

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07517

研究課題名(和文)新規アルツハイマー病モデルショウジョウバエを用いた病態修飾グリア関連遺伝子の検索

研究課題名(英文)Genetic screen for disease-associated genes in glial cells using a novel Drosophila model of Alzheimer's disease

研究代表者

関谷 倫子 (Sekiya, Michiko)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・室長

研究者番号：40367412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：認知症の主な原因疾患であるアルツハイマー病の発症メカニズムの解明、治療薬標的の同定は急務である。最近の知見から、アルツハイマー病の発症と進展には、ニューロンを取り巻くグリア細胞機能の変化が大きな影響を与えると考えられるが、実際にどのグリア細胞種の、どの遺伝子が担う機能変化が病態の形成に重要であるかは不明である。本研究では、グリア細胞に発現する遺伝子群を効率よく検索するための、新規アルツハイマー病モデルショウジョウバエを確立し、アルツハイマー病の発症・進展に影響を与えるグリア機能に関連する遺伝子同定を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化の進む我が国において、認知症患者数の急増は深刻な社会問題であり、その原因であるアルツハイマー病の発症メカニズムの解明、治療薬標的の同定は急務である。本研究では、アルツハイマー病におけるグリア細胞機能の関与を解明する目的で、新規のアルツハイマー病モデルショウジョウバエを確立した。このモデルを用いることで、アルツハイマー病におけるグリア細胞機能の関与を解明すると共に、グリア細胞に着目した治療薬標的の同定が期待できる。また、既存のモデルとは異なる新しいシステムを有するモデルでの研究は、アルツハイマー病の発症機序の解明に新たな知見をもたらす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disease and is the main cause of senile dementia. Accumulated genetic studies suggest that a number of SNPs associated with genes expressed in glial cells contribute to AD risk. To identify the glial genes that contribute to AD pathogenesis, we established a novel Drosophila model of Alzheimer's disease and performed the genetic screen using this fly model.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：アルツハイマー病 ショウジョウバエ アミロイドベータ グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

高齢化の進む我が国では、認知症患者数が急増しており深刻な社会問題となっている。この老年性認知症の最大の原因となる疾患が、アルツハイマー病 (AD) である。AD は、アミロイド β ペプチド (Aβ) を主成分とする老人斑、過剰リン酸化タウタンパク質を主成分とする神経原繊維変化の出現と、神経変性による脳の萎縮を特徴とする。AD の発症メカニズムの詳細は未だ明らかではないが、家族性 AD の原因遺伝子として、Aβ の前駆体タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) 遺伝子と、APP から Aβ を切り出す酵素であるプレセニリン遺伝子が同定され、これらの変異がいずれも脳内での Aβ の蓄積を促進することから、Aβ が疾患の発症原因であるという考え方が有力である。

一方、AD の 90% 以上は孤発性である。第 1 の危険因子は加齢であるが、2 番目の危険因子は家族歴であり、複数の遺伝的要因と環境要因が複雑に相互作用していると考えられる。遺伝的要因による最大のリスク因子として、アポリポタンパク質 E (ApoE) の遺伝子多型が知られているが、さらなるゲノムワイド関連解析から 40 以上のリスク遺伝子が同定されている。これら同定されたリスク遺伝子の発現は、ニューロンよりもむしろグリア細胞への集積が認められる。最大のリスク遺伝子である *APOE* はアストロサイトに、また最近注目を集めている *TREM2* はミクログリアに発現している。これらのことから、AD の発症にはニューロンをとりまくグリア細胞群の機能変化が大きな影響を与えていると考えられる。グリア細胞における様々な遺伝子多型の組み合わせや環境要因が、グリア細胞の本来の機能を低下、あるいは変化させることで、AD の原因と考えられる Aβ の蓄積や、Aβ 蓄積に伴う生体対応を変化させるのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

これまでのゲノムワイド関連解析から同定されたリスク遺伝子は、その多くの遺伝子の発現がグリア細胞に集積することが明らかになってきた。しかしながら、それらの遺伝子が本当にグリア細胞の機能に影響し、AD の発症に関与しているかどうかは明らかでない。本研究では、AD の発症に関与するグリア細胞遺伝子を同定するために、新たなスクリーニング系の確立を行った。

グリア細胞に発現する多くの遺伝子群を効率よくスクリーニングするためには、それに特化した新たな生物モデル系が必要である。ショウジョウバエは、遺伝的操作が簡便かつ短期間で行えるため、遺伝子スクリーニングに適している。また、ヒトでいうアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアの働きを持つグリアサブタイプを有しており、ニューロン-グリア間の機能解析が可能である。本研究では、グリア細胞機能のスクリーンを効率的かつ効果的に行うための新規のショウジョウバエモデルを確立することで、AD 病態に影響を与えるグリア関連遺伝子を同定し、グリア細胞に着目した治療薬標的の同定を目指す。

具体的には、(1) 効果的にグリア細胞遺伝子のスクリーニングを行うための新規 AD モデルショウジョウバエの確立、および、(2) 確立したモデルショウジョウバエを用い、AD の発症と進展に関与するグリア機能を担う遺伝子の同定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新規アルツハイマー病モデルショウジョウバエの確立

疾患の発症原因と考えられている Aβ₄₂ をニューロンで発現し (LexA システム)、グリア細胞で各遺伝子をノックアウトする (GAL4/UAS システム) ためのトランスジェニックショウジョウバエを作製した。既存のアルツハイマー病モデルショウジョウバエでは、ニューロンで発現した Aβ₄₂ が細胞内に凝集しやすい。そこで、Aβ₄₂ がより細胞外に分泌されグリア細胞に作用するような新しいシステムを取り入れてモデルの作製を行った。作製したトランスジェニックショウジョウバエについて、Aβ₄₂ の発現量の確認 (ウェスタンブロット法、免疫染色、アミロイド染色)、加齢依存的な神経変性や運動失調、生存率等の表現型解析を行った。

(2) 新規アルツハイマー病モデルショウジョウバエを用いたグリア遺伝子のスクリーニング

(1) で作製した新規モデルショウジョウバエが、グリア細胞遺伝子のスクリーニングに使用可能かどうかを確認するため、すでに Aβ₄₂ を分解することが知られているタンパク質をグリア細胞で発現させ、その効果をウェスタンブロット法にて Aβ₄₂ 量を定量することで評価した。

スクリーニングには、AD リスク遺伝子のうちグリア細胞で発現するもの、AD モデル動物や AD 患者の遺伝子発現解析より抽出したグリア細胞発現遺伝子を候補遺伝子とし、候補遺伝子の RNAi 系統（ノックダウン）を入手、作製した新規モデルショウジョウバエと交配してその影響を評価した。評価は、ウェスタンブロット法による Aβ42 量の比較により行った。

4. 研究成果

(1) 新規アルツハイマー病モデルショウジョウバエの確立

新しいシステムを使用し、Aβ42 をニューロンに発現するトランスジェニックショウジョウバエを作製した。既存のアルツハイマー病モデルとの違いについては、トランスジェニックショウジョウバエの作製に使用したベクターを培養細胞にトランスフェクションし、Aβ42 が細胞外に効率よく分泌されているかどうかを細胞と培養液のウェスタンブロット法にて評価し、新規システムの方がより効率良く細胞外（培養液中）に Aβ42 が分泌されることを確認した。

新規モデルの表現型解析では、生存率の測定においてわずかではあるが有意な寿命の短縮が認められた。一方、加齢飼育により 9 週年齢までの運動機能（運動失調）と神経変性を調べたが、いずれも顕著な変化は認められなかった。脳内の Aβ42 量は、加齢依存的に増加する傾向が認められたが、組織染色により β シート構造を有する Aβ42 の凝集や蓄積は認められなかった。

以上の結果を確認した後に、神経細胞で Aβ42 を発現し、グリア細胞で任意の遺伝子をノックダウンすることができるように、GAL4/UAS システムと LexA システムを併せ持つトリプルトランスジェニックショウジョウバエを作製した。発現システムの確認は、GFP 発現システムを利用することで、神経細胞で Aβ42 を発現し、グリア細胞で任意の遺伝子を操作（今回は GFP を過剰発現）できることを確認した。

(2) 新規アルツハイマー病モデルショウジョウバエを用いたグリア遺伝子のスクリーニング

(1) で作製したトリプルトランスジェニックショウジョウバエと、ポジティブコントロールとして Aβ の分解酵素として知られているタンパク質の過剰発現システムの交配により、Aβ42 量が減少することをウェスタンブロット法にて確認することができたため、Aβ42 量の変化をリードアウトとして遺伝子スクリーニングを行った。

最初に、AD のリスク遺伝子のうちグリア細胞での発現が報告されている遺伝子のショウジョウバエホモログ遺伝子についてスクリーニングを行ったが、Aβ42 量を大きく変化させる遺伝子は得られなかった。結果として、1 つの AD リスク遺伝子をグリア細胞でノックダウンしても、Aβ42 の代謝や蓄積には大きな影響が認められなかった。孤発性 AD のリスク遺伝子の多くは、1 つ 1 つの変異が AD の発症に与える影響（オッズ比）が小さいものの、いくつかの変異の組み合わせが AD の発症に影響を与えるというポリジェニック効果が知られている。AD リスク遺伝子については、いくつかの遺伝子の組み合わせによりはじめて Aβ42 の代謝や蓄積に影響を与える可能性も考えられる。

次に、老化により発現が変動するグリア細胞の遺伝子、神経損傷により発現が変動するグリア細胞の遺伝子、遺伝子発現解析より得られた候補遺伝子についてスクリーニングを行なった。その結果、劇的に Aβ42 量を変化させる遺伝子は無かったが、変化を示す可能性のある遺伝子をいくつか得ることができた。一方、いくつかのグリア細胞遺伝子は、ノックアウトすることで致死となった。これら遺伝子は発達期に重要な役割を持つと考えるが、成体期におけるこれら遺伝子の機能低下が Aβ42 の代謝や凝集に影響を与える可能性もある。これら遺伝子については、成体期に薬剤誘導性で遺伝子の発現調節を行えるシステムを用いたスクリーニング系により検討することで新しい知見が得られる可能性があると考えられる。

今回のスクリーニングから得られたグリア細胞遺伝子については、グリア細胞における機能解析と Aβ42 量を変化させる機序の解析を行う予定である。最終的には、これらの結果をマウスモデルへ外挿し研究を進展させることで、AD 発症機序の解明や創薬標的の同定につなげたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kikuchi Masataka, Sekiya Michiko, Hara Norikazu, Miyashita Akinori, Kuwano Ryoza, Ikeuchi Takeshi, Iijima Koichi M, Nakaya Akihiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Disruption of a RAC1-centred network is associated with Alzheimer's disease pathology and causes age-dependent neurodegeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 817 ~ 833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddz320	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sekiya Michiko, Iijima Koichi M.	4. 巻 2
2. 論文標題 Phenotypic analysis of a transgenic Drosophila model of Alzheimer's amyloid- toxicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100501 ~ 100501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100501	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wang Minghui, Li Aiqun, Sekiya Michiko, et al.	4. 巻 109
2. 論文標題 Transformative Network Modeling of Multi-omics Data Reveals Detailed Circuits, Key Regulators, and Potential Therapeutics for Alzheimer's Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 257 ~ 272.e14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuron.2020.11.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Michiko Sekiya
2. 発表標題 A Drosophila model of Alzheimer's disease
3. 学会等名 The 5th NCGG ICAH symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michiko Sekiya, Yasufumi Sakakibara, Sachie Chikamatsu, Koichi M. Iijima
2. 発表標題 A novel Drosophila model of Alzheimer's disease
3. 学会等名 AAIC2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関谷倫子, 榎原泰史, 近松幸枝, 飯島浩一
2. 発表標題 新規アルツハイマー病モデルショウジョウバエの作製
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関谷倫子, Wang Minghui, 榎原泰史, 近松幸枝, Zhang Bin, 飯島浩一
2. 発表標題 遺伝子ネットワーク解析を用いたアルツハイマー病の発症機序解明と創薬標的の探索
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯島浩一, Wang Minghui, 榎原泰史, Zhang Bin, 関谷 倫子
2. 発表標題 ネットワーク解析から解き明かすA 病態
3. 学会等名 第39 回日本認知症学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Michiko Sekiya, Xiuming Quan, Yasufumi Sakakibara, Sachie Chikamatsu, Koichi M. Iijima
2. 発表標題 Deficiency in a fly ortholog of HS-Aging related gene, sulfonyleurea receptor/Sur, increased vulnerability to neurodegeneration in Drosophila models of Alzheimer ' s disease.
3. 学会等名 AAIC2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Michiko Sekiya, Xiuming Quan, Yasufumi Sakakibara, Sachie Chikamatsu, Koichi M. Iijima
2. 発表標題 Sulfonyleurea receptor/Sur deficiency increased vulnerability to neurodegeneration in Drosophila models of Alzheimer ' s disease.
3. 学会等名 ADPD2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関谷倫子, 権秀明, 榊原泰史, 近松幸枝, 飯島浩一
2. 発表標題 アルツハイマー病におけるATP感受性K+チャネル機能の役割
3. 学会等名 第39 回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔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
研究協力者	飯島 浩一 (Iijima Koichi) (50632535)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・部長 (83903)	

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
---------	---------