

研究報告書

「アルツハイマー病の病態悪性化と炎症反応の相互作用の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 齊藤 貴志

1. 研究のねらい

認知症は、世界レベルで解決すべき喫緊の課題である。先進国の中でも特に日本は、少子高齢化の進行が突出しており、2025 年には、認知症患者数が 500 万人に達するとの試算もあり、急速に社会・経済の疲弊をもたらす事が懸念されている。認知症の約半数を占めるのが、アルツハイマー病(AD)であるが、AD に対する予防法・根本療法は未だ確立されておらず、対症療法に留まっているのが現状である。AD は、患者の剖検脳を用いた病理学的解析から、“老人斑”と“神経原線維変化”という二大病理像を示すことが明らかとなっているが、この病理構造物はそれぞれアミロイド β ペプチド(A β)と微小管結合蛋白・タウを主体としており、AD 発症の数十年前からすでに脳内で蓄積がはじまっている。すなわち、病因の蓄積から発症までにラグタイムがあるため、AD 病理形成機構の解明が困難であったと言える。一方、非ステロイド性抗炎症薬を服用していたリウマチ患者の AD 発症率が低いという疫学的事例が報告されていた。そのため、“炎症”が、AD 病態を悪性化させる一つの要因として指摘されてきた。実際、AD 剖検脳の解析では、病理構造物の周辺で脳内の免疫担当細胞であるグリア細胞の集積が認められており、神経炎症という概念で研究が進められてきた。しかし、神経炎症との関連も含めて、AD 病態形成機構はいまだ明らかとなっていない。研究成果がいまだに社会へ還元されるに至っていない最大の理由は、AD 研究に用いられてきたモデル動物の妥当性にあると言える。これまでに、病理学的、病態遺伝学的解析から、家族性(遺伝性)AD の原因遺伝子として A β の前駆体であるアミロイド前駆体蛋白(APP)が同定され、APP を過剰発現させることで脳内に A β を蓄積させる APP 過剰発現マウス(APP-Tg)が作製され研究に用いられてきた。しかし、過剰発現のパラダイムでは、多くの artifacts を誘導することが明らかとなり、APP-Tg の AD モデルとしての妥当性が揺らいできた。事実、APP-Tg を用いた創薬研究はいずれも成功していない。そこで本研究では、AD 病態への蓋然性の高い AD モデルマウスを新たに作製し、モデル妥当性を検証することを第一の目的とする。次いで、新型 AD モデルマウスを用いて、AD 病理形成機構とそれに関わる炎症の慢性化機構の関連性を明らかにする。最終的に、AD の予防・治療、もしくは発症遅延に向けた創薬標的を見出すと共に、AD の早期診断法の確立に貢献することを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

病気発症までの時間的プロセスが非常に長い AD の病態を総合的に捉え解析するためには、蓋然性の高い AD モデルマウスが必須である。これまでの AD モデルマウスは、APP-Tg マウスが主流であったが、APP の過剰発現に伴う artifact の要素が極めて大きく、しかも AD 病理を忠実に再現していなかった。これは、APP-Tg マウスを用いて得られた結果の一部が、

実際のAD病理・病態を反映していないことを示唆している。これら問題を克服するため、我々は、過剰発現法を用いずに、ノックイン手法による新規ADモデルマウス(APPノックインマウス:APP-KIマウス)の開発に成功した。APP-KIマウスは、患者のアミロイド病理に忠実で、グリア細胞(アストロサイトおよびミクログリア)の活性化を伴う激しい神経炎症を呈していた。APP-KIマウスは、既存のモデルマウスが有していた様々な問題点を克服しており、AD研究のための新たな世界基準ツールとなった(図1)。

APP-KIマウスを得たことで、AD病態形成機構における炎症反応の役割について解析が可能となった。我々は、AD病態形成におけるインフラマソームの関与を検討するために、インフラマソームの鍵分子の一つカスパーゼ1の欠損マウス(Casp1-KO)との交配を行った。既存のAPP-TgとCasp1-KOとの交配マウスによる先行研究では、インターロイキン1β(IL-1β)が、アミロイド病理形成に重要な役割を果たしていると報告されていたが、APP-KI x Casp1-KOマウスによる解析の結果、その再現性は確認できず、IL-1βとは異なるサイトカイン/ケモカインがインフラマソームに連動していることが明らかとなった。更に、APP-KIマウスの脳内で変動するサイトカイン/ケモカインを網羅的にスクリーニングした結果、既存のモデルマウスを用いた研究では見出せなかったサイトカイン/ケモカインの変動を明らかにし、AD病態形成機構の解明への新たな糸口を見出した。今後、APP-KIマウスを基軸とした各種交配マウスの解析を進めることで、初めてアミロイドカスケードに沿ったAD病理形成に対する、炎症反応の役割の解析を進めることが可能となり、AD病理・病態形成機構の全貌が解明できると期待される。

アルツハイマー病(AD)研究に資する新たな世界基準モデルの完成!

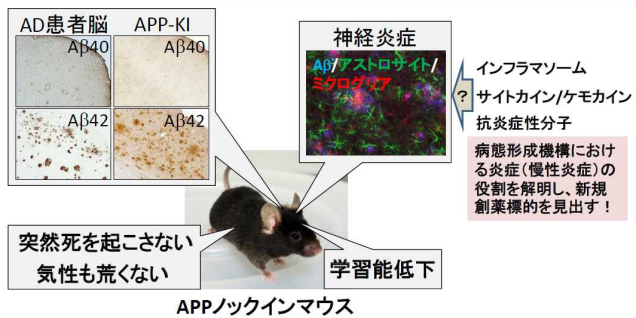


図1 既存のモデルマウスの問題点を克服し、AD患者の病理との蓋然性が高いモデルマウス(APP-KI)の開発に成功。このモデルを用いることで初めて、AD病態形成機構に対する炎症の役割を明確にすることが可能となり、新知見が得られ始めている。

(2) 詳細

研究テーマ1「ADモデルマウスの作製と解析」

既存のADモデルマウスの問題の基となった、過剰発現系を用いないADモデルマウスの開発を行ってきた。我々は、APPを過剰発現させずに、ノックイン(KI)技術を用いて、マウスAPPのゲノムのAβ配列周辺のExonにのみ家族性AD変異を一度の変異導入で多重に導入することに成功した。導入した遺伝子変異から命名したAPP NL-F KIマウス(Swedish変異とIberian変異を導入)とAPP NL-G-F KIマウス(加えてArctic変異も導入)の創出に成功した。それぞれを第二世代、第三世代APP-KIマウスと位置づけた(図2)。第二、第三世代マウス共に、第一世代であるAPP-Tgマウスが有していた問題点(病理が患者とかけ離れているだけでなく、通常状態でも気性が荒く、実験期間中に原因不明の突然死を起こす等)を克服し、さらに患者との病理蓋然性(特にアミロイド病理に対する)が高いマウスとして2014年にNature Neuroscience誌に報告した(論文発表1,2)。当該モデルマウスは、国内外からの反響が大きく、論文発表からわずか1年半ですでに130件以上の共同研究(マウスの提供)に発展

しており、当該マウスを用いた論文も発表され始めている(論文発表 3-5)。今後も、AD 研究に資する新しい世界基準モデルとしての有用性が高まるものと期待しており、予想以上の目的達成へと至っている。従って、研究テーマ2以降の解析に滞りなく進むことができた。

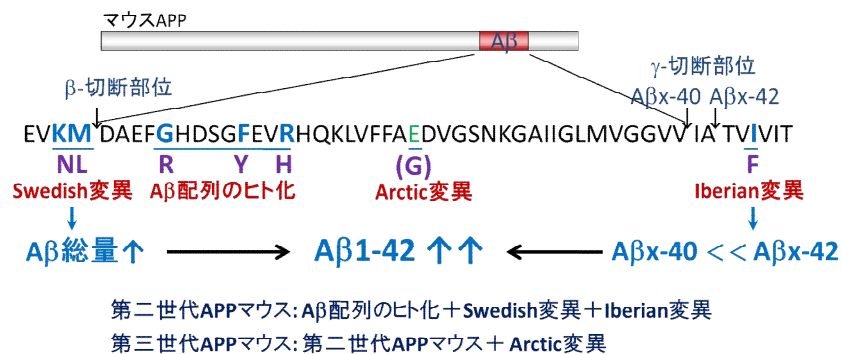


図2. 次世代型アルツハイマー病モデルマウス作製のためのコンセプト
 Aβは、酵素の作用により、APPのβ切断部位次いでγ切断部位の順に切断を受け産生される。次世代型アルツハイマー病モデルマウスとして、第二世代APPマウスは、Aβ産生量を増加させるSwedish変異及びAβx-42の産生比率を増加させるIberian変異を導入し、更に、マウスのAβ配列は凝集を示さないため、Aβ配列のヒト化を同時に行ったマウスである。一方、第三世代APPマウスは、上記変異に加えて家族性アルツハイマー病変異の1つであるArctic変異も導入したマウスである。

当初の予定ではさらに、Aβの神経毒性・凝集性が高く神経炎症誘導性が高いと目されるAβ 3pE-x種を産生しやすいコンストラクトを導入した第四世代APP-KIの創出も試み、2系統のマウスを取得するに至ったが、どちらのマウスモデルも産生するAβの脳内半減期が想定外に短く、目的としたアミロイド病変を発症するのに18ヶ月以上を要し、モデル妥当性としての意義が低下したため解析の優先順位を下げるに至った。しかし、Aβ 3pE-x種はAPP NL-F KIでもAPP NL-G-F KIでも産生されていることが明らかとなったため、神経炎症誘導におけるAβ 3pE-x種の役割の解析については、別の戦略で解析を進めている。その戦略とは、Aβ 3pE-x種の産生に関与すると考えられている、グルタミンリシクラーゼ及びイソグルタミンリシクラーゼそれぞれの欠損マウスとAPP-KIを交配した際に、Aβ 3pE-x種の産生量と神経炎症の度合いに変化が認められるか？というものである。交配も順調に進み、現在解析月齢に達するのを待っている状況である。

研究テーマ2「新規ADモデルマウスの応用解析・AD病理形成におけるインフラマソームの役割」

AD病理形成におけるインフラマソームの役割を解析するために、APP-KIマウスとインフラマソーム構成因子の鍵分子であるカスパーゼ1の欠損マウス(Casp1-KO)との交配を行った。2013年に競合する解析結果がHenekaraによりNatureへ報告されたが、その解析ではAPP過剰発現マウスを用いていた。そこで、APP-KI x Casp1-KOマウスの解析を詳細に進めた結果、Natureで報告された結果の再現性を得る事はできなかった。具体的には、APP-KI x Casp1-KOマウスの脳内では、インターロイキン1β(IL-1β)レベルの変動は認められず、アミロイド病変の形成も対照であるAPP-KIマウスと同等であった。Henekaraらの結果の再現性は得られなかったが、インフラマソームがAD病理形成に関与しない訳ではなく、インフラマソーム構成因子のひとつASCの発現増加がAPP-KI、APP-KI x Casp1-KOマウスでも同様に認められたため、カスパーゼ1非依存的なインフラマソームの存在が示唆された。今後、新たな視点でAD病態形成におけるインフラマソームの関与について解析を進める必要があると考

えられる。そして、AD 病態形成における炎症応答の役割を解析するためにはやはり、APP-Tg 系統を用いるよりも APP-KI 系統を用いて研究を行うことが望ましいことが明確になった。

研究テーマ 3「新規 AD モデルマウスにおける炎症関連因子の同定と AD 病態形成における役割」

APP-KI マウスの脳内で変動するサイトカイン/ケモカインを Cytokine profiler(R&D)を用いて網羅的スクリーニングを行った。その結果、既存のモデルマウス(APP-Tg をベースとした過剰発現モデル系)を用いた研究では見出せなかったサイトカイン/ケモカインが APP-KI 脳内で変動していることを明らかにした。研究テーマ 2 の結果と一致して、APP-KI マウスでは、IL-1 β の変動も認められなかった。現在、同定因子の遺伝子改変マウスと APP-KI マウスとの交配を行っており、AD 病態形成機構におけるそのサイトカイン/ケモカインの役割について解析を進めている。

3. 今後の展開

新型 APP-KI マウスの創出に成功したことで、既存のモデルマウスを用いた研究では見出せなかったサイトカイン/ケモカインの変動を明らかにし、AD 病態形成機構(炎症の慢性化の役割を含めた)の解明への新たな糸口を見出した。今後、APP-KI マウスを基軸とした各種交配マウスの解析を進めることで、初めてアミロイドカスケードに沿った AD 病理形成に対する、炎症応答の役割について解析を進めることが可能となり、AD 病理・病態形成機構の全貌が解明できると期待される。一方で、タウ病理の再現を完全に果たせていないことが、APP-KI マウスの弱点である。より完全なモデルマウスを創出するためには、APP-KI マウスの脳内でタウ病理を如何に再現させるかが、重要な検討事項となる。本研究結果から、神経炎症が、アミロイド病理の“下流”に位置していることが明らかとなったため、神経炎症の悪性を加速させる因子の同定が、タウ病理の再現にも繋がると考えられ、AD 病態形成機構の全貌を明らかにする手段とも直結する。このため、研究テーマ3で同定した、サイトカイン/ケモカインの役割を明らかにすることが、最重要検証事項となる。また、研究テーマ2で示唆された、カスパーゼ非依存的なインフラマソームの存在を明かにできれば、炎症研究における新たな炎症制御機構を提示することに繋がる可能性が高い。これらのことから、本研究結果の延長上に、AD 病態形成機構の解明と、炎症応答の関連性の全貌を明らかにできることが期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究提案の要であった、新型 AD モデルマウスの完成およびその応用解析は、予定通り達成された。一方、当初の目的の一つであった A β 3pE-x 種の炎症惹起性の役割の解析が、想定外の要因で遅れはしたが結果を得られるところまで来ている。それ以上に、新型 AD モデルマウスから同定したサイトカイン/ケモカインの役割解明の発端をつかめ、新たな概念の提示、およびその実証への足掛かりとなった点で目標の達成状況は大きなものであったと考える。AD のような老化疾患の解析は、マウスの加齢化などを必要とする長時間を要する提案で

はあったが、研究実施体制(マウス飼育・遺伝子型確定のための研究補助者の雇用)および研究費の支援により可能な範囲で最大限のマウスの交配・維持が行えた。APP-KI マウスの創出そしてその成果が、さきがけ研究からであった点も信頼性を勝ち得る要因の一つとなっており、国内外の AD 研究において、当該マウスの重要性が広く認識されるに至った点、非常に大きな波及効果があった。実際、製薬業界のみならず機能性食品に関わる企業からの問い合わせも多く、今後、当該マウスを用いた結果から、AD の予防・治療に繋がる製品の開発へ貢献することが大きく期待されている。また研究者として、AD 研究分野に広がりのある新たな概念を提示できた意義も大きく、今後独立する上でも研究者としての飛躍に大きくつながった。これら評価から、2015 年より日本認知症学会の代議員にも選出された。さらに、本さきがけ研究領域内外での交流からいくつかの共同研究に発展し、研究者個人としてだけでなく、他分野との“繋ぎ”をできる者として AD 研究内外の研究者からの注目を得ることができたことも研究者としての飛躍につながった。総じて、本さきがけ研究に採択されたことは、今後の研究者人生において、非常に有意義で実りの大きいものであった。

(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)モデルマウスとして従来使用されてきたA β を蓄積させるAPP過剰発現マウス(APP-Tgマウス)の欠点である種々のartifactを遺伝子ノックイン(KI)手法により克服し、新規ADモデルマウス(APP-KIマウス)の開発に成功し論文として発表した。そのインパクトは顕著であり、論文発表からわずか1年半で130件以上の共同研究に発展しており、APP-KIマウスはAD研究のための新たな世界基準ツールとなったと言えよう。Swedish変異とIberian変異を導入した第二世代、さらにArctic変異も追加導入した第三世代などのAPP-KIマウスを作出し、ヒトADにより近似したアミロイド沈着と神経炎症を呈することを確認している。神経炎症がアミロイド病理の下流に位置していることを明らかにしたが、現在さらにタウ病理も再現すべくマウスの改良を目指している。

APP-KI x Caspase-1 KOマウスを解析し、APP-Tgマウス用いた研究で報告されたADのアミロイド病理形成におけるカスパーゼ1依存性のインフラマソームの役割を否定できる結果を示し、カスパーゼ1非依存的なインフラマソームの存在が示唆された。また、APP-KIマウスの脳内で変動するサイトカイン/ケモカインを網羅的にスクリーニングし、特定した因子の影響を検討中で、これまで未解明であったAD病理の分子機構の解明につながると強く期待される。

これまでの粘り強い研究と本研究により、AD研究における新型モデルマウス(APP-KIマウス)を作出、その応用研究の成果は高く評価できる。AD研究におけるAPP-KIマウスの重要性は広く国内外に認識され始めており、企業等との共同研究を推進し、今後研究者として大きく成長する足がかりを得たと考える。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. **Saito T.**, Matsuba Y., Mihira N., Takano J., Nilsson P., Itohara S., Iwata N. and Saido TC.:

Single APP knockin mouse models of Alzheimer's disease. <i>Nature Neuroscience</i> 17, 661–663 (2014)
2. Nillson P., <u>Saito T.</u> and Saido TC.: New mouse model of Alzheimer's. <i>ACS Chemical Neuroscience</i> 5, 499–502 (2014)
3. Hama H., Hioki H., Namiki K., Hoshida T., Kurokawa H., Ishidate F., Kaneko T., Akagi T., <u>Saito T.</u> , Saido TC. and Miyawaki A.: ScaleS: An optical clearing palette for biological imaging. <i>Nature Neuroscience</i> 18, 1518–1529 (2015).
4. Huang Y., Skwarek–Maruszczyńska A., Horré K., Vandeweyer E., Wolfs L., Snellinx A., <u>Saito T.</u> , Radaelli E., Corthout N., Lo AC., Van Aerschot L., Callaerts–Vegh Z., Trabzuni D., Bossers K., Verhaagen J., Ryten M., Munck S., D'Hooge R., Swaab D.F., Hardy J., Saido TC., De Strooper B. and Thathiah A.: GPR3 modulation of the amyloid plaque burden and memory in Alzheimer's disease. <i>Science Translational Medicine</i> 7, 309ra164 (2015)
5. Zhang H., Wu L., Pchitskaya E., Zaharova O., <u>Saito T.</u> , Saido TC. and Bezprozanny I.: Neuronal store-operated calcium entry and mushroom spine loss in APP knock-in mouse model of Alzheimer's disease. <i>Journal of Neuroscience</i> 35, 13275–13286 (2015)

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)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)

<学会発表>

1. Alzheimer Association International Conference(シンポジウム):2013年7月15日(Boston, USA)「Update of novel type and more relevant mouse models for Alzheimer's disease」
2. 日本認知症学会(シンポジウム):2015年10月4日(青森)
「アルツハイマー病研究に資するモデルマウスの開発と応用」
3. BMB2015(ワークショップ):2015年12月4日(神戸):オーガナイザー
「アルツハイマー病における神経炎症制御」

<受賞>

1. 文部科学大臣表彰・若手科学者賞(2013年4月8日・東京)
「アルツハイマー病の病態発症・促進機構に関する研究」
2. 日本認知症学会・学会賞(2015年10月3日・青森)
「アルツハイマー病研究に資するモデルマウスの開発と応用」

<著作物>

1. 齊藤貴志「アルツハイマー病に対する創薬」臨床化学 43, 185–190 (2014)
2. 齊藤貴志、西道隆臣「アルツハイマー病研究の今後の展望」基礎老化研究 38, 19–24 (2014)
3. 齊藤貴志、西道隆臣「アルツハイマー病のモデルマウス」日本薬理学会誌 144, 250–252

(2014)

4. 齊藤貴志「アルツハイマー病における慢性炎症制御」別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患 4, 85-90 (2015)

<プレスリリース>

1. 「次世代型アルツハイマー病モデルマウスの開発に成功 –アルツハイマー病研究に資する新規リソース基盤に–」(2014年4月)http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140414_1/
2. JST news 明日へのトビラ「アルツハイマー病の新モデルマウスをつくる」(2014年11月)
http://www.jst.go.jp/pr/jst-news/pdf/2014/2014_11.pdf

<報道媒体への掲載>

1. 日研産業新聞「アルツハイマーのマウス 理研が作製 治療・診断法研究に道」(2014年4月14日)
2. 毎日新聞「アルツハイマー病マウス新開発 脳の症状再現 薬研究に期待」(2014年4月15日)
3. 日経バイオテク(net)「理研BSIが次世代型アルツハイマー病モデルマウス、APPノックインでAD患者に近い病理」(2014年4月14日)
4. サイエンスポータル「アルツハイマー病の新しいマウス作製」(2014年4月14日)
http://scienceportal.jst.go.jp/news/newsflash_review/newsflash/2014/04/20140414_01.html
5. 科学新聞「次世代型アルツ病モデルマウス開発」(2014年4月18日・第一面トップ記事)
6. 日刊工業新聞「アルツハイマー動物」(2014年4月22日)

合わせ多数