

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20893

研究課題名（和文）高精度ゲノム編集が可能にする疾患保護編集によるアルツハイマー病予防

研究課題名（英文）Development of high-precision genome editing technology to prevent Alzheimer's disease through disease-protective editing.

研究代表者

日野 智博（Hino, Tomohiro）

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：50967578

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病の一塩基多型に関して網羅的解析を行い、A 量の減少する疾患保護多型の同定に成功した。また、保護多型をノックインしたアルツハイマー病モデルマウスにおいてA の減少を確認した。さらに、アデニンベースエディターを搭載したアデノ随伴ウイルスの頭蓋内局所注射により後天的ゲノム編集についても確認することができた。今後は引き続き病理学的評価および行動実験による治療効果の確認を行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会に伴う認知症患者数の増加は社会的な問題であり、その約3分の2を占めるアルツハイマー病の患者は今後増加していくことが予想される。本研究ではアルツハイマー病に対して発症予防効果がある一塩基多型を同定することに成功し、その予防効果を細胞実験およびアルツハイマーモデルマウスで示すことができたため、今後の認知症研究において大きな一歩となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We performed a comprehensive analysis on single nucleotide polymorphisms in Alzheimer's disease and successfully identified a disease-protective polymorphism with reduced A levels. In addition, we confirmed that A was reduced in a mouse model of Alzheimer's disease in which the protective polymorphism was knocked in. Furthermore, we were able to confirm acquired genome editing by intracranial local injection of adeno-associated virus carrying an adenine-based editor. Pathological evaluation and behavioural experiments will continue to confirm the therapeutic effect.

研究分野：循環器内科

キーワード：アルツハイマー病 ゲノム編集 deep mutational scanning

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化に伴い、日本における認知症患者の数は急激に増加しており、2012年には462万人であった認知症患者の数は、2060年には1154万人へと増加するといわれている。現在の認知症の主な割合はアルツハイマー型認知症が67%とその大半を占めており、今後アルツハイマー型認知症患者の増加が予想されている。しかし、その医療や介護に要するコストは最大で年間12兆円にも上るとされており、今後の高齢化社会において決して無視することができない問題となっている。アルツハイマー病は、アミロイド前駆体（APP）の切断により生じるアミロイド（A $\beta$ ）の沈着とタウ蛋白質の蓄積による神経細胞死によって脳が委縮する疾患であるが、その根本的な治療は未だ確立されておらず、今後の医療経済的な観点からも新たな治療の開発が期待されている。

### 2. 研究の目的

近年のゲノム疫学研究により、APP遺伝子のA673T変異（アイスランド変異）がADに対して保護的に働くことが明らかとなり、アルツハイマー病ハイリスク患者や超早期アルツハイマー病の患者において保護的多型のゲノム編集による発症予防、進行予防が期待されている。我々はこれまでの疫学研究では評価が困難であったAPP遺伝子のレアバリエーションに関して網羅的な検討を行い、A $\beta$ の産生がほぼ消失する新たな保護的多型の同定に成功した。そこで、その新規保護的多型に基づく疾患予防の可能性をin vitro およびin vivo で検討するとともに、遺伝子編集治療への応用を試みた。

### 3. 研究の方法

バイオバンクのデータなどからADに関する一塩基多型を網羅的に解析し、A $\beta$ の量の比較を行った。さらに、保護多型をノックインしたヒト化ADモデルマウスを作成し、A $\beta$ の定量評価を行った。また後天的なin vivo ゲノム編集として、塩基編集ツールであるアデニンベースエディターをdeep mutational scan法を用いて改良し、アデニンベースエディター改変体を搭載したアデノ随伴ウイルス（AAV）を海馬領域へ頭蓋内定位注射し、遺伝子編集効率をおよびA $\beta$ の沈着を評価した。

また、使用するアデニンベースエディターについては、保護多型の配列をリンカーとしたsplit GFPを用いたレポーターシステムでDeep mutational scanningによる網羅的解析を行った。Deep mutational scanningは各種タンパク質の1アミノ酸変異ライブラリによる網羅的機能評価を行うことができる手法であり、その結果得られた変異を組み合わせることで編集効率の上昇する高機能アデニンベースエディターの作出を試みた。

### 4. 研究成果

まず、我々は培養細胞実験において、アルツハイマー病関連のSNPsを網羅的に検討し、A $\beta$ の前駆体であるC99のウェスタンブロットによる定量評価をそれぞれのSNPsにおいて検証した。その結果、既知の保護多型であるA673T変異ではA $\beta$ の産生が半減したのに対して、新規多型ではA $\beta$ の産生はほぼ消失した（図1）。

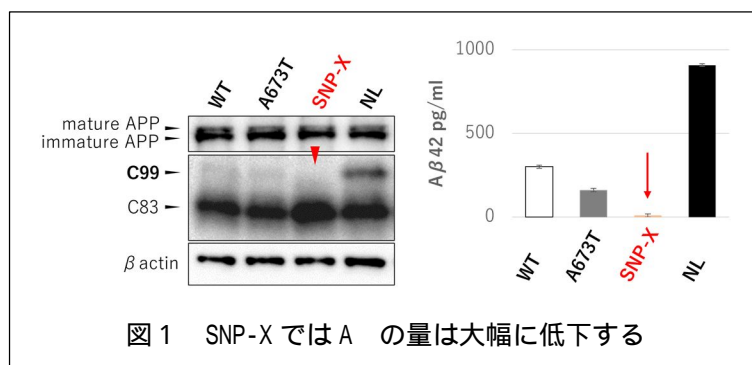


図1 SNP-XではA $\beta$ の量は大幅に低下する

続いて、それぞれのSNPsにおける細胞上清中のA $\beta$ 42およびA $\beta$ 40についてもELISAで評価を行ったところ、新規多型では大幅にA $\beta$ の低下を認めていた。さらに、この新規保護多型を既知のアルツハイマー型認知症の変異に組み込んだところ、そのすべてにおいてA $\beta$ の量は大幅に

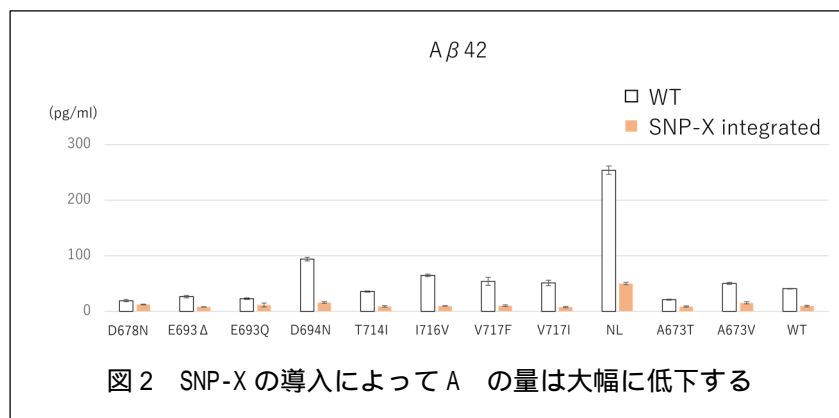
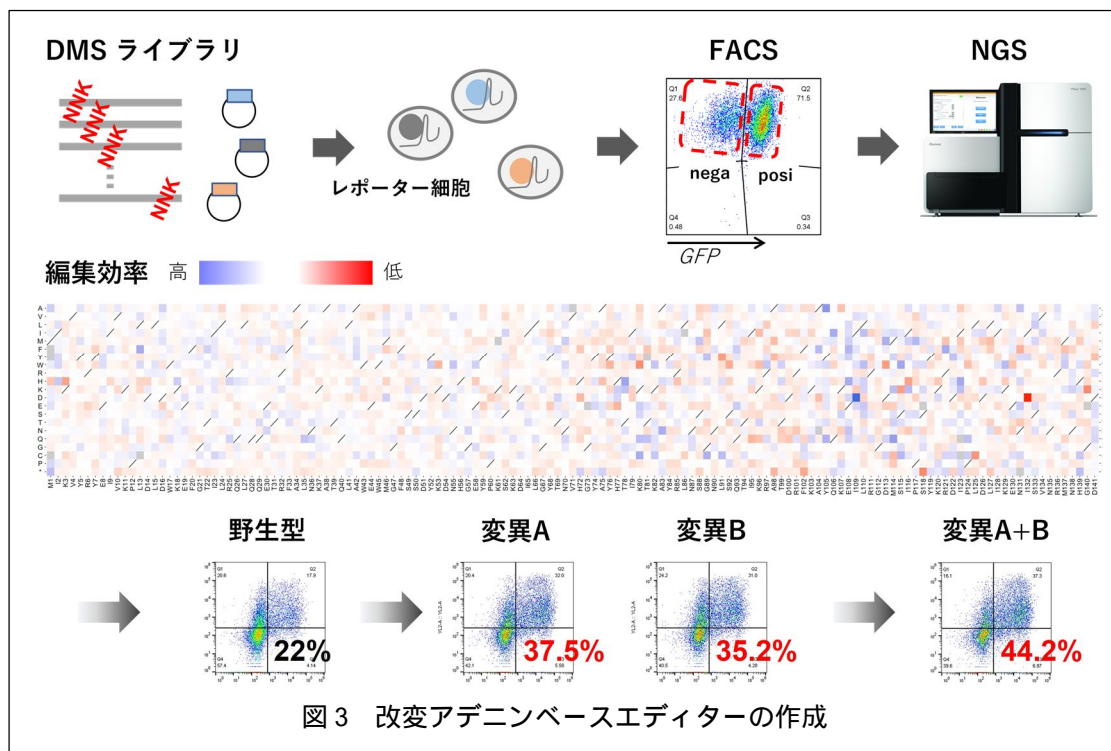


図2 SNP-Xの導入によってA $\beta$ の量は大幅に低下する

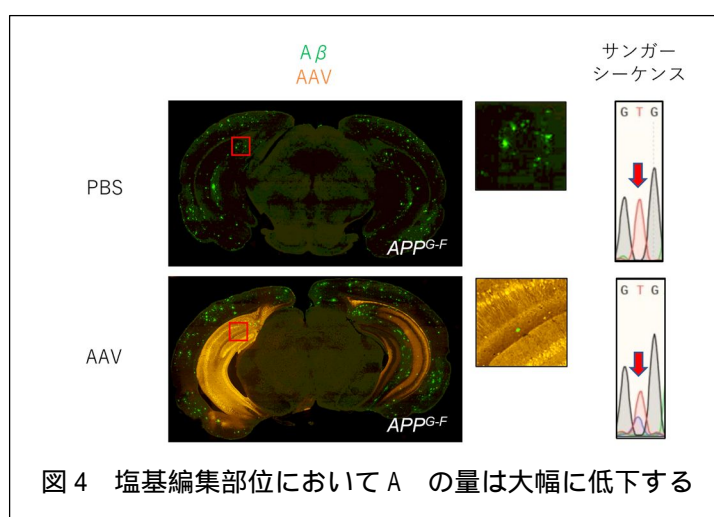
低下を認めた。以上のことから新規多型はアルツハイマー病ハイリスク患者においても保護的にはたらく可能性が示唆された(図2)。

続いて、新規保護多型をノックインしたアルツハイマー病モデルマウスを作成し、脳組織中の A $\beta$  42 および A $\beta$  40 の量を検討したところ、アルツハイマー病モデルマウスと比較し大幅に減少を認めていた。また、脳組織の免疫組織化学染色では新規保護多型ノックイン群でアミロイド斑はほぼ形成されず、本変異によるアルツハイマー病予防効果が示された。

さらに後天的なゲノム編集としてはアデニンベースエディターを用いた遺伝子編集を予定したが、野生型のアデニンベースエディターはそのままでは編集効率が低値であったため、アデニンベースエディターの改変にも着手した。具体的には GFP1-10 と GFP11 を新規保護多型の配列をもとにしたリンカーでつないだレポーター細胞を使用し、deep mutational scanning によって遺伝子編集効率が上昇する変異を同定し、それぞれの変異を組み合わせた改変アデニンベースエディターを作成した(図3)。



12 週齢のアルツハイマー病モデルマウスに改変アデニンベースエディターを搭載したAAVを頭蓋内定位注射し、1年後に脳組織におけるゲノム編集効率の評価を行ったところ、AAV 発現部位にて 30%程度の編集効率で目的配列への置換を確認することができた。また免疫組織染色により脳内の A $\beta$  の評価を行ったところ、AAV 発現部位にて A $\beta$  の産生が抑えられており、後天的ゲノム編集においてもアルツハイマー病に対する保護効果を示すことができた(図4)。



以上の結果より新規保護多型はアルツハイマー病に対して保護効果を認めており、後天的に導入を行うことでも効果があることが示された。今後はオープンフィールドテストにより、自発運動量などの評価を行っていくとともに、サンプル数を増やすことで統計学的な解析を行っていく予定である。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 日野 智博
2．発表標題 アルツハイマー病の保護的多型ゲノム編集による疾患予防
3．学会等名 第24回抗加齢医学会総会
4．発表年 2024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
---------	---------