APOE4の分子病態をアルツハイマー病先制治療に応用するための基盤研究

広島大学病院 脳神経内科
助教　山崎 雄

（共同研究者）
広島大学大学院 脳神経内科学　教授　丸山 博文
広島国際大学 リハビリテーション学科　教授　高橋 哲也

はじめに

超高齢社会を迎えた本邦では、認知症患者の増加は大きな社会問題である。とりわけ、その中核をなすアルツハイマー病の制圧は、本邦で率先して取り組まれるべきunmet medical needs（満たされていない医療ニーズ）である。

アポリポ蛋白E（APOE）遺伝子多型（APOE2、APOE3、APOE4）は、アルツハイマー病の強力な発症リスク規定因子である。本邦の約200万人はAPOE4をホモ型で持ち、そのアルツハイマー病の発症リスクは、一般的なAPOE3キャリアと比較し15倍以上である。すなわち、リスク効果とキャリア数に照らし、APOE4によるアルツハイマー病発症促進メカニズムの解明は、病態に基づくアルツハイマー病の予防および治療法開発のための有望なアプローチである（Yamazaki *et al*, 2019）。

アルツハイマー病脳では、アミロイドβ（Aβ）の異常な凝集・蓄積を起点として、神経細胞死など認知症発症に至る連鎖的イベントがおこる。実際、APOE4は脳Aβ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はない。

申請者らは、APOE4特異的に生じる分子基盤変化を同定し、アルツハイマー病との関連性の重みづけを行える方法として、脳トランスクリプトーム解析に着目した（Yamazaki *et al*, 2021a; Yamazaki *et al*, 2021b; Zhao *et al*, 2020）。そして、APOE2やAPOE3脳との比較において、APOE4脳特異的に発現が変化し、かつアルツハイマー病脳におこる分子基盤変化と重複する分子の探索を行い、分子Xを同定した。さらに、APOE4モデル動物と比較した場合、分子XをノックアウトしたAPOE4モデル動物において脳Aβ蓄積が減少することを見出した。

このように、APOE4とAβを繋ぐ分子として分子Xを想定する合理性は高い。そこで、本研究では「APOE4は分子Xの発現を介し脳Aβ蓄積を促進させるか？」を研究課題の核心をなす学術的「問い」として設定した。そして、これまで得た知見をヒトへの展開性を重視した視点で発展させるべく、本研究を計画した。

具体的には、全研究期間で：

① アンチセンスオリゴ（ASO）を用いた分子Xの脳内制御法の開発、
② ASOにより分子Xが脳内制御法されたAPOE4マウスモデルの構築、
③ APOE4マウスモデルにおけるアルツハイマー病関連病理の解析、
④ 分子Xとアルツハイマー病関連分子との生化学的関連性を明らかにするための剖検脳コホートの構築、
⑤ 剖検脳コホートの解析による分子Xのアルツハイマー病病態における位置づけの確立、
を行う。

結　果

2021年度は、そのうち①、②、④（はじめに参照）を、本研究助成金の補助を得て遂行した。以下にその成果を記載する。

《成果》

① ASOを用いた分子Xの脳内制御法の開発：

申請者らは培養細胞に対し効果的な分子X抑制効果をもつASO配列をすでに同定している。2021年度は、そのASO配列が生体内でも同様の分子X抑制効果を示すかの検証を行った。具体的には、異なる週齢のマウスに脳定位的なASO投与を行い（図1A）、分子XのmRNA発現量をリアルタイムPCR検査により比較・定量することで検証した（図1B、1C）。現在、投与方法/条件の最適化を継続している。

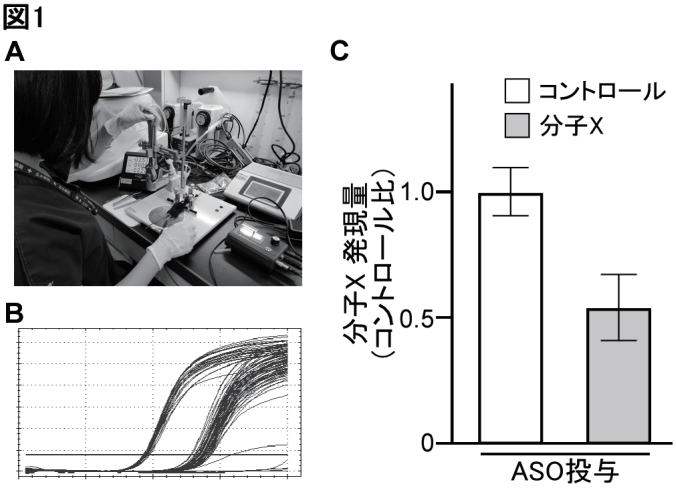

図1：A, 定位脳手術の写真、B, 分子Xの発現量を定量するためにリアルタイムPCR用プライマーを設計した。マウス脳から抽出したmRNAを用いたリアルタイムPCR増幅曲線を示す。C, Bで確立したプライマーを用いた分子X発現量の定量。内因性コントロールはβアクチンをもちいた。

② ASOにより分子Xが脳内制御法されたAPOE4マウスモデルの構築：

上記①と並行して実験用マウスコホートの構築に着手した。具体的には、理研より供与されたAPPノックインマウス（Saito *et al*, 2014）とヒト化APOEマウス（Hamanaka *et al,* 2000）の交配を開始し、系統の純化、コロニーの拡大を進めている（図2）。

④ 分子Xとアルツハイマー病関連分子との生化学的関連性を明らかにするための剖検脳コホートの構築：

高齢者ブレインバンク（東京都健康長寿医療センター：村山繁雄博士との共同研究）より

剖検脳を入手するために必要な、疫学研究に係る諸手続きを開始した。

考　察

特定の蛋白や経路に着目したAPOE4の分子病態研究においては、その研究で着目する蛋白や経路が、その他の分子と比較して、APOE4の分子病態においてどの程度中心的な役割を果たしているかの裏付けが難しい。申請者らは、オミックスデータを用いた俯瞰型の研究方法を取り入れることによって、APOE4の分子病態の中核をなし、かつアルツハイマー病にかかわる候補分子の同定が可能になると考えた。

図2

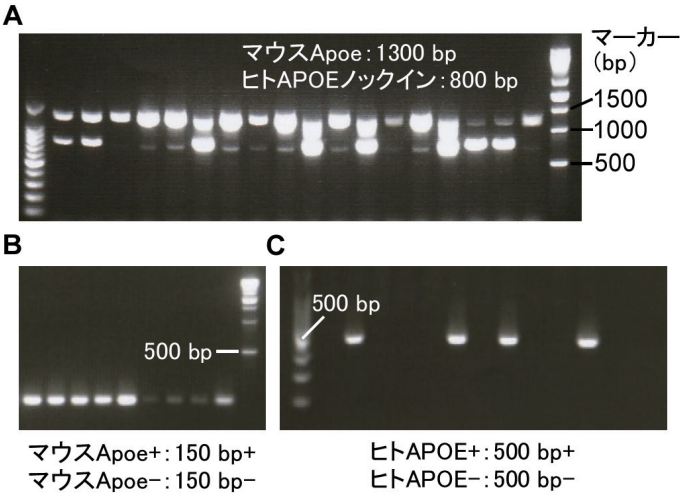

図2：A，理研より供与されたプライマーによるマウスジェノタイピング、B，マウスApoe遺伝子の有無を判定するために設計したin-houseプライマーによるマウスジェノタイピング、C，ヒトAPOE遺伝子の有無を判定するために設計したin-houseプライマーによるマウスジェノタイピング。A-Cに上げた異なる3通りの確認方法をもちい、各マウスのジェノタイピングを進めている。

本研究では、このような方法で同定された分子Xに着目した。本研究助成金の補助を得て遂行した2021年度の成果を基盤に、次年度は：ASOを用いた脳分子Xの抑制を行い、Aβ蓄積が抑制されるか？を確認する。また、ASO投与のタイミングと脳分子Xの抑制によるAβ病理の抑制効果との関連にも着目する。これにより、APOE4-Xの分子病態とAβ蓄積との関連性が個体レベルで明確になる。さらに、モデル動物の知見を、ヒト剖検脳の解析結果と組み合わせることで、ヒト応用性の高い仮説検証が可能となる。

さらに、本研究で行うトランスクリプトームに基づいた標的の同定と検証方法は、たとえば「APOE2はなぜアルツハイマー病の発症リスクを下げるのか？」という学術的問いの解決など、理解が遅れているAPOE2の分子病態研究にも応用可能である。

要　約

本研究助成金の補助を得て、「APOE4は分子Xの発現を介し脳Aβ蓄積を促進させるか？」を実験医学的に明らかにするための研究基盤が整った。

具体的には、アンチセンスオリゴ（ASO）を用いた分子Xの脳内制御法の開発、ASOにより分子Xが脳内制御法されたAPOE4マウスモデルの構築、分子Xとアルツハイマー病関連分子との生化学的関連性を明らかにするための剖検脳コホートの構築、に取り組み、予定していたベンチマークを達成した。

文　献

1. Hamanaka H, Katoh-Fukui Y, Suzuki K, Kobayashi M, Suzuki R, Motegi Y, Nakahara Y, Takeshita A, Kawai M, Ishiguro K *et al*（2000）Altered cholesterol metabolism in human apolipoprotein E4 knock-in mice. *Hum Mol Genet* 9: 353-361
2. Saito T, Matsuba Y, Mihira N, Takano J, Nilsson P, Itohara S, Iwata N, Saido TC（2014）Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 17: 661-663
3. Yamazaki A, Shue F, Yamazaki Y, Martens YA, Bu G, Liu CC（ 2021a ）Preparation of single cell suspensions enriched in mouse brain vascular cells for single-cell RNA sequencing. *STAR Protoc* 2: 100715
4. Yamazaki Y, Liu CC, Yamazaki A, Shue F, Martens YA, Chen Y, Qiao W, Kurti A, Oue H, Ren Y *et al*（2021b）Vascular ApoE4 Impairs Behavior by Modulating Gliovascular Function. *Neuron* 109: 438-447 e436
5. Yamazaki Y, Zhao N, Caulfield TR, Liu CC, Bu G（2019）Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol* 15: 501-518
6. Zhao N, Ren Y, Yamazaki Y, Qiao W, Li F, Felton LM, Mahmoudiandehkordi S, Kueider-Paisley A, Sonoustoun B, Arnold M *et al*（2020）Alzheimer's Risk Factors Age, APOE Genotype, and Sex Drive Distinct Molecular Pathways. *Neuron* 106: 727-742 e726