

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17812

研究課題名(和文)新規分泌分子ILEIの加齢に伴う発現低下がアルツハイマー病の一次要因となり得るか

研究課題名(英文) Can the age-related decrease in the expression of the novel secretory molecule ILEI be the primary factor in Alzheimer's disease?

研究代表者

渡邊 直希 (Watanabe, Naoki)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・助教

研究者番号：60769339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ADの基本病態である脳内A β 蓄積をきたす一次的原因を解析し、発症前診断法や先制治療法の開発に資することを目的とした。

A β 産生抑制活性を有するILEI発現低下機構の解明のため、ILEI遺伝子のプロモーター領域と内因性転写因子を同定した。AD脳のILEI発現レベル低下の原因が転写因子の発現低下によることが示唆された。脳内ILEI発現レベルの減少がAD発症のリスク因子となるかを検証するため、ゲノム編集でILEI KOマウス及びcKOマウスを作製し、実際にそれぞれILEI発現の消失及び減少を確認した。App(NL-F)及びApp(NL-G-F)マウスと掛け合わせ、解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで認知症の複数の臨床試験が進められたが、多くは効果不足と副作用から中断を余儀なくされてきた。認知症発症に25年以上先行するとされるA β 蓄積の初期ないし蓄積前からのA β 抑制を行う先制医療の実現のためには、脳内A β 蓄積の一次的要因を明らかにすることが重要な課題となる。しかし、これまでその知見は極めて乏しく、これが先制医療実現の障壁になっている。本研究による脳内ILEI発現低下機構及びAD発症のリスク因子の検証の成果は、発症前診断法や先制治療法の開発につながるものである。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to analyze the primary causes of A β accumulation in the brain, which is the basic pathophysiology of AD, and to contribute to the development of pre-emptive treatment and diagnosis.

To elucidate the mechanism of down-regulation of ILEI expression, we identified the promoter region of ILEI gene and endogenous transcription factors, suggesting that the down-regulation of ILEI expression in the AD brain is due to the down-regulation of the transcription factors.

To test whether the decreased expression level of ILEI in the brain is a risk factor for the development of AD, we generated ILEI KO and cKO mice by genome editing, and confirmed the disappearance and decrease of ILEI expression in these mice, respectively. These mice were crossed with App(NL-F) and App(NL-G-F) mice, and the analyses are in progress.

研究分野：分子神経科学

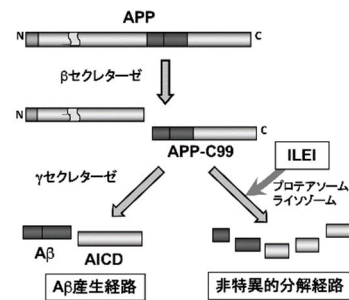
キーワード：アルツハイマー病 遺伝子発現制御 脳神経疾患 老化 神経科学 ILEI Amyloid- β Secretase

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)は老年期認知症の主な原因であり、その治療・診断法の確立は重要課題である。その基本病態は A β の脳内蓄積だと解明されているが、病態に基づいた根治治療法は未だ確立されていない。また、認知症発症後に A β 蓄積を除去しても効果がなかったことから、発症の 20 年以上前に始まる脳内 A β 蓄積を標的とした先制医療の開発が主要課題となっている。しかし、脳内 A β 蓄積をきたす一次的原因は遺伝要因以外には明らかでなく、その原因を標的とした治療も実現できていない。

我々が Amyloid- β (A β)ペプチドの脳内産生を制御する内在性タンパク質の探索によって同定した ILEI は、新たな分泌型機能分子 FAM3 ファミリーに属し、脳 A β 蓄積の要因に関与する可能性が示唆されてきた(*Nat Commun* 5:3917, 2014)。ILEI は γ セクレターゼ活性や Notch 切断は阻害せず、基質 APP-C99 に対し A β 産生を伴わない分解経路を選択的に促進することにより A β 分泌を抑制する(右図)。健康脳の神経細胞は高レベルに ILEI を発現し



ているが、加齢とともに転写活性が低下し AD 症例では発現減少が顕著になるのに逆相関して脳 A β 蓄積量が増加する (*Neuroscience* 330:236- 246, 2016)。従って、従来の γ セクレターゼ阻害剤で問題となった副作用を回避した治療法開発の標的として、また発症前診断のためのバイオマーカーとしても究めて有望である。脳内 A β 蓄積は生理的加齢によるとされてきた軽度の認知機能障害の相当部分の原因である可能性が指摘されるなか、ILEI を介した予防的抗 A β 治療はこれら認知症予備群の克服にも有効性が期待できる。本研究では、発症予防・早期対応を可能にすべく、ILEI に着目した発症前 AD の診断法および予防的治療法の開発に向けた基礎研究を進めた。

2. 研究の目的

我々は脳内 A β 産生抑制活性を有する ILEI/FAM3C を同定し、加齢や AD で発現が負に制御されることを示してきた。本研究では、AD の基本病態である脳内 A β 蓄積をきたす一次的原因を解析し、発症前診断法や先制治療法の開発に資することを目的とした。

加齢に伴う脳内 ILEI 発現低下のメカニズム解明：加齢及び AD に伴う脳内 ILEI 発現低下のメカニズム解明のため、ゲノム DNA の ILEI 遺伝子上流領域における転写制御機構を明らかにする。

脳内 ILEI 発現レベルの減少が AD 発症のリスク因子となることの検証：加齢に伴う ILEI 減少が脳内 A β 蓄積の要因となる可能性を、大脳皮質や海馬などの前脳領域の神経細胞に特異的に、かつタモキシフェン(Tam)投与により誘導的に ILEI 遺伝子欠失を操作できるコンディショナルノックアウト(ILEI-icKO)マウスを作出して調べる。まず、成熟後の発現レベルを抑制し、脳内 A β 蓄積を解析する。加えて、この ILEI-icKO マウスを AD モデルマウスと交配し、脳内 A β 沈着及び記憶障害の出現について調べることで、ILEI 発現低下が AD 発症のリスク要因であるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

加齢に伴う脳内 ILEI 発現低下のメカニズム解明

ヒト ILEI 遺伝子のの上流ゲノム BAC クローンを入手し、Luciferase reporter assay にて ILEI 転写調節領域をマッピングした。この配列を基に複数の転写因子認識配列のデータベースから候補因

子を選出した。この因子を培養細胞での強制発現およびノックダウンによる解析を行い、さらに培養細胞核抽出物を用いたゲルシフトアッセイを行った。加えて、剖検脳組織由来の核抽出タンパク質を用いた Western blotting により、AD 脳における各転写因子発現の評価を行った。

脳内 ILEI 発現レベルの減少が AD 発症のリスク因子となることの検証

・ ILEI-floxed マウスの樹立：マウス ILEI 遺伝子の遺伝子領域に loxP 配列を挿入することにより、Cre リコンビナーゼによる組換え後に ILEI が正常に翻訳されないように設計し、標的プラスミドベクターを作製した。ゲノム編集 CRISPR/Cas9 システムを用い、受精卵前核に Cas9 とガイド RNA を発現するプラスミド pX330 及びターゲティングベクターを混合注入した後、胚移植を行い、loxP 配列を挿入した ILEI-floxed マウス産仔を得た。この中からゲノム DNA を用いた PCR-RFLP assay 及び DNA シーケンシングにより ILEI-floxed マウスを選別した。

・ ILEI-icKO マウスの作製：作出した ILEI-floxed マウスと CaMKII-CreER^{T2} マウス(BMC Neurosci 8:63, 2007)との交配により、成熟期の神経細胞において ILEI 発現が消失するマウスを得た。成熟後の CaMKII-CreER^{T2}(+/Φ); ILEI(flx/flx) マウス及び CaMKII- CreER^{T2} マウスに Tam 投与を行い、時期特異的かつ神経細胞特異的な ILEI 遺伝子欠損を誘導したマウス及びその陰性対照マウスをそれぞれ得た。さらにアルツハイマー病態モデルマウスである App(NL-F)及び App(NL-G-F)マウスとの交配を行い、行動実験や神経機能に対する実験を進めた。

4 . 研究成果

加齢に伴う脳内 ILEI 発現低下のメカニズム解明

ヒト ILEI 遺伝子転写制御領域を特定するため、Luciferase reporter assay にて ILEI 転写調節領域をマッピングし、ILEI 転写開始点上流で弱い転写活性及び強い転写活性を示す領域を同定した。このうち強い転写活性領域はヒトとマウスで配列に相同性が認められた。この配列から転写因子結合モチーフデータベースを用いて候補因子を選出し、培養細胞での強制発現及び knockdown を施した解析から 3 候補を得た。さらにゲルシフトアッセイで強い転写活性を示す DNA 配列に対し、2 候補の直接結合が示された。また、剖検脳組織の核タンパク質を用いた Western blot からこの 2 因子の発現が有意に減少していることが示された。AD 脳では ILEI の発現レベルが転写レベルで低下するが、その原因は転写因子の発現低下によることが示唆された。

脳内 ILEI 発現レベルの減少が AD 発症のリスク因子となることの検証

・ ILEI ノックアウトマウスの解析：ゲノム編集により、ILEI 遺伝子をノックアウトした。ホモ接合のノックアウトマウスを得、ILEI 発現を確認したところ、発現は認められなかった。App(NL-F)及び App(NL-G-F)マウスと掛け合わせ、解析を進めている。

・ ILEI コンディショナルノックアウトマウスの解析：ゲノム編集により、ILEI-floxed マウスを得、CaMKII-CreERT2 マウスと掛け合わせ、目的のコンディショナルノックアウトマウスを得た。このマウスの ILEI 発現は脳ニューロンにおいて減弱した。App(NL-F)及び App(NL-G-F)マウスと掛け合わせ、解析を進めている。

将来、高齢者スクリーニングとして ILEI を含めたバイオマーカーを評価し AD リスクを推定した上で、ILEI 補充の予防的治療を加えるという認知症先制医療を実現するべく研究を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawatsuki Akihiro, Morita Shin-ya, Watanabe Naoki, Hibino Emi, Mitsuishi Yachiyo, Sugi Takuma, Murayama Shigeo, Nishimura Masaki	4. 巻 20
2. 論文標題 Lipid class composition of membrane and raft fractions from brains of individuals with Alzheimer's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100704 ~ 100704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2019.100704	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 -

1. 著者名 Seita Yasunari, Morimura Toshifumi, Watanabe Naoki, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Nakamura Shinichiro, Suzuki Toshiharu, Yanagisawa Daijiro, Tsukiyama Tomoyuki, Nakaya Masataka, Okamura Eiichi, Muto Masanaga, Ema Masatsugu, Nishimura Masaki, Tooyama Ikuo	4. 巻 75
2. 論文標題 Generation of Transgenic Cynomolgus Monkeys Overexpressing the Gene for Amyloid- Precursor Protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 45 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-191081	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中野 将希, 三ツ石 弥千代, 渡邊 直希, 日比野 絵美, 斉藤 貴志, 西道 隆臣, 鈴木 利治, 西村 正樹
2. 発表標題 大脳皮質における ILE1/FAM3C および A の間質液への分泌様式に関する比較検討
3. 学会等名 第38回 日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野将希, 三ツ石弥千代, 渡邊直希, 日比野絵美, 斉藤貴志, 西道隆臣, 鈴木利治, 西村正樹
2. 発表標題 Synaptic activity-dependent release of presynaptic ilei/FAM3C.
3. 学会等名 AAIC 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野将希, 三ツ石弥千代, 渡邊直希, 日比野絵美, 斉藤貴志, 西道隆臣, 鈴木利治, 西村正樹
2. 発表標題 Presynaptic ILEI/FAM3C is released in an activity-dependent manner like A exocytosis.
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊直希, 日比野絵美, 中野将希, 庄司航, 杉拓磨, 西村正樹
2. 発表標題 A 産生抑制タンパク質 ILEI/FAM3C の転写制御機構の解析
3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日比野絵美, 杉田昌岳, 三ツ石弥千代, 渡邊直希, 中野将希, 杉拓磨, 西村正樹
2. 発表標題 A 産生抑制タンパク質 ILEI の構造および機能の解析
3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Emi Hibino, Masatake Sugita, Yachiyo Mitsuishi, Naoki Watanabe, Masaki Nakano, Takuma Sugi, Masaki Nishimura
2. 発表標題 Structure-based analysis of ILEI/FAM3C activity to inhibit A generation
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日比野絵美、渡邊直希、西村正樹
2. 発表標題 特異な機序でアミロイド 産生を抑制する ILE1 / FAM3Cとアルツハイマー病リスク
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊直希, 川月章弘, 日比野絵美, 野村礼, 西村正樹
2. 発表標題 A 産生抑制分子 ILE1/FAM3Cの遺伝子転写制御メカニズム
3. 学会等名 第36回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川月章弘, 渡邊直希, 日比野絵美, 野村礼, 西村正樹
2. 発表標題 孤発性アルツハイマー病のリスク遺伝子TM2D3の機能解析
3. 学会等名 第36回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 日比野絵美, 森田修平, 野村礼, 川月章弘, 渡邊直希, 西村正樹
2. 発表標題 A 産生抑制タンパク質 ILE1の構造解析に基づく機能メカニズムの検討
3. 学会等名 第36回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡邊直希, 庄司航, 川月章弘, 日比野絵美, 野村礼, 西村正樹
2. 発表標題 神経系及び非神経系細胞における ILE1/FAM3C 遺伝子の転写制御解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 日比野絵美, 森田修平, 杉田昌岳, 渡邊直希, 川月章弘, 野村礼, 西村正樹
2. 発表標題 A 産生抑制タンパク質 ILE1/FAM3C の構造と機能の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017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