

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19525

研究課題名（和文）合成アミロイド 受容体によるアルツハイマー病の新規遺伝子細胞治療法の確立

研究課題名（英文）Development of synthetic Amyloid beta receptor for Alzheimer's disease therapy

研究代表者

星野 温（Hoshino, Atsushi）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：50737210

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病の原因と考えられているアミロイド をエンドサイトーシスで取り込みリソソームで分解する合成受容体を作製した。この受容体をアストロサイト、ミクログリア、血管内皮細胞、骨髄細胞に遺伝子導入し、アルツハイマーモデルマウスで疾患予防効果の確認を計画した。現在までにアデノ随伴ウイルスを用いて10週齢のマウスの両側海馬領域のアストロサイトに合成受容体を発現させるとアミロイド斑の減少とアミロイド 40/42の減少が確認された。引き続き、学習能力と他の細胞への遺伝子導入の効果を確認していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回独自に考案した細胞外のもを取り込んで分解する合成受容体に関してアミロイド において分解能をマウスで証明することができた。この合成受容体は標的結合ドメインを置き換えることで色々なものを対象とできる。未発表だがApoBを標的としてLDLコレステロールを取り込み、LDL受容体欠損症に効果があることが分かっていたが、今回標的を変えても効果があることが確認された。またアルツハイマー病は現在治療方法の確立が最も求められている疾患の1つだが治療戦略の選択肢の一つになる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We developed synthetic receptor that catch extracellular amyloid beta and degrade through endocytosis and lysosome pathway. We aimed to evaluate the therapeutic effect of this synthetic receptor in APP knock-in Alzheimer's disease model mouse. The synthetic receptor was expressed in astrocyte, microglia, endothelial cells, and bone marrow cells. We have confirmed that adeno-associated virus injection in both side of hippocampus successfully expressed the synthetic receptor and reduced amyloid plaque and amyloid beta 40/42 content. We continue to examine the memory impairment and protective effect in transgene to other effector cells.

研究分野：循環器内科

キーワード：アルツハイマー病 合成受容体 バイオエンジニアリング

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

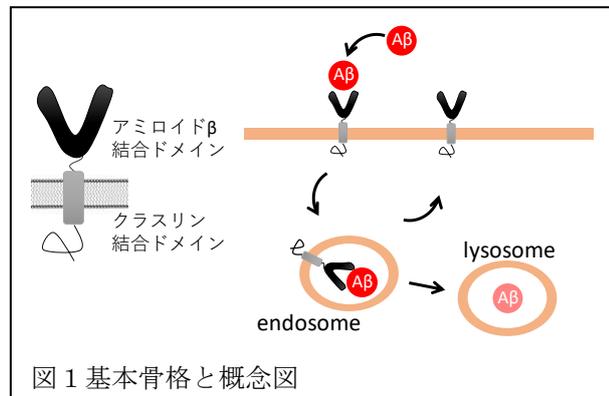
日本の認知症高齢者数は2002年厚生労働省予測で262万人、介護保険の要介護認定データから推計では、この推計よりも2倍以上増加して460万人以上に達している。65歳以上では10人に1人、85歳以上では3人に1人が認知症に罹患しているとされており、さらにその患者数は今後も急速に増加することが予想される。このような認知症の原疾患として、アルツハイマー病はその半分を占めるとされ、その診断法および根本的な治療法の開発は医学会に課せられた急務である。また全世界的には4600万人の認知症患者が存在し、アルツハイマー病は約半数の2300万人と考えられる。また毎年460万人の新しい患者が発症して、その前段階である軽度認知機能障害を含めると患者数は6000万人にのぼるとされており、アルツハイマー病はまさに21世紀の人類が早急に克服すべき最重要課題であるといえる。このような状況で米国では2012年5月に“National Plan to Address Alzheimer’s Disease”を発表し、2025年までにアルツハイマー病の根本治療薬を開発するという目標を宣言して多額の予算を配分している。我が国においても、2008年に厚生労働省は「認知症の医療と生活の質を高める緊急プロジェクト」を発表し「資源を集中し今後10年以内にアルツハイマー病の根本的な治療薬の実用化を目標とした研究を推進する」とし、アルツハイマー病の克服に取り組んでいる。

アルツハイマー病の原因は議論のあるところだが、現在はタウ病理とアミロイドβ病理は独立に出現し、アルツハイマー病ではアミロイドβ病理が出現することで正常加齢では内側側頭葉のみに局限しているタウ病理が広く新皮質に拡散して、広範な神経細胞障害を生ずると考えられている。期待される治療方法としてはアミロイドβの除去をめざすβ-セクレターゼ阻害薬、γ-セクレターゼ阻害薬、ネプリライシン、アミロイドβの抗原もしくは抗体療法があるが根本的な治療には至っていない。また多くの臨床試験が失敗する中で現在ではアルツハイマー病の治療は病態が不可逆的となるまでに、すなわち軽度認知障害や症状出現前に開始する必要があると考えられている。そのためには治療効果判定も症状だけでなく疾患の本質を反映するマーカーが不可欠となる。この観点からもポジトロン断層法(PET)による評価方法が確立しているアミロイドβを対象とした治療から開発が進んでいくと考えられている。

これらの現状を踏まえ、本研究では長期間の治療効果が期待できる遺伝子細胞治療法により確実にアミロイドβを取込み分解除去できるシステムの開発を行いアミロイドβの蓄積改善、アルツハイマー病の発症予防に取り組む。

### 2. 研究の目的

アルツハイマー病の発症予防として毒性の強い可溶性のオリゴマーを中心として蓄積したアミロイドβを細胞内に取り込んでエンドソーム-ライソソームの系で分解処理する合成アミロイドβ受容体をヒト由来タンパクで作製した。この合成受容体の基本骨格はアミロイドβ結合ドメインとクラスリン結合ドメインで構成され細胞内への取り込みはクラスリン依存性エンドサイトーシスを利用する(図1)。アミロイドβ結合ドメインのスクリーニングは候補タンパクにそれぞれクラスリン結合ドメインを連結した合成タンパクを作成し行った。この合成受容体はアミロイドβを細胞内に取り込み、それがライソソームと共局在することが免疫染色で確認され、またアミロイドβのモノマーよりオリゴマー優位に結合する。本研究では、この合成受容体がアルツハイマー病モデルマウスを用いてアルツは今病一は症予防に効果があるかを検討する。



### 3. 研究の方法

合成アミロイドβ受容体を下記の各種エフェクター細胞に遺伝子導入により発現させ、アルツハイマー病モデルマウスを用いてアミロイドβ蓄積抑制効果、認知機能維持効果を評価する。モデルマウスは理研の西道先生が開発したノックインマウス(AppNL-G-F/NL-G-F mice)を使用する。

①ミクログリアへの発現：タンパクの分解処理という目的から最も効果を期待する。遺伝子のデリバリーはアデノ随伴ウイルス(AAV)の新生児マウス脳室投与にて行う。Chakrabartyらが開発したF4/80プロモーター/改変AAV6のシステム(Molecular Therapy 2016)を使用する。AAVウイルスパッケージングはペンシルバニア大学で行う。

②アストロサイトへの発現：上記と同様にAAVを用いて遺伝子のデリバリーを行う。システムは既に確立しているGFAPプロモーター/AAV5を使用。

③骨髄幹細胞/リンパ球への発現：脳も免疫の監視機構がはたらいており近年脳のリンパ管システムの存在も報告され(Nature 2015)、脳を循環している免疫細胞でも効果が期待できる。ex vivoで造血幹細胞に遺伝子導入し骨髄移植を行う。リンパ球でも類似の手法で効果を確かめる。マウス血球系への遺伝子導入はエコトロピックのレトロウイルスをレトロネクチン併用で行う。

④血管内皮細胞：現在確立した遺伝子デリバリー方法がなくフィラデルフィア小児病院の Davidson らが現在開発中である。まずは血管内特異的トランスジェニックマウスを CDH5 プロモーターで作製し、アルツハイマー病モデルマウスと掛け合わせて効果を確認する。

#### 4. 研究成果

①ミクログリア：Chakrabarty らが開発した F4/80 プロモーター／改変 AAV6 のプラスミドを分与してもらい、ペンシルバニア大学でウイルスのパッケージングを行った。アルツハイマー病モデルマウスである APP KI マウスの生後 0 日目の脳室に AAV を投与しミクログリアへの遺伝子導入を試みた (図 2)。8 週齢で遺伝子導入効率を免疫染色で確認したところ発現が全く確認されなかった。ミクログリアのターンオーバーを考慮し、12 週齢のマウスの海馬付近に定位固定注入を行い (図 3)、1 週間後の評価も行ったがこちらも遺伝子発現が確認されなかった。もともとミクログリアに対する遺伝子導入は確立した方法がなく、今回使用したシステムも論文で報告されているような結果を得ることは難しいため、ミクログリア特異的合成受容体マウスを作製して検討を行う方針に変更した。具体的には ES 細胞で Rosa26 領域に loxp-stop-loxp-Ab receptor を挿入したノックイン細胞をペンシルバニア大学にて作製。これを用いて筑波大学でキメラマウスを作製した。このマウスと LysM-Cre マウス (理研 BRC より入手) を交配しマクロファージ特異的合成受容体発現マウスを作製した。現在、このマウスと APP KI マウスを交配している段階にある。



図 2 脳室投与

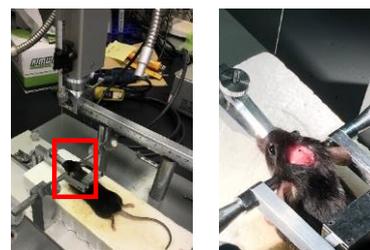


図 3 脳定位固定注入

②アストロサイト：アストロサイトへの遺伝子導入は最もよく使われている GFAP プロモーター／AAV5 のシステムでマウス新生児脳室インジェクションを行った。この方法で程度のタンパク発現が得られ (図 4)、また合成受容体の発現が得られた領域においてはアミロイド斑の減少も確認された (図 5)。ただ行動実験においては記憶力の低下の改善は確認できなかった。原因として新生児脳室投与では十分な範囲に遺伝子発現を得るのが難しい点がある。そのため、セロタイプの最適化を行い、AAV5 から AAV9 に変更し、投与方法も 8 週齢で両側の海馬領域に定位固定注入で行う事とした。現在、マウスへのインジェクションを終え評価を行う 9 か月例になるのを待っている段階にある。

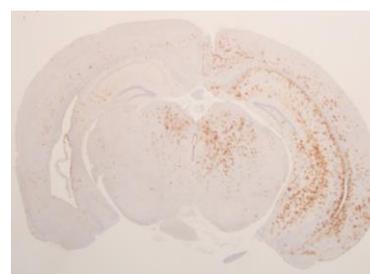


図 4 脳室投与による遺伝子導入

③骨髄幹細胞/リンパ球：マウス骨髄細胞、リンパ球に対しては当初、エコトロピックのレトロウイルスをレトロネクチン併用で行ったが、数%の遺伝子導入にとどまり十分な結果が得られなかった。レンチウイルスやピギーバックをエレクトロポレーションで導入することも試みたがいずれも不十分な結果であった。そのためミクログリアと同様に、まずは合成受容体発現マウスを作製し、そこから骨髄やリンパ球を得て実験を進めることとした。当初 CAG プロモータ下で合成受容体を発現するトランスジェニックマウスを作製したが (山形大学にて)、うまくマウスを得ることができなかった。合成受容体を発現する事により胎生致死になっている可能性を考へ、Rosa26 領域に loxp-stop-loxp-Ab receptor を挿入したノックインマウスに Rosa26 CreERT2 マウス (理研 BRC より入手) を交配し、タモキシフェン投与による合成受容体発現マウスを作製している。このマウスから骨髄またはリンパ球を採取し、アルツハイマーモデルマウスに骨髄移植またはリンパ球投与を行い評価を行う予定。

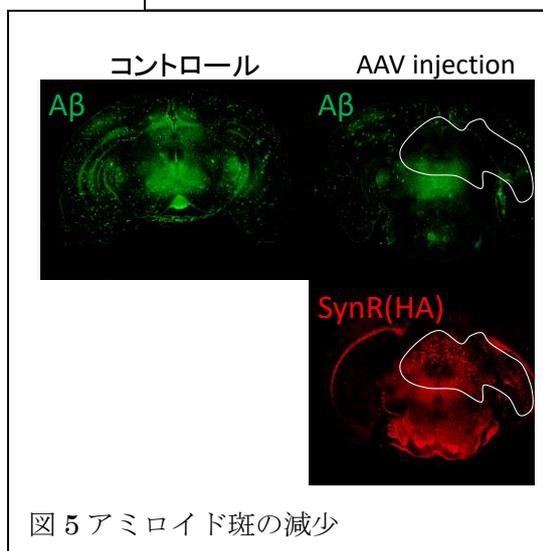


図 5 アミロイド斑の減少

④血管内皮細胞：血管内皮特異的合成受容体発現マウスを CDH5 プロモーターにてトランスジェニックマウスを作製 (山形大学にて) し、肺血管内皮細胞にてタンパク発現が得られていることを確認した。このマウスと APP KI マウスを掛け合わせて評価を行ったところ、アミロイド斑、記憶障害の改善は認められなかった。この結果からは、血管内皮への発現ではアルツハイマー病予防効果が得られないと考えられた。

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	伊東 恭子  (Ito Kyoko)  (80243301)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授    (24303)	