

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310144

研究課題名(和文)アルツハイマー病の発症と進行を説明する脳内ターゲット分子の探索

研究課題名(英文)Identification of target molecules related the progression of Alzheimer's disease

研究代表者

桑野 良三 (Kuwano, Ryozo)

新潟大学・脳研究所・フェロー

研究者番号：20111734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病脳の2大特徴である老人斑と神経原線維変化を指標にして分類された71人の凍結脳(嗅内野、側頭葉、前頭葉)の213箇所からRNAを抽出した。エクソンアレイ法によるmRNA半定量、次世代シーケンサーによる非翻訳RNA解析を行い、健康脳から病巣の進展に伴って変動する8種類のmRNAおよび5種類の非翻訳RNAを同定した。リスクSNPがイントロンや遺伝子の外にあることを理解するために、SK-N-SHならびにU-251を用いて、染色体上離れた遺伝子間相互作用を検出するゲノム高次構造解析のTethered Conformation Capture法の基盤技術を確立した。

研究成果の概要(英文)：Major neuropathological features of Alzheimer's disease are senile plaques and neurofibrillary tangles. To identify genes relevant to neuropathological expansion defined by the Braak stage, we conducted whole-genome exon array analysis with 213 human postmortem brain tissues from the entorhinal, temporal and frontal cortices of 71 brain-donor subjects. We identified eight mRNAs and 5 non-coding RNAs associated with the progression of the characteristic lesion of Alzheimer's disease brain diagnosed by Braak stage. We hypothesized that the phenotype-associated SNPs may spatially contact with distal genomic loci and may lead to regulate the gene expression. To analyze the relationship between the gene expression profiles by exon array and the higher-order chromatin structure data, we used the tethered conformation capture (TCC) method in the human neuroblastoma cell line, SK-N-SH, and the glioma cell line, U-251MG.

研究分野：神経分子遺伝学

キーワード：アルツハイマー病 ゲノム 脳組織 ターゲット分子 染色体 培養細胞 遺伝子発現 リスク遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病は、個人ゲノムの多様性を背景に体内外環境因子によって発症すると考えられる。アルツハイマー病のもっとも強力なリスク遺伝子として、第19番染色体の *APOE* が知られているが、 $s(5.0) > APOE(2.5)$  であることから、*APOE* に匹敵する感受性遺伝子がまだ存在するとされた。新規アルツハイマー病リスク遺伝子の探索を目標に、高密度 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) を用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS : Genome-wide Association Study) が数年間精力的に行われてきた。AlzGene (<http://www.alzgene.org/>) によると、1395の研究で695の感受性遺伝子が報告された。

(2) 孤発性アルツハイマー病のリスク遺伝子は、SNP ベースの大規模関連解析によって同定されている。それらの SNP のほとんどがイントロンまたは近傍の遺伝子上流か下流にあるために、翻訳されるアミノ酸配列は健常者と同じであり、タンパク構造に異常をもたらさない。リスク SNP がアルツハイマー病発症にどのように関与するのか、遺伝子発現に影響を与える核内ゲノムの分子機構が不明の状況である。

(3) 次世代シーケンサーが開発され、ハイスループット網羅的ゲノム構造解析が可能になった。

(4) タンパク間相互作用、転写制御領域などの公開データベースが充実してきた。

## 2. 研究の目的

多くの病気と同じようにアルツハイマー病も遺伝素因が関係するが、最大のリスクは加齢である。個人ゲノムの多様性をベースに、細胞老化や生活習慣など体内・体外環境の影響を受けて、アルツハイマー病を発症すると考えられる。受精後の個人ゲノム配列は変わらない。ゲノム配列に書かれていない遺伝子は存在しない。ではどのようにして、不変であるゲノム配列情報から多種多様な環境に対応して遺伝子発現が起こるのか？この遺伝子発現制御の解明を目的に焦点を絞り、正常～発病～進行過程を説明するターゲット分子を同定する。

(1) 遺伝子発現解析 : GWAS で得られるリスク領域の遺伝子によって、アルツハイマー病を直接説明できるかを検討する。剖検時に神経病理学的に診断された凍結ヒト脳を対象に、脳病変の進行に伴って変動する mRNA を定量する。リスク領域にある遺伝子で病理組織学的な病勢が説明できるかを検討する。

(2) ゲノム高次構造解析 : 遺伝子発現は、その遺伝子のプロモーターだけでなく核内のゲノム高次構造がもたらすとの仮説を立て、その分子機序を明らかにする。モデル実験系として性質の異なる培養細胞を用いて、染色体上離れた領域同士の空間的相互作用をしらべる。

(3) 非翻訳 RNA 解析 : リスク SNP がイントロンまたは遺伝子の外にあることから、非翻訳 RNA の機能解析に焦点当てる。ヒト凍結脳における非翻訳 RNA (マイクロ RNA) の量的変動を測定し、マイクロ RNA がターゲットする mRNA を同定し、その mRNA がコードするタンパク分子の機能とアルツハイマー病の発症過程との関連を解析する。

## 3. 研究の方法

(1) ゲノム高次構造の解析方法の確立 : 転写制御はその遺伝子のプロモーターなどの一次配列だけではなく、染色体上離れた領域が3次元高次構造を介して互いに近接して作用するとの仮説を、Chromosome Conformation Capture Sequence (3C-Seq) 法を改良した Tethered chromosome Capture (TCC) 法を採用して証明する。

そのための基盤研究として培養細胞実験系を確立する。ニューロン由来の SK-N-SH とグリア由来の U-251MG 培養細胞を用いる。

SK-N-SH と U-251 のそれぞれの細胞で、高発現 mRNA (5 個)、低発現 mRNA (5 個)、同程度発現 mRNA (3 個) をエクソソアレイで選別する。

培養細胞をホルマリンで軽く固定し、酵素処理を経て空間的に近接している DNA 同士を結合する。

次世代シーケンサーで人工的に連結された DNA の両端から解読し、ヒト全ゲノム配列を参照にして、細胞ごとに異なって近接する DNA および転写制御エレメントを同定する。

(2) 凍結ヒト脳における遺伝子発現解析 : アルツハイマー病脳は、2大組織病変である老人斑と神経原線維変化の出現部位と程度によって分類 (Braak 分類) される。この病変の進展 (嗅内野 → 側頭葉 → 前頭葉) に伴って変動する mRNA 量をエクソソアレイで半定量する。

(3) 非翻訳 RNA (マイクロ RNA) 解析 : 凍結脳組織から非翻訳低分子 RNA を調製し、次世代シーケンサーで解析する。シーケンスのリード数で発現量を計算し、公開データベースの非翻訳低分子 RNA 配列情報を参照して、アルツハイマー病脳病変に伴うマイクロ RNA を探索し、発現変動する mRNA との関連を調べる。

(4) ゲノム相互作用解析：公開されている既存データベースをもとに高度な情報学を駆使して、転写制御領域と相互作用する機能遺伝子群との関連をコンピューター上で抽出し、実験から得られるアルツハイマー病脳の変動遺伝子の生データを評価する。

#### 4. 研究成果

(1) 遺伝子発現解析：アルツハイマー病の発症や進行を説明するために、脳組織における遺伝子発現状態を直接解析する研究をおこなった。アルツハイマー病脳の2大特徴である老人斑と神経原線維変化を指標に、正常、中等度、重度の段階が病理学的に分類(Braak分類)される。Braak分類された71人の脳3カ所(嗅内野、側頭葉、前頭葉)からRNAを抽出し、エクソアレイ法によるmRNA半定量、ならびに次世代シーケンサー解析をおこなった。健康脳から重症脳へ病巣の進展に伴って変動する8種類のmRNAを同定した。これらは大きく4つのクラスターに分けられ、相互に関連することが示した。

(2) 非翻訳RNA解析：低分子RNAのうちアルツハイマー病脳の病巣進展を反映して、有意に変動するマイクロRNAを数個見出した。

(3) ゲノム高次構造解析：脳部位が固有の機能を発揮しているのは、それぞれの細胞に特異的な遺伝子発現があると考えられる。染色体上離れた転写調節機構をゲノム高次構造から解明するTCC法を導入し、その基盤技術を培養細胞系で確立した。ニューロン由来のSK-N-SHおよびグリア由来のU-251MG培養細胞をモデルに、TCC法を用いて細胞特異的な染色体相互作用が存在することを見出した。イントロンや遺伝子間に転写制御領域があることが推測されるので、アルツハイマー病に特徴的な病巣が時間経過と解剖学的広がって変動する本質的な遺伝子を同定し、その遺伝子がコードしているタンパク分子の機能解析研究に展開する結果が得られた。

(4) 高度な情報学解析：我々の生データおよび公開データベースを参照に、染色体上離れたイントロンと変動遺伝子との相互作用、タンパク間相互作用、同一代謝パスウェイまたは機能モジュールに存在する異なるリスク遺伝子の同定、などについて情報学的に解析を行った。これらの生物学的証明は今後の課題であるが、一つの方法として、培養細胞系を用いた分子生物学実験ならびに代謝マップや文献から検証する。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 18 件)

Kutoku Y, Ohsawa Y, Kuwano R, Ikeuchi T, Inoue H, Ataka S, Shimada H, Mori H, Sunada Y. A second pedigree with amyloidless familial Alzheimer's disease harboring an identical mutation in the amyloid precursor protein gene (E693delta). Intern Med. 査読有, 2015, 54 巻, 205-208. DOI: 10.2169/internalmedicine.54.3021.

Miyashita A, Hatsuta H, Kikuchi M, Nakaya A, Saito Y, Tsukie T, Hara N, Ogishima S, Kitamura N, Akazawa K, Kakita A, Takahashi H, Murayama S, Ihara Y, Ikeuchi T and Kuwano R. Genes associated with the progression of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Translational Psychiatry 査読有, 4 巻, 2014, e396. DOI: 10.1038/tp.2014.35

Miyashita A, Wen Y, Murayama S, Kakita A, Kuwano R 他 (47 人中 47 番目) Lack of genetic association between TREM2 and late-onset Alzheimer's disease in a Japanese population. J Alzheimers Dis. 査読有, 41 巻, 2014, 1031—1038. DOI:10.3233/JAD-140225

Jun G, Asai H, Zeldich E, Drapeau E, Chen C, Chung J, Park JH, Kim S, Haroutunian V, Foroud T, Kuwano R, Haines JL, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Lunetta KL, Kim JW, Buxbaum JD, Mayeux R, Ikezu T, Abraham CR, and Farrer LA. PLXNA4 is associated with Alzheimer disease and modulates tau phosphorylation. Ann Neurol. 査読有, 76 巻, 2014, 379-392. DOI: 10.1002/ana.24219

Tagami S, Okochi M, Yanagida K, Kodama T, Arai T, Kuwano R, Ikeuchi T, Takeda M. Relative ratio and level of amyloid- $\beta$  42 surrogate in cerebrospinal fluid of familial Alzheimer disease patients with presenilin 1 mutations. Neurodegener Dis. 査読有, 13 巻, 2014, 166-170. DOI: 10.1159/000355258.

Kikuchi M, Ogishima S, Miyamoto T, Miyashita A, Kuwano R, Nakaya J, Tanaka H. Identification of unstable network modules reveals disease modules associated with the progression of Alzheimer's disease. PLoS One. 査読有, 8 巻, 2013, e76162. DOI: 10.1371/journal.pone.0076162.

Miyashita A, Koike A, Jun G, Wang LS, Schellenberg GD, Farrer LA, Kuwano R 他 (61 人中 61 番) SORL1 is genetically associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese, Koreans and Caucasians. PLoS One. 査読有, 8 巻, 2013, e58618. DOI: 10.1371/journal.pone.0058618

Ogishima S, Mizuno S, Kikuchi M, Miyashita A, Kuwano R, Tanaka H, Nakaya J. A map of Alzheimer's disease-signaling pathways: a

hope for drug target discovery. Clin Pharmacol Ther. 査読有、93巻、2013、399-401. DOI: 10.1038/clpt.2013.37

Wen Y, Miyashita A, Kitamura N, Tsukie T, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Kakita A, Takahashi H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamaguchi H, Akazawa K, Ihara Y, Kuwano R. SORL1 is genetically associated with neuropathologically characterized late-onset Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 査読有、35巻、2013、387-394. DOI: 10.3233/JAD-122395

Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, (他68人中22番目), Multiple-System Atrophy Research Collaboration. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. N Engl J Med. 査読有、2013、369巻、233-244. DOI: 10.1056/NEJMoa1212115.

Mizuno S, Iijima R, Ogishima S, Kikuchi M, Matsuoka Y, Ghosh S, Miyamoto T, Miyashita A, Kuwano R, Tanaka H. AlzPathway: a comprehensive map of signaling pathways of Alzheimer's disease. BMC Syst Biol. 査読有、30巻、2012、6:52. DOI: 10.1186/1752-0509-6-52

Shiga A, Ishihara T, Miyashita A, Kuwabara M, Kato T, Watanabe N, Yamahira A, Kondo C, Yokoseki A, Takahashi M, Kuwano R, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. Alteration of POLDIP3 splicing associated with loss of function of TDP-43 in tissues affected with ALS. PLoS One. 査読有、7巻、2012、e43120. DOI: 10.1371/journal.pone.0043120

〔学会発表〕(計 18 件)

菊地正隆、原範和、宮下哲典、初田裕幸、齊藤祐子、村山繁雄、池内健、桑野良三. アルツハイマー病における生体分子間ネットワーク解析手法の提案. 日本認知症学会 2014年11月29日～12月01日 横浜パシフィコ(神奈川県・横浜市)

原範和、菊地正隆、宮下哲典、初田裕幸、齊藤祐子、村山繁雄、赤津裕康、池内健、桑野良三. ヒト剖検脳を用いたアルツハイマー病関連マイクロRNAの解析. 日本認知症学会 2014年11月29日～12月01日 横浜パシフィコ(神奈川県・横浜市)

菊地正隆、長谷川舞衣、原範和、宮下哲典、中谷明弘、池内健、桑野良三. 細胞特異的な遺伝子発現は染色体高次構造の影響を受けるのか? 日本分子生物学会 2014年11月25日～27日 横浜パシフィコ(神奈川県・横浜市)

Miyashita A, Kuwano R, Hatsuta H, Kikuchi M, Nakaya A, Saito Y, Tsukie T, Hara N, Ogishima S, Kakita A, Takahashi H, Murayama S, Ihara Y, Ikeuchi T. Genes associated with the progression of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease

brains. AAIC, 2014年07月11日～17日 コペンハーゲン(デンマーク)

長谷川舞衣、原範和、菊地正隆、宮下哲典、中谷明弘、池内健、桑野良三. 細胞特異的なゲノム高次構造解析法の検討. 日本分子生物学会 2013年12月3日～6日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

中谷明弘、宮下哲典、菊地正隆、長谷川舞衣、原範和、西田奈央、徳永勝土、井原康夫、池内健、桑野良三. AD/GD CNVdb: アルツハイマー病のコピー数変異データベース. 日本分子生物学会 2013年12月3日～6日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

菊地正隆、宮下哲典、初田裕幸、齊藤祐子、村山繁雄、池内健、桑野良三. アルツハイマー病におけるタンパク質ドメイン間相互作用ネットワーク解析. 日本認知症学会 2013年11月8日～10日 キッセイ文化ホール(長野県・松本市)

池内健、温雅楠、針谷康夫、宮下哲典、中谷明弘、月江珠緒、春日健作、田中晋、西澤正豊、桑野良三. 家族性および早発型アルツハイマー病症例におけるAPP重複変異の探索. 日本認知症学会 2013年11月8日～10日 キッセイ文化ホール(長野県・松本市)

Miyashita A, Kuwano R, Schellenberg G, Ihara Y, Kanazawa I, Tsuji S, Yamamoto K, Tokunaga K, Nishida N, Yoshida M, Pericak-Vance M, Haines J, Mayeux R, St. George-Hyslop P, Kim JW, Takahashi S, Wang LS, Jun G, Koike A, Farrer L. SORL1 is Genetically Associated With Late-Onset Alzheimer's Disease in Japanese, Koreans and Caucasians. AAIC, 2013年7月13日～18日、ボストン(アメリカ)

Kuwano R, Miyashita A, Koike A, Nishida N, Tokunaga K, Yamamoto K, Ihara Y, Kim JW, Pericak-Vance M, Farrer L, Schellenberg G. Genome-wide association study of Alzheimer's disease: a collaborative genetic study on Alzheimer's disease with Japan, Korea and the Alzheimer's Disease Genetics Consortium. AAIC, 2012年7月14日～19日 バンクーバー(カナダ)

宮下哲典、温雅楠、月江珠緒、桑野良三. アルツハイマー病とSORL1の関連解析. 日本認知症学会、2012年10月26日～28日 つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

Nakaya A, Miyashita A, Ihara Y, JGSCAD, Kuwano R. Copy number variation analysis of Alzheimer's disease. 日本分子生物学会、2012年12月11日～14日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://alzdb.bri.niigata-u.ac.jp>

日本人の家族性アルツハイマー病のデータベースを公開（JFAD: Japanese Familiar Alzheimer's Disease Database）

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

桑野 良三（KUWANO, Ryozo）  
新潟大学・脳研究所・フェロー  
研究者番号：20111734

##### (2) 研究分担者

池内 健（IKEUCHI, Takeshi）  
新潟大学・脳研究所・教授  
研究者番号：20372469

##### (3) 連携研究者

宮下 哲典（MIYASHITA, Akinori）  
新潟大学・脳研究所・助教  
研究者番号：60323995

中谷 明弘（NAKAYA, Akihiro）  
新潟大学・研究推進機構・准教授  
研究者番号：60301149