

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19330

研究課題名(和文)最新ゲノム編集法によるネコ型GAPDHノックイン新規アルツハイマー病モデルの開発

研究課題名(英文)Development of a new model of cat GAPDH knock-in Alzheimer's disease mice by the latest genome editing method

研究代表者

中嶋 秀満(Nakajima, Hidemitsu)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：30405360

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、最新ゲノム編集法を用いて、新規アルツハイマー病モデルマウスを開発することを目的とした。研究当初のポイントとして、多機能酵素GAPDHがアルツハイマー病進行に関わること、ネコはヒトと同様の病理学的3大徴候を示すことから、ネコ型のGAPDHを既存のアルツハイマー病モデルマウスにノックインすることで開発を試みた。しかし、マウスは胎生致死となり、開発は出来なかった。そこで研究方針を変更し、確立した最新ゲノム編集法を用いて、GAPDHと神経疾患の関連性について検討し、GAPDHカスケードの上流にあるASK1が関与する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長寿社会において、認知症は激増しており、認知症の60%以上であるアルツハイマー病、高齢伴侶動物の老齢性認知障害の克服は、急務課題である。これまでのところ、アルツハイマー病の医薬品開発が精力的に行われている。新薬の開発にはアルツハイマー病動物モデルでの薬効評価が不可欠である。しかし、アルツハイマー病の原因遺伝子を改変したモデルマウスは世界中で作製されているが、その確定診断である3大徴候を示すモデル動物は存在せず、新薬開発の障害になっている。本研究では、老齢ネコ認知症がヒトアルツハイマー病と酷似していることから、世界初ネコ型GAPDHノックインマウス作製を試みた。

研究成果の概要(英文):The purpose of this study was to develop a novel Alzheimer's disease model mouse using the latest genome editing method. As a point at the beginning of the study, the multifunctional enzyme GAPDH is involved in the progression of Alzheimer's disease, and cats show the same three major pathological signs as humans. We tried to develop it. However, the mouse was lethal to the embryo and could not be developed. Therefore, we changed our research goal and used the latest established genome editing method to obtain the results that ASK1, which is upstream of the GAPDH cascade, is involved in the relationship between GAPDH and neurological diseases.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 ゲノム編集 老齢ネコ GAPDH

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

医療高度化に伴う長寿社会において、認知症の罹患率は激増しており、認知症の 60% 以上であるアルツハイマー病、高齢伴侶動物の老齢性認知障害 (アルツハイマー病の中核症状と相同) の克服は、急務課題である。これまでのところ、アルツハイマー病は対症療法しかなく、原因療法を指向した医薬品開発が精力的に行われている。

新薬の開発にはアルツハイマー病動物モデルでの薬効評価が不可欠である。しかし、アルツハイマー病の原因遺伝子を改変したモデルマウスは世界中で数 10 種類以上作製されているが、その確定診断である 3 大徴候 (A 凝集・タウ凝集・神経脱落) を示すモデル動物は存在せず、新薬開発の障害になっている。

一方、近年、ヒト以外の哺乳類では高齢の「ネコ」がアルツハイマー病と同じ 3 大徴候を示すことが報告された (Acta. Neuropathologica. Communications 2015)。また、申請者は多機能性酵素グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) が、アルツハイマー病のリスク因子であることを世界に先駆けて報告した (JBC 2015)

### 2. 研究の目的

以上の経緯から、本研究では、最新ゲノム編集 GONAD 法と時空間自在に遺伝子発現制可能な AAV2-CreERT2 法を組み合わせ、「ネコ型」GAPDH を後天的にノックインすることで、3 大徴候を示す世界初の遺伝子改変マウスを開発し、原因療法を指向した医薬品開発における本マウスの有用性を実証することで、新規アルツハイマー病モデルマウスを開発することを目的とした。しかしながら、最新ゲノム編集 GONAD 法を用いても、ネコ GAPDH 遺伝子導入マウスが胎生致死になることが判明した。また、GAPDH 自身をノックアウト (KO) したところ、予測された通り胎生致死であった。そこで、確立した GONAD 法を最大限に活用する為に、未解明である「GAPDH とアルツハイマー病の周辺病態であるうつ・不安およびストレス反応との関連性を解明する」に目的を変更し、GAPDH カスケードの上流に位置する ASK-1 (apoptosis inducing factor-1) の KO マウスおよび GAPDH ヘテロ KO マウスを GONAD 法で作製することで検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### ゲノム編集マウスの作製 (GONAD 法)

ASK-1 KO マウス: crRNA (ターゲット配列: GGGTGGATGACCGTGAGTCC、30  $\mu$ M) と tracrRNA (30  $\mu$ M) を 95 で 5 分間インキュベートし、室温に戻して、S.p. Cas9 Nuclease V3 (6  $\mu$ M) と混合し CRISPR 溶液を調製した。妊娠後 0.7 日目マウスを三種混合麻酔 (塩酸メドミジン 0.3 mg/kg, ミダゾラム 4 mg/kg, 酒石酸ブトルファノール 5 mg/kg) 下で背側腰部正中を約 5 mm 切開し、筋層を鈍性剥離し卵巣と卵管を露出した。そして卵管膨大部の 1 カーブ前に、CRISPR 溶液を充填したガラスキャピラリーを挿入し、CRISPR 溶液を約 2  $\mu$ L 注入した。卵管膨大部を、PBS で濡らしたキムワイプで覆い、S ピンセット卵管用お椀白金電極 (ネッパジーン株式会社) で挟み込み、NEPA21 (ネッパジーン株式会社) を用いて、下記の電気条件でエレクトロポレーションを行った。

#### <エレクトロポレーション電気条件>

Poring Pulse: 電圧 50 V, Pon 5 msec, Poff 50 msec, 回数+/-3 回, 減衰率 10%  
Transfer Pulse: 電圧 10 V, Pon 50 msec, Poff 50 msec, 回数+/-3 回, 減衰率 40%

同様の操作を反対側の卵管でも実施し、臓器を戻し皮膚を縫合し、覚醒するまでホットプレート (株式会社ヒラサワ) で保温した。産仔のテールカットにより得られた DNA サンプルを用いて DNA ダイレクトシーケンスにより遺伝子導入効率を解析した。

GAPDH ヘテロ KO マウス: crRNA (ターゲット配列: CTGTGGTCTAGAAAACACGG および TACATACAGGTTTCTCCAGG、各 30  $\mu$ M) と tracrRNA (60  $\mu$ M) を 95 で 5 分間インキュベートし、室温に戻して、S.p. Cas9 Nuclease V3 (12  $\mu$ M) と混合し CRISPR 溶液を調製した。ASK-1 KO マウスと同様に GONAD 法を適用した。電気条件でエレクトロポレーションを行った。

#### <エレクトロポレーション電気条件>

Poring Pulse: 電圧 50 V, Pon 5 msec, Poff 50 msec, 回数+/-3 回, 減衰率 10%  
Transfer Pulse: 電圧 10 V, Pon 50 msec, Poff 50 msec, 回数+/-3 回, 減衰率 40%

以降、ASK-1 KO マウスと同様に操作・解析を行った。

#### ストレス性精神疾患モデルマウスの作製とストレス反応の評価

##### a. 急性ストレスモデルマウスの作製

野生型マウス (ddY 系雄性マウス 6 週齢) 6 頭, ASK-1KO マウス 3 頭, GAPDH ヘテロ KO マウス 2 頭を用いて、急性ストレスモデルとしてマープルベアリング試験を行った。マープルベアリング試験は強迫性障害 (うつ・不安症状の 1 つ) のモデルになると考えられている。ラット用の

ケージ(横 20 cm, 縦 38 cm, 高さ 13 cm)に, 厚さ 5 cm になるようにおがくずを敷き詰めた. 照度を 5 lux にした防音室内で, 20 個のビー玉を等間隔(約 6 cm)に床敷きの上に並べたケージに入れて, 30 分間観察した. 30 分後マウスを取り出し, 露出しているビー玉の面積が約 3 分の 1 以下のものを「覆い隠したビー玉」とした. 「覆い隠したビー玉」はマウスの急性ストレスの程度を示すものであり, その個数をカウントすることで, マウスのストレスレベルの評価を行った.

#### b. 慢性ストレスモデルマウスの作製

野生型マウス(ddY 系雄性マウス 8 週齢)および ASK-1KO マウスを用いて, 拘束水浸ストレスモデル実験を行った. 本ストレスモデル実験で使用したマウスを, すべて個別のケージで飼育した. 底に空気穴(直径 8 mm)を開けた 50 mL コニカルチューブにマウスを拘束し, 水を張った水槽に沈めて, 拘束水浸ストレスを負荷した. 水位は, マウスが十分に呼吸可能な鎖骨部までが浸水する 11.5 cm とした. ヒーターと氷を用いて 24 で水温を一定にした. 拘束水浸ストレスとして, 毎日午前 10 - 13 時(3 時間)を 7 日間連続で実施した. ストレス負荷後, キムタオルで丁寧かつ十分に体を拭き, 元のケージに戻した. コントロール群は無処置とした.

#### c. 行動評価試験

拘束水浸ストレスを負荷したマウスのうつ・不安様行動およびストレス反応を評価するために, オープンフィールド試験, ソーシャルインタラクション試験, テールサスペンション試験を行った.

##### c.-1 オープンフィールド試験

オープンフィールド試験に供することで動物が制約を受けることなく自由な行動を観察し, マウスのストレス行動を評価した. 30 cm 四方の黒い箱に被験マウスを入れ, 上からビデオカメラで 10 分間の行動を撮影した. Time OFCR1(小原医科産業社)を用いて行動解析を行った. 評価項目として新規環境でのストレス(うつ・不安)の程度を表す中央滞在時間(中央区画割合: 9/25)を測定した.

##### c.-2 ソーシャルインタラクション試験

ソーシャルインタラクション試験によりマウスの社会性行動を総合的に観察することができる. 3 つの 30 cm × 20 cm のチャンパーに分かれた 30 cm × 60 cm の箱に被験マウス(ddY 系雄性マウス 9 週齢)を入れ, 10 分間自由に探索させ, 装置に馴化させた. その後, 被験マウスを一度取り出し, 左側のチャンパーに設置されたケージ内に新規マウス(同系統, 同週齢)を入れ, 被験マウスを再び戻し 10 分間の行動を上からビデオカメラで撮影した. Time CSI(小原医科産業社)を用いて行動解析を行った.

##### c.-3 テールサスペンション試験

テールサスペンション試験に供することでマウスの尾を固定し逆さに吊し, 不動となる時間でマウスのうつ・不安様行動およびストレス反応を評価した. マウス(ddY 系雄性マウス 9 週齢)を床上 20 cm(頭の位置)で尾端をテープで固定することで懸垂し, 10 分間の行動をビデオカメラで撮影した. 映像を PC 上で目視観察し, 懸垂時間中にマウスがテールサスペンションストレスに抵抗せず不動となった時間(不動時間)をストップウォッチで測定した. 各群における不動時間を比較することで評価を行った.

図中の値は平均値 ± 標準誤差を表す. 全データの統計処理は, 2 群間の比較には student's t 検定を行った. 多群間の比較には一元配置分散分析後, Turkey-Kramer の多重比較検定を行った. 有意水準を 5%以下とした.

## 4. 研究成果

### ASK-1 KO マウスの作製

産仔計 4 頭を用いて, ダイレクトシーケンスおよびウエスタンブロット法で 4 系統の ASK-1 KO マウスを確認することができた. そのうちの雄性マウス 3 匹を以降の実験に使用した.

### 急性ストレスモデルでの ASK-1 KO の影響

ASK-1 KO 群で有意なビー玉覆い隠し行動の減少が認められた(Fig.1).

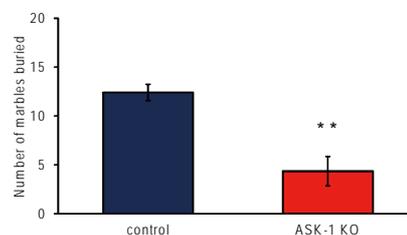


Fig. 1 :急性ストレスモデルにおけるASK-1 KOによる不安様行動への影響 (student's t test, mean ± S.E. [n = 5 / control, n = 3 / ASK-1 KO] \*\* : p < 0.01, vs. control)

慢性ストレス負荷による体重の経日変化量を測定したところ、ストレス群で有意な体重減少が認められた (Fig. 2)。一方で、ストレスを負荷した ASK-1 KO 群では、同じストレスを負荷した control 群と比較して、有意に体重減少が抑制された (Fig. 2)。

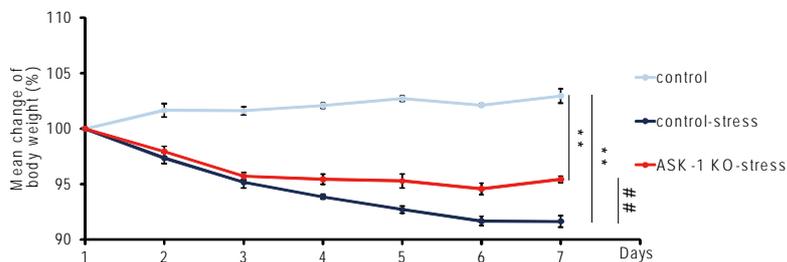


Fig. 2: 慢性ストレスモデルにおけるASK-1 KOの体重変化への影響 (One way ANOVA, Tukey-Kramer, mean  $\pm$  S.E. [n = 3 / group] \*\*: p < 0.01 vs. control [1-7 days], # #: p < 0.01 vs. control-stress [3-7 days] )

拘束水浸による慢性ストレスを負荷したマウスでオープンフィールド試験を実施したところ、control-stress 群で認められた中心滞在時間の顕著な減少は ASK-1 KO 群で改善が認められた (Fig. 3A)。テールサスペンション試験では、control-stress 群で見られた不動時間の顕著な増加は、ASK-1 KO 群で改善が認められた (Fig. 3B)。ソーシャルインタラクション試験では、control-stress 群と比較して、ASK-1 KO 群で社会性行動の有意な改善が認められた (Fig. 3C)。

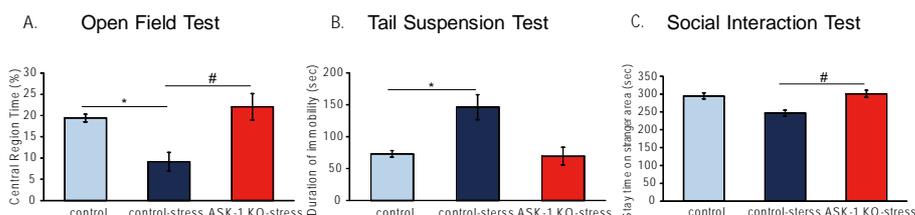


Fig. 3: 慢性ストレスモデルにおけるASK-1 KOのうつ・不安様行動への影響 (One way ANOVA, Tukey-Kramer, mean  $\pm$  S.E. [n = 3 / group] \*: p < 0.05 vs. control, #: p < 0.05 vs. control-stress)

#### GAPDH ヘテロ KO マウスの作製

GONAD 法にて GAPDH カスケードを半減させると推測される GAPDH ヘテロノックアウトマウスの作出を実施し、産仔 3 頭中 2 系統・計 2 頭を作製することに成功した (Fig. 4)。

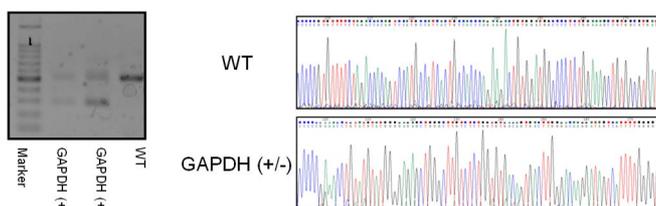


Fig. 4: GAPDHヘテロKOマウスのダイレクトシーケンスの解析

急性ストレスモデルにおける GAPDH ヘテロ KO マウスのストレス反応への影響

作製した 2 頭の GAPDH ヘテロ KO マウスを用いて急性ストレスモデルを作製しマーブルベリング試験を行ったところ、ビー玉覆い隠し行動の改善傾向が認められた (Fig. 5)。

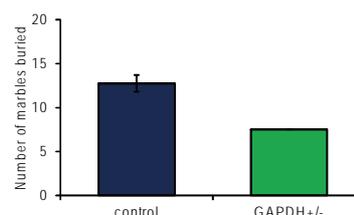


Fig. 5: 急性ストレスモデルにおけるGAPDHヘテロKOマウスの不安様行動への影響 [n = 6 / control, 2 / GAPDH +/-]

#### 考察

本学で確立した最新ゲノム編集 GONAD 法により、3 系統の ASK-1KO マウスの作成に成功した。これらのマウスを用いて、アルツハイマー病の中核症状である記憶障害についても検討したが、恐怖条件付け試験 および受動回避テスト (文脈記憶と作業記憶) においては、記憶障害改善効果は認められなかった (data not shown)。一方、アルツハイマー病の周辺症状である、うつ・不安行動およびストレス反応について検討したところ、急性ストレスモデルであるビー玉覆い隠し行動では、有意な改善効果が認められた。また慢性ストレスモデルにおいても、3 つの行動評価系において、有意な改善効果が認められた。加えて、2 系統の GAPDH ヘテロ KO マウスの作成に成功した。本マウスにおいても、急性ストレスモデルで不安行動 (ストレス反応) の改善が認められた。今後の課題として、例数追加と慢性ストレスモデルでの行動評価の実施が必要である。以上の結果から、ASK-1 活性化を上流とする GAPDH カスケードは、アルツハイマー病の中核症状には関与せず、周辺症状であるうつ・不安行動およびストレス反応に関連する可能性が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鳩谷 晋吾  (Hatoya Shingo)  (40453138)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授   (24403)	
研究分担者	秋吉 秀保  (Hideo Akiyoshi)  (50420740)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授   (24403)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関