

アルツハイマー病ハイリスクAPOE4からAPOE2への 「切り替え」による脳恒常性再構築

広島大学大学院脳神経内科学

講師 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

広島大学大学院脳神経内科学

大学院生 (学術振興会特別研究員) 石川 若芸

はじめに

日本は超高齢社会を迎え、認知症患者の増加が深刻な社会問題となっている。特に、その中核をなすアルツハイマー病の克服は、我が国において優先的に取り組むべき未解決の医療ニーズ (unmet medical needs) である。

アルツハイマー病の発症には、アポリポ蛋白E (APOE) 遺伝子多型 (APOE2、APOE3、APOE4) が強力なリスク要因として関与しており、その中でもAPOE4は特に注目されている (Casey, Atagi et al. 2015, Yamazaki, Painter et al. 2016, Yamazaki, Zhao et al. 2019, Liu, Yamazaki et al. 2020, Yamazaki, Shinohara et al. 2020, Takebayashi, Yamazaki et al. 2023)。現在、日本には約200万人のAPOE4ホモ型保有者が存在し、そのアルツハイマー病発症リスクは一般的なAPOE3キャリアと比較して15倍以上高いことが知られている。このような背景から、APOE4によるアルツハイマー病発症メカニズムの解明は、病態に基づいた予防および治療法開発において非常に有望なアプローチである (Yamazaki, Painter et al. 2016, Yamazaki, Zhao et al. 2019)。

APOE4キャリアはアルツハイマー病の発症リスクが高い一方で、APOE2キャリアはほとんどこの病気を発症しない。

本研究では、APOE2蛋白が持つ神経保護作用と抗認知症作用に注目し、これを利用してAPOE4の病原性を低減させる可能性をアルツハイマー病の文脈で明らかにする。具体的には、APOE4からAPOE2への時間的・細胞特異的なアイソフォーム切り替えを可能にするAPOE「スイッチ」(APOE4to2S) マウスモデルを用い、APOE4を保護的なAPOE2に変換することでAPOE4の病原性が低減するかどうかを検証する。

これにより、APOEの独自の生物学的特性をより深く理解し、将来的にはAPOEアイソフォームの操作がヒトへの介入法として発展する可能性を探る。

結 果

2023年度の研究では、APOE「スイッチ」技術が生体内で期待通りに機能するかどうかを確認するために、本研究助成金の補助を受けて以下の実験を実施した。

この解析は、APOE4to2Sと同様の原理を採用したAPOE4to3Sマウスを用いて行った。

《成果》

① APOE「スイッチ」マウスモデルコホートの構築

まず、APOE「スイッチ」マウスコホートの安定的な維持を行うため、マウスApoe遺伝子座にノックインされたAPOE4to3Sコンストラクトを簡便に検出する方法を確立した。

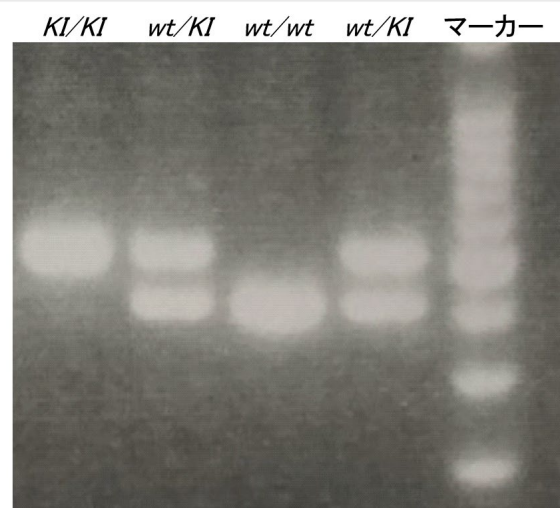
具体的には、マウスの尾からDNAを抽出し、APOE4to3Sコンストラクトに特異的なプライマーを使用してジェノタイピングを実施した。その結果、APOE「スイッチ」マウス個体にのみ特異的なバンドが検出され、特異的なプライマーを使用したジェノタイピング法により、APOE「スイッチ」マウス個体が確実に検出できることが示された(図1)。

② APOE「スイッチ」技術が生体内で機能するかどうかの生化学的確認

次に、APOE「スイッチ」技術が生体内で機能するかどうかを生化学的に確認した。

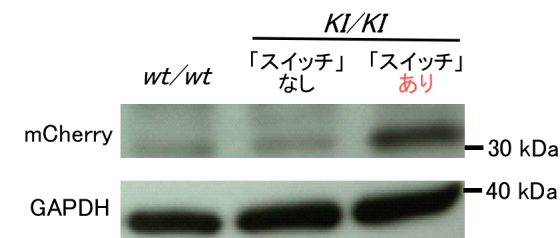
具体的には、APOE「スイッチ」マウスをCMV-Creマウスと交配することで、全身臓器におけるAPOE「スイッチ」を誘導した。その後、APOEを高発現する肝臓において、APOEの発現がAPOE4からAPOE3に変換されているかをウエスタンブロッティングにより確認した。APOE4とAPOE3の差異は一アミノ酸であり、既存抗体での区別が困難なため、変換の確認はノックインされ

図1: APOE「スイッチ」マウスのジェノタイピング



以下のプライマーを使用しジェノタイピングを行った。
F16525: AGGACTTGTTCGGAAGGAG
R16916: TCAGCCATGAGGAGCCACAGTTTG
なお、PCR productはwild type alleleが392 bp、targeted alleleが486 bpに相当する

図2: APOE「スイッチ」誘導後肝臓のウエスタンブロッティング



肝臓からRIPAバッファを用いて全タンパク質を抽出。SDS-PAGEゲル上でタンパク質を分離後、PVDF膜に転写した。5%スキムミルク(TBS-T)で室温1時間ブロッキングを行った。
mCherryは抗mCherry抗体(1:1000希釈)を使用して検出し、内在性コントロールとしてGAPDHは抗GAPDH抗体を用いて検出した。HRP結合二次抗体(1:5000希釈)で1時間インキュベーション後、ECL発光試薬を用いてタンパク質バンドを検出した。
GAPDHはmCherryの発現を正規化するためのローディングコントロールとして使用した。

たコンストラクト内に配置されたレポーター遺伝子 (mCherry) の発現を定量することで行った。「スイッチ」あり群にのみ、肝臓における mCherry 発現が確認され、APOE 「スイッチ」技術が生体内で機能していることが示された (図2)。

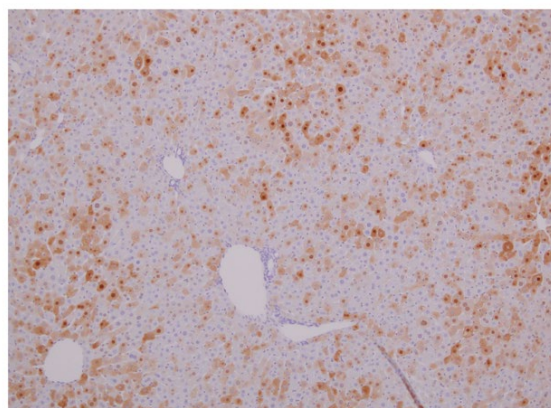
③ APOE 「スイッチ」技術が生体内で機能するかどうかの免疫組織化学的確認

最後に、APOE 「スイッチ」技術が生体内で機能するかどうかを免疫組織化学的に確認した。

具体的には、APOE 「スイッチ」マウスを CMV-Cre マウスと交配することで、全身臓器における APOE 「スイッチ」を誘導した。

その後、APOE を高発現する肝臓において、APOE の発現が APOE4 から APOE3 に変換されているかを免疫組織染色により確認した。APOE4 と APOE3 の差異は一アミノ酸であり、既存抗体での区別が困難なため、変換の確認はノックインされたコンストラクト内に配置されたレポーター遺伝子 (mCherry) の発現を定量することで行った。「スイッチ」あり群にのみ、肝臓における mCherry 発現が確認され、APOE 「スイッチ」技術が生体内で機能していることが示された (図3)。

図3: APOE「スイッチ」誘導後
肝臓の免疫組織染色



4%パラホルムアルデヒドで固定後、肝臓はパラフィン包埋された。5 μmの連続切片を作成し、抗mCherry抗体 (1:500希釈) を用いて一晩4°Cでインキュベートした。次に、HRP結合二次抗体で1時間室温でインキュベートし、DAB発色剤でシグナルを視覚化した。組織はヘマトキシリンで核を染色し、光学顕微鏡で観察した。mCherryの陽性シグナルは茶色で示されている。

考 察

本研究では、APOE 「スイッチ」技術が生体内で期待通りに機能するかを検証するために、APOE4to3S マウスを用いた解析を行った。得られた結果は、APOE 「スイッチ」が肝臓において確実に行われることを示し、この技術が生体内で機能することを確認した。このことは、APOE アイソフォームを操作するための有用な実験プラットフォームが確立された可能性を示す。

APOE4 から APOE2 への変換がアルツハイマー病において実際にどのような有益な効果をもたらすかについては、現時点では明らかになっていない。今後の研究では、この変換がアルツハイマー病の治療法として有望かどうかを検証する必要がある。本研究で確立されたプラットフォームを用いることで、APOE アイソフォームの操作がどのようにアルツハイマー病の病態に影響を与えるかを体系的に評価することが可能となる。具体的には、APOE4 から APOE2 への変換が神経保護作用をもたらすのか、またはアルツハイマー病の進行を抑制するののかといった点を、今後の研究で明らかにしていく予定である。これにより、

APOE4からAPOE2への変換が実際に治療効果を持つかどうかの判断材料が得られることが期待される。

要 約

本研究により、「アルツハイマー病ハイリスクAPOE4からAPOE2への「切り替え」による脳恒常性再構築」を実験病理学的に明らかにするための研究基盤構築が進んだ。

ご支援いただきました、公益財団法人大和証券財団の皆様にご心より感謝申し上げます。今後の成果獲得に向けて精一杯取り組んでまいります。引き続きご指導ご鞭撻を賜りますよう、何卒よろしくごお願い申し上げます。誠にありがとうございました。

文 献

1. Casey, C. S., Y. Atagi, Y. Yamazaki, M. Shinohara, M. Tachibana, Y. Fu, G. Bu and T. Kanekiyo (2015) . "Apolipoprotein E Inhibits Cerebrovascular Pericyte Mobility through a RhoA Protein-mediated Pathway." J Biol Chem **290** (22) : 14208-14217.
2. Liu, C. C., Y. Yamazaki, M. G. Heckman, Y. A. Martens, L. Jia, A. Yamazaki, N. N. Diehl, J. Zhao, N. Zhao, M. DeTure, M. D. Davis, L. M. Felton, W. Qiao, Y. Li, H. Li, Y. Fu, N. Wang, M. Wren, T. Aikawa, M. L. Holm, H. Oue, C. Linares, M. Allen, M. M. Carrasquillo, M. E. Murray, R. C. Petersen, N. Ertekin-Taner, D. W. Dickson, T. Kanekiyo and G. Bu (2020) . "Tau and apolipoprotein E modulate cerebrovascular tight junction integrity independent of cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **16** (10) : 1372-1383.
3. Takebayashi, Y., Y. Yamazaki, H. Yamada, K. Yazawa, M. Nakamori, T. Kurashige, H. Morino, T. Takahashi, Y. Sotomaru and H. Maruyama (2023) . "Apolipoprotein E genotype-dependent accumulation of amyloid beta in APP-knock-in mouse model of Alzheimer's disease." Biochem Biophys Res Commun **683**: 149106.
4. Yamazaki, Y., M. M. Painter, G. Bu and T. Kanekiyo (2016) . "Apolipoprotein E as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease: A Review of Basic Research and Clinical Evidence." CNS Drugs **30**(9) : 773-789.
5. Yamazaki, Y., M. Shinohara, A. Yamazaki, Y. Ren, Y. W. Asmann, T. Kanekiyo and G. Bu (2020) . "ApoE (Apolipoprotein E) in Brain Pericytes Regulates Endothelial Function in an Isoform-Dependent Manner by Modulating Basement Membrane Components." Arterioscler Thromb Vasc Biol **40** (1) : 128-144.
6. Yamazaki, Y., N. Zhao, T. R. Caulfield, C. C. Liu and G. Bu (2019) . "Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies." Nat Rev Neurol **15** (9) : 501-518.