

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09840

研究課題名(和文) 精神症状(BPSD)を主体とする新規PS1変異アルツハイマー病モデルマウスの開発

研究課題名(英文) Establishment of AD model mice harboring novel pathogenic PS1 mutation presenting "Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia"

研究代表者

川又 純(Kawamata, Jun)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60360814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：精神症状の強い家族性AD患者に認められた、新規のプレセニン1の1アミノ酸欠損の変異を導入したTgマウス(Psen1 delta p.277)を、CRISPR/Cas9法を用い作製した。作製の過程で、200回以上のインジェクションを行ったが、死産、または出生してもすぐに死亡する個体が多く、生存する個体が得られなかった。そのため、ガイドRNA(crRNA)の配列を再設計するなどして、生存する変異個体を得、3年目の終わりに繁殖が可能となった。期間内に変異マウスを作製することができたが、解析については、引き続き研究を継続し、変異個体の加齢を待ち、神経病理学および行動異常の有無などの検討を行う。

研究成果の概要(英文)：We report the familial Alzheimer pedigree carrying a novel mutation, three bases deletion, which results in one amino acid deletion of PS1 (Psen1 delta p.277). To establish the adequate animal model of AD especially presenting BPSD-like symptoms, we planned to make the transgenic mice harboring the mutation using CRISPR/Cas9 method. Even after injecting more than 200 times, no living mutant mouse was obtained. Remodeling guide RNA(crRNA) results in successfully establishing the transgenic mice, which will enable the neuropathological and behavioral analysis after aging of these transgenic mice, both heterozygote and possibly homozygote.

研究分野：臨床神経学

キーワード：アルツハイマー病 BPSD プレセニン1 トランスジェニックマウス CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

急速に高齢化する我が国で、認知症（特にアルツハイマー病）は社会的にも経済的にも大きな問題であり、加えて実際の在宅介護や施設の現場では、患者の認知機能障害以上にBPSD：認知症の行動・心理症状（Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia）が大きな負担となっている。

多くの神経変性疾患と同様に、アルツハイマー病(AD)の研究も家族性ADを研究することで、原因遺伝子同定に至り、背景となる分子生物学的知見が近年急速に集積されている。一方、臨床の場では、35年の歴史を持つコリン仮説に基づくアセチルコリンエステラーゼ阻害薬：AChEIが数種類開発され使用され一定の効果をj得ている。臨床の現場で、これらのAChEIはいわゆる中核症状（認知機能障害）の改善も期待される一方、介護の場での困難さの原因となっているいわゆる周辺症状（BPSD）の改善を期待されて投与されることも多い。BPSDのコントロールの可否が今後の保険医療政策を左右しかねない問題でありながら、暴力、暴言、徘徊、抑うつ、不安、幻覚、妄想などのBPSDの病態機序の分子生物学的研究については、これまで重点的に行われては来なかった。

今回我々は家族歴のある精神症状が極めて強い家族性ADにおいて、隣接した欠失と点変異を併せ持つ特異な新規プレセニン1遺伝子変異を同定した。発端者の母親は精神疾患と診断され、40代前半に精神病院で死亡。発端者も37歳時に精神症状を来し、統合失調症と診断されていた。我々に診察時（43歳）には、認知機能障害と共に罪業妄想、抑うつなどが強く、一般病棟での管理が困難な状況であった。

これまでの研究から一番頻度の高いADの原因遺伝子であるプレセニン1において、突然変異の部位によって様々な臨床症状をきたすことが知られている。例えば、エキソ

ン9をスキップするDelta9変異では痙性対麻痺をきたし、Cotton wool plaqueと呼ばれる特異な病理像を示すことが知られている。我々が今回同定した特異な新規変異は、これまで遺伝子変異が同定・報告された家族性ADの中でも特に精神症状に強く関連した変異だと考えられる。

これまで、ADの良いモデルマウスの作製は困難を極めている。APP遺伝子変異やプレセニン1遺伝子変異を組み込んだトランスジェニックマウスは、病理学的所見および行動解析において、ヒトのADを十分に反映したモデルマウスとしては確立されていない。現在の広く使用されているADのモデルマウスは、APP変異遺伝子およびプレセニン1変異遺伝子の重複過剰発現のトランスジェニックマウスであり、二重変異であるがゆえに、その解釈を複雑にしている。

今回、我々が作製を試みる新規プレセニン1遺伝子変異のトランスジェニックマウスにおいても上記と同様の困難さが予想されるが、特に本変異は神経細胞死に伴い（ニューロトランスミッターの低下が想定される）認知機能障害のみならず、（ニューロトランスミッターの亢進が想定される）強い精神症状を来すことから、アセチルコリン、ドパミン、セロトニン、ノルアドレナリン系などのニューロトランスミッターの変化による行動異常が認められる可能性が高いと推測している。

行動解析にて異常が検出された場合は、BPSDの病態生理・病態機序の解明につながりうる知見を得ることができると考えられる。それによりBPSDに対する新たな作用を持つ薬剤の開発などに応用可能性を持つ。

さらには、神経変性疾患領域のみならず、幾つかの仮説はあるものの確固たる分子生物学的な病態機序が明らかになっていないいわゆる内因性精神疾患（統合失調症など）

の研究に応用が可能なモデルとなる可能性も秘めていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究で我々は、強い精神症状を呈した新規プレセニン遺伝子変異を導入したトランスジェニックマウスを作製・行動解析・免疫組織学的検討を加えることで、BPSDの症状発現に關与する神経伝達物質系や関連蛋白などの同定を試み、今後のより良いBPSD治療薬の開発への足がかりとすることを目的とする。

BPSDの分子生物学的機序を研究するためのトランスジェニックマウスの作製を目指すにあたり、今回我々が見出した変異は、ADの中核症状である認知機能低下を来すと同時に、はっきりとした強い精神症状を呈することから、この目的に極めて適した変異であると考えられる。この変異を *in vitro* および *in vivo* でのモデルに組み込むことで、BPSDの発症に關与する神経伝達系や関連蛋白などの同定を試み、さらには今後のより良いBPSD治療薬の開発への足がかりとすることを本研究の目的としている。

3. 研究の方法

これまで多くのADの病態を反映したトランスジェニックマウスの作製が試みられている。今回、我々は、2013年に開発されたCRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9) を用いたトランスジェニックマウスの作製と目指すこととした。これは、APPやPS1がADの原因遺伝子として、報告された当時に試みられた変異ヒト遺伝子の導入し、大過剰の発現から、表現型を起こさせる方法に比して、マウスの遺伝子を変異させることで、より患者で実際に起こっている病態を発現させる環境に近いと言える。

欠点としては所謂 Loss of function による

発症する劣性遺伝形式をとる疾患のモデルとしては有利である反面、Gain of function による発症が想定される家族性常染色体優性遺伝形式をとる神経変性疾患では、十分な異常たんぱく質の蓄積が、マウスの比較的短い生存期間で認めにくいことが想定されることである。そのことは、神経病理学的検討が困難となる可能性を想定させるが、特に変異ホモ接合体では、マウスの正常プレセニン1が異常プレセニン1を代償することがないため、行動異常などではむしろ来しやすいと考えた。

トランスジェニックマウスの作製については、技術的に熟達した山形大学医学部メディカルサイエンス推進研究所遺伝子実験センター（以下センター）の中島修教授の技術的協力の元に作製を行った。ガイドRNA(crRNA)の配列の設計、オリゴRNA/ドナーDNAの設計についても、技術的なを相談しながら、行われた。それらを使用し、センターで、ガイドRNA(crRNA)を介したDNA切断活性の *in vitro* での確認をした。その後、マウス受精卵前核へのCrispr/Cas9 mRNA/ss donorDNAの導入を行った。

4. 研究成果

本研究のTGマウス作製については、記述的に熟練した山形大学医学部メディカルサイエンス推進研究所遺伝子実験センターの協力の元に作成がなされた。CRISPR/CAS9法で、第一回目を作製（インジェクション後、162個の生き残り胚を戻し、帝王切開で22匹を得たが、3匹が生後まもなく死亡）生存している個体については、遺伝子変異の導入が確認されなかった。第二回目も作製（インジェクションを後、93個の生き残り胚を戻し、2匹帝王切開で生まれたが1匹死亡）されたが、変異を含んだ個体を作製できなかった。CRISPR/CAS9法に使用されるガイドRNAの再設計を行い、第3回は、卵にハイブリッド系

(BDF1)も用いたが、帝王切開して得た 25 匹中 18 匹が尾が短く、蘇生できず、死亡。B6 の卵を用いた系でも同様に、生きた個体を得ることができなかった。

最終的には 3 年目の終りに、上記の BDF1 の卵を用いての生存個体を 3 体得ることができた。BDF1 バックで繁殖を行っており、今後、行動評価や病理評価を行っていく予定である。トランスジェニックマウス作製が困難であったことから、致死である可能性が示唆されているホモ個体であるが、ヘテロ個体を掛け合わせ作製を試み、行動異常の検討を行うと同時に、加齢に伴う神経病理学的な変化も検討を予定している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1: Howard JF Jr, Utsugisawa K, Benatar M, Murai H, Barohn RJ, Illa I, Jacob S, Vissing J, Burns TM, Kissel JT, Muppidi S, Nowak RJ, O'Brien F, Wang JJ, Mantegazza R; REGAIN Study Group. (collaborators: Kawamata J,他) Safety and efficacy of eculizumab in anti-acetylcholine receptor antibody-positive refractory generalised myasthenia gravis (REGAIN): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. Lancet Neurol. 2017 Dec;16(12):976-986. doi:10.1016/S1474-4422(17)30369-1. 査読有

2: Yamamoto D, Imai T, Tsuda E, Hozuki T, Yamauchi R, Hisahara S, Kawamata J, Shimohama S. Effect of local cooling on excitation-contraction coupling in myasthenic muscle: Another mechanism of ice-pack test in myasthenia gravis. Clin Neurophysiol. 2017 Nov;128(11):2309-2317. doi: 10.1016/j.clinph.2017.08.030. 査読有

3: Iwahara N, Hisahara S, Kawamata J, Matsumura A, Yokokawa K, Saito T, Fujikura M, Manabe T, Suzuki H, Matsushita T, Suzuki S, Shimohama S. Role of Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) in Altering Activated Microglia Phenotype in APP^{swe}/PS1^{dE9} Mice. J Alzheimers Dis. 2017;55(3):1235-1247. 査読有

[学会発表](計 1 件)

J. Kawamata, D. Yamamoto, T. Matsushita, A. Matsumura, S. Suzuki, S. Hisahara, S. Shimohama, E. Tsuda, R. Yamauchi
Decision making of using invasive mechanical ventilation in patients with amyotrophic lateral sclerosis in Sapporo area
XXIII World Congress of Neurology
WCN2017 (国際学会)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

川又 純 (KAWAMATA, Jun)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 6 0 3 6 0 8 1 4

(2)研究分担者

下濱 俊 (SHIMOHAMA, Shun)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 6 0 2 3 5 6 8 7

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()