

研究報告書

「神経変性疾患における系統的網羅的エピジェネティクス解析」

研究タイプ: 大挑戦型(※大挑戦型課題として延長有/増額有)

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 岩田 淳

1. 研究のねらい

神経変性疾患とは詳細な分子病態の解明, 治療方法のない一連の中枢神経疾患群をさす。アルツハイマー病, レビー小体病, 筋萎縮性側索硬化症, 多系統萎縮症などの疾患がほとんどを占め, それらの大部分は孤発性発症を呈する。様々なアプローチから疾患の病態解明の努力がなされているが, 既存の方法論で病態修飾の可能な治療方法まで到達しえたものはない。中枢神経疾患はその臓器特殊性から「生検」が非常に困難である。このため, 末梢血で代用可能なゲノム研究, もしくは死後脳を解析する方法論のどちらかが疾患研究の方法論の中心となる。このうち死後脳において理想的な解析方法としては, 神経細胞, グリア細胞などといった様々な種類の細胞から構成される脳という臓器で細胞種毎に生じている変化を切り分けられること, さらに多数の細胞を解析する事で細胞毎のばらつきをなくすこと, そしてハイスループットな検討が可能な方法である事, そして死後から解剖に至るまでの時間の間の変化が最小限に抑えられることが求められる。これらすべての条件を完璧に満たす方法論は現在の所存在しないが, それぞれの要素がある程度バランスの良い方法論として本研究ではエピゲノム解析を選択した。エピゲノム解析のうち特に DNA メチル化解析は遺伝子の発現パターンを間接的に表していること, 死後の変化が非常に軽いこと, そしてセルソーターを使用した方法を採用すれば 10^{-7} オーダーの多数の神経細胞特異的にハイスループットな解析が可能となる点がメリットと考えたためである。本研究では, まず candidate gene approach を用いて, 最大数の患者のいるアルツハイマー病において DNA メチル化異常が関与するというエビデンスを導き出すことを最初の研究テーマとした。その次に, 複数の神経変性疾患において細胞特異的な網羅的 DNA メチル化解析を行うことで新規病態の探索を行い, そこから得られた成果を元に仮説を立脚して *in vitro*, *in vivo* の系でその仮説を証明する事を目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

アルツハイマー病(AD)は我が国で患者数が 400 万人ともいわれ認知症性疾患の中でも最多のものだが, その原因理解は不十分で, 対症療法を超えた治療法は未だに存在しない。加齢は AD の最大の危険因子であるため, 社会の高齢化によって患者数は今後も爆発的に増加する事が見込まれる。ほとんどの AD は孤発性であり, 遺伝的異常が発症に与える影響は APOE 遺伝子を除いては関与が決して強いとは言えない。疾患を理解するための方法論には様々あるが, 本研究では患者脳を起点として研究を遂行した。孤発性 AD の原因は APP が切断されて生じる A β とか tau がそれぞれ神経細胞の機能を障害することが想定されているが, そのメカニズムの詳細は明らかではない。本研究では, 孤発例でのそれらの遺伝子発現調節異常がエピゲノム異常によって生じていると仮定し, 患者脳での DNA メチル化を解析すること

とした。そのためには、まず実際にエピゲノム異常がアルツハイマー病の患者脳で観察可能かを検討する事とし、candidate gene approach によって解析を行った。DNA のメチル化はその遺伝子の発現の調節を特異的に行っているため、現在までに AD に関与する事が想定されている遺伝子 *APP*, *PSEN1*, *MAPT*, *GSK3B*, *APOE*, *ACE* についてそのプロモーター領域の CpG アイランドのメチル化を正常脳と比較した。AD 患者脳 56 例と正常 74 例を比較した検討では *APP*, *MAPT*, *GSK3B* の 3 遺伝子の DNA メチル化が AD と正常の間では異なることが示された。また、この異常は病理学的異常のほとんど見られない小脳では観察されず、疾患の原因となっている可能性が示唆された。これによって関与が想定されていた遺伝子が「どのように」発症に関与しているかに関し、エピジェネティクスによる制御が関わっていることを明らかにすることができた(Iwata *et al*, Human Molecular Genetics, 2014)。次に、その成果を元に、神経細胞核特異的な DNA メチル化解析へと進んだ。30 例の AD 脳と 30 例の正常脳とを比較する事で、今まで全く関与が想定されていなかった 3 遺伝子を同定した。このうち 1 遺伝子の産物は AD 脳で過剰に発現しつつも正常な機能を喪失している事が示され、疾患の発症に深く関与していることが想定された。さらに同様の方法論を用いて他の神経変性疾患についても同様の解析を行った。これらの成果から、疾患脳を用いて神経変性疾患の病態を解析する新しい方法論としてエピゲノム解析が有用である可能性が示された。

方法	病態を反映	細胞種特異性	解析可能細胞数	分子特異性	死後分解	スループット
病理学的解析	良い	高い	少ない	悪い	ほぼ無し	低
メタボローム解析	良い	なし	少ない	高い	高い	中
トランスクリプトーム解析	良い	高い	とても少ない	高い	多	高
エピゲノム解析	間接的だが良い	高い	多い	比較的高い	ほぼ無し	高
ゲノム解析	必ずしもそうではない	なし	多い	高い	なし	高

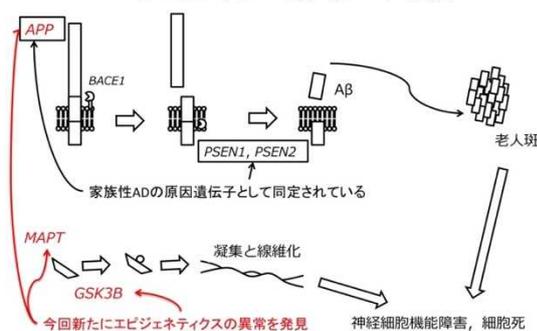
様々な解析方法の比較

(2) 詳細

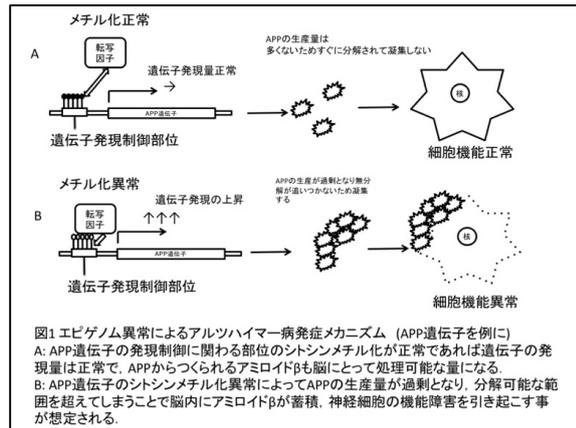
研究テーマ A「アルツハイマー病に関与する既知遺伝子の CpG メチル化解析」

孤発性アルツハイマー病(AD)におけるエピゲノム異常の有無を検証することを目標とした。AD の 1%以下は *APP*, *PSEN1*, もしくは *PSEN2* の変異によって生ずる。大半を占める孤発例ではこれらの遺伝子に変異は同定されないが、病理学的見地からはこれらの遺伝子に何らかの機能異常が想定されうる。しかしながらタンパク質や mRNA レベルの解析では死後変化やサンプリングのバイアスが大きく、一定の結論は得られていなかった。DNA の CpG アイランドのメチル化はその下流遺伝子の発現調節に密接に関わる。死後変化はほとんどなく、また、遺伝子発現との相関は非常に良く保たれた情報であるため、剖検脳を使用した解析には最適な方法と考えた。年齢をマッチさせた孤発性アルツハイマー病(AD)82 例とコントロール(NC)90 例の剖検脳を使用した。側頭葉、頭頂葉、小脳の皮質よりゲノム DNA を抽出した。*ACE* の 35CpG, *APOE* の 11CpG, *APP* の

孤発性アルツハイマー病(AD)の分子病態 アミロイド・カスケード仮説

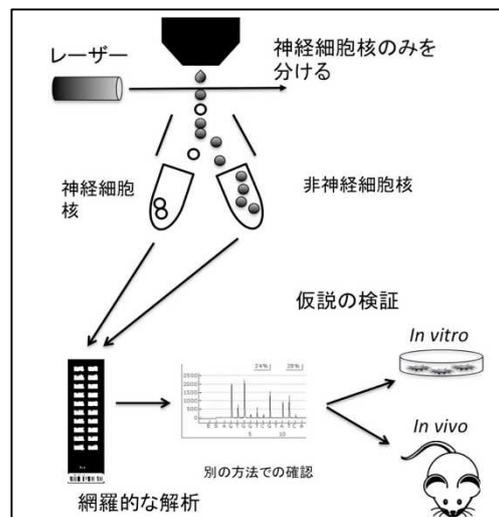


35CpG, *BACE1* の 20CpG, *GSK3B* の 26CpG, *MAPT* の 43CpG *PSEN1* の 33CpG のメチル化をパイロシーケンシング法で測定した。メチル化の程度を多重比較検定及び ANOVA による事後比較を行った。その結果, *APP* の 4CpG (平均差 $-1.141 \sim -2.148\%$, $AD > NC$), *GSK3B* の 5CpG ($-0.675 \sim -2.293\%$, $AD > NC$), *MAPT* の 5CpG ($0.776 \sim 1.115\%$ $AD < NC$) が統計学的に有意な CpG として抽出された。メチル化の差は頭頂葉や小脳と比べて側頭葉でより顕著に観察された。それぞれの CpG の位置は *APP* や *MAPT* の発現上昇に, *GSK3 β* の発現低下に関与する事が想定された。この結果孤発性アルツハイマー病では特定の遺伝子群にエピゲノムの異常が生じていることが示された。一つの細胞にはゲノムは 2 コピーずつ存在するため, CpG のメチル化は 0, 50, 100% の三つの値しか取らない。このため, 測定された値は高いメチル化を受けた細胞の数に相関する。AD と NC の間の差は最大でも 2-3% とわずかな差であったが, その生物学的意義としては, 神経回路全体の機能が 2-3% 程度の細胞の機能異常で攪乱される可能性, または易凝集性タンパク質の発現が異常に亢進した細胞がわずかに存在しつつそれらが他の細胞への伝播の核となっている可能性などが示唆された。この結果から, 家族性 AD で変異を認める遺伝子群が孤発性 AD でも変異はないながらも機能の異常を来している可能性が初めて示された。



研究テーマB「アルツハイマー病関脳における神経細胞特異的 DNA メチル化解析による新規病態の探索」

検体として使用した剖検脳は, AD 患者 30 人(男性 15 人, 女性 15 人), 正常コントロール 30 人(男性 15 人, 女性 15 人)に由来する検体をもちいた。平均年齢はアルツハイマー病群(以下 AD 群)79.4 \pm 7.4 歳, 正常コントロール群(以下 NC 群)76.7 \pm 7.4 歳(平均 \pm SD)で群間の有意さは認めなかった。AD のリスクファクターである ApoE ϵ 4 アリルの保有率は, AD 群 67%, NC 群 27%と妥当な範囲であった。神経細胞に特異的な DNA メチル化を検出するため, まず神経細胞核を FACS(fluorescence activated cell sorting)で精製した。得られた DNA はバイサルファイト変換を行った後, Illumina 社製 Infinium 450k DNA methylation Beadchip (以下 Infinium 450k)で解析を行った。得られたデータは R を使って解析を行った結果 316 個所のメチル化変化(Differentially methylated probe: DMP)を認めた。DNA メチル化による遺伝子の発現制御が領域単位で行われることをふまえて, 3連続以上の DMP を認めた



領域を抽出したところ、10 領域のメチル化変化領域(Differentially methylated region: DMR)を検出することができた。このうち、遺伝子 *B*, *Z*, *A* についてはプロモーター領域の CpG アイランドに DMR が含まれており、特に重要であると考えさらに解析を行った。メチル化解析の結果では、*B*, *A* はプロモーター領域の DNA メチル化が低下していたことから mRNA レベルの発現上昇が予想され、*Z* についてはプロモーター領域の DNA メチル化が上昇していたことから mRNA レベルの発現低下が予想された。Infinium 450k ではエピゲノムワイドに DNA メチル化の解析を行って複数の DMR を見出したが、見出した DMR の確認と、これらの変化の疾患特異性および組織特異性を評価するためにパイロシーケンスによる DNA メチル化解析を行った。*B*, *A* に関連した DMR についてパイロシーケンスを行ったところ、NeuN 陽性核から抽出した DNA では基本的に Infinium 450k でみられた DNA メチル化変化を確認することができた。同変化はレビー小体型認知症(Lewy body disease: LBD)では認めなかったことから、AD 特異的な変化であることが推定された。中枢神経系では、下側頭回 NeuN 陰性核由来の DNA、小脳 NeuN 陽性核由来の DNA においても、これらの DMR において一部分布は異なるながら DNA メチル化変化を認めた。一方で、別の被験者セットからのゲノム DNA の解析ではあったが、末梢血由来の DNA ではこのような DNA メチル化変化は認めなかった。このことは、今回見出した DMR が中枢神経系に特異的であることを示していると考えられた。解析手法という点では、DMR 内部で細胞種ごとに分布の違いあり、細胞種を分離しない場合にはこのような分布の違いが DMR 検出の感度に影響を与える可能性があり、今回のように細胞種特異的な解析を行うことの有用性を示唆していると考えられた。DNA メチル化解析とは異なった剖検脳の下側頭回から RNA を抽出し、RIN(RNA integrity index)が 7 以上の検体を選択した。RIN の基準を満たしたのは、AD 群 9 検体、NC 群 9 検体であった。これらの RNA について、qPCR で発現解析を行った。DNA メチル化解析から、*B*, *A* の発現亢進、*Z* の発現低下が予想されたが、qPCR では *Z* の発現に有意差はなかったものの、*B*, *A* の発現が有意に亢進していた。mRNA レベルの発現が有意に亢進していた *B* と *A* について、剖検脳パラフィン切片を用いて免疫染色を行った。AD 群において、*B* は海馬 CA1、嗅内皮質の神経細胞において、細胞質に強い染色性を認め、また間質内の neurite と考えられる構造が Thread 様に染色された。同様の変化は、前帯状回、頭頂葉にも認められたが、後頭葉には認められなかった。AD 病理の分布と有無・強弱は基本的に一致しており、AD の病理学的変化の進行と並行して *B* の細胞質における染色性が亢進していくことが予想された。AD 病理の進展と、*B* の染色性が変化していく時間的關係を評価するため、Braak stage 3 レベルの初期 AD 病変が見られる剖検脳で *B* の免疫染色を行った。細胞質における *B* の染色性亢進は海馬 CA1 でみられたものの、嗅内皮質では認めなかった。Braak stage 3 ではすでに嗅内皮質の AT8 抗体で確認できるようなリン酸化タウの沈着・神経原性変化はすでに起きており、*B* は神経原性変化の後に細胞質に蓄積すると考えられた。このような変化がリン酸化タウそのものの蓄積をみているのかどうかを確認するため、リン酸化タウがグリア細胞に沈着する代表的神経疾患である、進行性核上麻痺(Progressive Supranuclear Palsy: PSP)、大脳皮質基底核変性症(Corticobasal degeneration: CBD)でも *B* の免疫染色を行った。PSP の tufted astrocyte の一部で *B* がわずかに染色されるものの、基本的には AD でみられたような細胞質における *B* の強い染色性はみられなかった。*A* についても、アルツハイマー病の海馬 CA1、嗅内皮質において神経細胞の細胞質にわずかながら発現亢進を認めた。家族性 AD (APP V717 mutation)においても、孤

発性 AD でみられたのと同様な B, A の染色性亢進を認めた。この結果から、今まで全く想定されていなかった遺伝子の異常が孤発性 AD 発症に関与している可能性が示され、剖検脳を出発点とした病態解析に神経細胞特異的なエピゲノム解析が有効である可能性が示された。

研究テーマ C「遺伝子 B のアルツハイマー病への関与の詳細な検討」大挑戦期間の成果

B は本来、DNA 修復に関連した核に局在するタンパク質であり、このように細胞質での染色性が亢進することは発現亢進とともに、何らかの質的变化を起こしている可能性が考えられた。B のタンパク質レベルでの発現変化、および細胞質でみられていた B の可溶性を評価するため、脳組織の Differential Detergent Fractionation をおこない、ウエスタンブロットで解析した。B は AD 群でのみサルコシル可溶性分画、不溶性分画に抽出された。この結果から、AD 群では B の発現が亢進しているもの、不溶化して機能喪失した分子が蓄積していることが示された。

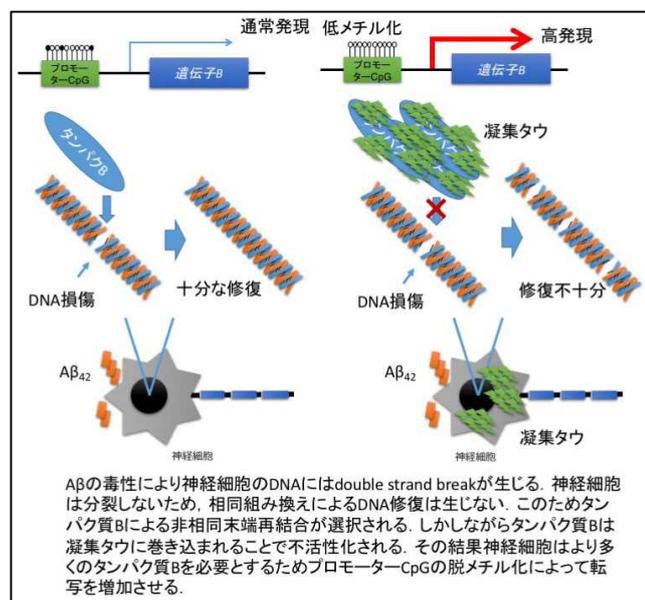
・Aβ の細胞レベルへの影響

Aβ の影響を評価するため、N2a および APPswe(Aβ 1-42 の産生量が増加する家族性アミロイドーシスの変異)を発現した N2a 安定細胞株(N2a swe.10)を使用した。N2a swe.10 では、蛍光免疫染色で γ-H2AX のフォーカス形成をみとめ、DNA の障害および修復が生じていることが示された。B の発現はウエスタンブロットで N2a に比較して N2a swe.10 において上昇を認めた。このことから、APPswe の過剰発現によって DNA 障害および修復が誘導されるものの、DNA 断片化を生じるまでは至らない事が示唆された。

・モデル動物を用いた B および DNA 障害の解析

モデルマウスの病理学的変化の検討として、3xTg AD マウスを用いた。月齢3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月で検討を行った。モデルマウスの病理学的変化の確認として、ヒトタウ(HT7)、リン酸化タウ(AT180, AT8), ヒトアミロイド β (6E10)の免疫染色を確認した。リン酸化タウ(AT8)は海馬 CA1 領域において、月齢 6ヶ月から観察された。コントロール(C57B/6)海馬 CA1 における神経細胞の B 染色性は月齢を追うごとに明瞭化していった。またこれと同時に、DNA の障害および修復のマーカーである

γ-H2AX の染色も増加していった。このような B の発現変化は他のリン酸化タウの沈着を認めないモデルマウス(APPPS1)では認められなかった。DNA 障害の測定として、マウス海馬を用いてコメットアッセイを行った。月齢 8ヶ月のマウスで検討したところ、3xTg AD マウスでは野生型マウスと比較して有意に DNA の断片化を認めた。以上により、Aβ の毒性により神経細胞の DNA には二重差切断が生じる。神経細胞は



分裂しないため、相同組み換えによる DNA 修復は生じない。このためタンパク質 B による非相同末端再結合が選択される。しかしながらタンパク質 B は凝集タウに巻き込まれることで不活性化される。その結果神経細胞はより多くのタンパク質 B を必要とするためプロモーター CpG の脱メチル化によって転写を増加させることが判明した。

研究テーマ D「神経変性疾患における系統的エピゲノム解析」大挑戦期間の成果

大挑戦採用を受けて FACS を購入し、それまで共同研究者に依存していた FACS 作業が大幅に加速した。そもそも神経細胞核を分取する FACS 作業は一検体当たり半日から一日かかることがあり、全体の律速となっていたためである。対象疾患はレビー小体病(パーキンソン病を含む概念)、筋萎縮性側索硬化症、多系統萎縮症の三疾患とした。レビー小体病の下側頭回 32 例と正常 32 例との比較では、AD と同様の解析方法によって疾患において高メチル化を認めた遺伝子 224、低メチル化を認めた遺伝子 22 を同定した。その中よりメチル化異常が遺伝子発現調節領域に存在する遺伝子を 9 つ同定、そのうち遺伝子 I 及び U が免疫染色でレビー小体病患者脳において特異な染色性を持った構造物を形成していることを同定した。筋萎縮性側索硬化症の運動野 12 例と正常 12 例の比較解析では疾患において高メチル化を示した遺伝子を 4、低メチル化を示した遺伝子を 30 同定した。このうち遺伝子の調節領域での異常は 17 遺伝子であった。多系統萎縮症では神経細胞核ではなくオリゴデンドロサイトの精製を行った。方法としては FACS で使用する抗体を Olig2 に対する抗体を使用するものである。多系統萎縮症の前頭葉 17 例、及び正常コントロール 13 例の比較によって 39 の遺伝子においてメチル化の差異を認めた。このうち疾患での低メチル化は 4 遺伝子、高メチル化は 35 であった。遺伝子の発現調節領域に異常が存在したのは 4 遺伝子であった。今後はこれらで同定された遺伝子群の疾患病態への関与を検討していきたい。

3. 今後の展開

孤発性神経変性疾患の病態解析において DNA メチル化解析が非常に強力な解析方法である事が示せたと思う。孤発性神経変性疾患で患者数の多い疾患については全て網羅して本研究で最低ラインの探索フェーズは終了することが出来た。今後は探索期において見いだされた遺伝子群の機能解析、疾患での病態関与を検討する多数のシーズを元に研究を推進していきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

大挑戦型研究課題としての最大の使命は neuro-epigenetics という方法論が神経変性疾患の病態解明にどのような意義を持つのかと云うことを明らかにすることであったと考えている。その点においては、まず、アルツハイマー病の解析では発症に関与すると考えられる新規分子を同定出来た点、そしてその新規分子が疾患脳、モデルマウスにおいて同様の挙動を示している事を同定できた点から、少なくともアルツハイマー病においては成功したと考えている。特に、その機能解析を行う事で病態のメカニズムに迫る事が出来た点においては(Mano *et al*, in preparation)この方法論の可能性をより深くしたと自負している。レビー小体病、筋萎縮性側

索硬化症, 多系統萎縮症といった疾患においても同様の方法論で新規関与分子を同定し得たことは, neuro-epigenetics 解析が広く応用可能である可能性を示唆したと言ってよいと考える。この成果は期間延長及び増額による FACS の購入に異存している所が多であり, 本研究に参加できたことを大変感謝している。反省するとすれば, 解析に時間がかかり, モデルマウスの表現型までの変化を捉えることが出来なかった点であろう(症状発現まで最短で1年程度かかるため)。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究では、アルツハイマー病(AD)孤発例での遺伝子発現異常がエピゲノム異常によって生じていると仮定し、患者脳での DNA メチル化を解析している。AD 患者脳の神経細胞核を用いて、AD の神経細胞特異的な DNA メチル化の変化がある遺伝子として、既知遺伝子の CpG メチル化解析、並びにこれまで AD との関連の報告がない三種類の新規遺伝子を同定した。そのうち遺伝子 B の産物が AD 患者脳で特異的に蓄積している点、かつ、AD モデルマウスにおいてこの蓄積の亢進が確認され、ヒトの病態解明に役に立ちつつある点は評価できる。

しかしながら、モデルマウスの表現型が現れるまで時間がかかり、現時点では AD 様症状の変化をとらえるまでは至っていない。また、同定した遺伝子の機能に関してどのように AD の発症や病態につなげることができるかの課題があり、様々な側面からのアプローチが必要になる。大挑戦型研究課題として、AD の病態に関して新しい概念(neuro-epigenetics)を提供できる可能性があり大いに期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yu Nagashima, Hisatomo Kowa, Shoji Tsuji, Atsushi Iwata. FAT10 binds to polyglutamine proteins and modulates their solubility. *Journal of Biological Chemistry*. 286(34), 29594–29600, 2011
2. Atsushi Iwata, Kenichi Nagata, Hiroyuki Hatsuta, Hiroshi Takuma, Miki Bundo, Kazuya Iwamoto, Akira Tamaoka, Shigeo Murayama, Takaomi Saido, Shoji Tsuji. Altered CpG methylation in Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation. *Human Molecular Genetics*. 23(3), 648–656, 2014
3. Ryo Ohtomo, Takashi Matsukawa, Shoji Tsuji, Atsushi Iwata. Abadie's sign in adrenomyeloneuropathy. *Journal of the Neurological Sciences*. 340, 245–246, 2014
4. Tatsuo Mano, Takayoshi Suzuki, Shoji Tsuji, Atsushi Iwata. Differential effect of HDAC3 inhibitor on nuclear and cytoplasmic polyglutamine aggregates. *PLOS One*. 9(11), e111277, 2014

5. Lumine Matsumoto, Hiroshi Takuma, Akira Tamaoka, Hiroshi Kurisaki, Hidetoshi Date, Shoji Tsuji, Atsushi Iwata. CpG Demethylation Enhances Alpha-Synuclein Expression and Affects the Pathogenesis of Parkinson's Disease. PLOS One. 5(11), e15522, 2010

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

2012年度日本神経学会学会賞(学術研究部門)

Atsushi Iwata. DIAN-Japan Clinical and Cognitive assessment. The US-Japan Dominantly inherited Alzheimer Network (DIAN) Collaborative workshop. 2015. Kyoto, Japan

Atsushi Iwata. Molecular Mechanism of AD Pathology at Early Stage and its Intervention. International Leaders in Alzheimer's Disease Summit 2015, 2015, Seoul, Korea, 特別講演

Atsushi Iwata. Epigenetics and Neurodegeneration. Asian Aging Core for Longevity. 2015, Osaka, Japan, 招待講演

Atsushi Iwata. Overview of Alzheimer's disease clinical studies in Japan. Lessons from the past and future perspective. Collaborative Symposium of China-Japan-Korean Dementia Researchers 2014. Seoul, Korea, 招待講演

Atsushi Iwata. How is Alzheimer's disease diagnosed and treated? The 2nd Asian Clinical Congress. 2014. Kyoto, Japan. 特別講演

Atsushi Iwata. Epigenetics and Neurodegeneration. Lecture at ICM (L'institut du Cerveau et de la Moelle Epiniere). 2013 Paris, France, 特別講演

Atsushi Iwata. Japanese ADNI, current status. ADNI Steering Committee meeting. 2013. San Diego, CA, USA 招待講演

Atsushi Iwata. Diagnosis and treatment of Alzheimer's dementia. 17th Malaysian Conference on Psychological Medicine. 2012. Kuala Lumpur, Malaysia. 特別講演

Atsushi Iwata. FAT10 protein binds to polyglutamine proteins and modulate their solubility. A ACL-Nagasaki Symposium: Japan Korea Joint Conference on Brain Aging and Neurodegeneration, 2011, Nagasaki, Japan, 特別講演

Atsushi Iwata, Takeshi Iwatsubo. Disease modifying therapy for Alzheimer's disease : Challenges and Hopes Neurology and Clinical Neuroscience, 1(2), 49-53, 2013 総説

Atsushi Iwata Therapeutics for polyglutamine diseases through protein degradation pathway: Targeting the nucleus Aging Mechanisms: Longevity, Metabolism, and Brain Aging. Edited by Nozomu Nori, Inhee Mook-Jung, Springer Book, 2015