

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03574

研究課題名(和文)アルツハイマー病変形成を促進する新たなモデルマウスの開発

研究課題名(英文)Development of a new mouse model to induce Alzheimer's pathology

研究代表者

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・室長

研究者番号：80392330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究成果により、老化に伴う軸索輸送モーター蛋白質Dyneinの機能低下がアミロイド蛋白質(A β)の蓄積を引き起こす要因となることが判明している。そこで本研究では、Dyneinコンディショナルノックアウトマウスの開発を目指し、脳神経細胞特異的にタモキシフェン誘導下においてDynein特異的gRNAを発現するマウスの開発を行った。その結果、用いたプロモーターの遺伝子発現誘導レベルが弱く、Dyneinのノックアウトは認められなかった。そこで、Dyneinそのものではなく輸送機能に関連する因子の全身性ノックアウトマウスの作出に切り替えたところ、無事に目的とするマウスが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病のモデルマウスはこれまでも数多く作成されているが、病変の形成が認められるまで1年以上の飼育が必要になるなど、病態解析に用いる場合はもちろん、薬剤の評価系としても少なからず問題が存在する。そこで本研究では、これまでの研究成果により明らかとなった、アルツハイマー病変蛋白質の蓄積を引き起こす脳神経系の老年性変化を人為的に促進するマウスを開発し、既存のモデルマウスと交配させることで病変形成をより加速化させることを目的とするものである。

本研究の成果により、アルツハイマー病研究をより効率的に進めることが可能となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：There are several mouse models which can reproduce Alzheimer's disease (AD) pathology, however, some models need almost one year to observe AD pathology in brain. We previously found that aging attenuates dynein-mediated retrograde transport in brain, and dynein dysfunction causes age-dependent accumulation of beta-amyloid protein (A β). In the present study, we aimed to establish a brand-new transgenic mouse which reproduces age-related dynein dysfunction to induce A β pathology.

Although we succeeded to establish triple transgenic mouse (Syn1-Cre/LSL-Cas9/Dynein-gRNA), we did not enough gene expression to induce dynein knockout in mouse brain. Then we changed our plan to establish whole body knockout mouse by using CRISPER/Cas9 system. Since dynein knockout is fatal, we selected dynein transport-related proteins, which can also affect A β accumulation, as the target for knockout. Fortunately, we established a new dynein transport-related protein knockout mouse line.

研究分野：細胞生物学、神経病理学

キーワード：モデルマウス開発 実験動物学 発生工学 老化 神経変性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は認知症を引き起こす代表的な老年性神経変性疾患の1つであるが、未だにその発症機序は不明のままであり、一刻も早い全容の解明が望まれている。AD 患者の脳内では病態の進行に伴い、老人斑と神経原線維変化という2つの病変が確認されるようになるが、前者はアミロイド蛋白(A β)、後者はタウ蛋白(Tau)の蓄積・重合によって形成される。このため、ヒト型 A β や Tau を脳内で過剰産生 (または過剰発現) させて AD 病変を再現するモデルマウスが数多く作成され、現在では世界中の研究者が AD 病態の解析や治療薬の開発研究に用いている。しかしながら、これら AD モデルマウスの大部分は、病変形成が確認されるまで1年近くもの飼育期間が必要となる場合が多く、研究活動を律速させる原因の1つとなっている。そこで、少しでも病変形成を早めようと、さらに過剰に原因蛋白を産生させたマウスや、複数の変異型遺伝子を同時に過剰発現させるモデルマウスも作成されているが、病変蛋白の過剰産生はそれ自体が非特異的の反応を引き起こすことに加え、実際の AD 患者の脳内では A β や Tau といった病変蛋白の産生量は変化していないため、それらの遺伝子改変マウスは正確な AD 病態を反映していない可能性が近年になって指摘されている (Saito et al., *Nature Neurosci* 2014)。これらのことから、より効果的な AD 研究を行うためには、老化に伴う AD 病態を反映し、尚且つ早期に病態形成が再現されるモデルマウスの確立が必要不可欠と考えられる。

一方、老人斑や神経原線維変化といった AD 病変は、ヒト以外の動物の脳組織においても老化に伴い形成される。そこで申請者は、それら老齢動物の脳組織を検索することで AD 病変の形成メカニズムを明らかにできると考え、ヒトに近縁な霊長類であるカニクイザルの脳組織を用いて研究を行ってきた。その結果、A β や Tau といった AD 病変の原因蛋白は老化に伴い、病変の形成に先立って神経細胞の膜画分に徐々に蓄積することを明らかにした (Kimura et al., *BBRC* 2003; Kimura et al., *Neuroptahol Appl Neurobiol* 2005)。さらにその後の研究成果により、脳内では老化に伴い軸索輸送モーター蛋白である Dynein (ダイニン) と Dynactin (ダイナクチン) の複合体形成能が低下して Dynein の輸送機能が低下し、その結果として AD 病変原因蛋白の蓄積が引き起こされることを明らかにした (Kimura et al., *J Neurosci Res* 2007; Kimura et al., *J Biol Chem* 2009)。特に、Dynein の輸送機能低下はエンドサイトーシスと呼ばれる膜輸送系の障害を引き起こし、アミロイド前駆体蛋白 (APP) の代謝を変化させることで A β の蓄積を引き起こすことを明らかにした (Kimura et al., *JBC* 2009; Kimura et al., *Am J Pathol* 2016)。事実、エンドサイトーシス障害の激しいカニクイザルほど、A β 病変が進行していることを我々は確認している (Okabayashi et al., *PLoS ONE* 2015)。さらに近年、海外の研究グループがシヨウジョウバエモデルを用いた遺伝子スクリーニングによって、Dynein の輸送機能低下が Tau 病変を著しく増悪することを報告した (Butzlaff et al., *Hum Mol Genet* 2015)。これらの結果から、Dynein の輸送機能低下は老化に伴う AD 病変の形成過程のみならず、その進行過程にも大きく関与している可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

人為的に Dynein の輸送機能を低下させて脳の老年性変化を加速化する遺伝子改変マウスを開発することができれば、そのマウスを既存の AD モデルマウスと交配させることで、より短期間の飼育で AD 病変を再現できる改良型 AD モデルマウスの開発につながり、AD 研究のスピードアップに大きく貢献できる可能性が高い。そこで本研究では、Dynein をターゲットとした老年性軸索輸送障害モデルマウスの開発を目的とする研究活動を行った。

3. 研究の方法

我々は以前、Dynein の遺伝子配列を特異的に認識する shRNA を発現させて Dynein をノックダウンするマウスの開発を試みたが、shRNA を過剰発現させても *in vivo* で十分なノックダウン効果は確認されなかった。Dynein は Dynactin と機能性複合体を形成することでエンドソームの軸索輸送を担うが、Dynactin を構成するサブユニットの1つである Dynamitin/p50 を過剰発現すると Dynactin は蛋白構造を維持できなくなり、Dynein との複合体形成が不可能になることで結果的に Dynein の輸送機能が障害されることが知られている (Burkhardt et al., *J Cell Biol* 1997)。そこで今回は当初、神経細胞特異的、且つテトラサイクリン応答性に神経細胞で Dynamitin/p50 を過剰発現するマウスの開発を試みたが、培養細胞を用いたスクリーニングにおいて、ドキシサイクリン非存在下においても Dynamitin/p50 の発現が若干確認されてしまったため、計画変更を余儀なくされた。そこで我々は、近年大いに注目を集めているゲノム編集技術である CRISPR-Cas9 システムと、テトラサイクリンに比べて制御性が高いとされるタモキシフェン誘導システムを組み合わせ、Dynein のコンディショナルノックアウトマウス開発を目的とする研究計画へと修正を行った。具体的には、以下に挙げる方法を用いた。

まず、Dynein を特異的に認識するガイド RNA (Dynein-sgRNA) を複数構築し、マウス神経芽細胞種 Neuro2a 細胞を用いてゲノム編集効果を検証する。最も効果の高かった sgRNA 配列を U6 プロモーター下流に組み込んだ遺伝子コンストラクトを作成してマウスの受精卵にインジェクションし、Dynein-sgRNA を発現する遺伝子改変マウスを作出する。

作出したマウスで Dynein-sgRNA が正しく作動することを確認するため、胎生期から全身性に Cas9 を発現するマウスと交配させ、産仔が得られるか否かを検証する。尚、Dynein は胎生期の紡錘糸形成に必須の因子であることから、sgRNA が正しく作動すれば全てのマウスは胎生

死となることが期待される。

Dynein-gRNA マウスの検証が終了次第、Cre/loxP システム下でのみ Cas9 を発現する LSL-Cas9 マウス、およびタモキシフェン誘導時かつ神経細胞特異的に Cre を発現するマウス (Syn1-CreERT2 マウス) と Dynein-sgRNA マウスと交配させ、Syn1-CreERT2/LSL-Cas9/Dynein-sgRNA マウスの系統化を行う。得られたマウスが成熟齢 (4 週齢、または 3 カ月齢) に達した後、タモキシフェン 2mg を 5 日間連続投与して、Dynein のノックアウトが生じていることを検証する。

4. 研究成果

Neuro2a 細胞を用いたスクリーニングにより最もゲノム編集効率が高かった sgRNA を発現するマウスの開発成功したため、まずは全身性 Cas9 発現マウス (CAG-Cas9 マウス) と交配させて in vivo でのゲノム編集効果を検証した結果、複数回行った交配で妊娠が認められなかったため、選択した sgRNA の有効性が明らかとなった。続いて研究計画に従い、Syn1-CreERT2 マウス、および LSL-Cas9 マウスと順次交配させることにより、目的とする Syn1-CreERT2/LSL-Cas9/Dynein-sgRNA マウスの作出に成功した。

作出したオスの Syn1-CreERT2/LSL-Cas9/Dynein-sgRNA マウスが 4 週齢、または 3 カ月齢に達した後、タモキシフェンを 2mg/個体の容量で 5 日間連続腹腔投与を行い、1 か月後に麻酔下で安楽殺解剖して脳組織を採取した。採取した脳組織から蛋白質を抽出し、western blot 法を用いて Dynein の蛋白質発現量を検索した結果、残念ながら Dynein の有意な蛋白質量減少が確認できなかった。今回我々が使用した LSL-Cas9 マウスは、Cas9 が遺伝子導入された細胞では目的蛋白質に加えて蛍光蛋白質 GFP が発現するように設計されている。そこで、採取した脳組織を用いて GFP の蛍光確認を行ったところ、残念ながら神経細胞において GFP の蛍光が確認されなかった。

最新の研究成果により、Cre/loxP システムを用いたマウスは性染色体上で意図していない組換えが生じることが判明し、実験系としてかなりの注意が必要となることが判明した。本研究では、Cre/loxP システムに依存しない CAG-Cas9 マウスと Dynein-sgRNA マウスを交配させた場合は計画通り Dynein のノックアウトが生じていると考えられるため、Syn1-Cre/LSL-Cas9/Dynein-sgRNA マウスでノックアウトが確認されなかったのは、sgRNA 配列や発現レベルの問題ではなく、Cre/loxP システムのコントロールに問題があったと考えられる。

そこで当初の予定を変更し、Cre/loxP システムに依存せず Dynein の機能を低下させるマウスの開発へ計画を修正した。まず、Dynein の輸送機能に関与する因子のうち、ノックダウンすることで Abeta の蓄積が誘導されるものを、Neuro2a 細胞を用いてスクリーニングした。その結果、因子 X (現在論文作成中のため、因子 X と表記) のノックダウンにより Abeta の蓄積が誘導されたため、同因子に対する sgRNA を発現する遺伝子改変マウスを開発し、CAG-Cas9 マウスと交配させた。その結果、胎生死を起こさずに因子 X のノックアウトマウスを得ることに成功した。今後は、同マウスを APP ノックインマウス (APP の過剰発現を伴わないため、非特異反応を抑えつつ Abeta 病理を再現できるマウス) と交配させ、老化に伴う Abeta 病理の形成が加速化させることを検証する予定である。本研究の成果により、より早期に Abeta 病理を再現する AD モデルマウスが開発が期待され、AD 研究の加速化に貢献することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeuchi Shingo, Ueda Naoya, Suzuki Keiko, Shimozawa Nobuhiro, Yasutomi Yasuhiro, Kimura Nobuyuki	4. 巻 189
2. 論文標題 Elevated Membrane Cholesterol Disrupts Lysosomal Degradation to Induce -Amyloid Accumulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 391 ~ 404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2018.10.011	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 木村展之	4. 巻 116
2. 論文標題 アルツハイマー病理の促進機序.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月刊糖尿病	6. 最初と最後の頁 14-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 木村展之	4. 巻 35(12)
2. 論文標題 認知症研究におけるカニクイザルの有用性	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 135-138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Kimura N, Yanagisawa K	4. 巻 S0197-0186(17)
2. 論文標題 Traffic jam hypothesis: Relationship between endocytic dysfunction and Alzheimer's disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurochem Int	6. 最初と最後の頁 30249-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2017.07.002.	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 Ishiguro A, Kimura N, Noma T, Shimo-Kon R, Ishihama A, Kon T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular dissection of ALS-linked TDP-43: involvement of the Gly-rich domain in interaction with G-quadruplex mRNA.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letter	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) 10.1002/1873-3468.13800.	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 Hata S, Omori C, Kimura A, Saito H, Kimura N, Gupta V, Pedrini S, Hone E, Chatterjee P, Taddei K, Kasuga K, Ikeuchi T, Waragai M, Nishimura M, Hu A, Nakaya T, Meijer L, Maeda M, Yamamoto T, Masters CL, Rowe CC, Ames D, Yamamoto K, Martins RN, Gandy S, Suzuki T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Decrease in p3-A β 37 and p3-A β 40, products of A β secretase generated by -secretase cleavages, in aged monkeys and patients with Alzheimer's disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Alzheimer's & Dementia	6. 最初と最後の頁 740-750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.trci.2019.015.	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

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kimura N, Takeuchi S, Ueda N, Suzuki K, Shimozawa N, Yasutomi Y.
2. 発表標題 Elevated membrane cholesterol aggravates endocytic disturbance, resulting in enhanced A β accumulation: a potential mechanism underlying exacerbation of A β pathology by type 2 diabetes mellitus.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村展之, 竹内真吾, 上田直也, 鈴木恵子, 下澤律浩, 保富康弘.
2. 発表標題 2型糖尿病による A β 病理増悪化機構: 膜コレステロール増加とエンドサイトーシス障害.
3. 学会等名 第37回日本認知症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kimura N, Takeuchi S, Ueda N, Suzuki K, Shimozawa N, Yasutomi Y.
2. 発表標題 Type 2 diabetes mellitus aggravates endocytic disturbance via elevated membrane cholesterol: mechanism underlying augmentation of age-dependent A β pathology.
3. 学会等名 第61回日本神経化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kimura N, Endo K, Kondo H, Adachi E, Shimozawa N, Yasutomi Y, Uchihara T.
2. 発表標題 Age-Related Tau Pathology in Cynomolgus Monkey brain.
3. 学会等名 第41回日本基礎老化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kimura N, Suzuki K, Tsuchiya Y
2. 発表標題 Concomitant disruption of retrograde trafficking induces intracellular accumulation of A β .
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y.
2. 発表標題 Dynein dysfunction impedes retromer trafficking and concomitant disruption of retrograde trafficking is required for the alteration in APP metabolism.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kimura N
2. 発表標題 Age-related endocytic dysfunction is involved in Alzheimer 's disease pathology.
3. 学会等名 第60回日本神経化学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y.
2. 発表標題 Dynein Dysfunction Reproduces Age-Dependent Retromer Deficiency: Concomitant Disruption of Retrograde Trafficking Alters APP Metabolism.
3. 学会等名 ADPD2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kimura N, Koinuma S, Shimozawa N, Yasutomi Y.
2. 発表標題 Upregulation of autophagy interrupts exosome secretion to augment endocytic disturbance and enhance intracellular accumulation of Abeta.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村展之.
2. 発表標題 老化に伴うエンドサイトーシスの破綻とアルツハイマー病
3. 学会等名 第125回日本解剖学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村展之, 鯉沼真吾, 下澤律浩, 保富康弘.
2. 発表標題 オートファジーの促進はエンドサイトーシス障害を増悪して細胞内A の蓄積を増加する
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 Kimura N.
2. 発表標題 Traffic Jam Hypothesis: Endocytic Disturbance & Alzheimer ' s Disease Pathology.
3. 学会等名 NEURO2019 (日本神経化学会、日本神経科学会 合同大会) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村展之.
2. 発表標題 Traffic Jam仮説: 老化に伴う細胞内膜輸送系の変化とアルツハイマー病態.
3. 学会等名 第31回日本老年学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kimura Nobuyuki	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 248
3. 書名 Diabetes Mellitus: A risk factor for Alzheimer disease ?	

〔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	小木 曾 昇 (Ogiso Noboru) (40638350)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・実験動物管理室・室長 (83903)	
研究分担者	下田 修義 (Shimoda Nobuyoshi) (90416173)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・再生再建医学研究部・室長 (83903)	