

令和 5 年 5 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03578

研究課題名（和文）脳トランスクリプトームを起点としたAPOE4による認知症発症促進メカニズムの解明

研究課題名（英文）Harnessing brain cortex-derived molecular data to unravel the mechanism underlying the APOE4-associated development of dementia

研究代表者

山崎 雄（Yamazaki, Yu）

広島大学・医系科学研究科（医）・講師

研究者番号：70866243

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,900,000円

研究成果の概要（和文）：APOE4とエフェクター分子：AACTの関わりを明らかにするため、Cre-loxpシステムによる条件付き遺伝子ノックアウト実験系の構築、新規ヒト化APOEマウスの作成および個体化、ヒト臨床検体中のAPOE量を定量できる高感度ELISAの開発、神経変性関連蛋白を検出できる複数のポリクローナル抗体の取得、に成功した。当初予期していないことが本研究計画中に生じたが、そういった事象が起きたことにより、結果としてヒト化APOEマウスの創生や剖検脳中の新規タンパクXを認識する抗体の発見につながった。これらのツールを活用し、アルツハイマー病などの神経疾患の分子病態解明研究を引き続き展開する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病発症の最も強い遺伝的危険因子はアポリポ蛋白E（APOE）遺伝子であり、APOE4対立遺伝子は劇的に認知症発症リスクを高める一方、APOE2対立遺伝子は保護的に働く。本研究計画により得られた、ヒト化APOEマウスや剖検脳中の新規タンパクXを特異的に認識する抗体は、現在進行中の臨床試験や将来の臨床試験に不可欠な実験病理学的ツールとなり、APOEを標的とする治療法開発に関する新知見を提供する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the association between APOE4 and the effector molecule AACT, we successfully achieved the following: 1) construction of a conditional gene knockout system using the Cre-loxp system, 2) creation and characterization of novel humanized APOE mouse models, 3) development of a highly sensitive ELISA for quantification of APOE in human clinical samples, and 4) acquisition of multiple polyclonal antibodies capable of detecting neurodegenerative-related proteins. Although unforeseen events occurred during the course of this research project, they led to the discovery of novel protein X in dissected brains and the creation of the humanized APOE mouse models. By utilizing these tools, we will continue to investigate the molecular pathogenesis of neurological disorders such as Alzheimer's disease.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病のリスク遺伝子・アポリポ蛋白 E4 多型 (APOE4) は、脳アミロイド (A) の蓄積を促進することで同病の発症に寄与するが、その分子基盤の理解は十分でない。申請者らは脳トランスクリプトーム解析を起点に、APOE4 脳特異的に生じる 1-antichymotrypsin (AACT) の発現上昇を同定した。本研究では「APOE4 は AACT 発現を介し脳 A 蓄積を促進させる」という仮説を、ヒトへの展開性を重視した視点で検証するべく、次の研究を計画した。すなわち、アンチセンスオリゴを脳室内に投与し、脳特異的に AACT の発現を抑制することにより、APOE4 による A 蓄積が抑制されるか？を明らかにするための動物モデルをもちいた実験、ヒト脳における AACT と、APOE4、A やリン酸化タウなどのアルツハイマー病関連分子とのかかわりを、剖検脳の生化学的解析により明らかにする実験、である。

2. 研究の目的

「APOE4 は AACT 発現を介し脳 A 蓄積を促進させる」という仮説を、ヒトへの展開性を重視した視点で検証する。

3. 研究の方法

目的 1. APOE4 によるアミロイド病理促進における、脳 AACT の役割の解明

(概要) ヒト APOE3 もしくは APOE4 を導入したアミロイドマウスモデル (APP/PS1; APOE-targeted replacement マウス。以下、E3 アミロイドマウス、E4 アミロイドマウスと記載) は、APOE 遺伝子多型とアミロイド病理進展の関わりを、個体レベルで研究可能にする優れたモデルである。ここでは、ASO による脳 AACT 抑制方法を確立し、E3、E4 アミロイドマウスの脳 AACT 発現を抑制する。そして、A 病理を E3、E4 アミロイドマウスと脳 AACT 発現抑制 E3、E4 アミロイドマウスで、定量、比較する。それにより、後天的に脳 AACT の発現を抑制することにより APOE4 による A 蓄積促進が抑制されるか？を明らかにする。

目的 2. ヒト脳における AACT と APOE4、アルツハイマー病関連分子との関わりの探索

(概要) モデル系を使用した実証研究 (目的 1) に加え、ヒト剖検脳を使用した記述的解析を行うことにより、ヒト疾患関連性を考慮した仮説検証が可能となる。ここでは、まず正常からアルツハイマー病に至る連続過程を反映する剖検脳コホートを構築する。アルツハイマー病において最も強く障害される側頭葉において、AACT や主要なアルツハイマー病関連分子を生化学的に定量する。そして、正常からアルツハイマー病に至る過程で AACT 発現量がどのように変化するかを明らかにする。さらに、AACT の動態が、その他のアルツハイマー病関連分子の動態とどのように、量的、時間的に相関するかを明らかにし、評価項目における APOE4 遺伝子多型の影響を決定する。

4. 研究成果

目的 1. APOE4 によるアミロイド病理促進における、脳 AACT の役割の解明

ASO の脳定位的投与による脳 AACT 抑制方法を確立した。その一方、ASO による高い中枢神経毒性が認められた。ASO 配列や化学合成法の変更など各種条件検討を行ったが、中枢神経毒性の克服は困難であった。

そのため、代替案に記載のごとく、Cre-loxp システムによる条件付き遺伝子ノックアウト実験系への切り替えを進めた。また、使用を予定していた APOE-targeted replacement マウスの繁殖が供給元とのライセンス契約上不可能であることが判明した。そのため、独自のヒト化 APOE マウスの作成を並行して進めた。

これらのうち、ヒト化 APOE マウスの研究成果について以下に記載する。具体的には、相同組み換えベクターの構築、薬剤耐性 ES 細胞クローンの 1 次スクリーニング、相同組換え ES 細胞クローンの樹立、アグリゲーション法によるキメラマウス作製、生殖系列 F1 キメラマウスの同定および取得を進めた (図 1)。薬剤耐性遺伝子の除去と並行して、現在解析用コホートの構築を進めている。

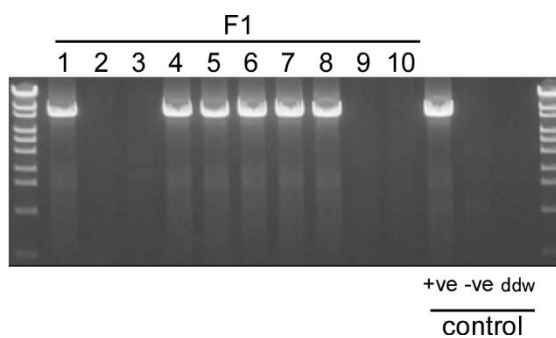
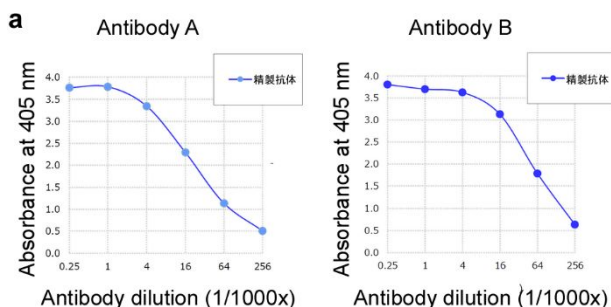


図 1: F1 産子の体組織より抽出された DNA をもちいた PCR 条件による遺伝子型判定。キメラマウスから、毛色を指標に、ES 細胞寄与率上位のマウスを選別し、これと野生型マウスとの交配で F1 産子を作製した。

目的 2. ヒト脳における AACT と APOE4、アルツハイマー病関連分子との関わりの探索

広島大学病院脳神経内科学に保管されている剖検症例の選定、また保管されている髄液、血液検体の選定を行い、それを研究解析するための院内手続きを進めた。剖検脳の生化学的解析のための多段階蛋白抽出法 (Yamazaki, Brain 2019) を本研究室において確立した。

使用する超遠心機が故障したため、機材の修理やローター購入の必要があり全体のサンプル調整が予定より遅れた。



一方、ヒト臨床検体中の APOE 量を定量できる高感度 ELISA の開発、神経変性疾患タンパクを検出できる複数のポリクローナル抗体の取得(図 2a)に成功した。特にポリクローナル抗体については、剖検脳中のタンパク X を検出できることが判明しており(図 2b) 今後それを活用した網羅的な剖検脳解析を予定している。

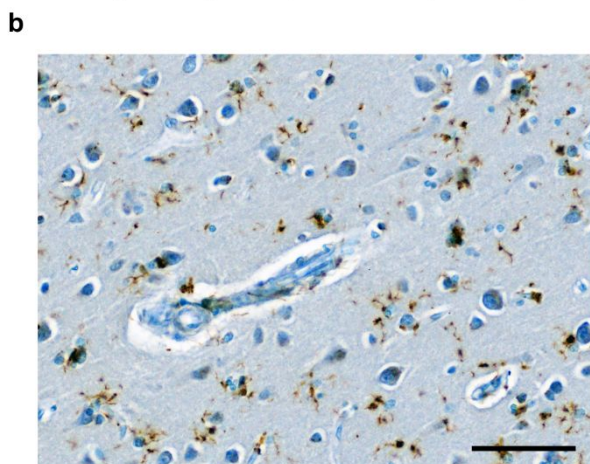


図 2:a, タンパク X を抗原とした精製ポリクローナル抗体の linearity of dilution 試験。異なる抗原部位を認識する 6 種類の精製抗体のうち、代表的な 2 例の抗体試験結果を示す。b, Antibody B によるヒト剖検脳切片における免疫組織化学染色 (DAB 発色)。ヘマトキシリンによる核対比染色を行った。スケールバー: 50 μ m

このように、本研究においては当初予期していないことが目的 1 および 2 とも生じたが、そういった事象が起きたことにより、新規ヒト化 APOE マウスの創生や剖検脳中の新規タンパク X を特異的に認識する抗体の発見につながった。これらのツールを活用し、アルツハイマー病などの神経疾患の分子病態解明研究を引き続き展開する。

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 Oue H, Yamazaki Y, Qiao W, Yuanxin C, Ren Y, Kurti A, Shue F, Parsons TM, Perkerson RB, Kawatani K, Wang N, Starling SC, Roy B, Mosneag IE, Aikawa T, Holm ML, Liu CC, Inoue Y, Sullivan PM, Asmann YW, Kim BY, Bu G, Kanekiyo T.	4. 巻 10
2. 論文標題 LRP1 in vascular mural cells modulates cerebrovascular integrity and function in the presence of APOE4	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight.	6. 最初と最後の頁 e163822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.163822.	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 Nazere K, Takahashi T, Hara N, Muguruma K, Nakamori M, Yamazaki Y, Morino H, Maruyama H.	4. 巻 15
2. 論文標題 Amyloid Beta Is Internalized via Macropinocytosis, an HSPG- and Lipid Raft-Dependent and Rac1-Mediated Process	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Mol Neurosci.	6. 最初と最後の頁 804702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2022.804702.	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 Liu CC, Zhao J, Fu Y, Inoue Y, Ren Y, Chen Y, Doss SV, Shue F, Jeevaratnam S, Bastea L, Wang N, Martens YA, Qiao W, Wang M, Zhao N, Jia L, Yamazaki Y, Yamazaki A, ... Kim BYS, Bu G	4. 巻 25
2. 論文標題 Peripheral apoE4 enhances Alzheimer's pathology and impairs cognition by compromising cerebrovascular function	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat Neurosci.	6. 最初と最後の頁 1020-1033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41593-022-01127-0	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4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎 雄
2. 発表標題 認知症発症のリスクとメカニズムの多様性：アルツハイマー病の高精度診断法と治療法開発に向けて 動物モデルをもちいたapoE4の分子病態解明
3. 学会等名 第94回日本生化学大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎 雄
2. 発表標題 Reassessment APOE4 in Alzheimer's disease: ApoE4 in Vascular Mural Cells and Brain Homeostasis
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mariet Allen, Zachary Quicksall, Xue Wang, Joseph S Reddy, Jeremiah Bergman, Stephanie R Oatman, Thuy Nguyen, Kimberly G Malphrus, Sarah J Lincoln, Yu Yamazaki, Yuka A Martens, Na Zhao, Michael DeTure, Melissa E Murray, Chia-Chen Liu, Takahisa Kanekiyo, Dennis W Dickson, Guojun Bu, Nilufer Ertekin-Taner
2. 発表標題 Transcriptome profiling in AD cases to identify distinct associations with AD-related neuropathology and protein levels in the brain
3. 学会等名 Alzheimer's Association International Conference
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Stephanie R Oatman, Mariet Allen, Zachary Quicksall, Joseph S Reddy, Minerva M Carrasquillo, Xue Wang, Chia-Chen Liu, Yu Yamazaki, Thuy Nguyen, Michael G Heckman, Yuka A Martens, Na Zhao, Michael DeTure, Melissa E Murray, Takahisa Kanekiyo, Dennis W Dickson, Guojun Bu, Nilufer Ertekin-Taner
2. 発表標題 Association of DNA methylation from the temporal cortex and cerebellum with AD-related neuropathology and biochemistry
3. 学会等名 Alzheimer's Association International Conference
4. 発表年 2022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
研究分担者	高橋 哲也 (Takahashi Tetsuya) (00435942)	広島国際大学・総合リハビリテーション学部・教授 (35413)	

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			
米国	Mayo Clinic			