

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：14202
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2022
課題番号：20K16491
研究課題名(和文)新規アミロイド産生抑制分子ILEIの発現低下によるアルツハイマー病リスクの検証

研究課題名(英文)Examining the risk of developing Alzheimer's disease induced by decreased expression of ILEI

研究代表者
渡邊 直希(WATANABE, Naoki)
滋賀医科大学・神経難病研究センター・助教

研究者番号：60769339
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：レポーターアッセイよりILEI転写活性領域は転写開始点近傍2か所で、データベース検索、ノックダウン、強制発現から転写因子SP1、EBF1を見出した。CRISPR/Cas9でのこの領域欠損で内在性ILEI低下、EMSA、ChIP-qPCRからこの領域とSP1、EBF1の結合を認めた。RNA-seqからAD脳でのILEI低下、AD脳でSP1、EBF1とこの領域の結合低下を認めた。神経特異的欠損誘導できるILEI-ck0マウスを作製、App(NL-F)系統と交配、3、6か月齢で欠損誘導後、14か月齢での免疫組織染色、ELISAでA β 沈着の増加を認めた。Y字迷路より10か月齢以降で作業記憶が低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ILEIはセクレターゼ活性を阻害せず、A β の基質APP-C99の不安定化によりA β 産生を減少させる。このためセクレターゼによる治療法開発で従来問題になったNotch阻害による副作用を回避した治療標的として有望であり、脳内A β 蓄積のリスク評価を標的としたバイオマーカーとしても期待できる。ILEIの特異な活性や脳内発現について申請者らが初めて見出したもので、本研究は独自性が高く、今後さらに新たな研究領域を生む創造性も期待できる。将来、高齢者スクリーニングとしてILEIを含めたバイオマーカーを評価し、リスクを推定した上で、予防的治療を加えるという認知症の先制医療の実現を目指し、研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：Reporter assay revealed two transcriptionally active regions of ILEI gene near the transcription start site, and transcription factors SP1 and EBF1 were found by database search, knockdown, and forced expression. RNA-seq revealed decreased ILEI in AD brain and decreased binding of SP1 and EBF1 to this region in AD brain. App(NL-F); ILEI-ck0 mice, which can be induced with a neural-specific defect, were generated and crossed with the App(NL-F) strain, and after defect induction at 3 and 6 months of age, increased A β deposition was observed in the brains of App(NL-F); ILEI-ck0 mice compared to the control mice at 14 months of age by immunohistochemical staining and ELISA. Y-maze test showed that the working memory of App(NL-F); ILEI-ck0 mice was impaired compared to the control mice after 10 months of age.

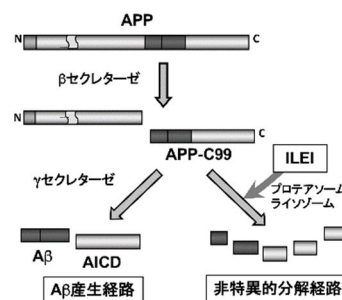
研究分野：分子神経科学

キーワード：アルツハイマー病 Amyloid- ILEI 遺伝子発現制御 老年期認知症

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)は老年期認知症の主な原因であり、その治療・診断法の確立は重要課題である。その基本病態は Amyloid- (A) の脳内蓄積だと解明されているが、病態に基づいた根治治療法は未だ確立されていない。また、認知症発症後に A 蓄積を除去しても効果がなかったことから、発症の20年以上前に始まる脳内 A 蓄積を標的とした先制医療の開発が主要課題となっている。しかし、脳内 A 蓄積をきたす一次的原因は遺伝要因以外には明らかでなく、その原因を標的とした治療も実現できていない。AD に対する多くの臨床治験が効果不足と副作用から中断されており、新たな治療戦略の開拓が求められているが、同時に AD 治療法開発は大きな転換点にあり、従来の症状を指標とした治療から、発症前の脳内 A 蓄積を指標とした治療へのパラダイムシフトを迫られている。それを実現するには、脳内 A 蓄積の要因を分子レベルで明らかにし、その制御法を開発することが重要な課題となる。

我々が A ペプチドの脳内産生を制御する内在性タンパク質の探索によって同定した ILEI は、新たな分泌型機能分子 FAM3 ファミリーに属し、脳 A 蓄積の要因に関与する可能性が示唆された(*Nat Commun* 5:3917, 2014)。この ILEI は セクレターゼ活性や Notch 切断は阻害せず、基質 APP-C99 に対し A 産生を伴わない分解経路を選択的に促進することにより A 分泌を抑制する(右図)。健常脳の神経細胞は高レベルに ILEI を発現しているが、加齢とともに転写活性が低下し AD 症例では発現減少が顕著になるのに逆相関して脳 A 蓄積量が増加する (*Neuroscience* 330:236-246, 2016)。



従って、従来の セクレターゼ阻害剤で問題となった副作用を回避した治療法開発の標的として、また発症前診断のためのバイオマーカーとしても究めて有望である。脳内 A 蓄積は生理的加齢によるとされてきた軽度の認知機能障害の相当部分の原因である可能性も指摘されており、ILEI を介した予防的抗 A 治療はこれらの認知症予備群の克服にも有効性が期待できる。本研究では、発症予防・早期対応を可能にするため、ILEI に着目した発症前 AD の診断法および予防的治療法の開発に向けた基礎研究を進める。

2. 研究の目的

本課題では、ILEI 転写制御と老化や Alzheimer 病に伴う発現低下機構の解析と、ILEI 発現低下が脳 A 蓄積の要因となることの検証を推進する。これにより、従来殆ど不明であった脳内 A 蓄積のリスクに関する重要な一端を明らかにすることを目的とする。脳 A は生理的加齢によるとされてきた軽度の認知機能障害の相当部分の原因でもあることが指摘され、ILEI を介した予防的抗 A 治療はその克服にも有効性が期待できる。次世代医療の中で、高齢者スクリーニングとして脳 A 蓄積リスクを分子レベルで評価し、リスクへの介入による認知症先制医療を実現することを目標とし、研究を進める。

(1) ILEI 転写制御機構と老化に伴う発現低下機構の解析

ILEI 発現制御メカニズムを、プロモーターと転写因子の解析から解明し、老化や Alzheimer 病(AD)に伴う転写活性低下のメカニズムを明らかにする。また、治療戦略としての ILEI 発現誘導の方策を検討する。

(2) 脳 ILEI 発現低下が AD 発症のリスク要因であることの検証

ILEI 減少が脳内 A 蓄積の要因となる可能性を、大脳皮質や海馬など前脳領域の神経細胞特異的に、かつタモキシフェン(Tam)投与誘導性に ILEI 遺伝子欠失を誘起できる ILEI-cKO マウスを作出して調べる。脳内 A 蓄積開始や記憶障害の出現時期について調べ、ILEI 発現低下が AD 発症のリスク要因であるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ILEI 転写制御機構と老化に伴う発現低下機構の解析

ILEI 遺伝子プロモーター領域の同定

ヒト ILEI 転写開始点上流のゲノム(約 8.8 kb)を BAC からサブクローニングし、Luc2/hRluc を用いた Luciferase レポーターアッセイにてプロモーター活性を示す領域を絞り込む。これを非神経系 HEK293、神経系 SH-SY5Y、マウス初代培養ニューロンにおいて調べる。細胞内転写発現様式の制御にこの領域が必要十分か否かを確認するため、この領域をゲノム編集 CRISPR/Cas9 により欠損させ、内在性 ILEI 発現の変化を検証する。

ILEI 転写因子の同定

上記で特定した転写活性領域の DNA 配列を元に複数のデータベース検索から転写因子候補を見出し、培養細胞にてノックダウンおよび強制発現を行う。この結果、候補として挙がった因子について、特定した ILEI 発現制御領域と ILEI 制御因子候補との結合をゲルシフトアッセイにより確認する。

加齢や AD における転写活性低下の解析

剖検脳の網羅的 RNA-seq 解析を実施し、AD 剖検脳における ILEI mRNA レベルが低下しているかどうかを確認する。また、剖検脳の前頭葉皮質の神経細胞核を FACS により回収し、ILEI 遺伝子メチル化を評価する。さらに、剖検脳から核タンパク質を抽出し、各転写因子候補の発現量変化を調べ、ILEI 活性領域との結合能を調べ、転写因子からの要因を検討する。

(2) 脳 ILEI 発現低下が AD 発症のリスク要因であることの検証

App(NL-F);ILEI-cKO マウスの作出

Tam 誘導性かつ前脳領域の神経細胞に特異的な CaMKII プロモーター下に Cre 発現を誘導することにより ILEI 遺伝子欠失を誘導できる ILEI-cKO マウスを作出し、Swedish + Iberian 変異型ヒト化 APP ノックイン(App(NL-F))マウス(*Nat Neurosci* 17:661,2014)と交配する。ILEI floxed マウスは作出済みであり、CaMKII-CreERT2 マウス(*BMC Neurosci* 8:63,2007)および AppNL-F マウスとの交配により、App(NL-F/NL-F);CaMKII-CreERT2(+/-);ILEI(flx/flx)マウスが産出している。外表に異常はなく、正常に発育することを確認している。

App(NL-F);ILEI-cKO マウスの解析

これまでに、脳内 ILEI は A β 前駆体や産生酵素とともにシナプス小胞やアクティブゾーンに局在し、神経活動依存的に A β とともに細胞外に分泌されることを見出している。

App(NL-F/NL-F)マウスでは 10 か月齢に大脳皮質の A β 沈着が始まり、12 か月齢から記憶障害が検出可能とされる。また、脳 ILEI 発現レベルは出生直後に最も高く、その後は徐々に減少することから、発生への影響を避けるため、成熟後に Tam 投与を行う。3 か月齢、6 か月齢、9 か月齢の App(NL-F/NL-F);CaMKII-iCreERT2(+/-);ILEI(flx/flx)マウス(App(NL-F);ILEI-cKO マウス)に Tam 投与を開始し、脳内 ILEI 発現減少と A β 産生及び沈着との関連性を経時的に評価する。評価は A β 免疫組織染色および western blotting、ELISA による。また、記憶学習能は Y 字型迷路の行動実験を実施する。

4. 研究成果

(1) ILEI 転写制御機構と老化に伴う発現低下機構の解析

ILEI 遺伝子プロモーター領域および転写因子の同定に関して、転写開始点上流領域を BAC からサブクローニングし、Luc2/hRluc を用いたデュアルレポーターアッセイにてプロモーター活性を示す領域を絞り込んだところ、転写開始点のごく上流付近の 2 か所にあり、その活性部位は非神経系 HEK293、神経系 SH-SY5Y、マウス初代培養ニューロンに共通していた。さらに、上記の転写活性領域の DNA 配列を元に複数のデータベース検索から転写因子候補を見出し、培養細胞にてノックダウン(KD)および強制発現(OE)を行ったところ、SP1 と EBF1 が転写因子と見られた。培養細胞株にてこの領域をゲノム編集 CRISPR/Cas9 により欠損させると、内在性 ILEI 発現は低下し、SP1、EBF1 等を KD および OE しても変化は見られなかった。特定した ILEI 発現制御領域と SP1、EBF1 との結合をゲルシフトアッセイおよび ChIP-qPCR により解析したところ、転写活性領域とこれらの 2 因子との結合が確認できた。さらに、剖検脳を用いた網羅的 RNA-seq 解析から、AD 剖検脳における ILEI mRNA レベルの低下が確認できた。剖検脳の前頭葉皮質の神経細胞核を FACS により回収し、ILEI 遺伝子メチル化を評価した結果、アルツハイマー病(AD)脳に特有のパターンは認められなかった。剖検脳からの核タンパク質抽出物では、SP1、EBF1 発現量が減少しており、剖検脳を用いたゲルシフトアッセイおよび ChIP-qPCR による解析から、AD 脳での SP1、EBF1 と ILEI 発現制御領域との結合能低下が見られた。

(2) 脳 ILEI 発現低下が AD 発症のリスク要因であることの検証

App(NL-F);ILEI-cKO マウスの解析に関しては、Tam 投与により前脳領域の神経細胞に特異的な CaMKII プロモーター下で Cre 発現を誘導できる ILEI 遺伝子を欠損させた ILEI-cKO マウスを作製し、さらに Swedish + Iberian 変異型ヒト化 APP ノックイン(App(NL-F))マウスと交配した。成熟後の 3 か月齢および 6 か月齢の App(NL-F);ILEI-cKO マウスおよびコントロールマウスに Tam 投与し、14 か月齢にて A β 免疫組織染色および ELISA を実施したところ、コントロールと比較し、App(NL-F/NL-F);ILEI-cKO マウス脳で A β 沈着の増加が認められた。加えて、3 か月齢に Tam 投与を行った App(NL-F);ILEI-cKO マウスの方が 6 か月齢のものよりも A β 沈着の増加は大きかったことから、早期の ILEI 発現減少による影響があることが示唆された。一方、9 か月齢に Tam 投与を行った場合には有意差は見られなかった。さらに、充分成熟した時期の 6 か月齢において Tam 投与し、Y 字型迷路により短期の作業記憶を測定したところ、コントロールと比較し、10 か月齢から alternation の有意な減少が見られ、作業記憶の増悪が示唆された。

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 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Watanabe Naoki, Nakano Masaki, Mitsuishi Yachiyo, Hara Norikazu, Mano Tatsuo, Iwata Atsushi, Murayama Shigeo, Suzuki Toshiharu, Ikeuchi Takeshi, Nishimura Masaki	4. 巻 31
2. 論文標題 Transcriptional downregulation of FAM3C/ILEI in the Alzheimer's brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 122 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab226	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 Seita Yasunari, Morimura Toshifumi, Watanabe Naoki, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Nakamura Shinichiro, Suzuki Toshiharu, Yanagisawa Daijiro, Tsukiyama Tomoyuki, Nakaya Masataka, Okamura Eiichi, Muto Masanaga, Ema Masatsugu, Nishimura Masaki, Tooyama Ikuo	4. 巻 75
2. 論文標題 Generation of Transgenic Cynomolgus Monkeys Overexpressing the Gene for Amyloid- Precursor Protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 45 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-191081	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 Nakano Masaki, Mitsuishi Yachiyo, Liu Lei, Watanabe Naoki, Hibino Emi, Hata Saori, Saito Takashi, Saido Takaomi C., Murayama Shigeo, Kasuga Kensaku, Ikeuchi Takeshi, Suzuki Toshiharu, Nishimura Masaki	4. 巻 80
2. 論文標題 Extracellular Release of ILEI/FAM3C and Amyloid- Is Associated with the Activation of Distinct Synapse Subpopulations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 159 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-201174	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊直希, 村山 繁雄, 西村正樹
2. 発表標題 A 産生抑制分子 ILEI / FAM3C の発現制御機構
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊直希, 中野将希, 西村正樹
2. 発表標題 A 産生を抑制する ILE1/FAM3C の転写制御メカニズム解析
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

1. 発表者名 渡邊直希, 中野将希, 西村正樹
2. 発表標題 新規A 産生抑制分子 ILE1 の発現低下によるアルツハイマー病リスクの検証
3. 学会等名 第41回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2022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

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			
米国	CHORI BACPAC Resources	National Cancer Institute		
ドイツ	German Cancer Research	Max Planck Institute		
フランス	IGBMC			
カナダ	Mount Sinai Hospital			
米国	CHORI BACPAC Resources	National Cancer Institute		

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	German Cancer Research	Max Planck Institute		
フランス	IGBMC			
カナダ	Mount Sinai Hospital			