

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290039

研究課題名(和文) 加齢性病態を再現する孤発性アルツハイマー病モデルマウスの開発と解析

研究課題名(英文) Development and analysis of new Alzheimer's disease model mice which can reproduce age-related changes in brain.

研究代表者

松田 潤一郎 (Matsuda, Junichiro)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・疾患モデル小動物研究室・研究リーダー

研究者番号：60181731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞特異的に細胞内輸送機能を低下させることで、脳の老年性(加齢性)変化を再現する孤発性アルツハイマー病モデルマウスの開発を目的とし、Tet-onシステムを用い軸索輸送モーター蛋白であるdynein特異的shRNAを神経細胞特異的に発現するマウス作成を目指した。細胞実験系ではdyneinのノックダウンに成功したが、作成したマウスの脳内でdyneinのノックダウンは確認されず、認知機能の低下も無かった。このマウスではshRNA発現量が不十分と考えられ、今後、より強力なプロモーターを用いることで、新たなアルツハイマー病モデルマウスの開発に取り組みたい。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop brand-new Alzheimer's disease model mice which can reproduce age-related changes such as endocytic pathology. Our previous studies showed that the alteration in dynein-mediated retrograde transport can reproduce age-related endocytic pathology in vitro. Therefore, we tried to generate the transgenic mice which specifically express shRNA against dynein in neuronal cells. Although we confirmed that our shRNA efficiently downregulated dynein in vitro analyses, we failed to observe the knockdown of dynein in the brain of generated mice. We observed neither cognitive dysfunction nor endocytic pathology in the mice. Since we confirmed the strong downregulation of dynein in vitro analyses, we considered that the expression level of shRNA would be insufficient in vivo. Thus, we attempt to use more potent promoters to generate new Alzheimer's disease model mice in future.

研究分野：実験動物学

キーワード：疾患モデル動物 アルツハイマー病 加齢

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) 患者の約 9 割は加齢によって発症する孤発性患者であり、その病態メカニズムは未だ不明であるが、AD 患者の脳組織を用いた病理学的解析や家族性 AD 患者の変異遺伝子解析により、アミロイド蛋白 (A $\beta$ ) の蓄積が AD 発症の引き金になることが示唆された。このため、A $\beta$  の産生を亢進させる家族性 AD 変異遺伝子を導入したトランスジェニック (Tg) マウスが数多く作出され、それらモデルマウスを用いた研究成果をもとに数多くの AD 治療候補薬が開発されたが、そのことごとくが実際の AD 患者を対象とした臨床試験では失敗に終わるといったショッキングな事態となった。この失敗の要因の 1 つとして、既存のモデルマウスの脳内では家族性 AD 変異遺伝子に由来する蛋白質が過剰に発現していることが挙げられる。孤発性 AD 患者はもちろんのこと、家族性 AD 患者においても変異遺伝子に由来する蛋白質の過剰発現は認められていないことから、たとえ病変形成が再現されるとはいえ、既存のモデルマウスは実際の AD 病態を忠実に再現するモデル動物であるとは言えない。

一方、我々はこれまで、遺伝子改変を伴わずとも AD 病変が加齢性に形成されるカニクイザルを用いて脳神経系の加齢性変化を検索してきた。その結果、脳内では加齢に伴いエンドサイトーシス障害が生じ、その結果として A $\beta$  の代謝系が障害を受け、A $\beta$  が蓄積する原因となることを発見した (Kimura et al., J Biol Chem 2009)。エンドサイトーシス障害は、孤発性 AD 患者の神経細胞において高頻度に検出される病的変化であり (Cataldo et al., J Neurosci 1997) 近年では家族性 AD 患者でも同様の報告がなされていることから (Nizon & Cataldo, J Alzheimer Dis 2006; Nixon et al., Autophagy 2008) AD 病態の根幹に大きく関与している可能性が指摘されている。

そこで、加齢性エンドサイトーシス障害の原因を明らかにするため、更にカニクイザル脳組織を用いた検索を進めたところ、脳内では加齢に伴い軸索輸送蛋白の 1 つである dynein (ダイニン) の機能が低下することを発見し、分子細胞生物学的手法を用いた検索により、dynein の機能障害がエンドサイトーシス障害を引き起こす要因であることを明らかにした (Kimura et al., J Biol Chem 2009)。これらの結果から、脳内で dynein の機能を人為的に低下させてエンドサイトーシス障害を誘発することができれば、実際に加齢性病態を再現できる新規 AD モデルマウスの開発が可能になるのではないかと考え、本研究計画の立案に至った。

### 2. 研究の目的

生体マウスの神経細胞内で dynein をノックダウンしてエンドサイトーシス障害を引

き起こし、A $\beta$  の蓄積や神経伝達物質輸送の障害など、これまでの in vitro 実験で得られた成果が in vivo でも再現されるか否かを明らかにするとともに、行動学的解析手法を用いてマウスの認知機能を解析し、老年性病態を再現する新たな AD モデルマウスとしての評価を行う。

### 3. 研究の方法

Tet-ON システム (テトラサイクリン存在下で目的遺伝子を発現させる) を応用し神経細胞特異的に rtTA (リバーステトラサイクリン活性化因子) を発現するマウス (CaMK2a-rtTA Tg) と、テトラサイクリン刺激応答性に dynein 特異的 shRNA を発現するマウス (tetO-hU6-dynein shRNA Tg) を交配することでダブル Tg マウスを作成し、テトラサイクリン系抗生物質であるドキシサイクリン (Dox) を与えることで、神経細胞特異的に dynein をノックダウンし新たな AD モデルマウスを作成することとした。

tetO-hU6-dynein shRNA Tg マウス作成用の遺伝子コンストラクトは図に示したとおりであり、テトラサイクリン非存在下での shRNA の発現が厳密に抑制される系とするためにテトラサイクリン調節性転写サイレンサー (tTS) を共発現する遺伝子コンストラクトとした。

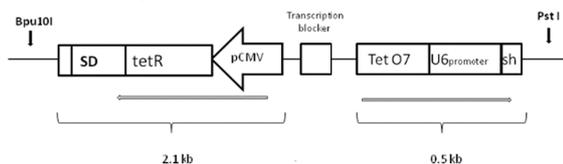


図 遺伝子コンストラクト

tetO-hU6-dynein shRNA が実際にテトラサイクリン応答性に dynein をノックダウンするかどうかを明らかにするため、マウス神経芽細胞腫細胞株である Neuro2a 細胞にこの遺伝子コンストラクトを遺伝子導入し、Dox 存在下で培養した細胞から蛋白質を抽出して western blot を行い、dynein の蛋白発現量を検索した。

この DNA コンストラクトの Bpu19I-PstI 断片 2,754bp を常法に従い C57BL/6NCrSlc マウスの受精卵前核に注入し、産仔を得、導入遺伝子の有無を PCR により判定し、系統として樹立した。本マウスと別途導入した CaMK2a-rtTA Tg マウスを交配し目的とするダブル Tg マウスを得た。

得られたダブル Tg マウス成熟雄 (6 カ月齢、n=5) に Dox を投与した。具体的には、5%スクロース水溶液に終濃度 2mg/ml となるよう調整した Dox 溶液を作成し、給水瓶を介した飲水によって投与した。

Dox を 4 週間投与後に Y 迷路試験を行い、Tg マウスの認知機能を評価した。認知機能評価後、マウスは安楽殺解剖して海馬組織を摘出し、western blot による生化学的検索とともに組織学的検索をあわせて行った。

#### 4. 研究成果

Tg マウス作成用の遺伝子コンストラクトについては細胞を用いた予備試験の結果、Dox 非存在下でも発現が見られたため、Dox 非存在下での shRNA の発現が厳密に抑制される系とするためにテトラサイクリン調節性転写サイレンサー(tTS)を共発現する遺伝子コンストラクト tetO-hU6-dynein shRNA (図)を作成した。

作成した遺伝子コンストラクト (tetO-hU6-dynein shRNA) が実際にテトラサイクリン応答性に dynein をノックダウンするかかを明らかにするため、Neuro2a 細胞を用いて検証を行った。まず、リポフェクション試薬を用いて Neuro2a 細胞に遺伝子導入を行い、培養 24 時間後に Dox を細胞培養液中に添加した。Dox 添加 24 時間後に細胞を回収してライセート化し、western blot による dynein の蛋白発現量検索を行ったところ、shRNA 発現細胞において有意な dynein のノックダウンが確認された。また、shRNA 発現細胞ではエンドソームの輸送に必須の GTPase である Rab5 や Rab7 の有意な発現上昇とともにアミロイド前駆体蛋白質 (APP) の蓄積が確認され、切断産物の蓄積も認められた。

遺伝子コンストラクト tetO-hU6-dynein shRNA 断片をマウス受精卵 340 個に注入し 247 個が生存し、そのうち 2 細胞期胚まで発生した 207 個を偽妊娠マウス卵管に移植し 33 匹の産仔を得た。このうち 4 匹 (4/33、12.1%) が Tg マウスであり、Tg マウス 4 ラインを樹立した。

CaMK2a-rtTA Tg マウスと tTS-tetO-hU6-GFP Tg マウス、または新規樹立した tTS-tetO-hU6-dynein shRNA Tg マウスを交配して得られたダブル Tg マウス (それぞれ、tetO-GFP Tg、tetO-shRNA Tg とする) の雄個体 (N=5) が 6 カ月齢に達した時点で Dox 投与を開始し、投与 4 週間後のマウスを用いて Y 迷路試験を行ったところ、tetO-GFP Tg と tetO-shRNA Tg 間における有意な差は残念ながら確認されなかった。安楽殺解剖後にそれぞれのマウスから脳組織を採取し、左大脳半球の海馬組織からマイクロゾーム画分を抽出して western blot を行ったところ、tetO-GFP Tg マウスにおいて GFP の発現が認められたのに対し、tetO-shRNA Tg マウスでは dynein のノックダウンは確認されなかった。また、右大脳半球を 4% パラホルムアルデヒドで固定後にパラフィンブロックを作成して病理学的解析を行ったところ、神経細胞内における明らかなエンドソームの肥大化や APP、A $\beta$  の蓄積は認められなかった。

今回の Tg マウス作成に用いた遺伝子コンストラクトは全て、in vitro 実験系においては有意な dynein のノックダウンを確認している。このことから、今回作成したマウスの脳内で dynein のノックダウンが確認されな

かった原因は、発現させた shRNA の配列が問題なのではなく、十分なノックダウン効果を発揮できるほどの shRNA を発現させられなかったことに起因すると考えられる。今後は、より強力に下流の遺伝子を発現させるプロモーターを用いた改良型遺伝子コンストラクトを作成して、再度 Tg マウスの開発に取り組みたい。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi N. Dynein Dysfunction Reproduces Age-Dependent Retromer Deficiency: Concomitant Disruption of Retrograde Trafficking Is Required for Alteration in APP Metabolism. *Am J Pathol*, In press. 査読有り
2. Ueda N, Tomita T, Yanagisawa K, Kimura N. Retromer and Rab2-dependent trafficking mediate PS1 degradation by proteasomes in endocytic disturbance. *J Neurochem*, 137(4): 647-658, 2016. 査読有り
3. Ishiguro A, Kimura N, Watanabe Y, Watanabe S, Ishihama A. TDP-43 recognizes RNA G-quadruplex structures, and controls neurite mRNA transport for local protein synthesis. *Genes Cells*, 21(5): 466-481, 2016. 査読有り
4. Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y, Yanagisawa K, Kimura N. Diabetes mellitus accelerates A $\beta$  pathology in brain accompanied by enhanced GABA $\beta$  generation in nonhuman primates. *PLoS ONE*, 10(2): e0117362, 2015. 査読有り
5. Kimura N, Okabayashi S, Ono F. Dynein dysfunction disrupts A $\beta$  clearance in astrocytes via endocytic disturbances. *Neuroreport* (2014) 25(7): 514-520. 査読有り
6. Morihara T, Hayashi N, Yokokoji M, Akatsu H, Silvermana MA, Kimura N, Sato M, Saito Y, Suzuki T, Yanagida K, Kodama TS, Tanaka T, Okochi M, Tagami S, Kazui H, Kudo T, Hashimoto R, Itoh N, Nishitomi K, Kabata-Yamagichi Y, Tsunoda T, Takamura H, Katayama T, Kimura R, Kamino K, Hashizume Y, Takeda M. Transcriptome analysis of distinct mouse strains reveals kinesin light chain-1 splicing as an amyloid beta accumulation modifier. *PNAS* (2014) 111(7): 2638-2643. 査読有り

〔学会発表〕(計 18 件)

1. Ueda N, Tomita T, Yanagisawa K, Kimura N. The perturbation of intracellular presenilin 1 transport aggravated  $\beta$ -amyloidogenesis in endosomes. 第 8 回 NAGOYA グローバルリトリート、2016 年 2 月 12~13 日、愛知県大府市
2. Kimura N. Type II diabetes mellitus enhances  $GA\beta$  generation and accelerates  $A\beta$  pathology in nonhuman primate brain. 11th International Symposium on Geriatrics and Gerontology, 2016 年 2 月 6 日、愛知県大府市
3. 木村展之. 老化に伴う細胞内輸送機能の障害とアルツハイマー病態 BMB2015 (第 88 回日本生化学会), 2015 年 12 月 1~4 日、兵庫県神戸市
4. 上田直也, 富田泰輔, 柳澤勝彦, 木村展之. プレセニン 1 の細胞内局在におけるレトロマーの関与. BMB2015 (第 88 回日本生化学会), 2015 年 12 月 1~4 日、兵庫県神戸市
5. 木村展之, 上田直也, 富田泰輔, 柳澤勝彦. エンドサイトーシス障害と Presenilin-1: retromer と ERAD による共役機構. 第 34 回日本認知症学会、2015 年 10 月 2~4 日、青森県青森市
6. Kimura N, Okabayashi S, Ono F. Endocytic pathology in astrocytes: dynein dysfunction disrupts Abeta clearance in astrocytes via disturbed endosome trafficking. 第 58 回日本神経化学会、2015 年 9 月 11~13 日、埼玉県大宮市
7. Kimura N, Okabayashi S, Ono F. The dysfunction of retrograde transport is sufficient to disrupt Abeta clearance in astrocytes via disturbed endosome trafficking. 40th Congress of the Federation of the European Biochemical Societies (FEBS), 2015 年 7 月 4~9 日、ベルリン (ドイツ)
8. 木村展之, 岡林佐知, 下澤律浩, 保富康宏, 柳澤勝彦. 型糖尿病は老年性エンドサイトーシス障害の増悪を介して  $A\beta$  病理を加速化する. 第 38 回日本基礎老化学会、2015 年 6 月 12~14 日、神奈川県横浜市
9. Kimura N, Okabayashi S, Ono F. Dynein dysfunction disrupts synaptic vesicle transport and docking via endocytic disturbance. 第 37 回日本基礎老化学会、2014 年 6 月 26~27 日、愛知県大府市
10. Kimura N, Okabayashi S, Ono F. DYNEIN DYSFUNCTION PERTURBS INTRACELLULAR VESICLE TRAFFICKING AND SYNAPTIC VESICLE DOCKING VIA ENDOCYTIC DISTURBANCES: A POTENTIAL MECHANISM UNDERLYING AGE-DEPENDENT COGNITIVE DYSFUNCTION. FENS 2014, 2014 年 7 月 5 日~9 日、ミラノ (イタリア)
11. 木村展之, 岡林佐知, 下澤律浩, 保富康宏, 柳澤勝彦. 糖尿病は GM1 ガングリオシド結合型  $A\beta$  の産生増加を介して  $A\beta$  病理を加速する. 第 57 回日本神経化学会、2015 年 9 月 29 日~10 月 1 日、奈良県奈良市
12. 木村展之. Traffic Jam 仮説: 老年性エンドサイトーシス障害とアルツハイマー病態との関係. 第 36 回日本認知症学会、2014 年 11 月 29~31 日、神奈川県横浜市
13. 木村展之. アルツハイマー病におけるエンドサイトーシス障害: 病態解明と創薬標的としての可能性 シンポジウム「アルツハイマー病先制治療薬の創出」, 2015 年 1 月 17 日、名古屋
14. Ueda N, Yanagisawa K, Kimura N. Effects of endocytic disturbance in PS1 localization and  $\gamma$ -secretase complex formation. 第 7 回 NAGOYA グローバルリトリート、2015 年 2 月 13~14、愛知県大府市
15. Kimura N, Okabayashi S, Ono F. ENDOCYTIC DISTURBANCE DISRUPTS ABETA CLEARANCE IN ASTROCYTES WITHOUT AFFECTING ABETA UPTAKE. ADPD 2015, 2015 年 3 月 18 日~22 日、ニース (フランス)
16. Ueda N, Yanagisawa K, Kimura N. The relationship between age-dependent endocytic disturbance and Presenilin-1. ADPD 2015, 2015 年 3 月 18 日~22 日、ニース (フランス)
17. Kimura N, Okabayashi S, Ono F. Endocytic dysfunction in astrocytes of aged cynomolgus monkey brains. Neuro2013 (第 56 回日本神経化学会) 2013 年 6 月 20~23 日 京都府京都市
18. 木村展之, 岡林佐知, 小野文子, 上田直也, 下澤律浩, 保富康宏, 柳澤勝彦. Retromer の加齢性局在変化と Dynein 機能障害との関係. 第 32 回日本認知症学会 2013 年 11 月 8~10 日 長野県松本市

〔その他〕

ホームページ

<http://animal.nibiohn.go.jp/>

<http://tprc.nibiohn.go.jp/>

<http://www.ncgg.go.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松田 潤一郎 (MATSUDA, Junichiro)  
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・疾患モデル小動物研究室・研究リーダー  
研究者番号： 60181731

(2)研究分担者

木村 展之 (KIMURA, Nobuyuki)  
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・アルツハイマー病研究部・病因遺伝子研究室・室長  
研究者番号： 80392330

高橋 一郎 (TAKAHASHI, Ichiro)  
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・霊長類医科学研究センター・再雇用職員  
研究者番号： 90171470