

アルツハイマー病の関連遺伝子探索研究

●武田 雅俊¹⁾ ◆森原 剛史¹⁾ ◆田中 稔久¹⁾ ◆赤津 裕康²⁾ ◆新井 平伊³⁾ ◆中島 健二⁴⁾ ◆前田 潔⁵⁾
◆山縣 英久⁶⁾

1) 大阪大学医学部 2) 福祉村病院長寿医学研究所 3) 順天堂大学医学部 4) 鳥取大学医学部 5) 神戸大学医学部 6) 愛媛大学医学部

<研究の目的と進め方>

わが国は4人に1人が65歳以上という超高齢化社会をむかえようとしており、アルツハイマー病(AD)への早急な対策が必要とされている。家族性ADのゲノム研究の成果のおかげで、AD病態の理解、治療法の開発が進んだ。現在より根治的治療法として期待されるアミロイド病変治療薬の臨床開発が進んでいる。しかしながらリスク遺伝子については、1993年に同定されたApoE以降確実といえるADリスク遺伝子はいくつも同定されていない。そこで本研究では確かで有用なリスク遺伝子を同定するため、患者ゲノム解析のみならず、複合的アプローチを用いた遺伝子探索、さらに各遺伝子の機能解析を進める。創薬や診断につながる重要な遺伝子の同定を目指す。

<2008年度の研究の当初計画>

- ① AD兄弟発症例の収集を継続する。医療機関以外の施設も含め協力の範囲を広げていく。
- ② ヒト研究に比べ環境因子などの影響が少なく、また理想的な条件下で病理評価が可能なADモデル動物を用いた病理修飾遺伝子の探索を進める。
- ③ AD発症の有無だけでなく、神経心理所見など臨床データと遺伝子多型の関連も調べる。
- ④ これまでに同定してきたAD関連遺伝子について機能解析を行い、AD病態との間のメカニズムを明らかにしていく。

<2008年度の成果>

① AD兄弟発症例について平成20年度は7組16人ゲノム収集した。平成18年度2組と平成19年度7組14人を合わせ合計16組34人となった。病院に加え、デイサービス事業所6か所、保健所からも協力が得られるようになった。保健所関連の声かけの結果まずは1組3名ゲノム収集できた。

家族歴の特に濃いケースについてはPresenilinなど原因遺伝子のシーケンシングを行っているが、これまでのところ変異は見つかっていない。

② 12ヶ月間加齢させた背景遺伝子が異なるAPP TgマウスのADの中心病変である脳内A β 蓄積量をELISAで測定した。SJL系統由来の背景遺伝子が多いマウスに比べ、DBA系統由来の背景遺伝子が多いマウスはA β 蓄積量が有意に少なかった。例えばDBA由来遺伝子75%、B6由来遺伝子16%、SJL由来9%のマウスはSJL84%、B616%のマウスに比べ、Triton分画のA β 40量は-82% ($p < 0.01$ Turkey-Kramer)、A β 42量は-68% ($p < 0.01$)であった。より不溶性であるGuHCl分画でも同様の結果がみられた。例えば背景遺伝子がDBA75% B616% SJL9%のマウスはSJL69% B631%のマウスに比べA β 40量は-85%、A β 42量は-68%であった ($p < 0.01$, Turkey-Kramer)。

A β の前駆蛋白であるAPPのmRNA発現量、量や蛋白量にマウス系統間で有意差は認められなかった。3種類の各純系マウス、アミロイド病変が高度なAPP Tg、軽度なAPP Tgと各グループごとにmRNAをプールのしたサンプルを用い、ADと関連するという何らかの既知の報告がある約100の遺伝子について脳内の

mRNA発現量をMicro Fluidic Cardsで定量した。各遺伝子のmRNA発現量とA β 蓄積量との関係を検討したが、マウス背景遺伝子によるA β 蓄積量の差を説明できる遺伝子はなかった。このことは未知の遺伝子(群)によりこれらマウスのAD病変が修飾されていることを示唆する。今後はアレイを用いた解析を行うことでAD病変修飾遺伝子の探索を続ける。

③ 匿名化された遺伝子データベースと複数の臨床データベースの統合作業を行った。

遅延再生に関連すると報告(Papassitiropoulos AScience 2006)されているKIBRA多型について各患者の神経心理データとの関係を調べた。いくつか傾向が認められる神経心理検査項目があるものの、KIBRA多型と有意な関連が見つかる項目はなかった。検体数を増やして引き続き検討を続ける。

④ AD関連遺伝子として2008年論文報告(Aidaraliev NJ J Hum Genet 2008)したDynamin2(DNM2)について機能解析を進めた。DNM2 mRNAは脳でも末梢血でもADで発現が低下していた。DNM1/2 dominant negative細胞ではAPPの細胞内局在が変わりplasma membraneに局在するものが増加した。またDNM1/2 dominant negative細胞ではA β 40の分泌も上昇した。リスク多型ではDynaminの発現量が減少し、APPがendosomeからplasma membraneに局在が変わりA β 産生が増加するというメカニズムが想定された。このようにDNMについて遺伝子研究、発現解析、機能解析を組み合わせた新たなAD病態メカニズムを明らかにし論文発表した(論文11)。

<国内外での成果の位置づけ>

AD原因遺伝子については1995年のpresenilin以降、ADリスク遺伝子については1993年のApoE以降、確立されたAD関連遺伝子は同定されていない。大規模なサンプルを用い、新しい技術を投入しても、重要な進歩が10年以上ないというのが世界の現状である。

本研究班では遺伝子関連解析のみならず機能解析を積極的に行うことでより確からしいAD関連遺伝子の同定を試みている。実際dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A(DYRK1A)、DNM2は遺伝子多型の関連、発現、機能解析の3面からADとの関連を示すことができた。DYRK1Aについては国外の他のグループ(Ryoo SR J Neurochem 2008など)もADとの機能的関係を明らかにしている。DNMについてはファミリー遺伝子であるDNMBP(dynamin binding protein)のADとの関連が基盤ゲノムの桑野班など(Kuwano R Hum Mol Genet 2006, Bettens K Neurobiol Aging 2008)により認められている。

背景遺伝子によりアミロイド病変が大きく変わるという発見については、国内外の研究者、とくに製薬企業から多数の問い合わせを受けている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

兄弟発症例のゲノム収集はこれまでの遅れを挽回するまでには至っていない。主治医関係のないデイサービス利用者からは候補者と接触はできても同意率はゼロであった。AD兄弟例では特殊

な若年発症例を除き親族をまとめるキーパーソンがAD兄弟の親になる可能性はほとんどなく研究協力が得られにくい。

<今後の課題>

兄弟発症例収集については今年度に続き協力機関を増やしていく。基盤ゲノム班においてタイピングを行う予定である。

マウス背景遺伝子については、遺伝子発現差からAD関連候補遺伝子を探索していく。発現アレイ (Illumina MouseRef-8 Expression BeadChip) による解析をすすめる。mRNAの結果にSNPアレイ (Illumina low density linkage array)、メタボロミクス解析 (LC/MS Orbitrap) も組み合わせさらに信頼性の高い候補遺伝子 (分子・パスウェイ) を絞り込んでいく。同定されたパスウェイはアミロイド病理の治療ターゲットになりうる。また条件を整えば得られた有力な遺伝子についてヒト脳における発現、ヒトゲノムにおけるSNPについてADと対照群を比較する。

これまで得られたAD関連候補遺伝子について、機能解析、各臨床所見との関係の解析を引き続き行っていく。

神経心理検査データと遺伝子多型の関連研究については対象とする遺伝子の範囲を広げて引き続き行っていく。

<成果公表リスト>

1) 論文 (査読付きのものに限る)

1. 0901131318

Sugar chains of cerebrospinal fluid transferrin as a new biological marker of Alzheimer's disease. Taniguchi M, Okayama Y, Hashimoto Y, Kitaura M, Jimbo D, Wakutani Y, Wada-Isoe K, Nakashima K, Akatsu H, Furukawa K, Arai H, Urakami K. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 26(2):117-22(2008)

2. 0901131332

A functional polymorphism of the μ -opioid receptor gene is associated with completed suicides, Akitoyo Hishimoto, Huxing Cui, Kentarou Mouri, Hideyuki Nushida, Yasuhiro Ueno, Kiyoshi Maeda, Osamu Shirakawa *J Neural Transmission.* 115:531-536 (2008)

3. 0901131338

Association of RGS2 Gene Polymorphisms with Suicide and Increased RGS2 Immunoreactivity in the Postmortem Brain of Suicide Victims Huxing Cui, Naoki Nishiguchi, Elene Ivleva, Masaya Yanagi, Masaaki Fukutake, H Nushida, Y Ueno, Noboru Kitamura, Kiyoshi Maeda, Osamu Shirakawa *Neuropsychopharmacology*33(7):1537-1544 (2008)

4. 0901131402

Expression of Kruppel-like factor 5 gene in human brain and association of the gene with the susceptibility to schizophrenia. Masaya Yanagi, Takeshi Hashimoto, Noboru Kitamura, Masaaki Fukutake, Osamu Komure, Naoki Nishiguchi, Toshio Kawamata, Kiyoshi Maeda, Osamu Shirakawa *Schizophr Res.* 100:291-301 (2008)

5. 0901131416

Association of alpha2A-adrenergic receptor gene polymorphism with susceptibility to suicide in Japanese females. Fukutake M, Hishimoto A, Nishiguchi N, Nushida H, Ueno Y, Shirakawa O, Maeda K. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1;32(6):1428-33 (2008)

6. 0901131441

Event-related synchronization of alpha activity in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: an MEG study combining beamformer and group comparison. Kurimoto R, Ishii R, Canuet L, Ikezawa K, Azechi M, Iwase M, Yoshida

T, Kazui H, Yoshimine T, Takeda M. *Neurosci Lett.* 3;443(2):86-9 (2008)

7. 0901131447

Phosphorylation of tau at Ser214 mediates its interaction with 14-3-3 protein: implications for the mechanism of tau aggregation. Sadik G, Tanaka T, Kato K, Yamamori H, Nessa BN, Morihara T, Takeda M. *J Neurochem* 108(1):33-43. (2009)

8. 0901131512

Validation of grading scale for evaluating symptoms of idiopathic normal-pressure hydrocephalus. Kubo Y, Kazui H, Yoshida T, Kito Y, Kimura N, Tokunaga H, Ogino A, Miyake H, Ishikawa M, Takeda M. *Dement Geriatr Cogn Disord* 25(1):37-45 (2008)

9. 0901131519

Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. Begum AN, Jones MR, Lim GP, Morihara T, Kim P, Heath DD, Rock CL, Pruitt MA, Yang F, Hudspeth B, Hu S, Faulkner KF, Teter B, Cole GM, Frautschy SA. *J Pharmacol Exp Ther* 326(1):196-208. (2008)

10. 0901131534

Possible association between SORL1 and Alzheimer disease? Reanalysing the data of Shibata et al. Lee JH, Shibata N, Cheng R, Mayeux R. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 26(5):482 (2008)

11. 0901131547

Genetic association between SORL1 polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population. Shibata N, Ohnuma T, Baba H, Higashi S, Nishioka K, Arai H. *Dement Geriatr Cogn Disord* 26(2):161-4 (2008)

12. 0901131613

Decrease of dynamin 2 levels in late-onset Alzheimer's disease alters Abeta metabolism. Kamagata E, Kudo T, Kimura R, Tanimukai H, Morihara T, Sadik MG, Kamino K, Takeda M. *Biochem Biophys Res Commun* (2009)

13. 0901131620

Analysis of DNA variations in promoter region of HCNP gene with Alzheimer's disease. Okita K, Matsukawa N, Maki M, Nakazawa H, Katada E, Hattori M, Akatsu H, Borlongan CV, Ojika K. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008

14. 0901131645

Prevalence of Dementia in the Rural Island Town of Ama-cho, Japan. Wada-Isoe K, Uemura Y, Suto Y, Doi K, Imamura K, Hayashi A, Kitayama M, Watanabe Y, Adachi Y, Nakashima K. *Neuroepidemiology.*32(2):101-106 (2009)

15. 0811121416

Association between quality of life of demented patients and professional knowledge of care workers. Kazui H, Harada K, Eguchi YS, Tokunaga H, Endo H, Takeda M. *J Geriatr Psychiatry Neurol.*;21:72-8.(2008)

16. 0811121422

Processes of beta-amyloid and intracellular cytoplasmic domain generation by presenilin/gamma-secretase. Tagami S, Okochi M, Fukumori A, Jiang J, Yanagida K, Nakayama T, Morihara T, Tanaka T, Kudo T, Takeda M. *Neurodegener Dis.*;5:160-2. (2008)