用いてアルツハイマー病発症機序を読み解く, 飯島 浩一, 第91回日本生化学会大会 シンポジウム 1S10m「多様性に富むアルツハイマー病発症リスク: 最適化先制医療への最前線」, 2018/9/24, 京都市
- 2) 早期診断から先制治療に向けたアルツハイマー病に対する新たな研究アプローチ, 飯島 浩一, 第41回日本分子生物学会年会 セッションチェア、オーガナイザー,

2018/11/30, 横浜市

- 3) A $\beta$ アミロイドーシスモデルである *App* ノックインマウスにおける情動および認知機能に関する行動解析, 榊原 泰史 関谷 倫子 斎藤 貴志 西道 隆臣 飯島 浩一, 第41回日本神経科学大会, 2018/7/27, 神戸市
- 4) 加齢性海馬硬化症発症機序の解明, 権 秀明 関谷 倫子 榊原 泰史 飯島 浩一, 第41回日本神経科学大会, 2018/7/29, 神戸市
- 5) 加齢性海馬硬化症モデルショウジョウバエの解析, 飯島 浩一 権 秀明 榊原 泰史 関谷 倫子, 第37回日本認知症学会, 2018/10/12, 札幌市
- 6) 加齢性海馬硬化症発症機序の解明, 権 秀明 榊原 泰史 飯島 浩一 関谷 倫子, 第11回 NAGOYA グローバルリトリート, 2019/2/15, 大府市

#### 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