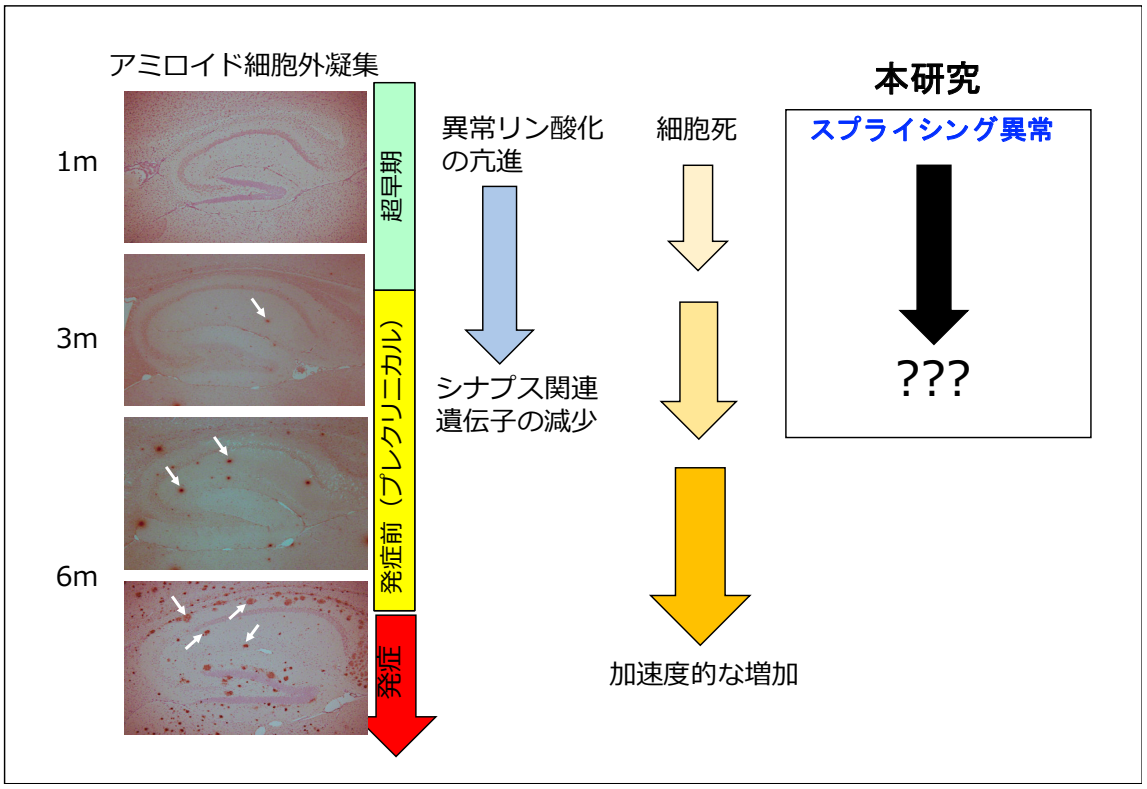
150　アルツハイマー病発症前スプライシング異常の解析	田中　ひかり

【目的】アルツハイマー病（AD）は、社会の高齢化に伴い、国内のみならず世界的にも罹患数が増加している神経変性疾患である。そしてこれまで、AD の病態の最上流は細胞外のアミロイドβ（Aβ）の蓄積だと考えられ、細胞外Aβの除去を治療戦略としたアミロイド抗体を用いた多くの臨床試験が行われてきた。しかし、アミロイドの除去には成功したものの認知機能の改善に十分な成果を得られていない。一方、研究代表者の先行研究において発症前及び細胞外Aβの蓄積前からすでに超早期病態が起こっていることを明らかにした。そして、この超早期病態では遺伝子のスプライシング異常が起こっている可能性が先行研究で示唆された。そこで、本研究ではこのスプライシング異常の影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】スプライシング異常が有意に確認された遺伝子のうち、特にヒトとマウスで配列に相同性の高い遺伝子に着目した。しかし、この遺伝子の機能はほとんど明らかとなっていなかったため、この遺伝子の機能解明を中心として、超早期アルツハイマー病態へ及ぼす影響を調べた。

【結果】機能未知遺伝子 X のミススプライシングは超早期アルツハイマー病モデルマウスで顕著に増加しており、またこのミススプライシングはヒト患者死後脳においても確認された。また、全長遺伝子 X と Exon 欠損遺伝子 X では異なる局在を示し、その下流へと及ぼす影響は異なることが明らかとなった。そして、この機能未知遺伝子 X はアルツハイマー病態だけでなく、今後複数の遺伝子制御に重要となる遺伝子である可能性が示唆された。

本研究の概要



150. アルツハイマー病発症前スプライシング異常の解析

田中　ひかり

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 神経病理学分野

Key words：ミススプライシング，アルツハイマー病，RNA 顆粒

緒　言

アルツハイマー病は、社会の高齢化に伴い、国内のみならず世界的にも罹患数が増加している難治性の神経変性疾患である。主な臨床症状は認知機能障害であり、病理学的特徴は「老人斑」と呼ばれる細胞外アミロイドベータ（Aβ）凝集体の蓄積と細胞内にタウタンパク質が凝集する神経原線維変化が知られる。そしてこの病理学的特徴に基づき、病理学的定義をそのまま原因仮説とした「細胞“外”Aβが神経変性過程の最上流である」といったアミロイド仮説が提唱され［1］、細胞外Aβ凝集体除去を治療戦略とした複数の臨床試験が行われた。しかし、発症後でのアミロイド抗体治療は、Aβ凝集物を減少させることに成功したにも関わらず、アルツハイマー病（AD）患者の認知機能に対しては十分な成果を得られていない。これは、細胞“外”アミロイド凝集形成前かつ発症前にすでに病態がはじまっていることを示唆していた。そして実際に我々の研究グループは、細胞“外”アミロイド凝集形成前かつ発症前にすでに超早期病態が存在していることを実証した［2〜5］。その研究成果の中で、SRRM2 分子のリン酸化が、発症前 AD モデルマウスと AD 患者の死後脳で観察され、リン酸化による TCP1α との相互作用不全により核輸送が阻害されることを示した［2］。さらにこれにより、知的障害原因遺伝子 PQBP1 が不安定化され、シナプス関連遺伝子に大きく影響を及ぼすことを明らかにし、AAV-PQBP1 による補充治療は AD モデルマウスにおけるシナプス表現型・認知機能低下を回復した［2］。さらに、この超早期段階、および軽度認知障害 MCI から細胞死が起きていることを明らかにし、従来の細胞外Aβが AD の直接的な原因だとする仮説を修正する新たな AD 病態仮説を提唱した［3］。そして、細胞“内”Aβは神経細胞死の後に、細胞外に露出され、細胞“外”のAβ凝集のコア（シード）となることも、この解析で明らかにした［3］。また、この神経細胞死は HMGB1 の放出、そしてそれに伴う DNA 損傷修復不全によって加速度的に増加すること、これが HMGB1 抗体で防ぐことができ、今後有効な新規治療薬として期待できる［6］。

そしてこれらの研究を進める中で、細胞“外”アミロイド凝集形成前かつ発症前の AD モデルマウスを対象に RNA sequence を行った結果、スプライシング機能異常を示すいくつかの遺伝子が存在することも明らかになってきた。本研究では特に、アルツハイマー病モデルマウスにおいて細胞“外”アミロイド凝集形成前かつ発症前にスプライシング異常が確認され、なおかつヒト AD 患者死後脳においても同様にスプライシング異常が確認された遺伝子 X を標的とし、splicing 異常遺伝子の機能変化が AD 病態に与える影響を解明することを目的とする。

方　法

1. RNA sequence 及び PCR 法を用いた Exon skipping の確認

アルツハイマー病モデルマウスとして、本研究では 5xFAD マウスを用いている。このマウスの発症は 6 ヶ月齢であり、病理学的特徴である細胞外Aβ凝集が観察され始めるのは 3 ヶ月齢からであるが、本研究はそれよりも前の段階である超早期病態に注目しているため、1 ヶ月齢の 5xFAD マウスの大脳から RNA を抽出し、RNA sequence を行った。この解析で得られた結果の再確認として、同様に 1 ヶ月齢の 5xFAD マウスの大脳 RNA から逆転写酵素によって cDNA 精製を行い、Protein X の skipping が同定された Exon 上及びその前後の Exon 上の配列を用いて Primer を作製し、PCR 法にてその遺伝子配列の増幅を確認した。併せて、ヒト患者死後脳でも同様の PCR を行った他、ヒト患者死後脳

においてはDot blot法を用いてAβ凝集との相関も確認した。

2. Plasmid vectorの作製

Protein Xは機能未知な遺伝子であり、その局在も明らかになっていない。ゆえに、はじめにこの遺伝子の局在を明らかにするために、正常体（FL）と異常splicing変異体（ΔExon）のplasmidを作製した。この際、蛍光観察を目的として、C末端側にEGFPを付加した。

3. 特異抗体の作製

MouseおよびHuman Protein Xの全長を認識する抗体、およびExon体のみを認識する抗体を作製した。これについてはWestern blot法を用いてその特異性を確認した。

4. 遺伝子導入

1. で作製したplasmid vectorを、培養細胞を播種した翌日にLipofectamine 2000を用いて一過性の過剰発現を行った。

5. 免疫染色法を用いた細胞内局在の確認

3. で遺伝子導入した細胞を用いて、Protein Xの細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡（Olympus社FV1200）で確認した。また、この際に同時にその局在に相当すると予測されたオルガネラや細胞内顆粒タンパクとの免疫染色を行い、S Protein Xの細胞内局在の詳細を観察した。

6. siRNAを用いたKD法

遺伝子Xのsi RNAを購入し、Lipofectamine RNAiMAXを使用した標準的な手法でKD実験を行った。

7. Mass解析による結合タンパクの同定

3. で遺伝子導入した細胞からタンパクを抽出し、EGFP-trap beadsを用いたEGFP付加タンパクを餌とした免疫沈降を行った。免疫沈降後、SDS-PAGE及び銀染色法を用いて結合タンパクを検出し、FLもしくはΔExonに特異的なバンドを切り出した。その後ゲルから再度タンパクを抽出し、Mass spectrometryにて特異的な配列からそのタンパクを同定した。

結果および考察

1. 5xFADマウスの超早期病態において特定遺伝子のミススプライシングが起こる

5xFADマウス1ヶ月齢大脳組織を用いたRNA sequenceにて特定遺伝子のExonが欠損することがわかった。以下、この遺伝子についてはXと記載する。さらに同様のRNAより逆転写を行って精製したcDNAを鋳型としたPCRの結果においてもその異常を認めた（図1）。

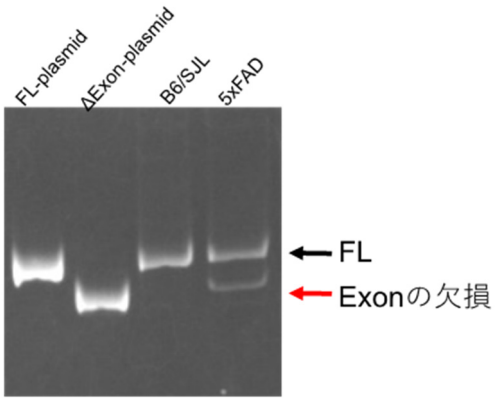


図1. PCRの結果をアガロースゲル電気泳動にて観察した結果

FLおよびΔExonのplasmidを鋳型としたものをポジティブコントロールとした（左2レーン）。同様のPCRをコントロールマウス（B6/SJL）及びアルツハイマー病モデルマウスで（5xFAD）も行い、アルツハイマー病モデルマウス（5xFAD）において、ミススプライスが起きていることを実際に確認できた。

さらに遺伝子 X はヒトとマウスで Exon の構造及び、配列の相同性が高いため、アルツハイマー病患者死後脳を用いて同様の解析を行った。その結果、アルツハイマー病患者死後脳でも同様のミススプライシングが起こること、そして同時に抽出したタンパクでの Aβ を Dot blot にて解析すると、そこに高い相関関係があることがわかった（図 2)。

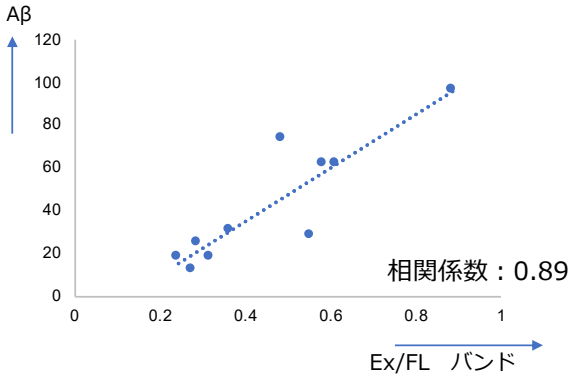


図 2.　Exon 欠損の増加と Aβ 量の相関関係

ヒト患者死後大脳組織の Lysate を用いて、Aβ 抗体を用いた Dot blot 法の結果（y 軸）と、Exon 欠損率（x 軸）の相関を見た。その結果相関係数は 0.89 という高い値を得た。

2.　Protein X の局在の確認

Protein X の解析を行う上で、最も重要かつ課題となったのは、機能・局在共に未知な遺伝子であるという点であった。そこで ProteinX の全長及び ΔExon の細胞発現用 EGFP tag 付 plasmid と特異抗体を作製した。これらの plasmid を使用して Protein X は細胞質に粒子状に局在することが明らかとなった。しかし、その形状は FL と ΔExon を比較すると明らかに異なった。この顆粒の形状は作製した特異抗体でも同様に観察された。次に、この粒が具体的にどこに局在しているかを解析すべく、ミトコンドリアマーカー、小胞体マーカー、リソソームマーカーを用いてその検討を行ったところ、FL, ΔExon 共にそれらには局在していないことがわかった。次に細胞質の顆粒物質の一つとして知られる Protein Y の抗体と染色した結果、FL の顆粒とは共局在しないにもかかわらず、ΔExon の顆粒と共局在することがわかった（非公表)。一方で、これらの解析からは FL の局在は明らかにならなかった。

3.　Protein X の機能解明

Protein X は細胞質の重要な顆粒物質の一つとして知られる。現在この顆粒物質自体、知られている詳細な機能は少なく、分子メカニズム等はわかっていないが、一部 RNA 量の調節に関わる可能性は示唆されている。現在、網羅的解析によってこの顆粒体を構成するタンパクは 125 あると知られているが、その中に Protein X は含まれていない。しかし、今回 Exon が欠損した Protein X がこの顆粒体に局在したということは、これが影響し、RNA 量の制御に異常が起きるのではないかということが考えられた。そこで正常な細胞と Protein X を KD した細胞、KD した細胞に Protein X FL を発現し rescue した細胞と ΔExon 欠損を発現した細胞から RNA を抽出し、RNAseq を行ったところ、実際に複数の RNA 量が正常と比較して優位な変動があることが明らかとなった。今後はこのデータと超早期アルツハイマー病モデルマウスの RNAseq データとの関連性を確認していく（図 3)。

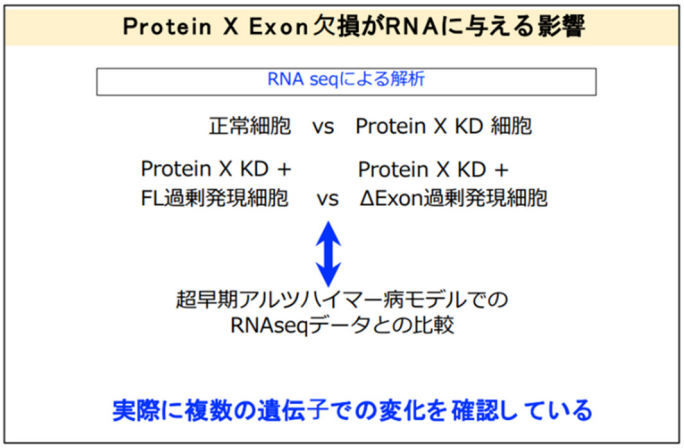


図 3. RNAseq 解析のスキーム

RNAseq では、まず正常と Protein KD との違いを解析し、次に KD した上で FL とで ΔExon を過剰発現したサンプルでの解析を行う。実際に、すでに複数の遺伝子での変化を確認できている。一方でその結果を先行研究で行った超早期アルツハイマー病モデルマウス（1 ヶ月齢 5xFAD マウス）での RNAseq データと照らし合わせることを今後行うべき課題としている。

4. Protein X の結合タンパクの同定

EGFP 蛍光タグを付加した Protein X を HEK293T 細胞に一過性過剰発現し、EGFP-trap beads による免疫沈降サンプルを用いて、Protein X FL もしくは ΔExon 特異的に結合するタンパク質を Mass spectrometry で解析した。この解析は現在途中段階ではあるが、Protein X の新規重要性が示唆されている。

共同研究者・謝辞

本研究は、東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学分野の岡澤均教授、本間秀典特任講師と共に実施した。また、その他の神経病理学分野の構成員には多大なるご支援をいただいた。

文　献

1） Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease, Trends in Pharmacological Sciences, 1991 Oct ;12(10):383-8. PMID: 1763432 doi: 10.1016/0165-6147(91)90609-V.

2） Tanaka H, Kondo K, Chen X, Homma H, Tagawa K, Kerever A, Aoki S, Saito T, Saido T, Muramatsu SI, Fujita K, Okazawa H. The intellectual disability gene PQBP1 rescues Alzheimer's disease pathology, Mol Psychiatry. 2018 Oct;23(10):2090-2110. PMID: 30283027　doi: 10.1038/s41380-018-0253-8.

3） Tanaka H, Homma H, Fujita K, Kondo K, Yamada S, Jin X, Waragai M, Ohtomo G, Iwata A, Tagawa K, Atsuta N, Katsuno M, Tomita N, Furukawa K, Saito Y, Saito T, Ichise A, Shibata S, Arai H, Saido T, Sudol M, Muramatsu SI, Okano H, Mufson EJ, Sobue G, Murayama S, Okazawa H. YAP-dependent necrosis occurs in early stages of Alzheimer's disease and regulates mouse model pathology, Nature commun. 2020 Jan 24;11(1):507. PMID: 31980612 doi: 10.1038/s41467-020-14353-6.

4） Tagawa K, Homma H, Saito A, Fujita K, Chen X, Imoto S, Oka T, Ito H, Motoki K, Yoshida C, Hatsuta H, Murayama S, Iwatsubo T, Miyano S, Okazawa H. Comprehensive phosphoproteome analysis unravels the core signaling network that initiates the earliest synapse pathology in preclinical Alzheimer's disease brain, Hum Mol Genet . 2015 Jan 15;24(2):540-58, PMID: 2523190 doi: 10.1093/hmg/ddu475. .

5) Fujita K, Motoki K, Tagawa K, Chen X, Hama H, Nakajima K, Homma H, Tamura T, Watanabe H, Katsuno M, Matsumi C, Kajikawa M, Saito T, Saido T, Sobue G, Miyawaki A, Okazawa H. HMGB1, a pathogenic molecule that induces neurite degeneration via TLR4-MARCKS, is a potential therapeutic target for Alzheimer's disease, Sci Rep, 2016 Aug 25;6:31895. PMID: 27557632 doi: 10.1038/srep31895.

6) Tanaka H, Kondo K, Fujita K, Homma H, Tagawa K, Jin X, Jin M, Yoshioka Y, Takayama S, Masuda H, Tokuyama R, Nakazaki Y, Saito T, Saido T, Murayama S, Ikura T, Ito N, Yamamori Y, Tomii K, Bianchi ME, Okazawa H. HMGB1 signaling phosphorylates Ku70 and impairs DNA damage repair in Alzheimer's disease pathology, Commun biol 2021 Oct 11;4(1):1175. PMID: 34635772 doi: 10.1038/s42003-021-02671-4.