

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07402

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を利用した変異プレセニリンによるアルツハイマー病機序の系統的解析

研究課題名(英文) Systematic analysis of Alzheimer's disease pathomechanisms utilizing genome editing technology

研究代表者

笹栗 弘貴 (Sasaguri, Hiroki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：10783053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化社会の到来により増加するアルツハイマー病(AD)の原因解明と治療法の確立は喫緊の課題である。プレセニリン1(PSEN1)遺伝子変異は家族性ADの原因となることが知られている。最新のゲノム編集技術により複数の変異Psen1マウス系統を作製し解析した結果、アミロイドの生体内での産生パターンは既報の培養細胞系におけるパターンとは異なることが判明した。また、変異Psen1マウスと当研究室で過去に作製した次世代型ADマウスを交配することにより、早期からヒトAD患者によく類似した病理を呈する優れたADモデルマウスを作製することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会を迎えている日本において、アルツハイマー病(AD)患者は増加の一途をたどっており、患者や介護者のウェルビーイング、介護離職、医療費や介護費増大など様々な社会問題を引き起こしている。本研究課題では、疾患モデルの特徴を明らかにし、更に早期からヒトAD患者によく類似した病理を呈する優れたモデルを作製することに成功した。これらの成果は、今後のADの病態理解および新規治療法の確立に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The size of the elderly population of Japan is increasing at an alarming rate and the number of patients suffering from Alzheimer's disease (AD) is rising in a similarly rapid manner. Elucidation of disease mechanisms and establishment of new strategies to prevent and/or treat and intervene AD are urgently required. Mutations in the PSEN1 gene are known to cause familial AD. In the current project, we generated multiple mouse lines that harbor different Psen1 mutations by genome editing technologies. Production pattern of amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) in the brain was different from that in culture cell models in previous reports. By crossing the mutant Psen1 mice with next generation AD mouse model that was previously developed in our lab, we succeeded in generating new AD mouse model that precisely recapitulates the brain pathology in human AD patients.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 プレセニリン1遺伝子 アミロイド (A $\beta$ ) セクレターゼ ゲノム編集技術  
塩基編集技術 マウスモデル

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は、認知症の原因疾患として最多の疾患であり、原因不明の神経変性疾患である。その発症機序はまだ詳細には解明されていないが、**amyloid precursor protein (APP)** タンパクから  $\beta$  および  $\gamma$  セクレターゼによって切断されて生じるアミロイド  $\beta$  (A $\beta$ ) が脳内に蓄積することが発症の引き金となると考えられ、アミロイドカスケード仮説として広く受け入れられている。AD 基礎研究においては、培養細胞やマウスを中心とした動物モデルを用いた実験が主流であり、家族性 AD に関連した変異を導入することで病態を再現した疾患モデルがしばしば用いられる。プレセニリン 1 (**PSEN1**) 遺伝子の変異は、常染色体優性遺伝形式を示す家族性 AD において最も頻度が高い原因遺伝子変異であり、これまでに 300 以上の変異が報告されている。**PSEN1** 遺伝子がコードする **PS1** タンパクは前述の  $\gamma$  セクレターゼの構成成分であり、**PSEN1** 変異は A $\beta$  の産生プロファイルに影響を及ぼし、病的な A $\beta$  産生パターンとすることで AD を引き起こすと考えられているが、最近、培養細胞において 138 の異なる **PSEN1** 変異を導入した系統を作製し、各変異の効果を網羅的に評価した結果、A $\beta$  産生パターンは多様であり、AD の発症年齢との相関も明確に示せなかったことが報告された (**Sun L, et al, Proc Natl Acad Sci USA 2017**)。一方、AD マウスモデルにおいては、これまで主に APP や **PS1** の過剰発現モデル (トランスジェニックマウス) が使用されており、過剰発現に伴う様々なアーチファクトが内在するため結果の解釈に注意を要する (**Sasaguri H, et al, EMBO J 2017**)。また、マウス A $\beta$  はヒト A $\beta$  と比較して凝集性が低いため、ノックイン手法によりマウス **Psen1** 遺伝子に変異を導入するだけでは脳アミロイド病理は再現されないことから、これまで **PSEN1** 変異の生体内での影響は十分検証されてこなかった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、最新のゲノム編集技術を駆使し、変異 **Psen1** モデルマウスを複数系統作出した上で、詳細に生化学的・病理学的解析を行い、系統的に比較検証することで、特に脳内 A $\beta$  産生プロファイルの異常と AD 病態との関連を明らかにし、**PSEN1** 変異による AD 発症の機序を解明することを目的とする。更に、当研究室で開発された過剰発現に頼らずに脳アミロイド病理を再現することに成功した次世代型 AD マウスモデルと交配することにより、**PSEN1** 変異による AD 病理への影響を詳細に評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) ゲノム編集技術による複数の変異 **Psen1** マウス系統の作出と解析

近年、著しく進歩したゲノム編集技術を利用し、家族性 AD の原因遺伝子変異をマウス **Psen1** 遺伝子に導入した。導入する変異は、**Sun** らの培養細胞系の結果をもとに、A $\beta$  自体の産生量は減少するものの病原性・凝集性の高い A $\beta_{42}$  が相対的に増加するとされる変異 (**P117A**)、病原性・凝集性が低く、健常者で多く産生される A $\beta_{40}$  が減少、A $\beta_{42}$ /A $\beta_{40}$  比が増加するとされる変異 (**P436S**)、A $\beta_{40}$ 、A $\beta_{42}$  とともに同程度減少するとされる変異 (**V94M**) と、A $\beta$  産生パターンに異なる影響を及ぼす変異を選択した。**P117A** および **P436S** 変異は、**CRISPR/Cas** システムの変法である塩基編集技術 (**Komor AC, et al, Nature 2016**) による C T 置換により導入し、**V94M** は **CRISPR/Cas9** を利用したノックイン手法により導入した。それぞれ、*in vitro* transcription により作製した標的ゲノム配列に対する **single guide RNA (sgRNA)**、**SpCas9** および **Base Editor mRNA**、また **V94M** 導入に際しては同変異を含む **single strand oligonucleotide (ssODN)** の混合溶液を、**C57BL/6J** マウス受精卵の細胞質にマイクロインジェクション法により導入した。得られた産仔を 2 週齢まで飼育し、尾部組織から **gDNA** を抽出し、**Sanger** 法による配列解析にて変異導入を確認した。

獲得された変異 **Psen1** マウスの脳試料を採取し、**enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)** 法により脳内 A $\beta_{40}$ 、A $\beta_{42}$  の定量を行った。

### (2) 変異 **Psen1** マウス由来胎児線維芽細胞 (**MEF**) の作出と解析

変異 **Psen1** マウスから **MEF** を作製し、培養液中の A $\beta_{40}$ 、A $\beta_{42}$  を **ELISA** 法により定量し、脳内の A $\beta$  産生パターンとの比較を行った。

### (3) **App<sup>NL-F</sup>Psen1<sup>P117L</sup>** マウスの作出と解析

変異 **Psen1** のアミロイド病理への影響を評価するため、当研究室で過去に作製された **App** ノックインマウスと交配し、生化学的、病理学的解析を行った。**App** ノックインマウスは、A $\beta$  の

配列をヒト化した上で、複数の家族性 AD に関連する *APP* 遺伝子変異をマウス *App* 遺伝子に導入することにより、過剰発現に頼らずに脳アミロイド病理性を再現することに世界で初めて成功したモデルマウスである (Saito T, et al, *Nat Neurosci* 2014)。今回交配に使用した *App<sup>NL-F</sup>* マウスは、スウェーデン変異 (NL) とイベリア変異 (F) の 2 つの家族性 AD 変異を導入しており、A $\beta$  自体の配列には変異が入っていないのが特徴である。

#### 4. 研究成果

##### (1) ゲノム編集技術による複数の変異 *Psen1* マウス系統の作出と解析

CRISPR/Cas9 を利用したノックイン手法により、*Psen1<sup>V94M</sup>* マウスを作製した。また、塩基編集技術により、*Psen1<sup>P117A</sup>* マウス、*Psen1<sup>P117L</sup>* マウス、*Psen1<sup>P436S</sup>* マウスを作製した (Sasaguri H, et al, *Nat Commun* 2018) (図 1)。これらのマウス脳試料を用い、脳内 A $\beta$  を ELISA 法により定量した結果、*Psen1<sup>V94M</sup>* マウスでは A $\beta$  産生の異常はみられなかった。また、*Psen1<sup>P117A</sup>* マウス、*Psen1<sup>P117L</sup>* マウス、*Psen1<sup>P436S</sup>* マウスはいずれも A $\beta_{42}$  増加、A $\beta_{42}$ /A $\beta_{40}$  比増加のパターンを示し、その増加量は AD 発症年齢が若い *Psen1<sup>P117A</sup>* マウス、*Psen1<sup>P117L</sup>* マウスでより高かった (図 2)。これらの結果は、Sun らの培養細胞系で報告された産生パターンと異なっており、*in vitro* と *in vivo* で A $\beta$  産生パターンは必ずしも一致せず、解釈に注意を要し、使用目的を厳密に検討する必要があることが示された。

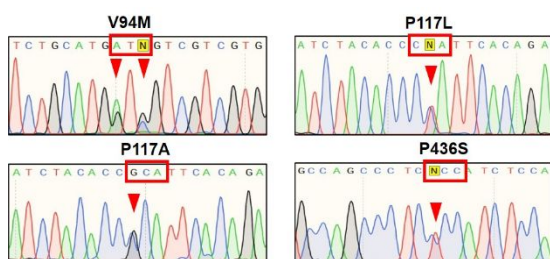


図 1. 変異 *Psen1* マウスの配列解析結果

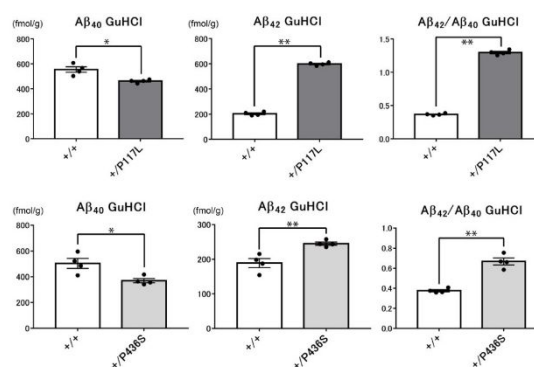
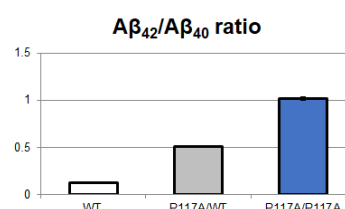


図 2. 変異 *Psen1* マウス脳における A $\beta$  産生パターン

##### (2) 変異 *Psen1* マウス由来胎児線維芽細胞 (MEF) の作出と解析

*Psen1<sup>P117A</sup>* マウス胎児から MEF を作製し、その培養液中の A $\beta$  のパターンを評価した。その結果、培養液中の A $\beta$  のパターンと脳内 A $\beta$  産生パターンは類似していることが示された (図 3)。

図 3 *Psen1<sup>P117A</sup>* マウス MEF における A $\beta$  産生パターン



##### (3) *App<sup>NL-F</sup>Psen1<sup>P117L</sup>* マウスの作出と解析

*Psen1* 変異のアルツハイマー病病理性への影響を詳細に評価するため、当研究室で作製された *App<sup>NL-F</sup>* マウスと *Psen1<sup>P117L</sup>* マウスを交配し、*App<sup>NL-F</sup>Psen1<sup>P117L</sup>* マウスを作製した。その結果、*App<sup>NL-F</sup>Psen1<sup>P117L</sup>* マウスは、*Psen1<sup>P117L</sup>* がヘテロ接合体で存在する場合で 4 か月齢から、ホモ接合体で存在する場合は 2 か月齢から明らかな脳アミロイド病理性を呈することが判明した (図 4)。アミロイド染色試薬である (E,E)-1-fluoro-2,5-bis-

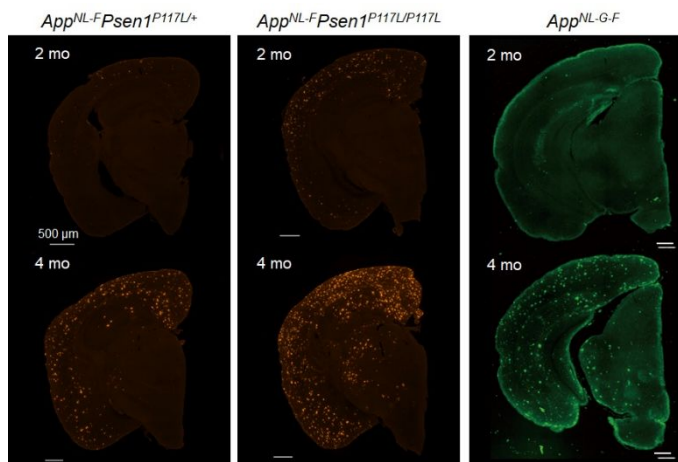


図 4. *App<sup>NL-F</sup>Psen1<sup>P117L</sup>* マウスおよび *App<sup>NL-GF</sup>* マウスにおけるアミロイド病理性

**(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy) styrylbenzene (FSB)** で染色した結果、*App<sup>NL-F</sup>Psen1<sup>P117L</sup>* マウスではほとんどのアミロイドプラークが陽性となり、ヒト AD 患者における脳病理をよく再現していると思われた (図 5)。また、ミクログリアやアストロサイトの集簇、シナプスマーカーの減少などの病理像の再現にも成功した。これらのアミロイド病変は過去に当研究室で作製された、家族性 AD の原因

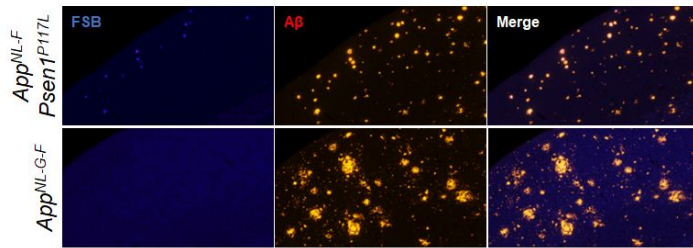


図 5 . *App<sup>NL-F</sup>Psen1<sup>P117L</sup>* マウスおよび *App<sup>NL-G-F</sup>* マウスにおけるアミロイド染色 (FSB)

遺伝子変異を 3 つ有する *App<sup>NL-G-F</sup>* マウスよりも重症であることが示された (図 4 , 5)。 *App<sup>NL-G-F</sup>* マウスが Aβ 配列内に北極変異 (Arctic 変異) を有するモデルであるのに対し、 *App<sup>NL-F</sup>Psen1<sup>P117L</sup>* マウスはヒト野生型 Aβ を発現していることから、早期からヒト野生型 Aβ が蓄積する優れたモデルであると考えられ、今後の AD 研究において Aβ の代謝や抗体療法の効果を検証するのに貢献することが期待される (Sato K, et al, *J Biol Chem* 2021)。

これらの研究成果は、*Nature Communications* 誌 (Sasaguri H, et al, *Nat Commun* 2018)、*Journal of Biological Chemistry* 誌 (Sato K, et al, *J Biol Chem* 2021) に報告した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sasaguri Hiroki, Nagata Kenichi, Sekiguchi Misaki, Fujioka Ryo, Matsuba Yukio, Hashimoto Shoko, Sato Kaori, Kurup Deepika, Yokota Takanori, Saido Takaomi C.	4. 巻 9
2. 論文標題 Introduction of pathogenic mutations into the mouse Psen1 gene by Base Editor and Target-AID	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2892
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-05262-w	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

1. 著者名 Sato Kaori, Watamura Naoto, Fujioka Ryo, Mihira Naomi, Sekiguchi Misaki, Nagata Kenichi, Ohshima Toshio, Saito Takashi, Saido Takaomi C., Sasaguri Hiroki	4. 巻 297
2. 論文標題 A third-generation mouse model of Alzheimer's disease shows early and increased cored plaque pathology composed of wild-type human amyloid peptide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101004 - 101004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.101004	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 Sasaguri Hiroki, Hashimoto Shoko, Watamura Naoto, Sato Kaori, Takamura Risa, Nagata Kenichi, Tsubuki Satoshi, Ohshima Toshio, Yoshiki Atsushi, Sato Kenya, Kumita Wakako, Sasaki Erika, Kitazume Shinobu, Nilsson Per, Winblad Bengt, Saito Takashi, Iwata Nobuhisa, Saido Takaomi C.	4. 巻 16
2. 論文標題 Recent Advances in the Modeling of Alzheimer's Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2022.807473	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 笹栗弘貴
2. 発表標題 ゲノム編集技術と認知症研究最前線
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroki Sasaguri
2. 発表標題 Generation of Alzheimer's disease animal models using an RNA-guided base editing technology
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Sasaguri
2. 発表標題 Generation of animal models using a novel RNA-guided base editing technology
3. 学会等名 第4回日本ゲノム編集学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Sasaguri
2. 発表標題 Generation of AD animal models using a novel RNA-guided gene editing technology
3. 学会等名 Alzheimer's Association International Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹栗 弘貴
2. 発表標題 塩基編集技術を利用した高効率な変異Psen1マウス作製
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 Hiroki Sasaguri, Misaki Sekiguchi, Ryo Fujioka, Kenichi Nagata, Takaomi C Saïdo
2. 発表標題 Generation of mutant presenilin 1 mice using a novel RNA-guided base editing technology
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹栗弘貴、関口みさき、藤岡亮、永田健一、松葉由紀夫、西道隆臣
2. 発表標題 新規ゲノム編集技術を利用したアルツハイマー病動物モデル作製
3. 学会等名 第3回 日本ゲノム編集学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹栗弘貴、関口みさき、藤岡亮、永田健一、松葉由紀夫、西道隆臣
2. 発表標題 新規ゲノム編集技術を利用したアルツハイマー病動物モデル作製
3. 学会等名 第37回 日本認知症学会
4. 発表年 2018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
---------	---------