

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08668

研究課題名(和文) プレシナプスにおけるアルツハイマー病発症の分子機序解析

研究課題名(英文) Study of synaptic mechanism for Alzheimer's disease pathogenesis

研究代表者

渡部 博貴 (Watanabe, Hirotaka)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任講師

研究者番号：30422413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：PS遺伝子のヒト神経細胞での生理的機能を検討するため、CRISPR/Cas9系を用いて、健常人由来ヒト人工多能性幹細胞(iPSC)からPS条件のノックアウトiPSCを作製した。これらのiPSCを大脳皮質神経細胞へ分化誘導し、Cre発現レンチウイルスを感染させることで、神経細胞でのPS発現を消失させることに成功した。これらのPSノックアウト神経を用いてA β 産生を測定したところ、PS1/PS2の両方ともノックアウトした神経細胞のみA β の低下が認められた。マウスでのA β 産生には主にPS1が重要であることから、ヒト神経細胞ではマウスとは異なるPS1/セクレターゼの性質を持つことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病(AD)の臨床・病理診断には長らく老人斑や神経原線維変化の責任分子であるA β やタウが用いられており、ADの発症や進展に関与していると広く受け入れられている。しかし、家族性ADで同定されている変異の大部分はPS遺伝子であるにもかかわらず、老人斑や神経原線維変化への寄与がマウスでは顕著ではなかった。本研究は、ヒト人工多能性幹細胞を用いることでヒト神経細胞でのPSの生理的機能を探求し、ヒトとマウスでのA β の産生能に対するPSの機能に差があることが分かった。AD発症におけるPS変異の機能的な影響を解明していくことは、画期的なAD治療薬の創出に繋がることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, to investigate whether presenilin 1 (PS1) plays essential physiological roles in human cortical mature neurons, we generated PS1 conditional knockout (cKO) induced pluripotent stem cells (iPSCs), in which PS1 can be ablated selectively under an introduction of Cre recombinase, and/or additional PS2 KO iPSC. We then differentiated the fPS1/fPS1 and fPS1/fPS1;PS2-/- iPSCs into human cortical neurons in vitro, and ablated PS1 proteins by infection of lentivirus expressing Cre. Whereas no gross morphological alteration and neuronal marker expression was observed between PS1- and/or PS2-null neurons and control neurons, A β production was robustly reduced only in PS1/PS2-null neurons. In contrast to previous studies using mouse genetics, in which β -secretase activity is mainly attributable to PS1, human PS2/ β -secretase activity is unexpectedly comparable with PS1/ β -secretase in human neurons. These results suggest an importance of enzyme/substrate subcellular localization.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 iPSC細胞

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の日本で約 200 万人以上が罹患しているとされるアルツハイマー病 (Alzheimer's Disease; AD) は、特徴的な神経病理像として、老人斑、神経原線維変化、神経細胞死が認められる初老期発症の神経変性疾患である。1990 年代に常染色体優性遺伝を示す家族性 AD (Familial AD; FAD) で 3 つの原因遺伝子が同定されているが、これまで報告されている変異の約 90% は *Presenilin 1* と *Presenilin 2* (*PS1*, *PS2*) 遺伝子上に存在するミスセンス変異である。これら 2 つの遺伝子がそれぞれコードしているプレセニリン蛋白質 (*PS*; *PS1*, *PS2*) は、患者脳内で特徴的な老人斑の主成分 アミロイドペプチド (*A*) の産生に必須であるアスパラギン酸プロテアーゼ複合体 (セクレターゼ) の触媒サブユニットである。*A* は 38~43 アミノ酸長の短いペプチドであり、もうひとつの原因遺伝子 Amyloid precursor protein (*APP*) がコードする前駆体膜蛋白質が段階的プロセッシングを受けて産生される。セクレターゼの切断部位によって *A* のペプチド長が決まっており、40 アミノ酸長の *A*₄₀ と 42 アミノ酸長の *A*₄₂ が生体内代謝産物の大部分を占めている。これまでの研究から、より凝集しやすい生化学的性質を持つ *A*₄₂ 量の相対的増加と、それに引き続く老人斑としての脳実質への沈着が、その後の病的経路を活性化しようという“アミロイド仮説”が提唱されている (Hardy J and Selkoe DJ 2002 Science. 297:353)。この仮説に基づき、FAD における *PS* 遺伝子変異は、より毒性の高い *A*₄₂ の産生亢進を促す機能獲得型変異であると広く考えられてきた。このように、*PS*/セクレターゼの研究は *A* 産生を中心に展開されてきたが、本研究は *PS*/セクレターゼのシナプスにおける生理的機能を探求する新規の提案である。

PS1 遺伝子のノックアウト (*KO*) マウスは周産期致死であるため、AD 患者発症時に相当する週齢での *KO* マウスを使用した機能解析は長らく出来ない状況であった。申請者らは *PS* の生理学的及び病態生理学的機能を解明するため、複数の *PS* 遺伝子改変マウスを使用して、多角的な視点で成体脳での *PS* の機能を検討してきた。まず、*CamKII* プロモーターを用いた *Cre/loxP* 系によって成体神経細胞特異的に *PS* 発現を *KO* させた *PS conditional double knockout* (*PS cDKO*) マウスでは、進行性の神経細胞死と記憶学習障害が起きることを示した (Saura CA et al. 2004 Neuron 42:23, Wines-Samuels M et al. 2010 PLoS One 5:e10195, Watanabe H et al. 2014 J Neurosci)。次に、疾患家系から同定された *PS1* 変異を持つ複数の *Knock-in* (*KI*) マウスを複製し、これらの変異が *PS* の機能喪失変異 (Loss of function) であることを示した (Watanabe H et al. 2012 J Neurosci, Xia D and Watanabe H et al. 2015 Neuron)。これらの *PS* 遺伝子改変マウスを用いた研究から、*PS* が神経細胞の生存や記憶・学習に重要であり、家族性認知症で同定されている *PS* 遺伝子のミスセンス変異が *PS* の生理的機能を損ねているということが明らかとなった。さらに非常に興味深いことに、申請者らのグループは、*PS cDKO* マウスで神経細胞死が顕在化する前に、シナプスが関わる機能障害が最初にかかることを報告している (Zhang C et al. 2009 Nature. 460:632, Wu B et al. 2013 Proc Natl Acad Sci USA. 110:15091)。このことから *PS* がシナプスの生理的機能に重要な役割を果たしていることが結論されるが、詳細な分子機序は今後の課題であった。したがって、“*PS* はシナプスでの生理的機能に深く関与し、*PS* 変異はその機能障害を端緒として AD 病態変化を導く”との仮説を立て、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

PS は膜蛋白質を基質とするアスパラギン酸プロテアーゼ複合体の触媒サブユニットであり、その遺伝子は家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として同定された。アルツハイマー病では、過剰に蓄積した特徴的な脳内凝集体が病理像として認識される一方、神経回路ネットワーク内でのシナプス障害が早期の病変として知られている。申請者らは、プレセニリン遺伝子の複数の遺伝子改変マウスを精査する事により、*PS* がシナプスでの生理機能に重要な役割を果たしている事を見出している。本研究では、ヒト神経細胞における *PS* のシナプスでの生理的機能を分子レベルで詳細に解明し、アルツハイマー病発症における *PS* 変異の病態生理学的分子機序を解明する。

3. 研究の方法

アルツハイマー病発症機序の分子レベルでの解明を目指した *PS* の機能解析には、脳内を再現できるモデルが重要である。本研究では、幹細胞由来のヒト神経細胞を用いてマウスで得られている結果がヒトでも同様に起こっているか検証する。そのために、健康人由来人工多能性幹 (*iPS*) 細胞からゲノム編集技術で *PS KO iPS* 細胞を作製し、ヒト遺伝的背景における *PS* 遺伝子産物の生理学的機能を解析する。このヒト神経細胞モデルを用いて、シナプス機能への分子機序を、分子生物学的手法やイメージング技術で明らかにする。なお、本研究の申請時には、遺伝子改変マウスも用いる計画としていたが、*iPS* 細胞の作出などに労力を割いたことから、本研究では *iPS* 細胞を用いた解析を中心に施行した。

(1) *PS* 機能を評価しうる *iPS* 細胞の樹立と大脳皮質神経細胞への分化誘導法開発

ゲノム編集技術による *PS KO iPS* 細胞の樹立

ヒト *iPS* 由来の神経細胞での *PS1* の生理的機能を解析する目的において、*PS1 KO iPS* 細胞

は必須となるが、PS1 は神経幹細胞の維持に必須であることから、PS1 KO iPS 細胞は解析しにくい可能性がある。したがって、CRISPR-Cas9 のゲノム編集技術を用いて、PS1 conditional KO (cKO) iPS 細胞を樹立する。ターゲティングベクター及び PS1 遺伝子を標的とする single-guide RNA/Cas9 発現ベクターを構築し、健康人由来 iPS 細胞へ導入することで、目的の iPS 細胞を樹立する(図 1)。さらに PS1 KO では、ホモログである PS2 による代償作用が予想されるため、同時に CRISPR-Cas9 のゲノム編集技術を用いて PS2 KO も導入する。

FAD 患者由来 iPS 細胞の樹立

慶應義塾大学及び複数の共同研究先より FAD 家系の iPS 細胞及び線維芽細胞を入手し、PS 変異を持つ iPS 細胞を作製・維持する。現在まで、PS1 A246E 変異を含む複数症例の iPS 細胞を入手している。iPS 細胞として入手していない PS1 変異を持つ体細胞からは、初期化因子導入で iPS 細胞を樹立する。

ヒト iPS 細胞からの神経細胞への分化誘導法開発

ヒト iPS 細胞に dual SMAD 阻害剤を作用させることで、外胚葉運命を持った神経前駆細胞を誘導する。その後、神経前駆細胞の分散培養を始めることで、成熟した大脳皮質神経細胞を作出する分化誘導法を確立する。フィーダーフリー iPS 細胞から神経細胞を効率よく分化誘導する手法を開発し、その神経細胞としての性質を検証する。

(2) ヒト iPS 由来神経細胞の解析

PS 変異及び PS KO のヒト iPS 由来神経細胞における APP 分解産物の解析

iPS 細胞から大脳皮質神経細胞へ分化誘導させ、PS 欠失によるシナプス分子の変化をウェスタンブロットや免疫細胞化学染色などで解析する。さらに、AD に特徴的な病理所見である老人斑と神経原線維変化を構成する A β とタウについて、PS KO による影響を検討する。iPS 由来ヒト神経細胞から培養上清へ放出される A β はサンドウィッチ ELISA を用いて測定し、タウについては、リン酸化を特異的に認識する抗体を用いた免疫細胞化学染色、或いはウェスタンブロットを行う。

PS 変異及び PS KO のヒト iPS 由来神経細胞における神経形態・機能の解析

分化誘導した各 PS 変異を持つ神経細胞を 1 か月以上の長期間培養した後、神経突起長や突起分枝などを測定する。また、PS cKO、及び PS 変異 iPS 神経細胞でのシナプス機能の電気生理学的特性、カルシウム蛍光指示薬を用いたカルシウムイメージングを検討する。

ヒト iPS 由来神経細胞における セクレターゼ複合体局在の解析

PS/ セクレターゼ複合体を特異的に認識し、内在レベルで免疫染色に使用可能な A5226A 抗体を用いて (Hayashi I et al. 2012 Oncogene 31:787)、ヒト iPS 由来神経細胞での セクレターゼ複合体と各細胞内小器官との局在を検討する。

4. 研究成果

本研究では、シナプス機能の分子生物学的解析を中心とした計画を申請していたが、PS1/PS2 の APP プロセッシングの新たな知見が得られたこと、及び電気生理学的解析を行うまでの予備検討が間に合わなかったこともあり、ヒト神経細胞における PS/ セクレターゼ複合体の酵素学的解析を中心に行った。

(1) PS 機能を評価しうる iPS 細胞の樹立と大脳皮質神経細胞への分化誘導法開発

ゲノム編集技術による PS KO iPS 細胞の樹立

健康人由来ヒト iPS である 201B7 株に、PS1 ターゲティングベクター及び single-guide RNA (sgRNA) /Cas9 発現ベクターを導入することで、PS1 遺伝子 exon2/3 を loxP で挟む構造の PS1 cKO iPS 細胞を作製した(図 1)。さらに、PS2 遺伝子 exon5 を標的とした sgRNA と Cas9 タンパク質を導入することで、PS1 cKO/PS2 KO (PS cKO) iPS 細胞を作製した。各遺伝子型の iPS 細胞へ Cre を導入し、PS1 タンパク質の発現をウェスタンブロットで解析したところ、PS1 cKO iPS 細胞では PS1 発現がほぼ消失することを

図 1

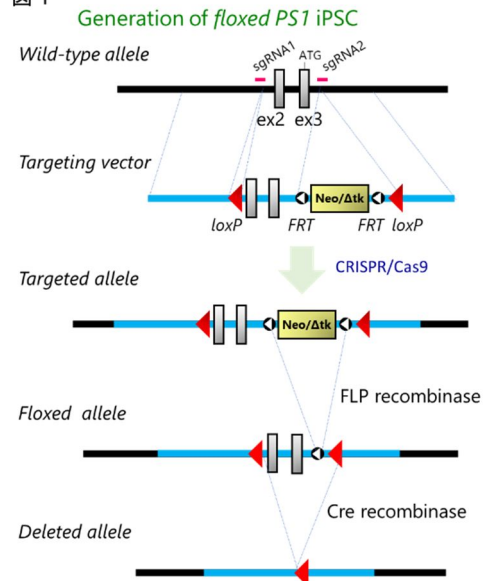
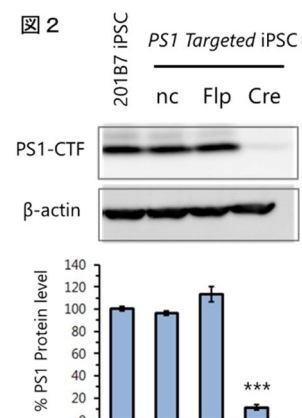


図 2



確認した(図2)。

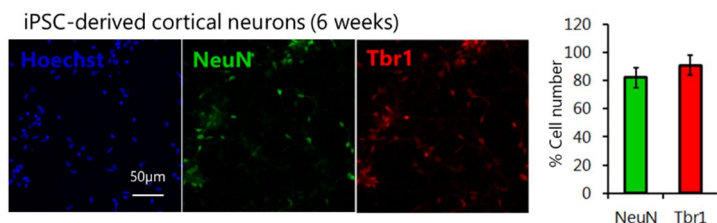
FAD患者由来 iPS 細胞の樹立

PS 遺伝子変異を持つ FAD 患者由来 iPS 細胞、または FAD 患者線維芽細胞を複数の共同研究機関から入手している。iPS 細胞として入手できなかった PS 変異を持つ FAD 患者由来線維芽細胞からは、初期化因子の導入によって複数症例の iPS 細胞を樹立した。さらに、患者由来の細胞が入手できない稀な変異 (E9) については、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術で目的変異を持つ iPSC の作出を行った。これらの iPS 細胞は核型解析などを行い、幹細胞としての性質を確認している。

ヒト iPS 細胞からの大脳皮質神経細胞の分化誘導法の開発

フィーダーフリー iPS 細胞から dual SMAD 阻害剤、及び WNT 阻害剤を組み合わせることにより、大脳皮質神経細胞を分化誘導した。分化誘導 1 か月後に成熟神経細胞マーカー NeuN、前脳特異的神経細胞マーカー TBR1、汎神経細胞マーカー III-Tubulin で免疫染色したところ、NeuN と TBR1 は全細胞において約 80 以上の比率を示し、高効率で成熟した大脳皮質神経細胞へ分化誘導していることが示された(図3)。

図3



(2) ヒト iPS 細胞由来神経細胞の解析

PS 変異及び KO のヒト iPS 由来神経細胞における APP 分解産物の解析

PS cKO iPS 細胞から分化誘導した大脳皮質神経細胞へ Cre 発現レンチウイルスを感染させることで成熟神経細胞の PS1 及び PS1/PS2 を KO させた。これらの神経細胞から分泌された A を定量したところ、PS1/PS2 を両方とも KO した神経細胞でのみ A が有意に減少した(図4A)。マウス脳神経では PS1 のみの KO で A 産生が有意に低下するという先行研究とは異なっており、ヒトとマウスでの種差、或いは切断様式の違いの可能性を示している。これらの成果は、2019 年に日本神経科学会 (@新潟) での発表をし、国際雑誌に投稿準備中である。

次に PS1 変異を持つ iPS 細胞から分化誘導した FAD 患者由来神経細胞では、健常人由来の神経細胞に比べ、A₄₂/A₄₀ 比が有意に上昇していることを見出した。さらに PS1 C410Y 変異では PS/セクレターゼ活性が有意に低下していることも明らかにしている。

PS 変異及び PS KO のヒト iPS 由来神経細胞における神経形態・機能の解析

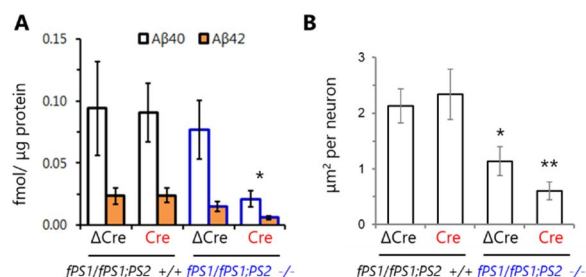
Cre レンチウイルスを感染することで作製した PS1、PS2 及び PS1/PS2 KO 神経細胞を MAP2 で免疫染色し、その陽性神経突起長の長さを計測した。4 群の神経突起長に有意な差は認められなかった。

次に Fluo8 などのカルシウム指示薬を用いたカルシウムイメージングを行い、PS の有無、或いは PS1 変異によってカルシウム動態に差があるかを検討したところ、ヒト iPS 由来神経では高 KCl 刺激下においてもカルシウム応答が弱いことが判明した。細胞内カルシウム動態を正確に測定するためには、神経細胞分化時にアストロサイトとの共培養など工夫を行う必要がある。

PS 変異及び PS KO のヒト iPS 由来神経細胞における セクレターゼ複合体局在の解析

Cre レンチウイルスを感染することで作製した PS1、PS2 及び PS1/PS2 KO 神経細胞を活性化セクレターゼ抗体 (A5226A)、初期エンドソームマーカー (EEA1)、後期エンドソームマーカー (LAMP1) で免疫染色し、その陽性顆粒の面積等を計測した。LAMP1 陽性の面積は 4 群間で変化はなかったが、EEA1 陽性の面積はコントロールに比べ PS1、PS1/PS2 KO 神経においてわずかに増加していた。また、4 群の神経での セクレターゼ局在を検討したところ、LAMP1 との局在は PS2 KO で低下していることから、PS2 は主に LAMP1 陽性の細胞内小器官に局在していると推測された(図4B)。

図4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morimoto Satoru, Ishikawa Mitsuru, Watanabe Hiroataka, Isoda Miho, Takao Masaki, Nakamura Shiho, Ozawa Fumiko, Hirokawa Yoshifumi, Kuzuhara Shigeki, Okano Hideyuki, Kokubo Yasumasa	4. 巻 9
2. 論文標題 Brain Transcriptome Analysis Links Deficiencies of Stress-Responsive Proteins to the Pathomechanism of Kii ALS/PDC	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 423 ~ 423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9050423	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 Sho Misato, Ichyanagi Naoki, Imaizumi Kent, Ishikawa Mitsuru, Morimoto Satoru, Watanabe Hiroataka, Okano Hideyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 A combinational treatment of carotenoids decreases A secretion in human neurons via secretase inhibition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2019.10.006	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 Ishikawa Mitsuru, Aoyama Takeshi, Shibata Shoichiro, Sone Takefumi, Miyoshi Hiroyuki, Watanabe Hiroataka, Nakamura Mari, Morota Saori, Uchino Hiroyuki, Yoo Andrew S., Okano Hideyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 miRNA-Based Rapid Differentiation of Purified Neurons from hPSCs Advancetowards Quick Screening for Neuronal Disease Phenotypes In Vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 532 ~ 532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9030532	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 該当する

1. 著者名 Nakamura Mari, Shiozawa Seiji, Tsuboi Daisuke, Amano Mutsuki, Watanabe Hiroataka, Maeda Sumihiro, Kimura Taeko, Yoshimatsu Sho, Kisa Fumihiko, Karch Celeste M., Miyasaka Tomohiro, Takashima Akihiko, Sahara Naruhiko, Hisanaga Shin-ichi, Ikeuchi Takeshi, Kaibuchi Kozo, Okano Hideyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Pathological Progression Induced by the Frontotemporal Dementia-Associated R406W Tau Mutation in Patient-Derived iPSCs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 684 ~ 699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2019.08.011	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

1. 著者名 Watanabe H, Shen J	4. 巻 114
2. 論文標題 Dominant negative mechanism of Presenilin-1 mutations in FAD	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 12635-12637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1717180114	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 該当する

[学会発表] 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 渡部博貴、周智、Celeste Karch、岡野栄之
2. 発表標題 ヒト人工多能性幹細胞を利用したpresenilin遺伝子変異の病態学的意義の検討
3. 学会等名 第38回 日本認知症学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirotaka Watanabe, Kent Imaizumi, Zhi Zhou, Hideyuki Okano
2. 発表標題 Development of novel stem cell tool to examine physiological functions of presenilin/ -secretase in human neurons.
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本悟、渡部博貴、岡本理志、岡野栄之
2. 発表標題 ApoE蛋白機能解析のためのヒトiPS細胞由来アストロサイト分化誘導法の確立
3. 学会等名 日本認知症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirotaka Watanabe
2. 発表標題 Presenilin and Alzheimer ' s
3. 学会等名 Blue Ribbon Panel Meeting on Setting the Future Directions of Alzheimer's Disease Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----