

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640122

研究課題名(和文)アルツハイマー病に特徴的な病巣が脳内に伝搬する分子機序の解明

研究課題名(英文)Molecular analysis of the differentially expressed miRNA related to 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)は病理組織学的に不可逆に進行する脳の変性疾患である。その病巣の進行は、脳全体に沈着するアミロイド斑(SP)と解剖学的に連続した脳部位が侵されていく神経原線維変化(NFT)の2大特徴がある。剖検時にSPとNFTの程度と拡がりによって病理学的にBraak分類された(SP;0, A, B, C, および NFT:0, I, II, III, IV, V, VI)脳の3箇所(嗅内皮質、側頭葉、前頭葉)からRNAを抽出して解析した。AD病巣の伝搬に関する分子としてexosome由来のmiRNAに注目して、脳部位別にBraak分類に伴って発現変動を見い出した。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is progressive neurodegenerative disorder characterized by two major pathological changes in expansion of senile plaques (SP) and neurofibrillary tangles (NFT) in the brain. Autopsy brains were diagnosed based on the degree of these two pathological findings defined by the Braak stage (SP: 0, A, B, and C, and NFT:0, I, II, III, IV, V and VI). We analyzed non-coding small RNA, especially miRNA, in the exosome as a candidate molecule of propagation of pathological lesion. Total RNA was isolated from three brain regions (entorhinal cortex, temporal cortex and frontal cortex) at several Braak stages. Over 20,000,000 single reads in each sample was determined by the next generation sequencing and statistically analyzed. We found differentially expressed miRNAs in the course of expansion of pathological lesion in each brain region.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：アルツハイマー病 miRNA 凍結ヒト脳

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病(AD)も多くの病気と同じように、個人ゲノム情報と環境因子の相互作用によって発症する。しかし、常染色体優性遺伝の若年発症ADでも30歳以前に発症することは少なく、加齢が最大の発症リスクと考えられる。大多数を占める孤発性ADは70歳をこえて急速に増加する。神経細胞が不可逆的に変性脱落し、正常脳機能が20年以上かけて緩徐に障害される脳の病気である。生殖系列の個人ゲノム配列は不変であるので、配列解析やコピー数多型だけでAD発症の分子機序の解明には限界がある。したがって、AD発症に影響するエピジェネティクス効果の解析に注目が集まっている。

(2) 申請者らはヒト凍結脳(約2000例のブレインバンク)をリソースとして脳組織のmRNA発現解析(Exon array)を行い、ADの進行に伴って脳部位によってmRNA発現が特徴的に変化することを見出した。この発現変動を制御する分子として、脳部位ごとの低分子RNA(miRNA)を分取し、発現変動量の解析研究に着手した。

2. 研究の目的

(1) ADは不可逆に進行する脳の変性疾患である。病理学的にみると細胞間に沈着する不溶性アミロイドからなる老人斑(SP)と神経細胞内に出現するリン酸化タウタンパクによる神経原線維変化(NFT)の2大変化がある。健康脳からAD発症～中等度～重症に至る臨床経過を反映する病理変化は、脳全体に散在性に沈着するSP数の増加、および解剖学的に隣接した脳部位に特定の方向性をもって拡大するNFTが知られている。しかしその分子機構はあまり解明されていない。

(2) AD脳は症例を超えて共通した病変の解剖学的進展があるので、AD病巣伝搬に関連する分子が存在すると推測される。ADの時間的空間的病理学的変化を理解するために、細胞外に分泌されるexosomeが注目され、主として培養細胞や動物実験が行なわれてきた。

(3) 脳部位別のexosomeに含まれる病巣伝搬分子としてnon-coding RNA(miRNA)を仮定し同定することが本研究の目的である

3. 研究の方法

(1) 研究対象として病理診断されたヒト凍結脳(共同研究)を用いる。剖検時に脳半球の病理組織学的検査を行う。AD

病理を特徴づける2大病変であるアミロイド沈着(SP:0、A、B、Cの4段階)と神経原線維変化(NFT:0、I、II、III、IV、V、VIの7段階)の程度によって正常、軽度AD、重度ADに分類(Braak stage)する。

(2) 残りの半球は7mm厚さにスライスし凍結保存する。(1)で診断された脳(同一提供者)ごとに嗅内皮質、側頭葉、前頭葉の3箇所から微小脳組織を切り出す(共同研究)。本研究では、正常脳(SP=0、A; NFT=0~II)AD脳(SP=C; NFT=IV~VI)と定義して、SP=BおよびNFT=IIIの症例はAD病変の移行時期と考えて解析する。

(3) 凍結正常脳およびAD脳からmiRNeasy Serum/Plasma Kit(QIAGEN)を用いて、トータルRNAを抽出し、次世代シーケンサー(Genome Analyzer IIX:GAIIx)用にTruSeq Small RNA Sample Preparation Kitを用いてサンプル調製し、アクリルアミド電気泳動によって分画・分取する。

(4) GAIIx用にIndex標識されたサンプルをシーケンサーにかけて、各サンプルにつき2000万以上のGAIIxシングルリード情報を網羅的に取得する。

(5) GAIIxから得られた生データを加工してFASTQ形式およびBAMファイルに変換してデータ・サーバーに保存する。低発現(50以下のリード数)は誤差を生じるために解析に用いない。False Discovery Rate(FDR)を用いて多重検定の補正した後、嗅内皮質、側頭葉、前頭葉ごとに正常脳とAD脳に発現しているmiRNAを個別に比較して、病理像を反映して統計学的に有意であるmiRNAを同定する。

(6) (4)で得られたmiRNAがNFTのBraak stageに伴って変動するかを、クラスター解析によって分類し、変動の程度を解析する。

4. 研究成果

(1) ADも遺伝素因が強く関与している。生殖系列の個人ゲノム情報は、生まれてから死ぬまで不変と考えられるが、ADは老化に連れて有病率・罹病率ともに増加する。また正常発達して一旦は獲得した高次脳機能が不可逆的かつ段階的に失われていくことはゲノムの塩基配列やコピー数多型では説明がつかない。ADの症状(表現型)に影響するエピジェネティクス解析が重要であることを支持する結果が得られた。

(2) エピジェネティクス機構にはDNA

メチル化や核内転写調節因子の寄与が知られている。また転写後の調節としてタンパク一次構造に関わらないイントロンや遺伝子間に存在するノンコーディングRNAによる制御が見つかった。これらのエピジェネティクスと考えられる機構は、特に細胞分裂を停止した神経細胞における多彩な機能を説明する上で重要な機構と推測され、それを担う分子の同定は本質的であることが判った。

(3)ADについては、2大特徴であるSPとNFTの量的空間的時期的変化が病勢に深く関連することが判ってきた。ADの本体は脳組織にあるので、SPとNFTを指標とした脳部位ごとに病理変化の程度(Braak ステージ分類)に伴う遺伝子発現 mRNA 量の変化を全 Exon array 法で測定した。有意な増減が認められた8種類の mRNA についてクラスター解析を行った結果、脳部位ごとに NFT Braak ステージと関連する mRNA が4群に分かれた。

RELN, GRB14: Braak 0 から IV まで高発現して V-VI で急激に減少。

PTGS2, NPAS4: Braak 0 で高発現し、I で急激に減少して VI まで低発現。

DCHS2: Braak I で一過性に増加。

MYO5C, PHYHD, TRIL: Braak 0 で低発現、その後 I-VI まで高発現。

これらの4群は各脳部位で類似の発現変動を示したが、嗅内皮質がもっとも明瞭に変化していた。公開データベースによると、8種類の mRNA がコードするタンパクは、全体が塊となってタンパク-タンパク相互作用がみられること、並びに連続的な Braak ステージの進行に伴って変化していることから病巣が伝搬する分子の本体を反映しているのかもしれない。その遺伝子群の発現調節機は今後の課題である。

(4)神経病理学的に診断された剖検脳を用いて、ADの初期脳病変部位である嗅内皮質に焦点を当ててmiRNAの解析をした。対象とした全miRNA(2,576種類が知られている)のうち、50以上のリード数(発現量)があって多重検定をパスした475 miRNAについて、有意差検定を行った。その結果、嗅内皮質で有意($P < 0.01$)に発現量が変動する158個のmiRNAを同定した。これらのmiRNA発現変動パターンに特徴があるかをNFT Braakステージを指標としてクラスター解析を行った。その結果、4群に分けることができた。

クラスター1(51 miRNA): NFT Braak ステージに連れて増加。

クラスター2(40 miRNA): NFT Braak ステージに連れて減少。

クラスター3(23 miRNA): NFT Braak

ステージ 0 から III まで減少し、IV から VI にかけて増加する V 字変化。

クラスター4(44 miRNA): NFT Braak ステージ II, III に若干増加してその後 IV から VI にかけて減少。

miRNA は mRNA に結合して mRNA の安定性や翻訳抑制をしていると考えられている。miRBase や TargetScan 等の公開データベースを参考に、上記の miRNA がターゲットにする mRNA を探し(3)の Exon array で同定した mRNA との関連を調べた。その結果、直接的な強い関連性は見出されなかった。この点について、mRNA の安定性だけでなく病理変化(病巣の伝搬)は、翻訳後の発現タンパクを含めた解析が必要なのかもしれない。

(5)NFT病変の進行に伴ってmRNA発現量の増加または減少を(3)で検討した。次にタンパク発現に置き換えて解析する方法を考案した。Exon arrayで得られるエクソンの発現量をタンパクドメインの発現と仮に定義して解析を試みた。異なるタンパクドメインが共発現した場合、それらは相互作用すると考え、各脳部位で共発現するドメイン間相互作用ネットワークを構築した。Braakステージの進行に伴うタンパク機能ドメインドメインネットワークの変化を観察した結果、すべての脳部位でドメイン間ネットワークは崩壊する傾向があった。また、Braakステージの進行(病巣伝搬)とともに多くの相互作用を失うタンパクとしてRAC1を同定した。

(6)(4)または(5)で同定されたmiRNAをヒト神経細胞由来の培養細胞に導入して、ターゲット mRNA の変動を観察した。ターゲット mRNA やそれらと相互作用する mRNA の転写後の量的変動を確認するために、NGS で発現量データを網羅的に取得した。

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 10 件)

Kikuchi M, Ogishima S, Mizuno S, Miyashita A, Kuwano R, Nakaya J, Tanaka H. Network-Based Analysis for Uncovering Mechanisms Underlying Alzheimer's Disease. *Methods Mol Biol*. 査読有, 2016, 1303 巻, 479-491. doi: 10.1007/978-1-4939-2627-5_29.

Ogishima S, Mizuno S, Kikuchi M, Miyashita A, Kuwano R, Tanaka H, Nakaya J. AlzPathway, an Updated Map of Curated Signaling Pathways: Towards Deciphering Alzheimer's

Disease Pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 査読有, 2016, 1303 巻, 423-432. doi: 10.1007/978-1-4939-2627-5_25.

Kutoku Y, Ohsawa Y, Kuwano R, Ikeuchi T, Inoue H, Ataka S, Shimada H, Mori H, Sunada Y. A second pedigree with amyloid- less 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.

Iwasaki Y, Mori K, Ito M, Tatsumi S, Mimuro M, Kuwano R, Hasegawa M, Yoshida M. An autopsied case of unclassifiable sporadic four-repeat tauopathy presenting with parkinsonism and speech disturbances. *Neuropathology.* 査読有, 2015, doi: 10.1111/neup.12274.

Kasuga K, Kikuchi M, Tokutake T, Nakaya A, Tezuka T, Tsukie T, Hara N, Miyashita A, Kuwano R, Ikeuchi T. Systematic review and meta-analysis of Japanese familial Alzheimer's disease and FTDP-17. *J Hum Genet.* 査読有, 2015, 6 巻, 281-283. doi:10.1038/jhg.2015.15.

Sakai M, Watanabe Y, Someya T, Araki K, Shibuya M, Niizato K, Oshima K, Kunii Y, Yabe H, Matsumoto J, Wada A, Hino M, Hashimoto T, Hishimoto A, Kitamura N, Iritani S, Shirakawa O, Maeda K, Miyashita A, Niwa S, Takahashi H, Kakita A, Kuwano R, Nawa H. Assessment of copy number variations in the brain genome of schizophrenia patients. *Mol Cytogenet.* 査読有, 2015, 8 巻, 46. doi: 10.1186/s13039-015-0144-5. eCollection 2015.

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, Farrer LA. PLXNA4 is associated with Alzheimer disease and modulates tau phosphorylation. *Ann Neurol.* 査読有, 2014, 76 巻, 379-392. doi: 10.1002/ana.24219.

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, 2014, 4, 巻 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, 2014, 41 巻, 1031—1038. doi:10.3233/JAD-140225

Tagami S, Okochi M, Yanagida K, Kodama T, Arai T, Kuwano R, Ikeuchi T, Takeda M. Relative ratio and level of amyloid- β 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.

[学会発表](計 12 件)

菊地正隆、原範和、長谷川舞衣、宮下哲典、桑野良三、池内健、中谷明弘. 分子生物学会アルツハイマー病感受性領域が近接する染色体領域の同定. 第38回日本分子生物学会(2015年12月1日-4日、神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市))

中谷明弘、菊地正隆、宮下哲典、原範和、春日健作、西田奈央、徳永勝士、桑野良三、池内健. 日本人アルツハイマー病に関連するコピー数変異のゲノム配列中での構造と分布. 第38回日本分子生物学会(2015年12月1日~4日)神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)

Akatsu H, Tomioka M, Kanematsu T, Toda Y, Yamagata H, Amamoto S, Ohara H, Ikeuchi T, Kuwano R, Hashizume Y, K.Ueda K. Autopsy confirmed Alzheimer's disease, especially early onset and apolipoprotein E4 negative male has the variant in the ATP-binding cassette transporter (ABCA7). IAGG (International Association of Gerontology and Geriatrics) 2015年10月19~22日 チェンマイ(タイ)

Shimada-Sugimoto M, Otowa T, Miyagawa T, Khor S-S, Kashiwase K, Sugaya N, Kawamura Y, Umekage T, Kojima H, Futagami T, Saji H, Miyashita A, Kuwano R, Kaiya H, Kasai K, Tanii H, Okazaki Y, Tokunaga K, Sasaki T. Search for new susceptibility genetic factor associated with panic disorder -pathway analyses based on genome-wide association study-. ASHG (American Society of Human Genetics) 2015年10月9日~10日 ボルチモア (アメリカ)

桑野良三. バイオマーカーとしてのゲノム解析. 第34回日本認知症学会 2015年10月3日 リンクステーションホール (青森県・青森市)
菊地正隆、原範和、長谷川舞衣、宮下哲典、桑野良三、池内健、中谷明弘. アルツハイマー病感受性領域が近接する染色体領域の同定. 第34回日本認知症学会, 2015年10月3日 リンクステーションホール (青森県・青森市)
原範和、菊地正隆、宮下哲典、初田裕幸、齊藤祐子、村山繁雄、春日健作、池内健、桑野良三. アルツハイマー病の血清バイオマーカーとしてのマイクロRNA解析. 第34回日本認知症学会, 2015年10月2日, リンクステーションホール (青森県・青森市)
G. Jun, Chung J, Tosto G, Vardarajan B, Reitz C, Lunetta KL, Manly JJ, Byrd GS, Haines J, Pericak-Vance MA, Kuwano R, Mayeux R, Schellenberg GD, Farrer LA. Transethnic Genome-Wide Meta-Analysis for Alzheimer Disease. AAIC (Alzheimer's Association International Conference) 2015年7月17日~23日 ワシントン (アメリカ)
Kasuga K, Kikuchi M, Tokutake T, Nakaya A, Tezuka T, Tsukie T, Hara N, Miyashita A, Kuwano R, Ikeuchi T. Systematic review of Japanese familial Alzheimer's disease and FTDP-17. AAIC (Alzheimer's Association International Conference) 2015年7月17日~23日 ワシントン (アメリカ)
Kuwano R, Suemitsu S. Genetic risk factors and gene expression analysis of dementias. AADMD (American Academy of Developmental Medicine and Dentistry) 2015年7月27~29日 ロサンゼルス (アメリカ)
Kuwano R. Molecular genetics of Alzheimer's disease. The First International Taiwanese Congress of Neurology, 2015年5月7日 台北 (台湾)
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)

〔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：
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

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

()

研究者番号：

(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