

令和元年5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16113

研究課題名(和文)新規アルツハイマー病モデルの開発とDNA傷害の解析

研究課題名(英文)A novel model for DNA damage accumulation in Alzheimer's disease

研究代表者

間野 達雄 (Mano, Tatsuo)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20704331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病におけるDNA傷害の蓄積は、アミロイド β によって誘導されている。病初期においてはBRCA1がその修復をになっているが、進行期にはリン酸化タウの蓄積によってこのような修復機構が破綻している。このような現象をより詳細に解析し、治療法開発へと結び付けていくにはモデル化することが必要であり、本研究ではヒト由来の神経前駆細胞を用いて、細胞モデルの構築を行った。また、DNA傷害はゲノム上に均一におきるものではないと考えられ、そのゲノム上での分布についての解析、およびBRCA1の結合領域に関する解析を行った。

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病態はまだまだ明らかでなく、今回の研究では神経細胞におけるDNA傷害の蓄積が神経細胞の機能低下の一因となっている可能性を示し、細胞モデルの構築を行った。さらにはゲノム上のDNA傷害領域、修復タンパクの結合領域を解析した。DNA傷害・修復は神経細胞における普遍的な問題であると考えられ、本研究はアルツハイマー病の病態とともに、加齢における神経細胞の変化についても明らかにしてあげたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：In the early stage of Alzheimer's disease, amyloid beta induced DNA damages in neuronal cells, which are repaired by BRCA1. However, these mechanism was deteriorated by BRCA1 co-aggregation with phosphorylated tau in the advanced stage of Alzheimer's disease. We developed a novel model for DNA damage accumulation in neuronal cells. We also developed a method for quantification of DNA damage accumulation using FACS, and analyzed genome-wide distribution of DNA damages and BRCA1 binding regions.

研究分野：神経内科学

キーワード：アルツハイマー病 DNA傷害 3次元細胞培養系 アミロイド β リン酸化タウ 剖検脳

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)は最大の認知症疾患であり、病態解明には様々なアプローチが試みられてきた。しかし、アミロイド (A β)、リン酸化タウといった病理所見は確立しているが、これらの分子がどのような分子メカニズムを経て神経変性につながるのかは未解明であった。申請者はこれまで、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 の解析を通してエピゲノムの神経変性過程における重要性に着目するに至り(Mano T et al. PLoS One 2014)、AD における神経細胞特異的 DNA メチル化解析を行った。これまで行った研究から、AD においては、

- (1) A β によって生じた DNA 傷害を DNA 修復タンパク質である BRCA1 が修復
- (2) 凝集タウタンパク質によって BRCA1 が不溶化し機能を喪失、DNA 修復機構が破綻
- (3) DNA 傷害が蓄積し、神経細胞の可塑性喪失の原因となっている

ということを示した。この研究は、ヒト死後脳のエピゲノム解析から新たな生物学的意義を見出すことのできたという点でこれまでにない画期的なものである。この新規病態基盤を分子生物学的に深め、そして創薬へとつなげるためには、凝集タウタンパク質による BRCA1 の不溶化、およびそれによる DNA 障害の修復機構破綻という現象を適切にモデル化して解析する必要がある。

これまでも様々な AD 細胞モデルが作られてきているが、そのなかでも細胞レベルでの A β による凝集タウタンパク質蓄積モデルとして、レンチウイルスを用いて変異 APP および変異 PSEN1 遺伝子をトランスジーンとして導入したヒト神経前駆細胞を細胞外基質マトリゲルに埋め込んで長期培養したモデルが報告されている(Choi SH et al, Nature, 2014)。細胞外基質中に A β が濃縮されることによってタウ凝集過程が促進されているものと考えられ、本研究でも以下の述べるように、この方法を発展させた手法を行うこととする。

2. 研究の目的

これまで行ってきたメチル化解析から、AD における DNA 傷害の蓄積が示唆されており、その結果をより正確にするため、まずは細胞・動物モデルの作成を行い、さらにはヒト剖検脳を用いて、モデルによって得られた結果を解析する。具体的には、A β による DNA 傷害、およびそれに対して BRCA1 がどのように関与しているのかを明らかにする。さらに DNA 傷害が蓄積した際に、神経細胞にとってどのような影響があるのかを、初代神経細胞モデルおよびマウスモデルを使って、より生理的な神経細胞を用いて検討する。進行期 AD では脳内の BRCA1 総量は増加しているものの不溶化しており、活性を有する BRCA1 は実質的に減少している。この現象をモデル化するために、初代培養系および AD マウスモデルに対して、レンチウイルスによる BRCA1 のノックダウンを行うこととする。

新規 AD 細胞モデルの作成に当たっては、変異型 APP 遺伝子および変異型 PSEN1 遺伝子を発現した神経前駆細胞を作成し、分化させる実験系を確立する。さらには細胞外基質マトリゲル中で 3 次元培養を長期間(2-3 ヶ月)にわたって行う、3次元培養系の確立を行うこととする。この方法によって、実際の AD と同様の A β 産生を得られることが期待できるとともに、また、ヒト由来の細胞を用いることで、ヒト脳組織におけるタウアイソフォームパターンを得ることが期待される。AD では、3 リピートおよび 4 リピート両者のタウが混合して凝集しており、本モデル系によって、AD における A β および凝集タウタンパク質の蓄積を正確に再現することができることが期待される。

AD における BRCA1 の DNA 修復機構について、BRCA1 は本来は細胞分裂時の組換え依存的な DNA 修復酵素として知られており、神経細胞のような分裂のない細胞における役割についてこれまで知られていない。本研究では、ヒト由来の神経前駆細胞を分化誘導し、DNA 傷害モデルを確立することで、BRCA1 のゲノム DNA 結合様式を明らかにすることを目的とする。具体的には、BRCA1 および γ -H2ax に対するクロマチン免疫沈降法を行って、ゲノム DNA に対する結合領域を解析することとしている。

3. 研究の方法

上記目的のため、以下の研究計画を実施する。

3-1. AD 神経細胞における DNA 傷害蓄積と BRCA1 の関係性

- (1) 実際のヒト剖検脳において DNA 傷害が蓄積しているか、Comet assay および γ -H2ax 免疫染色を行って確認を行う
- (2) BRCA1 shRNA 配列を発現するレンチウイルスの作成・濃縮を行う
- (3) (2)で確立したレンチウイルスをマウス由来初代神経培養細胞に導入、さらに AD モデルマウスに対して注入し、これらの実験系において BRCA1 のノックダウンが神経細胞に与える影響を解析する。

3-2. 3次元培養による AD 神経細胞モデル

- (1) ヒト由来神経前駆細胞に対して、レンチウイルスを用いて、変異型 APP 遺伝子および変異型 PSEN1 遺伝子を導入し、安定発現細胞株を樹立する。
- (2) (1)で得られた細胞について、神経細胞への分化誘導法を確立する
- (3) (2)で得られた細胞をマトリゲルに包埋して培養、分化誘導を行う

3-3. BRCA1 の DNA 修復過程における役割

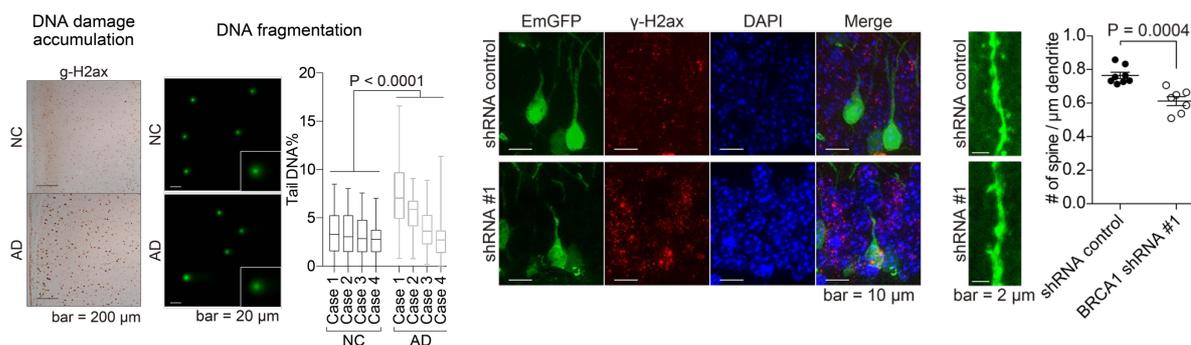
- (1) BRCA1 のゲノム DNA に対する結合領域を同定するため、BRCA1 によるクロマチン免疫沈降法

を実施する

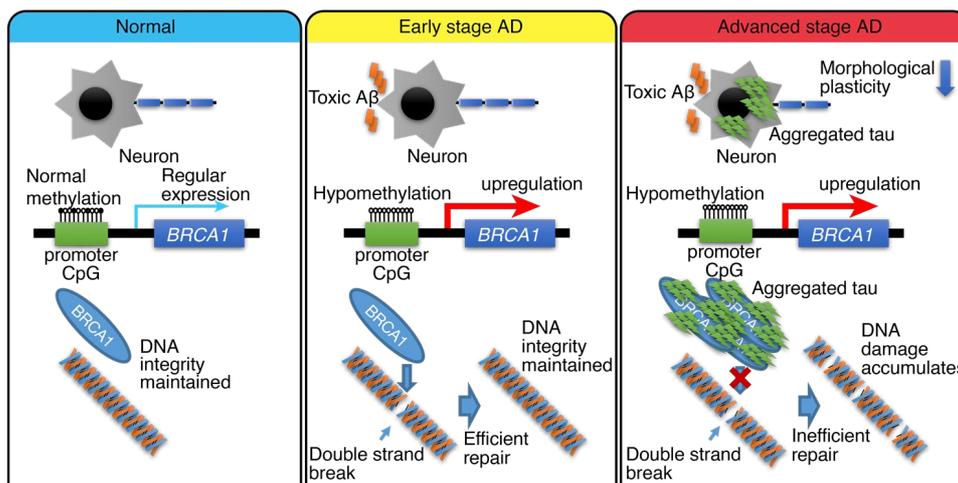
- (2) (1)でえられた領域と、DNA 傷害領域との関係を同定するため、 γ -H2ax によるクロマチン免疫沈降法を行い、(1)との比較を行う
- (3) 上記クロマチン免疫沈降法を、ヒト由来神経細胞に対してを行い、さらに AD 神経細胞に対して応用する

4. 研究成果

AD 神経細胞における DNA 傷害蓄積と BRCA1 の関係性については、下図に示すような結果を得た。AD においては、 γ -H2ax の染色性が亢進しており、AD において DNA 傷害が蓄積していることが確認された。また、Comet assay についても、AD 群において有意に DNA 断片化がみられており、 γ -H2ax 染色の結果に一致して、DNA 傷害が蓄積していると考えられた。以上より、AD 剖検脳において DNA 傷害の有意な蓄積があると考えられた。また、AD マウスモデルに対する *in vivo* BRCA1 ノックダウンにおいては、ノックダウンした神経細胞において γ -H2ax の染色が確認された。また、spine 形成が抑制されており、神経細胞の可塑性が障害されていると考えられた。このような結果は、初代神経細胞においても確認された。



上記の結果は、本研究課題の背景となった AD 神経細胞 DNA メチル化解析のデータとともに報告した。これらのデータをまとめると、初期 AD においては A β による DNA 傷害に対して BRCA1 が防御的に反応しているものと考えられた。一方で、進行期 AD においては凝集タウとともに BRCA1 の機能が喪失するため DNA 傷害が蓄積し、神経細胞の可塑性を低下させているものと考えられた (Mano T, PNAS, 2017)。



3次元培養系については、変異型 AD 関連遺伝子を導入した神経前駆細胞を確立し、神経分化および3次元培養を行った。現在は、A β 蓄積およびそれによる神経細胞機能に対する影響について解析を行っている。通常の2次元培養系と比較して、長期間（3か月以上）の培養が可能であり、緩徐進行性である実際の病態に近いモデルとして解析ができることを期待している。BRCA1 および γ -H2ax の ChIP-seq についても、実験系の確立を行った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

1. Sato K., **Mano T.**, Ihara R., Suzuki K., Tomita N., Arai H., Ishii K., Senda M., Ito K., Ikeuchi T., Kuwano R., Matsuda H., Iwatsubo T., Toda T., Iwata A., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Lower Serum Calcium as a Potentially Associated Factor for Conversion

- of Mild Cognitive Impairment to Early Alzheimer's Disease in the Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. *Journal of Alzheimer's disease : JAD.* 2019;68(2):777-88. 査読有り
2. Bannai T., **Mano T.**, Chen X., Ohtomo G., Ohtomo R., Tsuchida T., Koshi-Mano K., Hashimoto T., Okazawa H., Iwatsubo T., Tsuji S., Toda T., Iwata A. Chronic cerebral hypoperfusion shifts the equilibrium of amyloid beta oligomers to aggregation-prone species with higher molecular weight. *Scientific reports.* 2019;9(1):2827. 査読有り
 3. 間野かがり, **間野達雄**, 岩田淳 神経変性における DNA メチル化 医学のあゆみ 2018 Vol. 264 No. 10 pp. 912-913. 査読無し
 4. **間野達雄**, 岩田淳 Current topics 神経細胞特異的メチル化解析から明らかになったアルツハイマー病における DNA 修復の障害 実験医学 2018 Vol. 36 No. 4 pp.556-559. 査読無し
 5. **間野達雄**, 岩田淳 アルツハイマー病のエピジェネティクス 医学のあゆみ 2018 Vol. 267 No. 8 pp. 612-614. 査読無し
 6. Yamaguchi N., **Mano T (Correspondence).**, Ohtomo R., Ishiura H., Almansour M. A., Mori H., Kanda J., Shiota Y., Taira K., Morikawa T., Ikemura M., Yanagi Y., Murayama S., Shimizu J., Sakurai Y., Tsuji S., Iwata A. An Autopsy Case of Familial Neuronal Intranuclear Inclusion Disease with Dementia and Neuropathy. *Intern Med.* 2018;57(23):3459-62. 査読有り
 7. Ohtomo G., **Mano T (Correspondence).**, Seto A., Tsuji S. Degeneration of the Substantia Nigra Following Ipsilateral Striatal Infarction. *Intern Med.* 2018;57(5):767-8. 査読有り
 8. Nagata K., **Mano T.**, Murayama S., Saido T. C., Iwata A. DNA methylation level of the neprilysin promoter in Alzheimer's disease brains. *Neuroscience letters.* 2018;670:8-13. 査読有り
 9. Kodama S., **Mano T (Correspondence).**, Kakumoto T., Ishiura H., Hagiwara A., Kamiya K., Hayashi T., Tsuji S. Ketotic hyperglycemia-related seizure with reversible white matter lesion: Metabolic implication of its reversibility based on magnetic resonance spectroscopy study. *Journal of the neurological sciences.* 2018;390:20-1. 査読有り
 10. Takumida H., Yakabe M., Mori H., Shibasaki K., Umeda-Kameyama Y., Urano T., **Mano T.**, Hayashi A., Ikemura M., Ogawa S., Akishita M. Case of a 78-year-old woman with a neuronal intranuclear inclusion disease. *Geriatr Gerontol Int.* 2017;17(12):2623-5. 査読有り
 11. **Mano T.**, Nagata K., Nonaka T., Tarutani A., Imamura T., Hashimoto T., Bannai T., Koshi-Mano K., Tsuchida T., Ohtomo R., Takahashi-Fujigasaki J., Yamashita S., Ohyagi Y., Yamasaki R., Tsuji S., Tamaoka A., Ikeuchi T., Saido T. C., Iwatsubo T., Ushijima T., Murayama S., Hasegawa M., Iwata A. Neuron-specific methylome analysis reveals epigenetic regulation and tau-related dysfunction of BRCA1 in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2017;114(45):E9645-E54. 査読有り
 12. **間野達雄**, 岩田淳 認知症のエピジェネティクス 実験医学 2017. 査読無し
 13. Kodama S., **Mano T (Correspondence).**, Masuzawa A., Hirata Y., Nagasako Y., Koshi Mano K., Hamada M., Terao Y., Hayashi T., Ono M., Tsuji S. Tacrolimus-Induced Reversible Cerebral Vasoconstriction Syndrome with Delayed Multi-Segmental Vasoconstriction. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association.* 2017;26(5):e75-e7. 査読有り

[学会発表](計6件)

1. **間野達雄**, アルツハイマー病における神経細胞ゲノム DNA の恒常性, 日本認知症学会, 2018, 招待講演
2. **Tatsuo Mano**, Atsushi Iwata, Takashi Nonaka, Airi Tarutani, Tadafumi Hashimoto, Masato Hasegawa, Takeshi Iwatsubo, Tatsushi Toda Tau-related dysfunction of BRCA1 lead to reduced neuronal plasticity in Alzheimer's disease, 日本神経科学大会, 口演
3. **Tatsuo Mano**, Atsushi Iwata, Takashi Nonaka, Airi Tarutani, Tadafumi Hashimoto, Masato Hasegawa, Takeshi Iwatsubo, Tatsushi Toda Tau-related dysfunction of BRCA1 lead to reduced neuronal plasticity in Alzheimer's disease, Alzheimer's Association International Conference, 2018, 口演
4. **Tatsuo Mano**, Takashi Nonaka, Airi Tarutani, Tadafumi Hashimoto, Masato Hasegawa, Takeshi Iwatsubo, Atsushi Iwata, Tatsushi Toda Tau-related dysfunction of BRCA1 lead to reduced neuronal plasticity in Alzheimer's disease, 日本神経学会総会, 口

演

5. Tatsuo Mano, Takashi Nonaka, Airi Tarutani, Tadafumi Hashimoto, Masato Hasegawa, Takeshi Iwatsubo, Atsushi Iwata, Tatsushi Toda Tau-related dysfunction of BRCA1 lead to reduced neuronal plasticity in Alzheimer's disease, American Academy of Neurology, 2018, ポスター発表
6. Tatsuo Mano, Atsushi Iwata, In vitro AD model using human neural progenitor cell, WCN2017, ポスター発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。