

APOE4 の分子病態を応用した認知症先制治療法を実現するための基盤研究

山崎 雄

広島大学病院 脳神経内科

【研究の背景】

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 ($A\beta$) 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 $A\beta$ 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 $A\beta$ 蓄積が減少することを見出した。

【目 的】

このように、APOE4 と $A\beta$ 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 $A\beta$ 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。

【方 法】

2021 年度は、そのうち①、②、④(目的参照)を、本研究助成金の補助を得て遂行した。以下にその方法と成果を記載する。

《成果》

①ASO 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。

②ASO により分子 X が脳内制御された 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。

【結 果】

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。

【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。

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

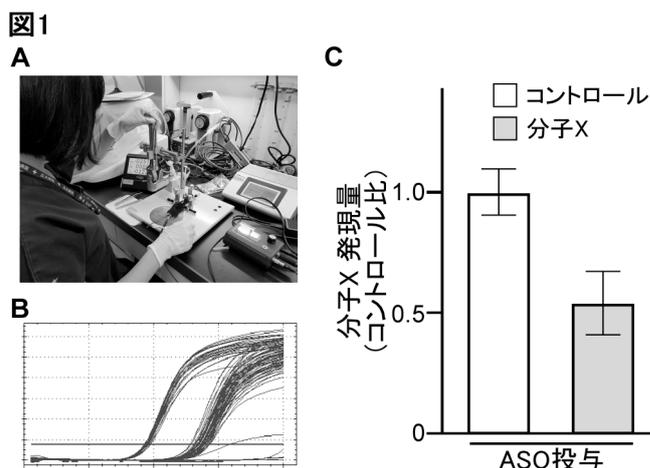


図1:A, 定位脳手術の写真、B, 分子 X の発現量を定量するためにリアルタイムPCR用プライマーを設計した。マウス脳から抽出した mRNA を用いたリアルタイム PCR 増幅曲線を示す。C, B で確立したプライマーを用いた分子 X 発現量の定量。内因性コントロールはβアクチンをもちいた

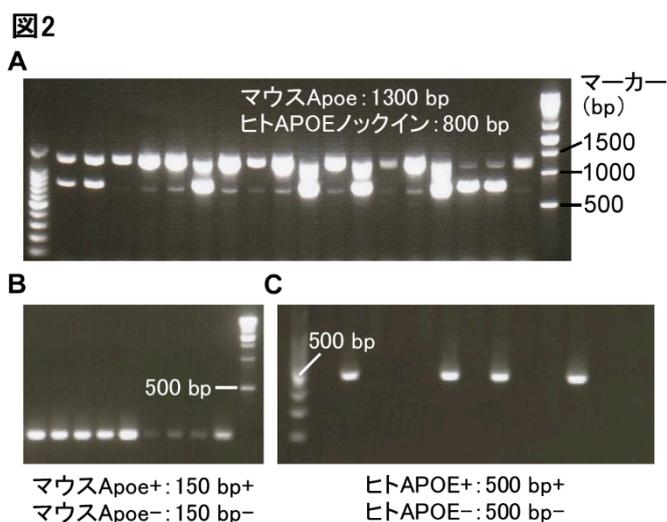


図 2:A, 理研より供与されたプライマーによるマウスジェノタイピング、B, マウス ApoE 遺伝子の有無を判定するために設計した in-house プライマーによるマウスジェノタイピング、C, ヒト APOE 遺伝子の有無を判定するために設計した in-house プライマーによるマウスジェノタイピング。A-C に上げた異なる 3 通りの確認方法をもちい、各マウスのジェノタイピングを進めている

基盤に、次年度は:ASO を用いた脳分子 X の抑制を行い、A β 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 A β 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 A β 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。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

2022 年度以降の解析により「APOE4 は分子 X の発現を介し脳 A β 蓄積を促進させる」ことが明らかになれば、APOE4 の分子病態を応用した認知症先制治療法を実現できる可能性がある。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。

【参考・引用文献】

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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