

平成 30 年 8 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461747

研究課題名(和文) マウストランスクリプトミクス新戦略によるアルツハイマー病関連遺伝子同定と機能解析

研究課題名(英文) Alzheimer disease modifier gene: Identification by novel transcriptions and functional analysis

研究代表者

森原 剛史 (Moriyama, Takashi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90403196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病は複雑な多因子疾患である。その解明のため現在行われているヒトゲノムワイド関連解析(Genome Wide Association Study: GWAS)は膨大な研究リソースが必要である。また同定された疾患関連遺伝子の機能解析は難航している。本研究ではヒトの代わりにマウスを、ゲノム解析の代わり独自の発現解析を行った。DBA/2というマウス系統ではアルツハイマー病の中心病理であるA $\beta$  脳内蓄積量が低かった。DBA/2のどの遺伝子がA $\beta$  蓄積量を抑制している遺伝子産物KLC1 $\Delta$ Eを独自の2段階トランスクリプトームで同定した。この結果はヒト剖検脳や新設培養細胞でも確認された。

研究成果の概要(英文)：Genetic studies of common complex human diseases, including Alzheimer's disease (AD), are extremely resource intensive, yet have struggled to identify genes that are causal in disease. Combined with the costs of such studies and the inability to identify the "missing heritability" particularly in AD, alternate strategies warrant consideration. We devised a unique strategy that combines distinct mouse strains that vary naturally in amyloid beta (A $\beta$ ) production with transcriptomics to identify Klc1 splice variant E as a modifier of A $\beta$  accumulation, a causative factor of AD. In AD patients, the expression levels of KLC1 variant E in brain were significantly higher compared to unaffected individuals. The identification of KLC1 variant E suggests that dysfunction of intracellular trafficking is causative in AD.

研究分野：老年精神医学

キーワード：アルツハイマー病 疾患リスク遺伝子 オミックス アミロイド マウス背景遺伝子 トランスクリプトーム解析

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の中心病理は脳内での A $\beta$  の蓄積である。A $\beta$  蓄積の抑制または除去はアルツハイマー病の根治的治療になると考えられ、多くの大規模な臨床研究が行われている。しかしながら、これらすべてのアルツハイマー病根治療法の臨床研究は失敗に終わっている。申請者の場合、高濃度の R-flurbiprofen が培養細胞実験で A $\beta$  42 産生抑制効果を持つことを以前報告した (JNeurochem. 2002 v83 p1009)。米国 Myriad 社は申請者らの論文をホームページのトップページに引用しつつ根治療法薬 R-flurbiprofen の臨床治験を約 70 億円かけて行ったが、第 1 相試験で失敗した。

臨床治験の失敗の理由は、治験計画段階から申請者が指摘していた問題 (Ann NY Acad Sci. 2004 v1035 p68、日本痴呆学会誌 Dementia Japan 2004 年 18 巻 1 号 46 ページ、Psychogeriatrics 2008 v8 p15) も含めいくつもあるが、ここでは申請中の研究とも関連する 3 つの問題について述べる。

1 つ目は、生理的条件であるかどうかである。申請者を含めたすべての基礎研究グループの培養実験で用いられた R-flurbiprofen の濃度はヒト脳内では達成困難な高濃度であった。関連する基礎研究においても、R-flurbiprofen 類似の薬物 (NSAIDs) が A $\beta$  抑制に成功したことが多くの基礎研究者や製薬企業により再現されているが、どれも臨床的に非現実的な高濃度の薬物が用いられていた。

臨床応用のためには人工的実験条件ではなく生理的条件でも効果が得られるよう薬剤を改善するという大きな壁を乗り越えなければならない。

本研究では自然に存在するゲノムのバリエーションの範囲で A $\beta$  脳内蓄積量が 3 倍以上変化する現象を突き止めた。

2 つ目は、アルツハイマー病は多因子疾患 (common complex disease) であるにもかかわらず、治療ターゲットとなる分子があまりにも少数しか同定されていないことである。A $\beta$  蓄積はアルツハイマー病の中心病理であるが、そのメカニズムは A $\beta$  産生を直接行う極少数の酵素しか解明されていない。そのため根治療法開発のターゲット分子は A $\beta$  そのものやこれら少数の酵素になりがちで、その臨床治験は不成功の連続である。A $\beta$  蓄積には多くの分子やメカニズムが関与しているはずであり、A $\beta$  蓄積に関与する多彩な分子を発見することが求められている。本研究では A $\beta$  脳内蓄積量を規定する遺伝子産物 KLC1vE (kinesin light chain-1 splice variant E) を同定した。

3 つ目は疾患リスク遺伝子研究が膨大な研究リソースを必要とし、かつその結果を臨床応用することが困難であることである。上記 2 つ目の問題の解決方法の王道はゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association

Study: GWAS) など疾患関連遺伝子の同定である。

この GWAS は通常 1 万人以上の患者と健康者の DNA 検体を収集し解析する。近年の技術革新によりゲノムのシーケンズコストは大幅に下がったものの、最終的な遺伝子解析には多くの作業が必要である。臨床検体の収集に必要な労力は膨大であり、必要とされている検体数は増加しており、ますます膨大な研究リソースを割く必要性が増えている。一研究施設で可能な範囲はすでに超えており、多くの研究施設、複数の国家が協力してなんとか目標を達成しようとしている状態である。

そしてこの膨大な研究リソースを投入した GWAS で同定された疾患関連遺伝子を効率的に解析する方法はない。GWAS で同定されたい疾患関連遺伝子から臨床応用への道のりはとてつもなく遠いのが現状である。

本研究はこのヒト GWAS の代わりとなる、全く新しい疾患修飾遺伝子の同定法も提示する。

### 2. 研究の目的

複雑な多因子疾患であるアルツハイマー病の発症に関与している遺伝子産物を、これまででない効率的な方法で同定する。

### 3. 研究の方法

我々は従来のヒト GWAS の代わりに、異なるマウス系統の脳における遺伝子発現を網羅的に調べることで多因子疾患の関連遺伝子同定を効率的に行えるのではと考えた<sup>2</sup>。実験用マウスはヒトと異なり環境因子の統制が可能でかつ背景遺伝子も単純化でき、はるかに効率的な遺伝子探索が可能となる。さらに脳の遺伝子発現を解析することでゲノム解析に比べ直接的かつ効率的な遺伝子同定が可能となる。さらに発現解析で同定された遺伝子は発現量が変化していることが最初から確定しており、その後の遺伝子の機能解析も容易になるという利点がある。

アルツハイマー病のなりやすさを比較するマウス系統は C57BL/6, DBA/2, SJL の 3 系統を選んだ。マウス背景遺伝子による遺伝子発現の差をとらえるため、3 系統のマウスの海馬の mRNA 発現量をマイクロアレイ (Illumina) でプロファイルした。A $\beta$  が蓄積しにくい体質を持つ DBA/2 が他の 2 系統と発現量が異なる遺伝子群を抽出した。

次にアルツハイマー病モデル動物として広く使われている APP トランスジェニックマウス (Tg2576) の背景遺伝子を交配により上記の 3 系統で混合させた。これらのマウスの A $\beta$  脳内蓄積量は ELISA (Wako Japan) で測定した。海馬遺伝子発現はマイクロアレイで測定した。脳内 A $\beta$  蓄積量と発現量が相関する遺伝子を FDR < 0.001 で抽出した。

マイクロアレイの結果は逐次 QPCR で確認した。

ヒト剖検脳は福祉村病院から倫理委員会の承認を受けたうえ提供を受けた。各剖検脳からの RNA 品質 (RIN 値) は極めて良好であった。

#### 4. 研究成果

主要な成果は PNAS 2014 に発表し、また一般メディア (日経、毎日、読売、産経など新聞 12 紙、8 本のテレビニュースと 2 本のテレビ情報番組) でも概要を伝えた

我々は最初にアルツハイマー病になりにくいマウス系統は存在するか検討した。そして DBA/2 系統が背景遺伝子があると、APP Tg マウスの脳内 A 蓄積量が 1/3 ~ 1/4 ( $p < 0.0001 \sim 0.001$ ) と大幅に少ないことを見いだした。DBA/2 はアルツハイマー病になりにくいマウスであった。

では DBA/2 系統のどの遺伝子が A 蓄積量を抑制しているのでしょうか。まず A 病理が出現しない non-Tg マウスをもちいて、DBA/2 系統だけで発現量が異なる遺伝子群を抽出した。この遺伝子発現量の違いは A 蓄積による 2 次的変化ではなく、純粋に背景遺伝子が原因である。

次に DBA/2 その他の系統を交配することで背景遺伝子を混合させた APP Tg マウスを用意した。これらのマウスの脳内 A 蓄積量と発現量が相関する遺伝子を、先に抽出した遺伝子群の中から探した。こうして脳内 A 蓄積量を規定する遺伝子産物 KLC1vE を同定した。

マウスでの A 脳内蓄積量を規定する遺伝子産物 KLC1vE の同定に成功したが、ヒトアルツハイマー病ではどうであろうか? ヒト剖検脳でも KLC1vE はアルツハイマー病で健常者よりも高値 (cont:  $n=14$ , AD:  $n=10$ , +30.7%,  $p=0.0096$ ) であった。

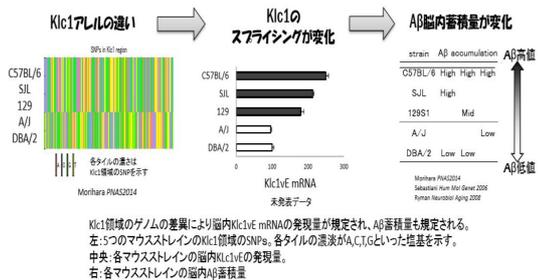
KLC1vE は何をしているのでしょうか? KLC1vE の機能を直接的に調べるため、神経培養細胞の KLC1vE の発現量を人工的に抑制した (RNAi によるノックダウン)。すると A の産生が抑制 (A<sub>40</sub>:  $-44.7 \pm 2.6\%$ ,  $p < 0.0001$ , A<sub>42</sub>:  $-39.3 \pm 0.6\%$ ,  $p < 0.0001$ ) されることが分かった。KLC1vE はアルツハイマー病の原因物質である A の産生に関与していることが強く示唆された。

アルツハイマー病研究として

アルツハイマー発症の新たなメカニズムが明らかになりつつある。実験用マウスには様々な系統があり、その Klc1 領域のゲノムが C57BL/6 らと共通の系統のマウスは Klc1 スプライスバリエント E の脳内発現量が高く、A 脳内蓄積量が多い。

多因子疾患の疾患修飾遺伝子の効率的な同定方法として  
ヒト GWAS よりもはるかに少ない研究リソースで効率的に疾患修飾遺伝子を同定する方法を開発した。多くの多因子疾患の疾患モ

デルマウスがすでに開発されており、我々が提唱する研究方法の応用範囲は広い。発現解析なのに原因となる遺伝子を同定できるというユニークさについては、多くの分野の研究者に知っていただくよう今後も努力していく予定である。



#### 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)

1: Hirano A, Ohara T, Takahashi A, Aoki M, Fuyuno Y, Ashikawa K, Morihara T, Takeda M, Kamino K, Oshima E, Okahisa Y, Shibata N, Arai H, Akatsu H, Ikeda M, Iwata N, Ninomiya T, Monji A, Kitazono T, Kiyohara Y, Kubo M, Kanba S. A genome-wide sociation study of late-onset Alzheimer's disease in a Japanese population. *Psychiatr Genet.* 2015 Aug;25(4):139-46. doi: 10.1097/YPG.0000000000000090. PubMed PMID: 26049409.

2: Gan KJ, Morihara T (責任著者), Silverman MA. Atlas stumbled: kinesin light chain-1 variant E triggers a vicious cycle of axonal transport disruption and amyloid-generation in Alzheimer's disease. *Bioessays.* 2015eb;37(2):131-41. doi: 10.1002/bies.201400131. Epub 2014 Nov 13. PubMed PMID: 25394182.

3: Omi T, Tanimukai H, Kanayama D, Sakagami Y, Tagami S, Okochi M, Morihara T, Sato M, Yanagida K, Kitasyoji A, Hara H, Imaizumi K, Maurice T, Chevallier N, Marchal S, Takeda M, Kudo T. Fluvoxamine alleviates ER stress via induction of Sigma-1 receptor. *Cell Death Dis.* 2014 Jul 17;5:e1332. doi: 10.1038/cddis.2014.301. PubMed PMID: 25032855; PubMed Central PMCID: PMC4123092.

4: Morihara T (責任著者), Hayashi N, Yokokoji M, Akatsu H, Silverman MA, Kimura N, Sato M, Saito Y, Suzuki T, Yanagida K, Kodama TS, Tanaka T, Okochi M, Tagami S, Kazui H, Kudo T, Hashimoto R, Itoh N, Nishitomi K,

Yamaguchi-Kabata Y, Tsunoda T, Takamura H, Katayama T, Kimura R, Kamino K, Hashizume Y, Takeda M. Transcriptome analysis of distinct mouse strains reveals kinesin light chain-1 splicing as an amyloid- accumulation modifier. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Feb 18;111(7):2638-43.  
doi: 10.1073/pnas.1307345111. Epub 2014 Feb 4. PubMed PMID: 24497505; PubMed Central PMCID: PMC3932848.

5:  
Miyashita A, Wen Y, Kitamura N, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M, Tomita N, Furukawa K, Arai H, Asada T, Harigaya Y, Ikeda M, Amari M, Hanyu H, Higuchi S, Nishizawa M, Suga M, Kawase Y, Akatsu H, Imagawa M, Hamaguchi T, Yamada M, Morihara T, Takeda M, Takao T, Nakata K, Sasaki K, Watanabe K, Nakashima K, Urakami K, Ooya T, Takahashi M, Yuzuriha T, Serikawa K, Yoshimoto S, Nakagawa R, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Kakita A, Takahashi H, Yamaguchi H, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Ikeuchi T, Kuwano R. Lack of genetic association between TREM2 and late-onset Alzheimer's disease in a Japanese population. J Alzheimers Dis. 2014;41(4):1031-8.

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

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

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
森原 剛史 (MORIHARA Takashi)  
大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90403196

(2)研究分担者  
武田 雅俊 (TAKEDA Masatoshi )  
藍野大学・医療保健学部・学長  
研究者番号：00179649

田中 稔久 (TANAKA Toshihisa )  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：10294068

(3) 連携研究者  
赤津 裕康 (AKATSU Hiroyasu)  
医療法人さわらび会福祉村病院・長寿医療研  
究所・研究員  
研究者番号：00399734

鈴木 利治 (SUZUKI Toshiharu)  
北海道大学・薬学研究科(研究院)・教授  
研究者番号：80179233

角田 達彦 (TSUNODA Tatsuhiko)  
独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学  
研究センター・グループディレクター  
研究者番号：10273468