

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18871

研究課題名(和文) 免疫応答パスウェイによるA β 貪食制御機構の解明

研究課題名(英文) Genome wide screening of genes involved in Abeta phagocytosis by CRISPR/Cas9 system

研究代表者

堀 由起子(Hori, Yukiko)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：80610683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)に特徴的な老人斑はamyloid peptide(A β)を主要構成成分とする。孤発性ADではA β クリアランスの低下が報告されていることから、クリアランス機構の解明は重要である。本研究ではクリアランス機構の中でもA β 取り込み過程に着目し、CRISPR/Cas9を用いたゲノムワイドスクリーニングにより新規関連遺伝子を探索した。スクリーニング系を構築し、A β 取り込みに関わるいくつかの候補遺伝子および候補細胞機能を見出した。また、ADリスク因子がA β 取り込み制御を介してAD病態形成に寄与する可能性を示した。以上の結果からA β クリアランス機構の一端を解明できたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by the deposition of senile plaques, which are composed of amyloid peptide (A β). As rate of A β clearance from the brain is impaired in sporadic AD cases, understanding the molecular mechanism of A β clearance is important. In this study, we have performed the genome-wide screening for A β uptake ability using CRISPR/Cas9 system, and established the validation method in Cas9 knockin mouse. Using these strategies, we have identified several genes and cell function involving A β uptake. Additionally, our data indicate that one of the known AD risk genes may exert effect by A β uptake pathway.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脳神経疾患 神経科学 アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

(1)

アルツハイマー病(AD)の特徴的な病理学的所見の一つに、Amyloid β peptide ($A\beta$)を主要構成成分とする老人斑が挙げられる。これまでに、常染色体優性遺伝形式を示す家族性ADに連鎖する変異の研究から、これらの家族性AD変異が $A\beta$ 産生量の上昇あるいは凝集性の亢進をもたらすことが明らかになっている。またAD発症を予防する遺伝子バリエーションは $A\beta$ 産生を抑制することが報告されており、これらの知見から $A\beta$ の凝集・蓄積がAD発症を引き起こすと考えられている。このことは、脳内における $A\beta$ 量制御の重要性を示唆している。

(2)

脳内 $A\beta$ 量は、産生とクリアランスの均衡によって制御されていると考えられている。前述の通り、いくつかの家族性AD変異は $A\beta$ 産生量を上昇させることによって、この均衡が崩れAD発症に至る。一方、ADの大部分を占める孤発性ADでは、 $A\beta$ 産生ではなく脳内からの $A\beta$ クリアランスの異常が報告されており、クリアランス機能低下による脳内 $A\beta$ 量の制御不全がAD発症の一因と考えられている。このことから、 $A\beta$ クリアランス機構の解明が必要であると考えられるが、今までのAD研究では家族性AD変異が重点的に解析されてきた経緯もあり、孤発例におけるクリアランス機構についての知見は乏しい。特に、中枢神経系を構成する神経やグリアといった細胞が、 $A\beta$ クリアランス機構においてどのような役割を果たしているかを明らかにすることが求められている。

2. 研究の目的

(1)

クリアランス経路については、血液脳関門を介した排出や酵素による分解などの経路が知られている。加えて、AD患者脳において老人斑の周囲にグリア細胞が集積するグリオーシスが認められることから、障害される神経細胞だけでなくアストロサイト、ミクログリアが $A\beta$ に対し反応することが知られている。これらの細胞内には $A\beta$ 陽性顆粒が検出されることから、細胞による $A\beta$ 貪食がクリアランスに寄与する可能性も考えられる。

(2)

一方で、近年の孤発性AD患者のゲノムワイド関連解析から、AD発症リスクとしていくつかのエンドサイトーシスに関連する遺伝子が報告された。また、いくつかのADリスク因子は $A\beta$ 貪食を制御する可能性も報告されている。これらの知見から、 $A\beta$ クリアランス機構の中でも細胞による $A\beta$ 貪食機構がAD病理形成に重要な過程であると考えられた。しかしその包括的な理解は得られてい

いたため、申請者は $A\beta$ 取り込み・貪食過程に関与する新規遺伝子の網羅的探索・同定を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1)

$A\beta$ 貪食に関わる新規遺伝子の網羅的スクリーニングのために、CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集技術と次世代シーケンサーを利用したゲノムワイドのノックアウトスクリーニング系を構築した。Cas9恒常発現細胞による蛍光標識 $A\beta$ 取り込みを評価する系において、gRNA発現レンチウイルスライブラリーにより $A\beta$ 取り込み過程が影響を受けた細胞を回収し、次世代シーケンサーにより細胞集団中のgRNAを決定する手法を用いた。

(2)

前述した一次スクリーニングにより得られた遺伝子群について統計解析、パスウェイ解析、インタラクトーム解析を行った。パスウェイ解析からは細胞機能が、インタラクトーム解析からは注目する遺伝子群と相互作用マップにおいて距離的に近傍の遺伝子群が得られるため、それぞれの解析から得られる遺伝子群について個別にgRNAを設計、 $A\beta$ 取り込み能力について再評価した。

4. 研究成果

(1)

スクリーニングから得られた候補分子は、最終的にその機能を*in vivo*で評価する必要がある。そのための実験手法として、Cas9ノックインマウス脳内にレンチウイルスを用いてgRNAを導入し、標的分子をノックアウトすることを考えた。この実験系確立のために、まず*in vitro*で作動確認されたBACE1に対するgRNAを用い検討を行った。BACE1は $A\beta$ 産生経路の律速段階を担う切断酵素であり、今後の候補分子に対する*in vivo*検討においては比較対照としても用いることができる。

Cas9ノックインマウスはZhangらにより開発されたもので、Rosa26遺伝子座にCAGプロモーター制御下でCas9が恒常的に発現しているマウス(Platt et al, Cell 2014)を用いた。本マウスの片側海馬に対し、BACE1 gRNAを発現するレンチウイルスをインジェクションした。海馬におけるBACE1発現を免疫組織化学的に検討したところ、コントロールgRNAレンチウイルスをインジェクションした反対側海馬と比較し、BACE1 gRNA発現によりBACE1発現量が減少することが明らかになった(図1)。このことから、Cas9ノックインマウスを用いた*in vivo*実験系が確立できたと考えられる。

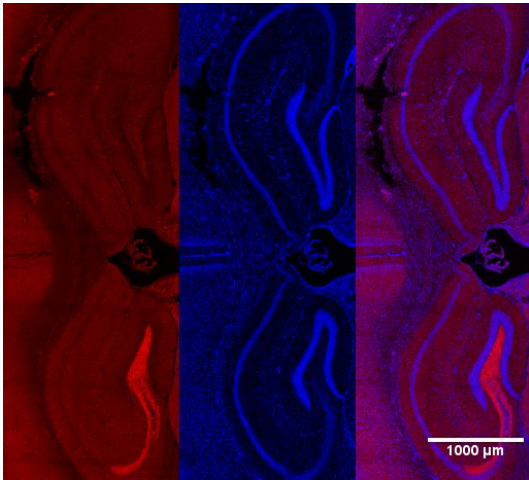


図1 Cas9 ノックインマウスにおける BACE1 のノックアウト (赤: BACE1、青: DAPI) 右海馬 (図上側) には BACE1 gRNA を、左海馬 (図下側) にはコントロール gRNA を発現させた

(2)

β 取り込み過程に関連する分子のスクリーニングにおいては、以下のように解析・評価し、研究を進めた。

2nd スクリーニングに進める候補遺伝子の選別は、1st スクリーニングの統計解析の結果から、p 値から影響度が大きいと推測される遺伝子、パスウェイ解析 (ORA) から推測される候補細胞機能に対して影響度の大きい遺伝子群、インタラクトーム解析から推測される分子相互作用ネットワークの中心にいる遺伝子群、の3つの解析・評価に基づいて行った。表 1、2 にはパスウェイ解析の結果を示す。

取り込み低下群の統計値のパスウェイ解析により得られた細胞機能

phosphatidylinositol-3-phosphate binding
endosome organization
carboxypeptidase activity
proteasome regulatory particle
detection of bacterium
detection of other organism

表 1

パスウェイ解析の結果 (取り込み低下群)

取り込み増加群の統計値のパスウェイ解析により得られた細胞機能

defense response to Gram-negative bacterium
autophagosome
positive regulation of lipopolysaccharide-mediated signaling pathway
regulation of cell-cell adhesion mediated by integrin
regulation of dendritic spine development

表 2

パスウェイ解析の結果 (取り込み増加群)

からは上位の p 値を示す遺伝子もしくは遺伝子群、についてはインタラクト

ム中における既知 AD リスク因子との距離に基づく選考から上位の遺伝子群を選択し、候補遺伝子とした。

これらの候補遺伝子について個別に gRNA 発現レンチウイルスベクターを構築し、スクリーニングと同様の評価系で β 取り込みにおける効果の再現が得られるかを確認した。その結果、同じ傾向を示すいくつかの遺伝子を得たものの、有意な再現性は得られなかった。

から得られた候補遺伝子のうち、有意ではないものの同様の傾向を示した遺伝子群の中には Arl10 や Dock3 がある (図 2)。特に Dock3 は脳で特異的に発現が高い細胞骨格に関わる遺伝子であり、これらの病理学的な役割について改めて解析する価値があると考えられる。その他、パスウェイ解析からは Slc11a1 や Apoc3 が得られている (図 2)。Apoc3 は、AD において最も強力なリスク因子として知られる ApoE と同じ Lipoprotein に属することから、これらが共通して β 取り込みに寄与している可能性も考えられ興味深い。個別に詳細な解析を進める価値があると考えられる。

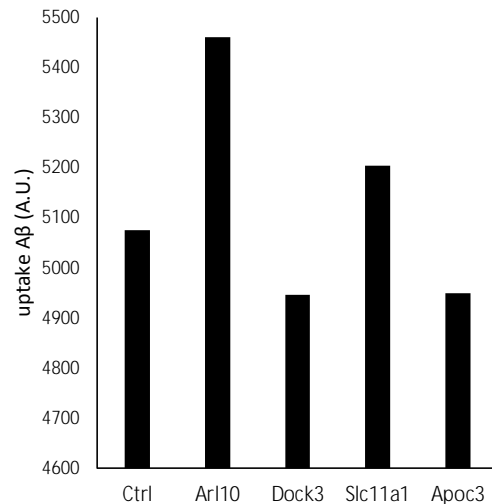


図 2 2nd スクリーニングの代表的な結果

(3)

本スクリーニングにおいては、β に対する特異的な受容体候補分子の同定も可能であると考えて研究を進めていた。しかし実際には、そのような受容体候補分子の同定に至ることができなかった。この理由としては2つ考えられる。1つ目は、(a) β 以外にもより広範なりガンドと相互作用する受容体分子が、β 貪食にも強く関与している可能性である。β 特異的取り込みであることを指標に検出した本スクリーニングでは、このような受容体分子は検出できない。2つ目は、(b) 複数の受容体が共役して β 取り込みに関与している可能性である。実際に、β と相互作用

する受容体がいままで数多く報告されていることはこの可能性を支持しており、一遺伝子ずつ介入する今回のスクリーニング系では検出力が不足したかもしれない。いずれにおいても、A β 取り込み特異的な受容体が単一で存在するという仮定に対しては否定的な結果といえる。

これらの理由を鑑みると、スクリーニング系や A β 取り込み評価系の修正が必要かもしれない。一方で、もし後者の (b) が理由であった場合は、複数の分子の効果を同時に評価することが必須であるため、パスウェイ解析や インタラクトーム解析から得られた結果は、統計的有意差の順位より優れた検出力を有していると考えられ、有用な解析手法であると思われる。今後、スクリーニング系や評価系などの実験系の修正を行ったうえで (b) の解析をすることで、(b) のような候補受容体分子にも迫ることができると推測され、今後の検討課題と考える。

(4)

インタラクトーム解析結果から、いくつかの AD リスク因子と A β 取り込みとの関連が示唆され、AD リスク因子が A β 取り込みに影響する可能性が考えられた。

そこでまず AD リスク因子が A β 取り込み機構に及ぼす影響を検討するために、既知の AD リスク因子を標的とした gRNA を個別に設計し、レンチウイルスベクターを用いて Cas9 恒常発現細胞に導入して A β 取り込み能を評価した。しかし、AD リスク因子のノックアウトによる有意な取り込み量の変化は観察されなかった。

その原因として、モデル細胞として使った Cas9 恒常発現細胞における内因性 A β 受容体の発現が低い可能性が想定された。また、(3) (a) で述べたように、A β 取り込みに対し非特異的な受容体分子が関わっている可能性も考えられる。そこで、今までに報告のあるいくつかの A β 受容体の中から、ここでは広範なリガンドを持つ既知の A β 受容体分子 LDL 受容体ファミリーに属する LDL-related protein 1 (LRP1) に着目し、LRP1 依存的な A β 取り込み機構における AD リスク因子の関与を再度解析することを考えた。

新たなモデル細胞として Cas9/LRP1 恒常発現細胞を作出し、そのゲノム編集能力及び A β 取り込み能力について確認したうえで、AD リスク因子が A β 取り込みに及ぼす影響について個別に評価した。その結果、リスク因子の一つである PICALM が LRP1 依存的な A β 取り込みを正に制御していることが明らかとなった。

(5)

本研究において、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノムワイドスクリーニングの結果から、A β 取り込みを制御する特異的な受容体分子が単一で存在する可能性については否定的であることが示唆された。一方でパスウェイ解析、インタラクトーム解析からは、A β 以外にもリガンドをもつ非特異的な受容体、もしくは共役して機能する複数の受容体の関与が示唆された。その候補として LRP1 について検証したところ、AD リスク因子が LRP1 依存的に取り込みを制御することが明らかとなった。以上の結果から、A β クリアランス機構の一端を明らかにできたと考えられる。

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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

1. Ebinuma I, Hori Y, Tomita T.
Genome wide screening of molecules involved in A β uptake by CRISPR/Cas9 system
Society for Neuroscience Annual Meeting, November 12-16, 2016, San Diego, USA
2. Hori Y, Ebinuma I, Tomita T.
Genome wide screening of genes involved in A β uptake by CRISPR/Cas9 system
The 7th BRI international Symposium 2017, March 10-11, 2017, 新潟大学脳研究所(新潟)
3. 海老沼五百理、堀由起子、富田泰輔
CRISPR/Cas9 システムによる A β 取り込み経路関連分子のゲノムワイドスクリーニング
2017 年度生命科学系学会合同年次大会、ポスター発表 1P-1195、2017 年 12 月 6-9 日、神戸ポートアイランド(兵庫)
4. 松田友亨、海老沼五百理、堀由起子、富田泰輔
LRP1 依存的なアミロイド β 取り込みを指標とした遺伝学的スクリーニング系の構築
日本薬学会 第 138 年会、ポスター発表 28PA-pm336S、2018 年 3 月 25-28 日、おもてなしドーム(石川)

[図書](計 0 件)

[産業財産権](計 0 件)

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~neuropsych/tomita/>

6．研究組織

(1)研究代表者

堀 由起子 (Hori Yukiko)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：80610683