

アルツハイマー病の病態モデルマウスにおける
小胞体ストレスと新規神経変性誘導因子 PRMT8 の作用

(Evaluation of the Role of Endoplasmic Reticulum Stress and
Novel Neurodegeneration Inducing Factor PRMT8
in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease Model Mouse)

石井 綾乃

アルツハイマー病の病態モデルマウスにおける
小胞体ストレスと新規神経変性誘導因子 PRMT8 の作用

(Evaluation of the Role of Endoplasmic Reticulum Stress and
Novel Neurodegeneration Inducing Factor PRMT8
in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease Model Mouse)

石井 綾乃

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

獣医学専攻博士課程平成 27 年入学

(指導教授：横須賀 誠)

平成 31 年 3 月

目次

目次.....	1
略語一覧.....	2
第1章 序論.....	3
第1章 図と表.....	15
第2章 研究1 AD病態と小胞体ストレスの関係の再検証.....	25
2-1 緒言.....	26
2-2 材料と方法.....	29
2-3 結果.....	38
2-3-1 実験1 : A β 蓄積とAPP過剰発現が小胞体ストレスに与える影響.....	38
2-3-2 実験2 : タウ病理が小胞体ストレスに与える影響.....	39
2-4 考察.....	40
第2章 図と表.....	43
第3章 研究2 Tauと相互作用が変動するPRMT8が脳神経病理に与える影響.....	58
3-1 緒言.....	59
3-2 材料と方法.....	62
3-3 結果.....	75
3-3-1 実験1 : PRMT8欠損がdKIマウスの脳神経病理に与える影響.....	75
3-3-2 実験2 : PRMT8の発現増加がdKIマウスの脳神経病理に与える影響.....	76
3-3-3 実験3 : PRMT8の発現増加がWTマウスとTau KOの脳神経病理に与える影響.....	78
3-4 考察.....	79
第3章 図と表.....	83
第4章 総括.....	102
第4章 図と表.....	107
参考文献.....	108
謝辞.....	1255

略語一覧

AAV	adeno-associated virus / アデノ随伴ウイルス
AD	Alzheimer 's disease / アルツハイマー病
ALS	amyotrophic lateral sclerosis / 筋萎縮性側索硬化症
APP	amyloid precursor protein / アミロイド前駆体タンパク質
ATF	activating transcription factor
A β	amyloid β peptide / アミロイド β ペプチド
CDS	cognitive dysfunction syndrome / 認知機能不全症候群
CHOP	C/EBP-homologous protein
dKI	double knock-in (<i>App</i> ^{N-G-F} マウス x <i>MAPT</i> KI マウス)
DM	Degenerative Myelopathy / 変性性脊椎症
eIF2 α	eukaryotic translation initiation factor 2 α
FTDP-17	Frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome -17 / 17 番染色体に連鎖する家族性前頭側頭型認知症パーキンソニズム
FUS	fused in sarcoma
GFP	green fluorescent protein
GRP78	glucose-regulated protein 78
IRE1	inositol-requiring 1
KI	Knock-in
KO	Knock-out
MAPT/ Tau	microtubule-associated protein tau / 微小管関連タンパク質タウ
PDI _s	protein disulfide isomerases / 蛋白質ジスルフィドイソメラーゼ
PERK	PKR-like endoplasmic reticulum kinase / 小胞体膜貫通型キナーゼ
PRMT8	Protein arginine methyltransferase 8 / タンパク質アルギニンメチル基転移酵素 8
PS	presenilin
sgRNA	single guide RNA
SOD	Cu/Zn superoxide dismutase
Tg	Transgenic
XPB1	X-box binding protein 1

第 1 章

序論

1-1 神経変性疾患の現状と問題点

高齢化社会を迎えたわが国において、アルツハイマー病 (Alzheimer 's disease : AD) や筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) に代表される神経変性疾患を発症する患者の急増が危惧されている (日本神経学会、2013)。神経変性疾患とは、「徐々に発症し、緩徐だが常に進行する神経症状を呈し、その症状も多くは対称的にある種の系統がおかされ、家族性のことが多いものである。一方、病理学的にはとくに神経細胞を中心とするさまざまな種類の退行性の変化があり、血管障害、感染、中毒のような明らかな原因がつかめない一群の神経疾患」と定義されている (豊倉 康夫ら、2004)。神経変性疾患の多くが原因不明とされてきたが、近年では各疾患に関連する遺伝子変異や病態関連タンパク質が同定され、原因遺伝子は各疾患で異なるにも関わらず、神経細胞の内外に異常なタンパク質の凝集・蓄積が起こるという共通点が認められている (Ross and Poirier, 2005)。そのため、これら異常なタンパク質の凝集・蓄積が原因となって神経変性疾患が生じる共通の発症機序の存在が想定されている。しかし、ヒトの AD に代表される多くの神経変性疾患には根本的な予防・治療法が存在しないのが現状である。その理由として、各疾患の発症機序が未だに解明されていないことが挙げられる。すなわち、各疾患の原因となる遺伝子や疾患特有の病態変化に伴う病理学的変化については解明が進んでいるものの、その病理学的変化を誘導する分子機構の理解が不十分であるという重大な問題を抱えているのである。

1-2 神経変性疾患と小胞体ストレス

神経変性疾患の病態進行に関わると考えられている現象の一つに、異常なタンパク質の発現や蓄積によって惹起される小胞体ストレスがある (Paschen and Mengesdorf, 2005)。細胞内の小胞体は、タンパク質の高次構造を作りその機能発現を導く細胞小器官である。しかし、この小胞体に異常タンパク質の蓄積やカルシウム濃度の変動、酸化ストレス、低グルコース等の負荷がかかると、通常の機能が障害されて小胞体内腔に折りたたみ不全タ

ンパク質が蓄積する状態である“小胞体ストレス”に陥る。細胞はこれを回避する為に小胞体ストレス応答を活性化させ、小胞体内の折りたたみ不全のタンパク質の是正を行う。しかし、小胞体ストレス応答が正常に機能しない、あるいは過度な小胞体ストレスが惹起されるなどの場合、細胞にはアポトーシスが生じる。ヒトの AD や ALS を含む神経変性疾患の、患者の死後の脳や疾患研究モデル動物の一部において、この小胞体ストレスの上昇が認められることから、神経変性疾患の治療標的として小胞体ストレス応答の関連分子が注目されている (Boyce et al., 2005; Kudo et al., 2008)。しかし、各疾患の病態進行と小胞体ストレスの関係については十分には明らかにされていない。

1-3 アルツハイマー病 (AD) の疫学

神経変性疾患の中で最も患者数の多い疾患がヒトのアルツハイマー病 (以下、単に AD とする) である。AD は、認知症の原因の 6 割以上を占める疾患でもある (Winblad et al., 2016)。認知症は、記憶障害を主症状とする一連の疾患群であるが、その発症は患者本人および介護に関わる家族に心理的・経済的な負担となるばかりでなく、自動車事故に代表される社会問題の原因にもなっている。とりわけ、高齢化が最も進んでいる日本においては、認知症を発症する患者数は 2025 年に 700 万人に達すると推定されている (厚生労働省, 2015)。高齢化と同時に少子化問題を抱える我が国において、AD の克服は国の存亡に関わる最重要課題と言える。

1-4 AD 発症機序における“アミロイドカスケード仮説”

何故、AD に関して多くの研究が行われているにも関わらず、その予防法・治療法の開発が期待されるほど進まないのであろうか。その原因の一つが、上述した「疾患の病理学的変化を誘導する分子機構の理解が未だ不十分」という問題である。

AD 患者で認められる病理像として、神経細胞外 (脳実質) に蓄積する老人斑、神経細胞内の神経原線維変化、そして大脳皮質や海馬を中心とした脳領域における神経細胞の脱落に

よる脳萎縮が観察されている (Hardy and Selkoe, 2002; Jucker and Walker, 2013)。老人斑は主にアミロイドβペプチド (amyloid β peptide; Aβ)から構成され (アミロイド病理)、神経原線維変化は主に過剰なリン酸化を受けた微小管関連タンパク質タウ (microtubule-associated protein tau: MAPT もしくは Tau) から構成される (タウ病理)。このADの病理学的特徴の発生には時系列が存在し、「アミロイド病理を引き金に、タウ病理が生じ、神経変性および細胞死に至る」という“アミロイドカスケード仮説”が提唱されている (Hardy and Higgins, 1992) (John and Gerald, 1992)。さらに、家族性ADに連鎖する遺伝子変異の同定や、家族性AD患者を対象としたAβやTauの分子イメージング解析により、AD発症の約20年前からすでにAβ蓄積が始まることが明らかとなり (Bateman et al., 2012)、ヒトADの発症機序として“アミロイドカスケード仮説”がより強く支持されるようになった。それにも関わらず、ヒトADにおける「アミロイド病理」「タウ病理」「神経の変性および細胞死」の各病理学的特徴を繋ぐ分子機構は未だに解明されていない (図1-1)。これが、ヒトADの予防法・治療法の開発が進まない大きな原因の一つであり、この分子機序の理解を深めることがAD克服にとって極めて重要だと考えられている。

1-5 アミロイド病理の“Aβ”の産生と分解

ADの発症機序と考えられている“アミロイドカスケード仮説”は、Aβの産生から始まる。Aβは、細胞膜に存在するアミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein; APP) からβ-セクレターゼと、プレセニリンを活性中心とするγ-セクレターゼにより二段階切断を受けて産生される (図1-2)。AβにはC末端側長が異なるAβ40とAβ42が存在するが、Aβ42はAβ40と比べて凝集能・神経毒性が高く (Dahlgren et al., 2002)、Aβ42の存在比 (Aβ42 / Aβ40)の増大はAD発症に深く関与すると考えられている (Güntert et al., 2006)。通常、Aβは種々のメカニズムにより脳実質から代謝・除去されている。これまでに、神経細胞の分泌顆粒内およびシナプス膜上でAβを分解する酵素

として、ネプリライシンが同定された。ネプリライシンの活性と発現量は、加齢に伴い減少するため、ネプリライシンによる A β 分解機能の低下が、孤発性 AD における A β 蓄積の一因だと考えられている。近年、理化学研究所・脳神経科学研究センターの神経老化制御研究チーム（以下、西道チーム）によって、ウイルスベクターを用いてネプリライシン遺伝子を AD 病態モデルマウスの末梢血管内に投与する実験が行われた。その結果、脳内の A β 量の低下と認知機能の改善が認められ、遺伝子治療への応用が期待されている（Iwata et al., 2013）。

1-6 タウ病理の“Tau”について

A β の凝集による老人斑が、AD あるいはダウン症といった疾患において比較的特異的に観察される所見であるのに対して、Tau の異常リン酸化および凝集は多くの神経変性疾患で共通に認められている（Wang and Mandelkow, 2015）。タウ病理を有する神経変性疾患は、タウオパチーと総称され、AD や前頭側頭型認知症などが含まれている。特に AD においては、過剰リン酸化 Tau が AD 病態の進行に伴い時間的・空間的に特徴的な分布を示し、これが神経細胞死の程度や認知障害の臨床症状と強い相関性を持つことが明らかとなっている（Gómez-Isla et al., 1997）。

Tau は、中枢神経系に多く発現する微小管結合タンパク質の一種であり、主に神経細胞の軸索に存在している。微小管は、主要な細胞骨格の一つであり、細胞の形態、細胞の分裂、細胞内輸送等にも関与する（Higuchi et al., 2002）。Tau には多数のリン酸化部位が存在し、通常でも一部はリン酸化されているが、Tau の過剰なリン酸化は、微小管の不安定化を招き、その結果、神経細胞の軸索輸送に異常が生じると考えられている。AD 患者では、複数部位で Tau のリン酸化が認められており（Noble et al., 2013）、Tau のリン酸化の亢進は、AD 病態の進行の指標と捉えることが出来るのである。

1-7 家族性 AD に連鎖する遺伝子変異

ヒト AD 患者の約 1%が家族性の常染色体優性遺伝形式を原因として発症し、残りの約 99%が孤発性である。しかし、原因は異なるものの、両者はほぼ同様の臨床症状と病理所見を示す (Ryan et al., 2016)。そのため、家族性 AD の遺伝子変異に着目した病態解析は、孤発性 AD の病態の理解にも繋がる可能性が高いと考えられる。これまで、家族性 AD に連鎖する遺伝子変異として、21 番染色体上の A β 前駆体タンパク質である APP の遺伝子における変異が数多く同定されている (図 1-3)。APP 遺伝子の変異の違いにより、発現する AD 病態も異なる事が知られている。例えば、Swedish 変異 (K670N/K671L) は総 A β 生産量を増加させる変異であり (Citron et al., 1992)、Arctic 変異 (E693G) は A β の凝集性を高める変異であり (Nilsberth et al., 2001)、Iberian 変異 (I716F) は A β 42 の産生比率を上昇させる変異である (Guardia-Laguarta et al., 2010)。APP 以外にも、14 番染色体上のプレセニリン (presenilin; PS) の PS1 遺伝子もしくは PS2 遺伝子において 150 種以上の変異が同定されている (Sherrington et al., 1995)。PS は、 γ セクレターゼの活性部位を構成する分子である事から、この PS 遺伝子の変異が A β 42 産生比率を増加させて AD の病態を促進すると考えられている (Kumar-Singh et al., 2006)。

一方、AD 患者の脳ではタウ病理が認められるにも関わらず、家族性 AD に関連する Tau 遺伝子の変異は同定されていない。この点も、ヒト AD の発症機序として“アミロイドカスケード仮説”が提唱されているにも関わらず、「アミロイド病理」、「タウ病理」、および「神経の変性および細胞死」を繋ぐ分子機構が未解明である原因の一つとなっている。

1-8 AD 病態モデルマウスにおける問題点

ヒト AD の発症機序の解明および創薬標的の探索・評価を行うために、数多くの AD 病態モデルマウスが作出されてきた。初期には、家族性 AD の変異を導入した APP 遺伝子を過剰発現させた APP-トランスジェニック (Transgenic ; Tg) マウスが作製され、広く AD 研究に使用されてきた (Games et al., 1995)。しかし、APP-Tg では A β の蓄積が認められ

ているが、外挿遺伝子を過剰に発現させる手法で作製されているため、 $A\beta$ 以外の APP 断片も過剰に産生される。過剰生産された APP 断片は、転写因子としての作用などを持つため (Guo et al., 2012)、本来の AD 患者における $A\beta$ 病理とは異なる現象が誘導されているのではないかという問題点が指摘されている (Sasaguri et al., 2017) (表 1-1)。また、膜タンパク質の過剰発現は細胞質カルシウム濃度を上昇させ、慢性的に小胞体ストレスを惹起することが知られている (Chaudhari et al., 2014)。このことから、膜タンパク質である APP と PS1 を過剰に発現する従来の AD 病態モデルマウスで認められる小胞体ストレスの上昇は、膜タンパク質の過剰発現に由来するアーチファクトである可能性が懸念されるようになってきた (Barbero-Camps et al., 2014; Reinhardt et al., 2014; Borkham-Kamphorst et al., 2016)。

1-9 APP 過剰発現マウスにおける小胞体ストレスの疑問点

海馬の脳スライス標本や初代培養神経細胞を用いた解析において、 $A\beta$ オリゴマーやフィブリルが小胞体ストレスを誘発することが報告されている (Cornejo and Hetz, 2013)。このことから、 $A\beta$ 蓄積によって誘導された小胞体ストレスは、AD 病態の神経細胞死に関与するとされているのである (Hitomi et al., 2004; Costa et al., 2013; Kang et al., 2013)。さらに、複数の APP-Tg マウスにおいて、小胞体ストレス応答が活性化しているとの報告がある (Endres and Reinhardt, 2013; Barbero-Camps et al., 2014)。一方で、APP-Tg マウスでは小胞体ストレスの上昇は認めないという報告もある (Lee et al., 2010)。このように、従来の AD 病態モデルマウスにおける小胞体ストレス誘導の結果は必ずしも一致していないのである。

小胞体ストレスを巡る問題は、AD 病態を解明して治療標的を検索するという研究戦略にとって大きな障害となっている。従来の APP-Tg を用いた解析では、膜タンパク質の過剰発現による影響を受けずに $A\beta$ 蓄積によって小胞体ストレスが惹起されるかどうかを解析することは困難であった。そこで、APP の過剰発現に頼らずに $A\beta$ 蓄積と小胞体ストレスの

関係を解析する AD 病態モデルマウスの開発が求められるようになった。

1-10 *App* ノックインマウス

膜タンパク質を過剰発現する従来の APP-Tg マウスが抱える問題点を解決するため、西道チームは、遺伝子過剰発現を伴わず APP 遺伝子に変異を導入するノックイン (Knock in ; KI) 手法で2種類の *App* KI マウスの作製を試みた (Saito et al., 2014) (図 1-4)。*App* KI マウスのうち、*App*^{N-F}マウスは、マウス *App* 遺伝子の A β 配列がヒト化され、家族性 AD 変異である Swedish 変異 (KM670/671NL)、Iberian 変異 (I717F) が導入されたマウスである。一方、*App*^{N-G-F}マウスは、*App*^{N-F}マウスに Arctic 変異 (E693G) の導入が加えられたマウスである。これら *App* KI マウスは、家族性 AD 変異を導入したヒト型 APP を野生型 (wild type : WT) マウスと同等量で発現し、A β 蓄積やグリオシスなどの AD に関連する病理学的変化を示す (Saito et al., 2014; Sasaguri et al., 2017)。

これまで APP-Tg マウスを用いて行われた研究において、カルシウム活性化プロテアーゼであるカルパインの活性化が A β プラークの形成に関与する可能性が示されている (Higuchi et al., 2012)。カルパイン抑制タンパク質 (カルパスタチン) 遺伝子を欠損 (Knock-out : KO) させてカルパインを過剰活性化したマウスと、APP-Tg マウスを掛け合わせたマウスでは、A β 沈着、Tau のリン酸化、神経炎症、および神経変性が促進されること、10 週齢で死亡率の増加することが示されている (Higuchi et al., 2012)。しかし、カルパスタチン KO マウスと *App*^{N-F}マウスを掛け合わせて作成したマウスでは、若齢個体における原因不明の死亡は認められず、さらに病理学的変化も再現されなかった。この結果は、AD 病態におけるカルパインの影響は本来の AD 病態を反映したものではない可能性を示唆している (Saito et al., 2016)。

このように、従来の AD 病態モデルマウスである APP-Tg マウスで認められる病理学的変化は、APP 遺伝子の過剰発現によるアーチファクトを含んでいる可能性が高く、過剰発現を伴わない *App* KI マウスを用いた研究の必要性が求められて来たのである。

1-11 *App*^{NL-G-F}マウスと *MAPT* KI マウスを掛け合わせた double KI マウス

AD 発症機序の解明には、アミロイド病理だけでなく、タウ病理が生じる分子機序を明らかにすることも重要である。しかし、APP 遺伝子の変異を導入したマウスでは、Tau のリン酸化の亢進は認められるものの、AD 患者で見られるような神経原線維変化が認められていない。一方、第 17 染色体遺伝子に連鎖しパーキンソニズムを伴う家族性前頭側頭型認知症 (Frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome -17 ; FTDP-17) の変異を Tau 遺伝子に導入したタウ病態モデルマウス (Tau-Tg マウス) では神経原線維変化が認められている。このため、ヒト AD 患者では Tau 遺伝子の変異は認められていないにも関わらず、FTDP-17 の変異を Tau 遺伝子に導入したマウスと、APP 遺伝子に家族性 AD の変異を導入したマウスを掛け合わせたモデルマウスが、AD 病態の解析に使用されてきた (Oddo et al., 2003)。また、ヒトとマウスでは発現する Tau のアイソフォームが異なることが知られている (Andreadis, 2005)。ヒトの Tau 遺伝子では、選択的スプライシングによりエクソンが挿入されて 6 種類のアイソフォームが発現している (図 1-5)。このうち、C 末端側に存在する微小管結合領域のリピート配列の個数により、4 リピート Tau (0N4R、1N4R、2N4R) と、3R Tau (0N3R、1N3R、2N3R) に区別される。一方、マウスは 4 リピート Tau (0N4R、1N4R、2N4R) のみを発現している。ヒト AD 患者と同様に、変異を持たないヒト Tau とタウ病理を同時にもつ、より AD 患者の病態に近いモデルマウスが求められていた。

このような研究背景より、ヒトとマウスの *MAPT* 遺伝子配列をノックイン手法で置き換え、遺伝的変異を持たないヒト Tau を発現する *MAPT* KI マウスが作製された。さらに、*App*^{NL-G-F}マウスと *MAPT* KI マウスを掛け合わせた double KI (dKI) マウスを作成して解析が行われてきた (Saito、投稿中) (図 1-6)。しかし、この dKI においても *App*^{NL-G-F}マウスと比べてタウ病理および神経細胞死の増悪は認められず、依然として AD 患者で見られる病理像の再現には至っていなかった。

1-12 A β 病理が既存する脳内で Tau と結合する因子の探索と同定

dKI マウスの研究結果から、西道チームでは「A β が蓄積する状態において何らかの病態増悪因子が存在し、その因子が Tau と相互作用することにより、神経変性を誘導する」という全く新しい視点からの仮説が立てられた。そこで、この仮説を立証するために、脳内で A β 病理依存的に Tau との相互作用（解離性あるいは結合性）が変動するタンパク質の探索が行われた。Tau に結合するタンパク質を効率的に得るため、Flag エピトープを有する変異を持たないヒト Tau を発現する Wtau-Tg マウスと Wtau-Tg マウスに *App*^{M-F} マウスを交配させたマウスを用いて、Flag 抗体を用いた免疫沈降とそのサンプルを用いた質量分析が行われた。その結果、25 個の候補因子が同定されたのである（Saido、未発表データ）（図 1-7）。

1-13 アルギニンメチル基転移酵素 8 (PRMT8)

同定された 25 個の候補因子に興味ある分子が含まれていた。それは、アルギニンメチル基転移酵素 (Protein arginine methyltransferase 8 ; PRMT8) という、中枢神経系に特異的に発現するタンパク質であり、なおかつフォスファジチルコリンからコリンを産生するリン脂質の分解酵素作用も有することが知られている分子である (Dillon et al., 2013; Kim et al., 2015)。同定された 25 個の因子の中で、PRMT8 は特に中枢神経系で重要な役割を担うタンパク質である可能性が考えられた。

これまで PRMT8 と AD 病態に関する報告は無く、PRMT8 が AD で認められる各病理学的特徴を繋ぐ新規因子である可能性が高いと期待が持たれたのである。

1-14 AD とイヌの認知機能不全症候群の類似性

AD 病態の初期像とイヌの認知機能不全症候群 (cognitive dysfunction syndrome ; CDS) には病理学的な類似性が認められる (Davis and Head, 2014)。また、CDS 罹患犬の脳において、AD 患者脳と同様にアミロイド病理および神経変性・細胞死が認められている

(Borràs et al., 1999; Araujo et al., 2005) (表 1-2)。ヒトとイヌの APP のアミノ酸配列は 98% 相同であり (Johnston, 1991)、A β 領域のアミノ酸配列は完全に一致している (Youssef et al., 2016) (表 1-3)。しかし、イヌ CDS に AD 患者のような遺伝子変異は同定されていない。一方で、ヒト AD 患者同様に、CDS 罹患犬においてもネプリライシン発現量の低下が報告されている (Canudas et al., 2014)。さらに、イヌではタウ病理は生じないと考えられてきたが、近年、CDS 罹患犬の死後脳でもシナプスにおけるリン酸化 Tau が増加すること、さらには神経原線維変化が生じることが示された (Schmidt et al., 2015; Smolek et al., 2016)。また、イエネコの脳内でも神経原線維変化が認められている (Chambers et al., 2015)。

イヌ CDS は、重度に進行すると徘徊行動や昼夜問わず吠えを繰り返えず症状が顕在化し、症例犬および飼い主の QOL を著しく低下させる (Landsberg, 2005)。そして、ヒトの認知症同様、イヌ CDS にも予防法・治療法が存在していない。我々は、国内における家庭犬の CDS の実態を把握することを目的に、イヌの認知機能を評価する質問表 (Rofina et al., 2006; Fast et al., 2013) を用いた疫学調査を行った。その結果、CDS が疑われるイヌの割合は、8 歳以上で 21% であった (石井ら、2016) (表 1-4、図 1-8)。日本では寿命による自然死を望む文化が根付いており、「動物の愛護及び管理に関する法律」では家庭動物の終生飼養が明文化されている。日本の家庭犬の平均寿命は、2017 年の段階で 14.19 歳に達しており (一般社団法人ペットフード協会、2010 および 2017)、CDS 罹患犬は増加すると予想される。AD の克服が医療の重要課題であると同様に、イヌ CDS の克服は獣医療の重要な課題の一つである。したがって、AD 病態モデルマウスを用いる研究は、医療だけでなく獣医療にも貢献できると考えられるのである (図 1-9)。

1-15 本研究の目的

本研究では、神経変性疾患の一つである AD の病態モデルマウスを用いて、神経変性の発症機序の解明を目的に、2つの研究を行った（図 1-10）。

研究1（第2章）では、AD病態と小胞体ストレスの関係を再検証することを目的に、*App*^{M-*G-F*}マウスを含む複数系統の AD 病態モデルマウスを用いて、生化学および分子生物学的手法により小胞体ストレスマーカーを測定して比較検討を行った。一方、「アミロイド病理」「タウ病理」「神経の変性および細胞死」の各病理学的特徴を繋ぐ分子の探索を目的に、研究2（第3章）では、アミロイド病理が既存する脳内で Tau との相互作用が変動する因子として新たに同定されたタンパク質アルギニンメチル基転移酵素（PRMT）ファミリーの PRMT8に着目し、PRMT8が脳の神経病理に与える影響を検討した。AD病態モデルとして *App*^{M-*G-F*}マウスと *MAPT* KI マウスを掛け合わせた dKI マウスを用いて、PRMT8 遺伝子を欠損もしくは発現を増加させ、生化学的に Tau のリン酸化レベルを解析して、組織化学的に神経炎症と神経変性、神経細胞死に与える影響を解析した。最後に、総括（第4章）として、本研究の結果と現在の AD 研究動向を合わせて総合的に議論した。

第1章 図と表

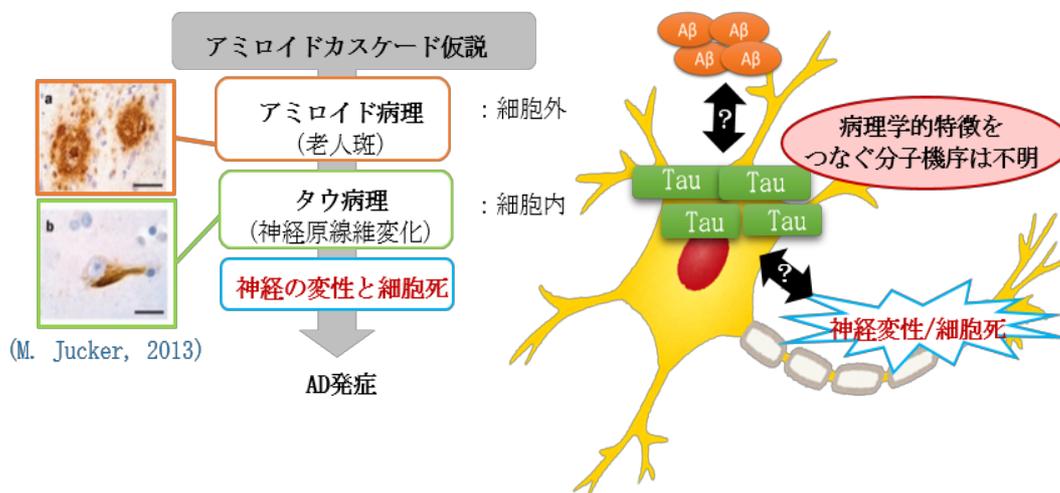


図 1-1 AD 発症に至るアミロイドカスケード仮説と未解明の問題

左写真はヒト AD 患者で認められる老人斑と神経原線維変化の病理画像 (Jucker and Walker, 2013) である。細胞外に蓄積する Aβ と細胞内に凝集する Tau、その後神経変性に至る分子機序は現在でも解明されていない。

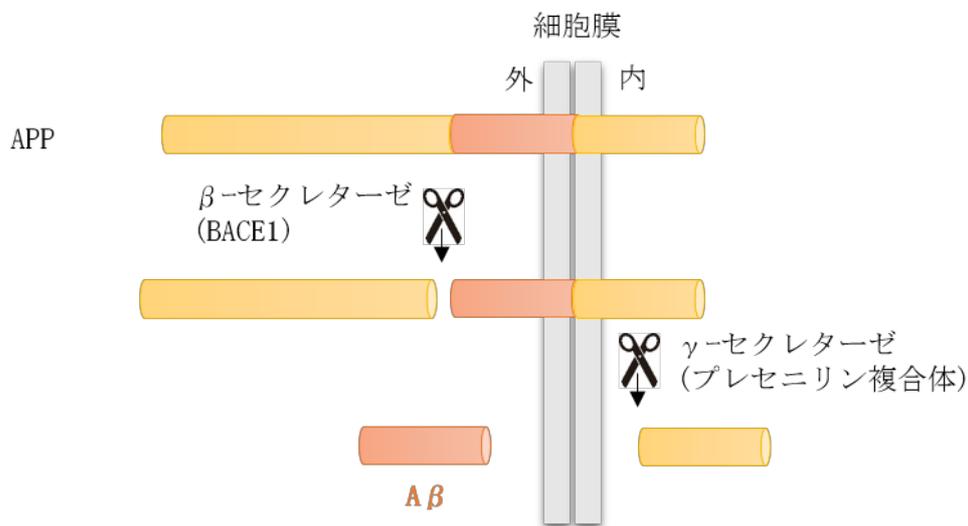


図 1-2 APP からの Aβ の切り出し

APP は細胞膜に存在し、β-セクレターゼとγ-セクレターゼにより切断される。この作用を受けて、Aβ が産生されて細胞外へと放出される。

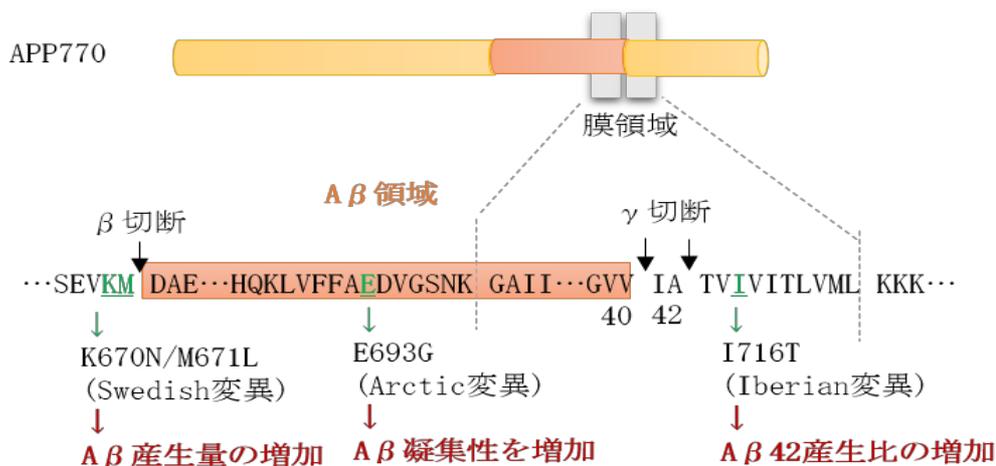


図 1-3 APP 遺伝子における家族性変異と Aβ への影響

ヒト家族性 AD で認められている、APP 遺伝子変異が同定されたアミノ酸残基の番号とその変異と Aβ に与える影響。Swedish 変異 (K670N/K671L) は総 Aβ 生産量を増加させ変異、Arctic 変異は Aβ の凝集性を高める変異、Iberian 変異 (I716F) は Aβ42 の産生比率を上昇させる変異である。

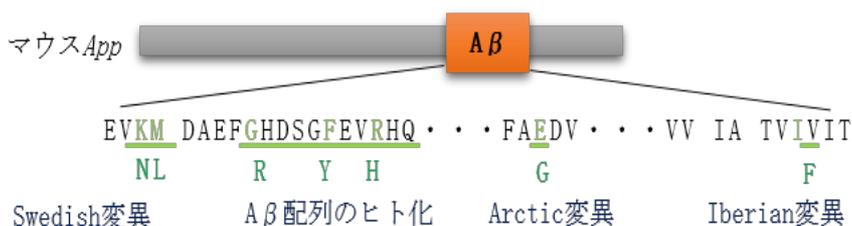


図 1-4 ヒト家族性 AD 変異を APP 遺伝子に導入して作製された App^{NL-G-F} マウス

App KI マウスは、ノックイン手法で APP 遺伝子に置き換えを行ったマウスである (緑が置き換えを行った箇所)。作製した 2 種類の App KI マウスのうち、 App^{NL-F} マウスは、マウス APP 遺伝子の Aβ 配列をヒト化したヒト家族性 AD 変異である Swedish 変異と Iberian 変異が導入されている。 App^{NL-G-F} マウスは、 App^{NL-F} マウスに Arctic 変異の導入をしたマウスである。

表 1-1 従来の AD 病態モデルマウスである APP-Tg マウスの問題点

<p>挿入遺伝子が内在性遺伝子の遺伝子を破壊する可能性があり、ホモ接合体での解析は行えない (Kuro-o et al., 1997; Verret et al., 2012; Saito et al., 2016)。</p>
<p>過剰産生された Aβ 以外の APP 断片は、細胞タンパク質と非生理学的に相互作用する可能性がある (Nicolas and Hassan, 2014; Kerridge et al., 2015)。</p>
<p>非特異的小胞体ストレスは APP / PS 過剰発現マウスに生じる可能性がある (Barbero-Camps et al., 2014; Chaudhari et al., 2014; Reinhardt et al., 2014; Borkham-Kamphorst et al., 2016)</p>
<p>AD 患者脳に見られるものとは異なる Aβ 蓄積が出現する可能性がある (Saido et al., 1995; Saito et al., 2016)。</p>
<p>変異を導入した APP 遺伝子の発現を誘導するプロモーターは、Tg マウスごとに異なるものが使用されている (Jucker and Walker, 2013; Höfling et al., 2016)。</p>
<p>同一系統のモデルマウスを使用しているにも関わらず、矛盾した薬物効果が認められる (Ohno, 2014; Duggan and McCarthy, 2016)。</p>
<p>特定の系統のマウスとの交雑により、若齢での死亡率が増加する (Carlson et al., 1997; Chishti et al., 2001)。</p>

Sasaguri らの報告 (Sasaguri et al., 2017) から抜粋・改変。赤字が小胞体ストレスに関連する論文。

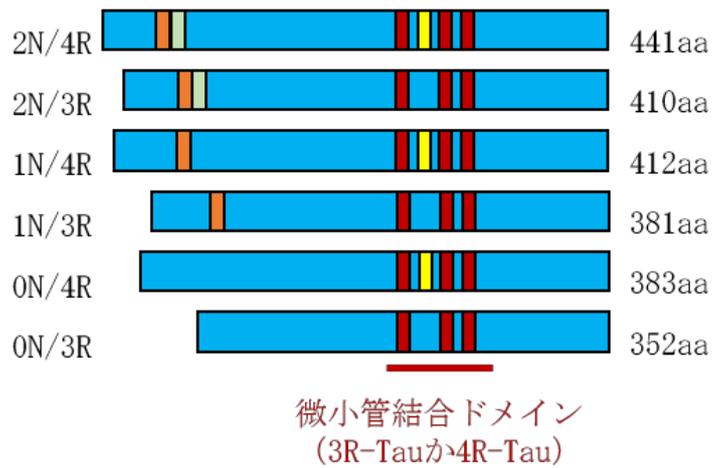


図 1-5 ヒト Tau のアイソフォーム

ヒト Tau の 6 種類のアイソフォームおよび各アイソフォームにおける選択的スプライシングが挿入される位置と微小管結合ドメインを示す。

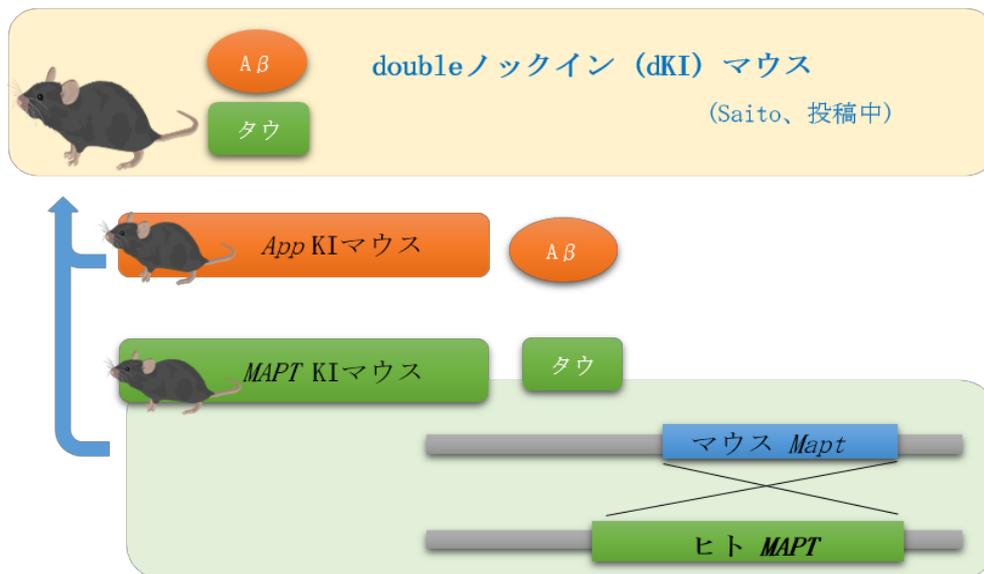


図 1-6 dKI マウス (double knock in マウス) の概要

App^{NL-G-F} マウスと *MAPT* KI マウスを掛け合わせて、dKI マウスが作製された。dKI マウスは、変異を有するヒト型 $A\beta$ の蓄積、および変異を有さないヒト型 Tau の発現を持つ。

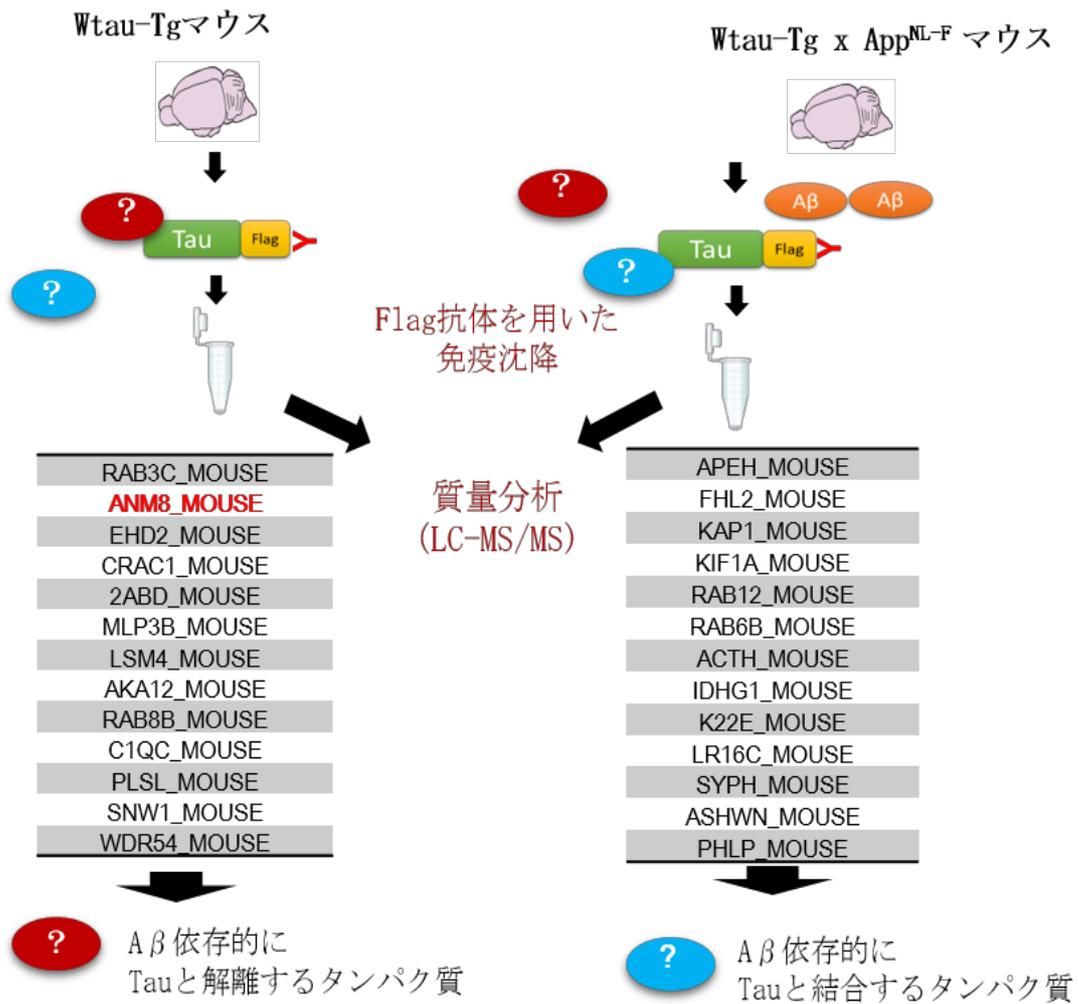


図 1-7 Aβ病理の存在下でTauとの相互作用が変動するタンパク質の探索

アミロイド病理の存在下においてTauとの結合性が変動する因子の探索が行われた。その結果、25因子が同定された。本研究（第3章）で注目したPRMT8はこのうち赤字で示した新規因子（ANM8_MOUSE）である。

表 1-2 ヒト AD および高齢イヌと加齢ラットで見られる AD 病理関連の病理学的変化

認められる病理学的特徴	ヒト AD	高齢 イヌ	加齢 ラット
A β 蓄積	+	+	-
アミロイド血管症	+	+	-
神経原線維変化	+	*	-
酸化ストレス障害	+	+	+
大脳皮質の萎縮	+	+	-
脳室の拡大	+	+	-
記憶障害	+	+	+
非認知行動の変化	+	+	+
A β 病理に付随する認知機能の低下	+	+	-

「+」は左項目の病理学的特徴が認められることを意味する。「-」は左項目の病理学的特徴認められないことを意味する。「*」は CDS イヌの死後脳で神経原線維変化が認められることを意味する (Smolek et al., 2016)。Araujo らの報告 (Araujo et al., 2005) を引用・改変。

表 1-3 ヒト、イヌ、マウスの A β 領域アミノ酸配列と寿命の関係

動物種	平均寿命(約)	A β のアミノ酸配列
ヒト	80 年	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
イヌ	15 年	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
マウス	2 年	DAEFGHDSGFEVRRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

赤字はマウスとヒトおよびイヌとで異なるアミノ酸残基を示す。APP KI マウスではこの3残基がヒト化されている。ヒトとイヌは平均寿命が大きく異なるにも関わらず、A β のアミノ酸配列は 100%同じである。Youssef らの報告(Youssef et al., 2016)を引用・改変。

表 1-4 イヌ認知機能評価の疫学調査で使用した質問表

① 食欲の変化		⑦認知(知覚)の変化	
変化なし	0	変化なし	0
今までより食欲が減った	1	家具にぶつかることがある	1
食欲の増え、下痢をする	2	狭い所を通ろうとすることがある	4
食欲が増え、下痢はしない	3	ドアの間違った側(蝶番側)を通ろうとする	4
② 飲水の変化		⑧自分が置かれている状況の判断力の変化	
変化なし	0	変化なし	0
以前より水を飲むようになった	2	新しい場所や散歩道で状況が判断できない	1
③ 排泄の変化		いつもの散歩道で状況が判断できない	3
変化なし	0	自宅で状況が判断できない	4
室内で排尿するようになった	1	⑨記憶力の変化	
自宅で排尿・排便するようになった	3	変化なし	0
④昼夜リズムの変化		馴染みのある人を認識できない	1
変化なし	0	休日の後に飼い主を認識できない	3
睡眠時間が増加した	1	日常的に飼い主を認識できない	4
日中に寝て、夜寝ない時間が増えた	2	⑩性格の変化	
⑤行動の変化		変化なし	0
目的の無い行動はしない	0	他の動物や子供に対して、攻撃的になった	2
空中を凝視するようになった	1	飼い主に対して、攻撃的になった	3
徘徊することが増えた (うろうろ歩きまわる)	2	点数とグレード	0点 : 異常なし 1-5点 : 軽度認知機能低下の疑いが強い 6点以上 : 認知機能低下 (CDS)
旋回することが増えた (ぐるぐる同じ場所で回る)	3		
⑥活動性や交流の変化			
変化なし	0		
活動性や交流性が減った	1		
飼い主や周りの環境への 反応が減った	3		

Rofina ら (Rofina et al., 2006) と Fast ら (Fast et al., 2013) の報告を参考に、日本の飼い主が利用できるように日本語で再構成した。

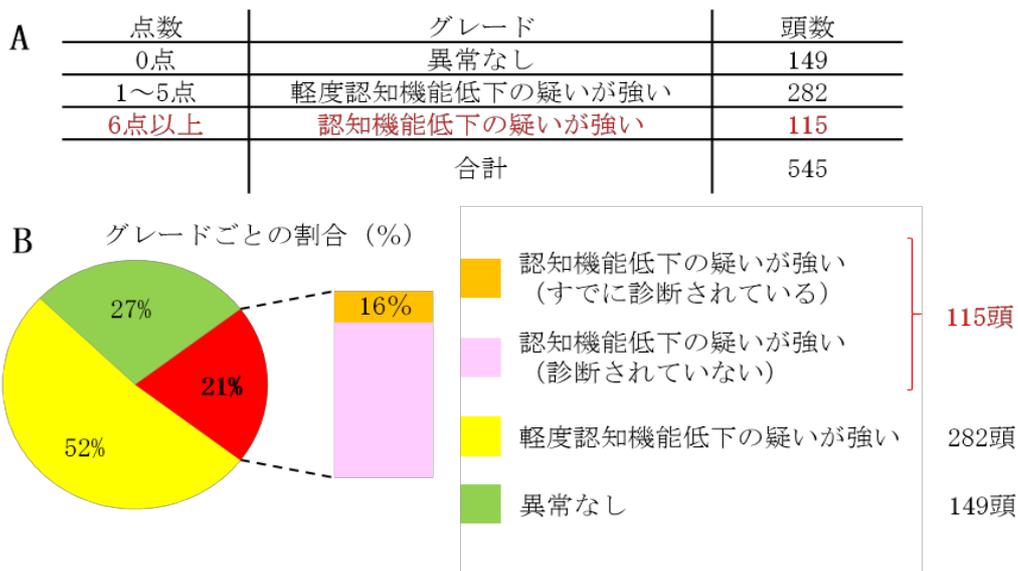


図 1-8 我が国の 8 歳以上の家庭犬における認知機能低下の疫学調査結果

A: 認知症レベル (グレード) ごとの頭数。B: 円グラフは各グレードの割合。6 点以上 (21%) は赤、1-5 点は黄色 (52%)、0 点は緑 (27%) で色分けした。オレンジ (16%) は、6 点以上に分類された 115 頭のなかで動物病院で CDS と診断を受けた個体の割合。

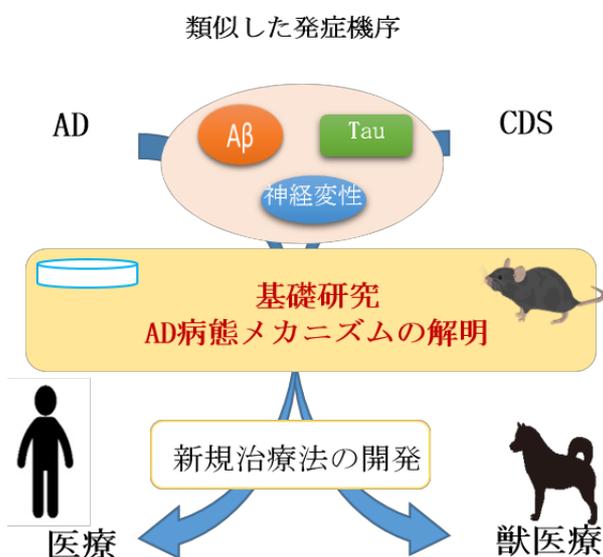


図 1-9 AD とイヌ CDS の共通性

AD とイヌ CDS には共通した神経病理学的特徴が認められることから、AD 発症機序の解明は、獣医療にも有用であると考えられる。

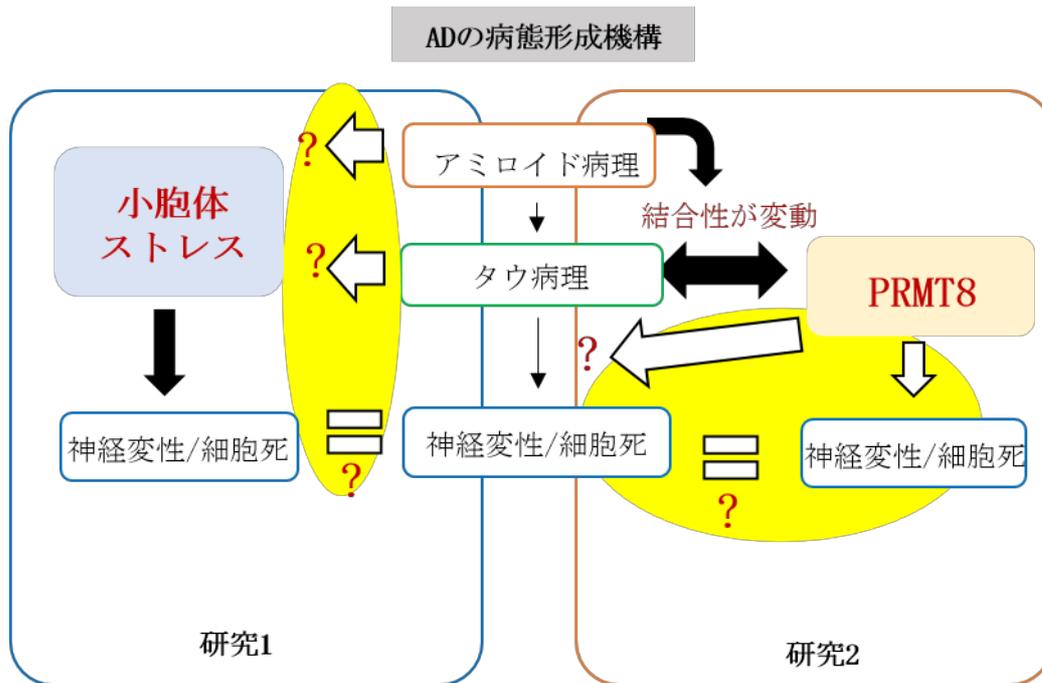


図 1-10 本研究の概要

本研究の概要を示した相関図。研究1（第2章）では、従来のAD病態モデルマウスにおける研究からAD病態の重要な病態変化と考えられている小胞体ストレスについて再検討を行なった。研究2（第3章）では、アミロイド病理の存在下においてTauとの結合性が変動する因子として同定されたPRMT8に注目して解析を行った。

第2章

研究1

AD病態と小胞体ストレスの関係の再検証

2-1 緒言

小胞体に異常タンパク質の蓄積やカルシウム濃度の変動などの負荷が加わると、小胞体内の機能が障害され、小胞体の内腔に折りたたみ不全のタンパク質が蓄積する小胞体ストレス状態となる。この小胞体ストレスを回避するため細胞は小胞体ストレス応答を活性化させる。小胞体ストレス応答では、小胞体膜上に存在する3つの膜貫通シグナリングタンパク質である Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)、activating transcription factor (ATF)6、および inositol-requiring 1 (IRE1)が小胞体ストレスセンサーとして働く (Hashimoto and Saido, 2018) (図 2-1)。

通常、これら膜貫通タンパク質の小胞体内腔側に glucose-regulated protein 78 (GRP78)が結合しているが、小胞体ストレスが惹起されると膜貫通タンパク質より GRP78 が解離して小胞体ストレス応答が開始される。3つの経路のうち1つ目の経路では、PERK の多量化・自己リン酸化が生じ、リン酸化 PERK (p-PERK) により eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α) がリン酸化される。このリン酸化により、eIF2 α の翻訳開始複合体の形成が阻害され、タンパク質の合成が抑制される (Harding et al., 2000)。2つ目の経路では、ATF6 が小胞体からゴルジ体に輸送され、プロテアーゼにより膜内切断を受ける。細胞質側の ATF6 切断断片は転写因子として核に移行して、小胞体シャペロンである GPR78 やタンパク質折りたたみ酵素である protein disulfide isomerases (PDIs) の発現を促し、タンパク質の折りたたみ不全を是正する (Haze et al., 1999)。3つ目の経路では、IRE1 の二量体・自己リン酸化が生じ、リン酸化 IRE1 は転写因子 X-box binding protein 1 (XBP1) mRNA のイントロンを切り出すことでフレームシフトを生じさせ、C 末端に転写促進因子を持つスプライス型 XBP1 mRNA を発現させる。スプライス型 XBP1 は核に移行し、シャペロンタンパク質の発現を誘導し、タンパク質の正しい折りたたみが促進される (Yoshida et al., 2001)。一方、それぞれの経路を介して転写因子 C/EBP-homologous protein (CHOP) の発現が誘導されると、アポトーシスが生じる (Harding et

al., 2000)。

AD 病態において、 $A\beta$ によって誘発された小胞体ストレスが神経細胞死に關与する可能性が示されている (Hitomi et al., 2004; Costa et al., 2013; Kang et al., 2013)。これまで、複数の AD 病態モデルマウスを用いた調査が行われている (図 2-2)。複数の家族性 AD 変異を導入した APP 遺伝子と PS1 遺伝子を過剰発現する 5XFAD マウスでは、p-IF2 α およびスプライス型 XBP1 mRNA の発現量増加が認められる (O' Connor et al., 2008; Reinhardt et al., 2014)。また、変異型 APP と PS1 を過剰発現する APP/PS1 マウスは、加齢に伴い GRP78、p-PERK、p-eIF2 α と CHOP の発現量増加を示す (Barbero-Camps et al., 2014)。一方、変異型の APP、PS1 の発現に加えて、変異型 Tau を発現する 3xTg-AD マウスでも GRP78 の上昇が認められているが、同じ月齢でも雄雌で結果が一致していない (Soejima et al., 2013)。また、AD 患者の死後の脳で GRP78 が上昇しないことや (Katayama et al., 1999)、変異型 APP を単独で過剰発現する Tg2576 マウスでは、GRP78、PDI、および CHOP の発現量が上昇しないことが示されている (Lee et al., 2010)。これまでに、膜タンパク質の過剰発現が、細胞質カルシウム濃度を上昇させて慢性的な小胞体ストレスを惹起することが示されている (Chaudhari et al., 2014)。したがって、変異型 APP と PS1 の二重過剰発現マウスで認められる小胞体ストレスの上昇は、膜タンパク質の過剰発現に由来するアーチファクトである可能性がある。AD 病態モデルマウスでみられる小胞体ストレス上昇は、 $A\beta$ 蓄積、APP の過剰発現、変異型 PS1 の発現、さらにタウ病理による影響ではないかと考えられるのである。

そこで、研究 1 では「AD 病態と小胞体ストレスの再検証」を行うために、以下の 2 つの実験を行った (図 2-3)。

実験 1 では、 $A\beta$ 蓄積もしくは APP の過剰発現が小胞体ストレスに与える影響を明らかにするため、WT マウスと、APP の過剰発現を伴わない *App*^{ML-G-F} マウス、また APP 単独の過剰発現モデルである APP23 と Tg2576 マウスを用いて、生化学的・分子生物学的手法により小胞体ストレスマーカーの発現量を測定して比較した。また、変異型 PS1 の発現が小胞体

ストレスに与える影響を検討するため、小胞体ストレスマーカーの上昇が報告されている APP/PS1 と 3xTg-AD マウスを使用し、小胞体ストレスマーカーの変化について検証を行った。全体の対照実験として、初代培養神経細胞および Neuro2A 細胞に小胞体ストレスを誘導するタブシガルギンを添加して実験的に小胞体ストレスを誘導させて、AD モデルマスの脳と比較した。

実験 2 では、タウ病理が小胞体ストレスに与える影響を解析するため、WT マウスとタウ病態モデル (P301S-Tau-Tg) マウスを用いて、実験 1 と同様の手法で、小胞体ストレスマーカー発現量を測定して統計学的な比較を行った。

2-2 材料と方法

実験 1 と実験 2 の全ての実験は、国立研究開発法人理化学研究所（和光市）（以下、理研）において「理化学研究所ガイドライン」に従って実施した（遺伝子組換え実験承認番号：2016-043（3）、動物実験承認番号：H27-2-209（2））。

実験に使用した動物は、理研の実験動物飼養保管施設において、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数 15 回/時間、オールフレッシュ方式、明期 12 時間（午前 8:00～午後 8:00）、暗期 12 時間（午後 8:00～午前 8:00）の条件下で飼養保管した。給水は自由給水、飼料はペレット状固形飼料を用いた。

研究 1 で使用した AD 病態モデルマウスの名称、各モデルマウスに導入されている遺伝子変異を表 2-1 に示した。また、研究 1 で使用した AD 病態モデルマウスで認められる各種病理変化（ $A\beta$ 蓄積、ミクログリアの活性化、シナプス消失、神経原線維変化）と、認知機能低下が生じる月齢を図 2-4 に示した。

実験 1： $A\beta$ 蓄積と APP 過剰発現が小胞体ストレス誘導に与える影響

供与動物

野生型 (WT) マウス

WT マウスは、繁殖業者（C57BL/6、日本エスエルシー、静岡）から導入後、西道チームで繁殖・維持されている 6 ヶ月齢と 14 ヶ月齢の雄マウスを 3 頭ずつ使用した。

APP の過剰発現を伴わない App^{NL-G-F} マウス

APP の過剰発現を伴わず $A\beta$ 蓄積が小胞体ストレスに与える影響を解析するため、ノックイン手法でマウス APP 遺伝子の $A\beta$ 配列をヒト化し、さらに家族性 AD 変異に導入でヒト型 $A\beta$ 蓄積を示す、 App^{NL-G-F} マウス (Saito et al., 2014) を使用した。

App^{NL-G-F} マウスでは $A\beta$ の蓄積が 2 ヶ月齢より認められ、9 ヶ月齢までに梨状皮質と海馬の全体に広がることを確認されている。そこで、実験には 6 ヶ月齢と 14 ヶ月齢の App^{NL-G-F}

マウスを使用した。各月齢の雄マウスを3頭ずつ使用した。

APP を過剰発現する APP23 マウス

APP 単独の過剰発現が小胞体ストレスに与える影響を解析するために、APP (Swedish 変異) を過剰に発現する APP23 マウス (Sturchler-Pierrat et al., 1997) を使用した (6 ヶ月齢、雄マウス3頭)。

APP を過剰発現する Tg2576 マウス

APP 単独の過剰発現が小胞体ストレスに与える影響を解析するために、APP23 と同様に、APP (Swedish 変異) を過剰発現する Tg2576 マウス (Hsiao et al., 1996a) (Hsiao et al., 1996b) を使用した (6 ヶ月齢、雄マウス3頭)。

APP と PS1 を過剰発現する APP/PS1 マウス

変異型 PS1 の発現が小胞体ストレスに与える影響を解析するため、APP (Swedish 変異) と PS1 (エクソン9欠損) を過剰発現する APP^{swe}/PSEN1^{dE9} (APP/PS1) マウス (Jankowsky et al., 2001) を使用した。APP/PS1 マウスは、小胞体ストレスの上昇が報告されている AD 病態モデルマウスである (Barbero-Camps et al., 2014)。実験には、6 ヶ月齢と 21 ヶ月齢の APP/PS1 マウス (雄) を1頭ずつ、6 ヶ月齢の WT マウス (雄) を1頭使用した。

APP を過剰発現し、変異型 PS1 を発現する 3xTg-AD マウス

変異型 PS1 の発現が小胞体ストレスに与える影響を解析するため、APP (Swedish 変異) と Tau (P301L 変異) を過剰に発現し、M146V 変異がノックインされた PS1 を発現する 3xTg-AD マウス (Oddo et al., 2003) を使用した。3xTg-AD マウスは、先行研究によって小胞体ストレス上昇が報告されている AD 病態モデルマウスである (Soejima et al., 2013)。実験には、23 ヶ月齢の雄マウス1頭と、同月齢の WT マウスを1頭使用した。

APP/PS1 マウス、3xTg-AD マウス、同月齢の WT マウスは、早稲田大学・先進理工学部生命医科学科・大島登志男博士より供与された。

マウス脳組織の取り出しと処理

ペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル、Cat# SOM02-YA1312、共立製薬、東京）(100mg/kg)の腹腔内投与で麻酔をかけた。痛覚消失を確認した後、氷冷したリン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline；以下PBS）（pH 7.4、Cat# T9181、タカラバイオ）を用いて経心臓法で灌流した。その後、素早く断頭して全脳を取り出した。摘出した脳は、左右半球に分割して、小脳と延髄を取り除き、大脳皮質と海馬に分けて、液体窒素で凍結してウエスタンブロット解析とスプライシング解析に使用するまで-80℃で保存した。

-80℃保存した大脳皮質と海馬の標本を解凍し、タンパク質抽出用緩衝液（pH 7.5、50 mM トリス塩酸緩衝液、150 mM 塩化ナトリウム、1%プロテアーゼ阻害剤、1%ホスファターゼ阻害剤、および1% Triton-X 100）を加えた。引き続き、マルチビーズショッカーで20秒間の破碎を行ない、15分間遠心（20400 g、4℃）し、上清を抽出してタンパク質抽出液とした。抽出したサンプルのタンパク質濃度は、BCAタンパク質アッセイキット（Cat# 23227、Thermo Fisher Scientific、USA）を用いて測定した。測定した濃度を元にして、タンパク質抽出液に対して4倍希釈になるように試料用緩衝液（2ME+）（x4）（Cat# 191-13272、富士フイルム和光純薬）を混合し、ウエスタンブロット解析用のサンプルとした。

培養細胞

小胞体ストレスマーカーの上昇が正しく検出されていることを確認するために、初代培養神経細胞とマウス神経芽細胞腫（Neuro2A）細胞を用いて薬剤添加による人為的小胞体ストレスの誘導を行い、AD病態モデルマウスの脳サンプルと平行して小胞体ストレスマーカーの検出を行った。

初代培養神経細胞の作成

妊娠 18 日目のマウス (C57BL/6J、日本エスエルシー) の子宮から胎仔を取り出して、実体顕微鏡下で胎仔の頭蓋骨を切開して脳を摘出した。次いで、脳表面の髄膜を剥離して脳組織を培養液 (Hanks' Balanced Salt Solution ; HBSS、Cat# 17460-15、ナカライテスク) の入ったシャーレに浸漬して集めた。氷上に置いたシャーレの中でメスを用いて脳組織を細切し、細切した組織を 15 mL の遠心チューブに移し替え、そこに 0.25%トリプシンを加え、37°Cで 15 分間振とうさせて脳組織を分散させた。その後、細胞の収集率を上げる目的で DNase (1%) を加えた。ピペッティングにより混和した後、3 分間遠心 (1500 g、4°C) した。遠心した後に上清を取り除いて、DNase (1%) を含む HBSS を添加し、温水中 (37°C) で 5 分間静置した。静置した後に 3 分間遠心 (1500 g、室温) し、上清を取り除き、細胞の生存率を上げる目的で 2% B27 サプリメント (Cat# 17504044、Thermo Fisher Scientific) と 0.5 mM L-グルタミン (Cat# 25030149、Thermo Fisher Scientific) を含む Neurobasal medium (Cat# 21103-049、Thermo Fisher Scientific) を添加した。その後、直径 100 μm のメッシュ (Cat# 352360、Falcon、USA) でろ過して、最終的に採集した細胞数を数えた。ポリ-L-リシン溶液 (Cat# P4707、Merck、Germany) で 37°C一晩コーティングして洗浄処理を行った 60mm 細胞培養プレートに、 1.0×10^6 / mL の密度で細胞を播種した。その後、実験に用いるまで、インキュベーター (37°C、5% CO₂/ 95% O₂) で 7 日間培養を行った。

マウス神経芽細胞腫

小胞体ストレス検出の陽性反応を確認するために、初代培養神経細胞に加えて、西道チームで継代・維持されている Neuro2A 細胞 (Shirotani et al., 2001) を使用した。
-80°Cで凍結保存されている Neuro2A 細胞を室温に戻して、10% 非働化ウシ胎児血清、ペニシリン-ストレプトマイシン混合液 (Cat# 09367-34、ナカライテスク) を含む培養液 (Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM、Cat# 11995065、Thermo Fisher Scientific)

で培養を開始して、実験に用いるまでの7日間、37°C (5% CO₂/95% O₂) の環境で静置した。この間3日間隔で培養液の交換を2回行った。

培養細胞への小胞体ストレスの誘導

初代培養神経細胞と Neuro2A 細胞への小胞体ストレスの誘導は、Ca²⁺-ATPase 阻害剤であり細胞内カルシウム恒常性を攪乱させる試薬であるタプシガルギンを使用した (Rogers et al., 1995)。

7日間培養した初代培養神経細胞に対して2 μM タプシガルギン (Cat# 33637-31、ナカライテスク) を添加して8時間反応させた。一方、7日間培養した Neuro2A 細胞に5 μM タプシガルギンを添加して18時間反応させた。初代培養神経細胞と Neuro2A 細胞の上清を回収した後に PBS で洗浄し、その後タンパク質抽出用緩衝液を加えてウエスタンブロット解析用のサンプルとしての細胞を回収した。回収した細胞は、超音波ホモジナイザーを用いて10秒間×2回で破碎処理した。処理後の細胞は、マウス脳組織と同様の手法でサンプルの調製を行った。

ウエスタンブロット解析

各系統マウスおよび細胞における小胞体ストレスマーカー発現量を比較するため、小胞体ストレスマーカー (GRP78、PDI、CHOP、p-eIF2α) と、内在性コントロール (eIF2α、β-actin) のタンパク質をウエスタンブロット解析で測定した。また、各系統マウスの APP タンパク質、APP/PS1 と 3xTg-AD マウスの PS1 タンパク質の検出を行った。

大脳皮質、海馬、初代培養神経細胞、および Neuro2A 細胞から調製したウエスタンブロット解析用のサンプルは、7.5~15%の SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて、電気泳動 (20 mA 定電流、室温、約 90 分間) を行った。泳動後のゲルに含まれるタンパク質は、100% メタノールで処理した 0.45 μm PVDF メンブレン (Cat# IPVH00010、Merck) に、セミドライ式ブロッタターを用いて転写した (126mA 定電流、室温、約 65 分間)。転写後のメンブレ

ンは、ECL Prime Blocking Reagent (Cat# RPN418、GE Healthcare、USA)を含む Tween20 含有トリス緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline containing Tween 20 ; TBST、pH 7.6、Cat# T9142、タカラバイオ) と室温で 30 分間反応させてブロッキングを行った。その後メンブレンをブロッキング溶液で希釈した一次抗体 (表 2-2) に 4°C で一晩反応させた。反応後、メンブレンを TBST 中で 5 分間×3 回洗浄して、ブロッキング溶液で希釈した HRP 標識二次抗体の Anti-Rabbit IgG (Cat# NA9340、GE Healthcare) と、Anti-Mouse IgG (Cat# NA9310、GE Healthcare) に室温で 1 時間反応させた。二次抗体への反応後、メンブレンを TBST 中で 5 分間×3 回洗浄し、ECL Select Western Blotting Detection Reagent (Cat# RPN2235、GE Healthcare) を用いて発色反応させた。メンブレン上のバンドは、CCD イメージセンサ (ImageQuant LAS 4000mini ; GE Healthcare) によって検出した。

ウエスタンブロット解析で得られたバンド強度の定量は、画像解析ソフト (Image Studio Software ; LI-COR、USA) を用いて算出した。GRP78、CHOP、PDI のバンドの数値は、 β -actin のバンドの数値で補正した。p-eIF2 α のバンドの数値は、eIF2 α のバンドの数値で補正した。

スプライシング解析

各系統マウスの脳、および培養細胞における小胞体ストレスマーカー発現量を比較するため、小胞体ストレスにより発現が誘導されるスプライス型 XBP1 mRNA の検出を以下の方法で行った。

Total RNA の抽出

大脳皮質、初代培養神経細胞、および Neuro2A 細胞に、RNA 抽出試薬 (RNAiso Plus ; Cat# 9108、タカラバイオ) を添加して破碎処理をした。処理した細胞は、5 分間遠心 (12,000g、室温) し、遠心後に上清を回収した。回収した上清にクロロホルムを加えて攪拌し、5 分間室温で静置し、15 分間遠心 (12,000g、室温) し、上層を分注した。分注した溶

液にイソプロパノールを加えて攪拌し、10 分間室温で静置し、10 分間遠心 (12,000g、室温) した後に、沈殿したペレットに氷冷した 70%エタノールを加えて攪拌し、5 分間遠心 (12,000g、室温) し、風乾させて水分を取り除いた後に、RNase free water に溶解した。65°Cで 5 分間静置した後、氷上に移動させて RNA を変性させた後に、超微量分光計 (NanoDrop ND-100 Spectrophotometer ; Thermo Fisher Scientific) を用いて、RNA 濃度を測定した。

cDNA の合成

cDNA の合成は、RNA と逆転写酵素、および Oligo dT Primer (PrimeScript RT-PCR Kit、Cat# RR014A、タカラバイオ) を用いて、30°Cで 10 分間、42°Cで 60 分間、次いで 70°Cで 10 分間、逆転写反応を行った。

XBP1 mRNA スプライシング解析

XBP1 特異的プライマー (5'-acacgcttggaatggacac-3') と (5'-ccatgggaagatgttctctggg-3') で、PCR 酵素 (KOD FX Neo、Cat# KFX-201、東洋紡、大阪) を用いて、94°C2 分間を 1 サイクル、98°C10 秒間・50°C30 秒間・68°C1 分間を 40 サイクルの PCR 反応を行った。2% アガロースゲル電気泳動を行い、分子画像装置 (Gel Doc EZ Imager ; Bio-Rad、USA) を用いて、それぞれ非スプライス型 XBP1 mRNA (152 bp) とスプライス型 XBP1 mRNA (126 bp) の PCR 産物を検出した。XBP1 mRNA スプライシング解析で得られたバンド強度の定量は、画像解析ソフト (Image Studio Software ; LI-COR、USA) を用いて算出し、スプライシング効率は非スプライス型に対するスプライス型の比として数値化した。

統計処理

6 ヶ月齢と 14 ヶ月齢の WT、*App*^{NL-G-F} マウスの多重比較、6 ヶ月齢の WT、*App*^{NL-G-F}、APP23、および Tg2576 マウスの多重比較は、一元配置分散分析とテューキーの検定を用いて行い、グ

ラフは平均値±標準誤差で表した。ウエスタンブロット解析の結果は、6ヶ月齢のWTマウスの平均値を1.0として、比較するマウスの数値との相対値で示した。

実験2：タウ病理が小胞体ストレスに与える影響

供試動物

タウ病態モデルマウス (P301S-Tau-Tg マウス)

タウ病理と小胞体ストレスの関係を検討するために、FTDP-17に関連する変異であるP301S変異が導入されたTauを発現するP301S-Tau-Tgマウスを用いた。このマウスは、タウ病理に付随する神経細胞死による脳萎縮を9~12ヶ月齢で示すことが報告されている(Yoshiyama et al., 2007)。タウ病理が生じる以前の月齢(3ヶ月齢)から、脳萎縮が生じた後の月齢(15ヶ月齢)にかけての小胞体ストレスを確認するために、3、6、9、12、および15ヶ月齢(それぞれ3頭ずつ)の雌マウスを使用した。

野生型(WT)マウス

WTマウスは、P301S-Tau-Tgマウスと同じ月齢(3、6、9、12および15ヶ月齢)の雌を3頭ずつ使用した。

マウス脳組織の取り出しと処理

動物はペントバルビタールナトリウム(100 mg/kg)の腹腔内投与で麻酔した。以下、脳の取り出、脳の保存、脳組織のサンプル調製は、実験1と同じ方法で行った。

ウエスタンブロット解析

WTマウスとP301S-Tau-Tgマウスの小胞体ストレスマーカー発現量を比較するため、ウエスタンブロット解析で、Tau、小胞体ストレスマーカー(GRP78、PDI、CHOP、p-eIF2 α)、

内在性コントロール(eIF2 α 、 β -actin)のタンパク質の検出を行った。ウエスタンブロット解析は、実験1と同じ方法で行った。

スプライシング解析

WT マウスと P301S-Tau-Tg マウスにおける小胞体ストレスマーカー発現量を比較するため、小胞体ストレスで発現誘導されるスプライス型 XBP1 mRNA の検出を行った。スプライシング解析は、実験1と同じ方法で行った。

統計処理

WT マウス、および P301S-Tau-Tg マウスの多重比較は、一元配置分散分析とテューキーの検定を用いて行い、グラフは平均値 \pm 標準誤差で表した。ウエスタンブロット解析の結果は、3ヶ月齢WT マウスの平均値を1.0として、比較する各系統マウスの数値を相対値として示した。

2-3 結果

2-3-1 実験1：A β 蓄積とAPP過剰発現が小胞体ストレスに与える影響

A β 蓄積が小胞体ストレスに与える影響

若齢および高齢の WT マウスと *App*^{NL-G-F} マウス的大脑皮質を用いて、ウエスタンブロット解析を行った結果を図 2-5 に示す。APP の発現量は、WT と *App*^{NL-G-F} マウスで同等であった。また、小胞体ストレスマーカーである GRP78、CHOP、PDI、および p-eIF2 α の発現量を定量し比較したところ、若齢および高齢の WT マウスと *App*^{NL-G-F} マウスの間で統計学的な有意差が認められなかった (図 2-6)。一方、APP/PS1 マウスでは、WT マウスと比べて APP および、SP1 の発現量の増加が認められた。また、6 ヶ月齢の WT マウスの各小胞体ストレスマーカーの発現量を 1.00 とした場合、同月齢の APP/PS1 マウスの発現量は、GRP78 が 1.16、CHOP が 1.04、PDI が 1.24、p-eIF2 α が 1.44 といずれも上昇していた (図 2-5)。タブシガルギンを加えたマウス初代培養神経細胞と Neuro2A 培養細胞において、無処置の細胞と比べて小胞体ストレスマーカーの発現量の上昇が認められた。したがって、本実験の小胞体ストレスマーカー解析は正しく行われていたことを示している。

また、XBP1 mRNA スプライシング解析において、タブシガルギンを添加した細胞では 126bp のスプライス型 XBP1 mRNA の発現誘導が認められた。しかし、若齢および高齢の WT マウスと *App*^{NL-G-F} マウスの間で、スプライス型 XBP1 mRNA 発現量に有意差は認められなかった (図 2-7)。

APP 過剰発現が小胞体ストレスに与える影響

WT マウス、*App*^{NL-G-F} マウス、APP23 マウスおよび Tg2576 マウス (いずれも 6 ヶ月齢) の大脑皮質における小胞体ストレスマーカータンパク量を比較したところ、4 群の間で統計学的な有意差は認められなかった (図 2-5、2-8)。同様に、WT マウス、*App*^{NL-G-F} マウス、APP23 マウスおよび Tg2576 マウスの間で、スプライス型 XBP1 mRNA 発現量に統計学的な有意差は認められなかった (図 2-7)。

海馬における結果も大脳皮質の結果と同様、WT マウス、*App*^{M-G-F} マウス、APP23 マウスおよび Tg2576 マウス（いずれも 6 ヶ月齢）における小胞体ストレスマーカータンパク量に統計学的な有意差は認められなかった（図 2-9、2-10）。

これとは対照的に、WT マウス海馬の p-eIF2 α の発現量を 1.00 として比較したところ、APP/PS1 マウス（6 ヶ月齢）では発現量が 1.48、APP/PS1 マウス（21 ヶ月齢の）では発現量が 1.49 にいずれも上昇していた。また、WT マウスの各小胞体ストレスマーカーの発現量を 1.00 としたて比較したところ、3xTg-AD マウス（6 ヶ月齢）では GRP78 が 1.47、CHOP が 16.73、PDI が 1.21、p-eIF2 α が 1.18 と、いずれも上昇していた（図 2-9）。

2-3-2 実験 2：タウ病理が小胞体ストレスに与える影響

WT マウスと P301S-Tau-Tg マウス（3~15 ヶ月齢）の大脳皮質を用いて行ったウエスタンブロット解析の結果を図 2-11 に示した。小胞体ストレスマーカーのタンパク量は、3、6、9、12、15 ヶ月齢の WT マウスと P301S-Tau-Tg マウスの間で有意な差は認められなかった。

同様に、スプライス型 XBP1 発現量においても、WT マウスと P301S-Tau-Tg マウス（3~15 ヶ月齢）の間で統計学的な有意差は認められなかった（図 2-12）。

また、12 ヶ月齢の WT マウスと P301S-Tau-Tg マウスの海馬においても、小胞体ストレスマーカーの上昇は認められなかった（図 2-13）。

2-4 考察

本研究では、*App*^{NL-G-F}マウス、2系統のAPP過剰発現マウスを含む複数のAD病態マウスを用いて、APP、PS1、Tauの存在が脳皮質および海馬における小胞体ストレスの誘導とどのように関連しているのか検討した。

実験1において、*App*^{NL-G-F}マウスにおいて月齢に伴い進行するアミロイド病理、および過剰産生されたAPPタンパク質のいずれも小胞体ストレスは上昇させないことが明らかとなった (Hashimoto et al., 2018; 石井ら, 2018a)。したがって、アミロイド病理は小胞体ストレスを上昇させる直接的な原因では無い可能性が示された。類似の報告として、LeeらによるAPP単一の過剰発現モデル Tg2576 マウスでは小胞体ストレスが惹起されないことが示されている (Lee et al., 2010)。すなわち、APPとPS1に変異が導入された複数系統の二重過剰発現マウスで報告されている小胞体ストレスの上昇は、AD病態において必須の病態変化ではないことが推察される。これを裏付けるためには、変異型PS1ノックインマウスにおける小胞体ストレスマーカーの発現量を測定する必要があると考えられる。以前の報告において、PSは9回膜貫通型ドメインを有するため、変異型PS1の過剰発現は小胞体膜選択的に影響を与える可能性が示唆されている (Annaert et al., 1999; Area-Gomez et al., 2009)。通常、PS1は小胞体のカルシウム恒常性の調整に関与する (Zhang et al., 2010; Honarnejad and Herms, 2012)。さらに、PS1は細胞質内から小胞体膜へのカルシウム流入を担う筋小胞体カルシウムポンプだけでなく、小胞体関連カルシウムチャンネルであるイノシトール三リン酸受容体と、リアノジン受容体の機能を調整する (Guo et al., 1996; Chan et al., 2000; Stutzmann et al., 2004; Green et al., 2008)。さらに、家族性ADに関連するPS1変異は、カルシウムの流入を変動させることが示されている (Zhang et al., 2010; Honarnejad and Herms, 2012)。

先行研究によって、タプシガルギンに暴露された培養神経細胞では、小胞体内カルシウム濃度の変動により小胞体ストレスが強く誘発されることが報告されている (Rogers et al., 1995)。このことは、変異型PS1がカルシウムの流入を変えて小胞体内カルシウム濃

度の変動が生じることで小胞体ストレスが惹起されることを示唆している。実際、変異型 PS1 ノックインマウスの線維芽細胞および初代培養神経細胞を用いた研究において、家族性 AD に関連する PS1 変異は小胞体ストレス応答の活性化を遅延させることが示されており (Katayama et al., 1999; Sato et al., 2000)、初代培養神経細胞における PS1 の欠損および過剰発現が小胞体ストレス応答を変化させる (Sato et al., 2000; Terro et al., 2002)。

本実験と先行研究の結果を合わせると、APP と PS1 の二重遺伝子変異を有するマウスにおいて認められる小胞体ストレスの上昇は、AD 病態とは直接関係せずに生じている可能性が推察される。さらに、APP と PS1 の二重遺伝子変異を有するマウスによる結果も、小胞体ストレスは A β 病理には関係がない PS1 変異により生じた可能性がある。APP と PS1 の二重遺伝子変異を有する AD 病態マウスは複数存在するが、本実験で使用した APP/PS1 マウスは Barbero-Camps らと同様のマウス (Jankowsky et al., 2001; Barbero-Camps et al., 2014) を使用したにも関わらず小胞体ストレスの亢進は示さなかった。APP 過剰発現モデルである Tg2576 マウスでは、表現型の出現率がマウスの遺伝的背景によって影響を受けることが指摘されている (Lassalle et al., 2008)。さらに、APP/PS1 マウスの継代が繰り返されたことにより、APP および PS1 タンパク質の発現量が低下した可能性も推察される。

また、実験 2 によって、Tau を過剰発現するタウオパチー病態モデルである P301S-Tau-Tg マウスでも、小胞体ストレスが惹起されないことが明らかとなった。この結果より、タウ病理を介した神経変性に小胞体ストレスは関与しない可能性が示唆される。また、APP や PS1 と異なり Tau は膜タンパク質ではないため、Tau の過剰発現が小胞体ストレスを惹起しないという結果は、膜タンパクの過剰発現が小胞体ストレスを惹起するという結果 (Barbero-Camps et al., 2014) に矛盾しない。

これまで、AD 患者の死後脳において小胞体ストレスの上昇が認められているが (O' Connor et al., 2008; Nijholt et al., 2011; Chang et al., 2002)、その一方で AD

患者死後脳における GRP78 の顕著な減少が報告されている (Katayama et al., 1999)。AD 患者の脳神経細胞は、標本採取前にリソソームおよびミトコンドリアの損傷に付随する変性が生じている可能性があり、mRNA およびタンパク質の死後分解は健常者と AD 患者の間で異なると推測される。マウス死後脳においても、カルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインの非生理的な活性化が報告されている (Saito et al., 2016)。加えて、カルシウム濃度およびカルシウム関連応答は死後の環境下で変動することも知られており、死後脳サンプルを使用した mRNA およびタンパク質の解析および小胞体ストレスの結果の評価には注意が必要だと考えられる。

本研究より、「アミロイド病理およびタウ病理は必ずしも小胞体ストレスの惹起しない」可能性が示された。この結果は、APP と PS1 の二重遺伝子変異を有するマウスで認められる小胞体ストレス上昇の意義については再検討が必要であることを示している。これまで過剰発現 AD 病態モデルでその効果が認められなかった因子に関して、*App* KI マウスを用いて再検証することで、AD 病態の新たな創薬標的が見つかる可能性があると考えられる。

第2章 図と表

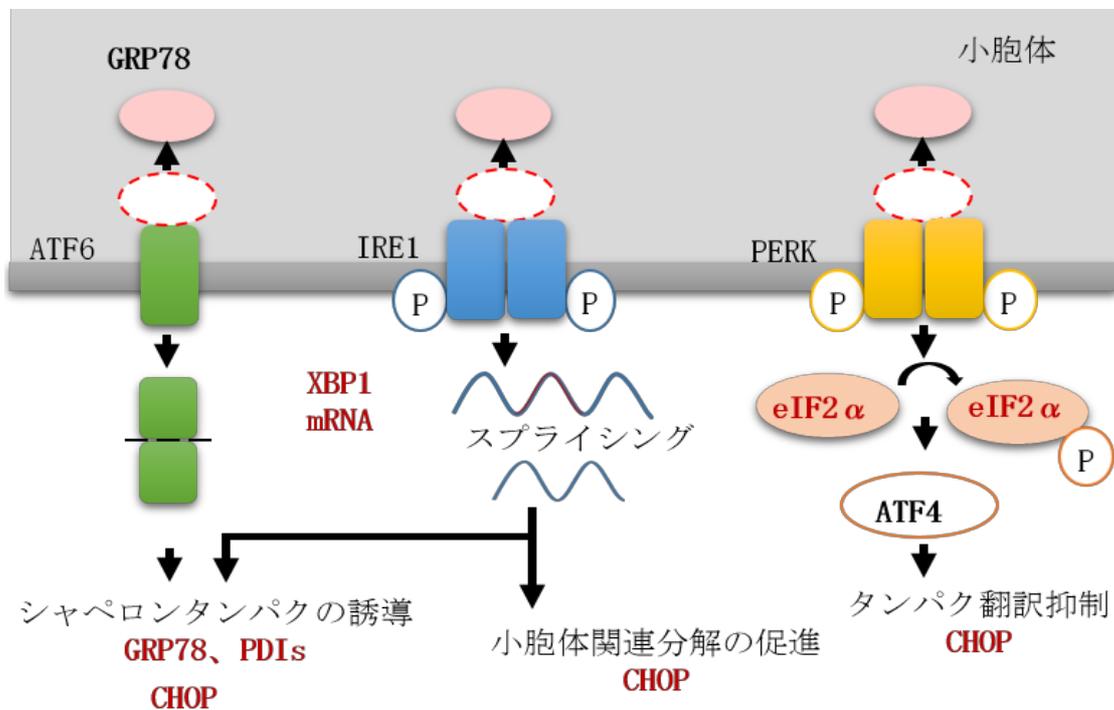


図 2-1 小胞体ストレス応答の分子機構と小胞体ストレスマーカー分子の関係

小胞体ストレスが惹起されると、3つの膜貫通シグナルタンパク質の小胞体内腔側に結合している GRP78 が解離して小胞体ストレス応答が開始される。eIF2 α がリン酸化されることにより、余分なタンパク質の合成が抑制される。プロテアーゼによって切断された ATF6 は、核に移行して GRP78 や PDI の発現を促し、タンパク質折りたたみ不全の是正を促進する。イントロンの切り出しにより産生されたスプライス型 XBP1 mRNA は転写活性を有しており、シャペロンタンパク質の発現を誘導する他、小胞体関連分解を促進させる。3 経路でそれぞれ、転写因子 CHOP の発現が誘導され、アポトーシスが生じる。赤字で示した小胞体ストレス応答関連分子の発現量増加は、小胞体ストレス上昇の指標とされる。

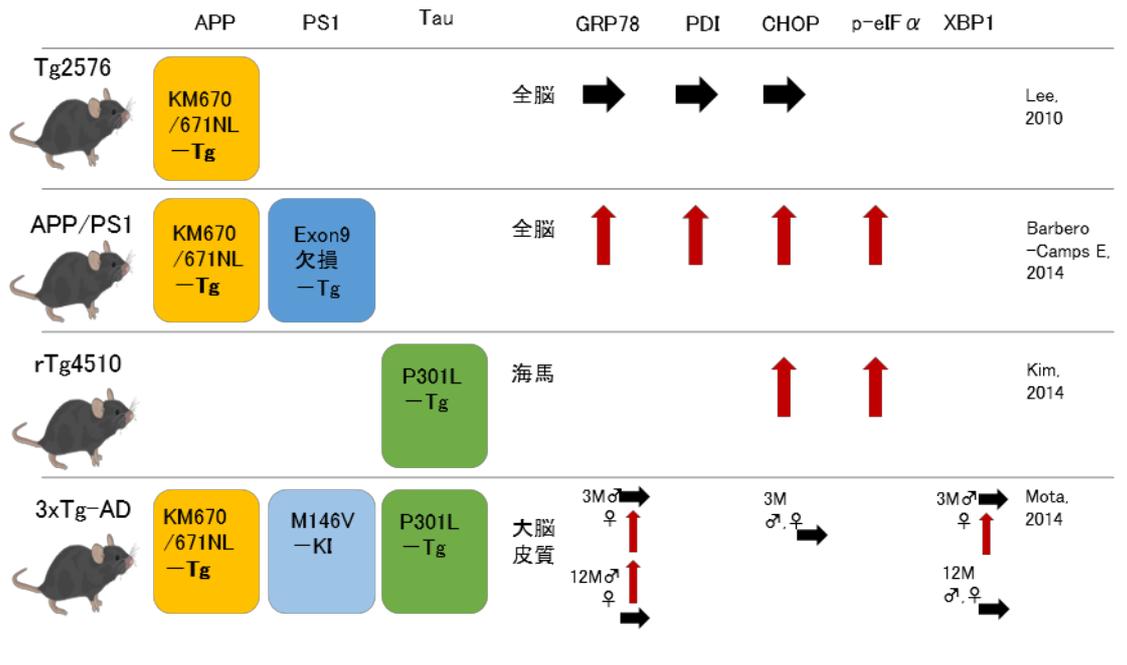


図 2-2 従来の AD 病態モデルマウスで認められる小胞体ストレスマーカーの発現

従来の AD 病態モデルマウスにおける小胞体ストレスの誘導に関する結果を示す。「↑(赤色)」は小胞体ストレスマーカーの上昇が認められること、「→(黒色)」は小胞体ストレスマーカーの上昇は認められないことを意味する。

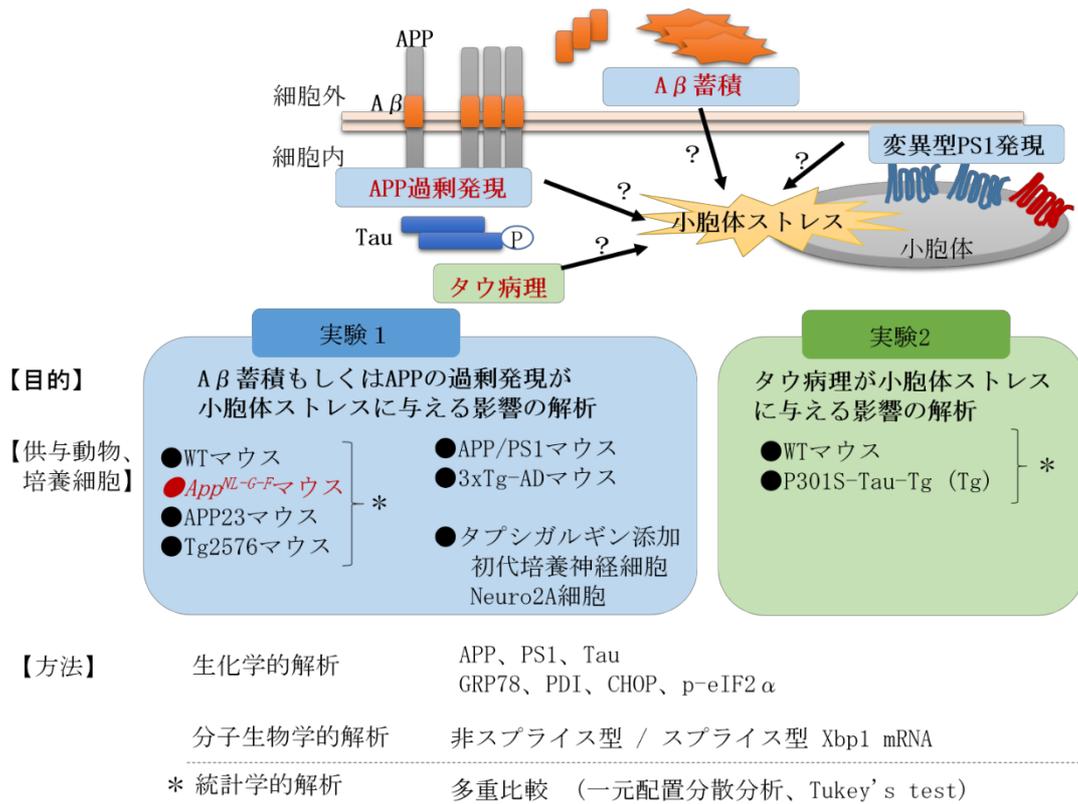


図 2-3 研究 1 (実験 1 と実験 2) の目的と材料および方法

上半分の図は、AD 病態モデルマウスと小胞体ストレスとの関係を示す概念図。下の図は、実験 1 と実験 2 の研究目的、材料 (供与動物と培養細胞)、および解析方法についての概要を示す。

表 2-1 研究 1 で使用した AD 病態モデルマウスの種類

動物	変異が導入された遺伝子とプロモーター		
	APP 遺伝子	PS1 遺伝子	TAU 遺伝子
モデルマウス名 (バックグラウンドの系統)			
<i>App</i> ^{ML-G-F} (C57BL/6)	KM670/671NL、 E693G、I716F -KI (endogenous)	—	—
APP23 (C57BL/6)	KM670/671NL -Tg (Thy-1)	—	—
Tg2576 (B6 ; SJL 混合)	KM670/671NL -Tg (Prion)	—	—
APP/PS1 (C57BL/6)	KM670/671NL -Tg (Prion)	Exon9 欠損 -Tg (Prion)	—
3xTg-AD (C57BL/6)	KM670/671NL -Tg (Thy-1)	M146V -KI (endogenous)	P301L -Tg (Thy-1)
P301S-Tau-Tg (B6C3H/F →C57BL/6)	—	—	P301S -Tg (Prion)

研究 1 (実験 1 と実験 2) で使用した遺伝子改変マウスにおける APP (黄色)、PS1 (青)、および TAU (緑) に導入された遺伝子変異の一覧。「—」は遺伝子に変異が導入されていないことを示す。各遺伝子変異の背景色の違いは変異の導入手法が異なることを意味する。薄い色はノックイン、濃い色は過剰発現であることを示す。

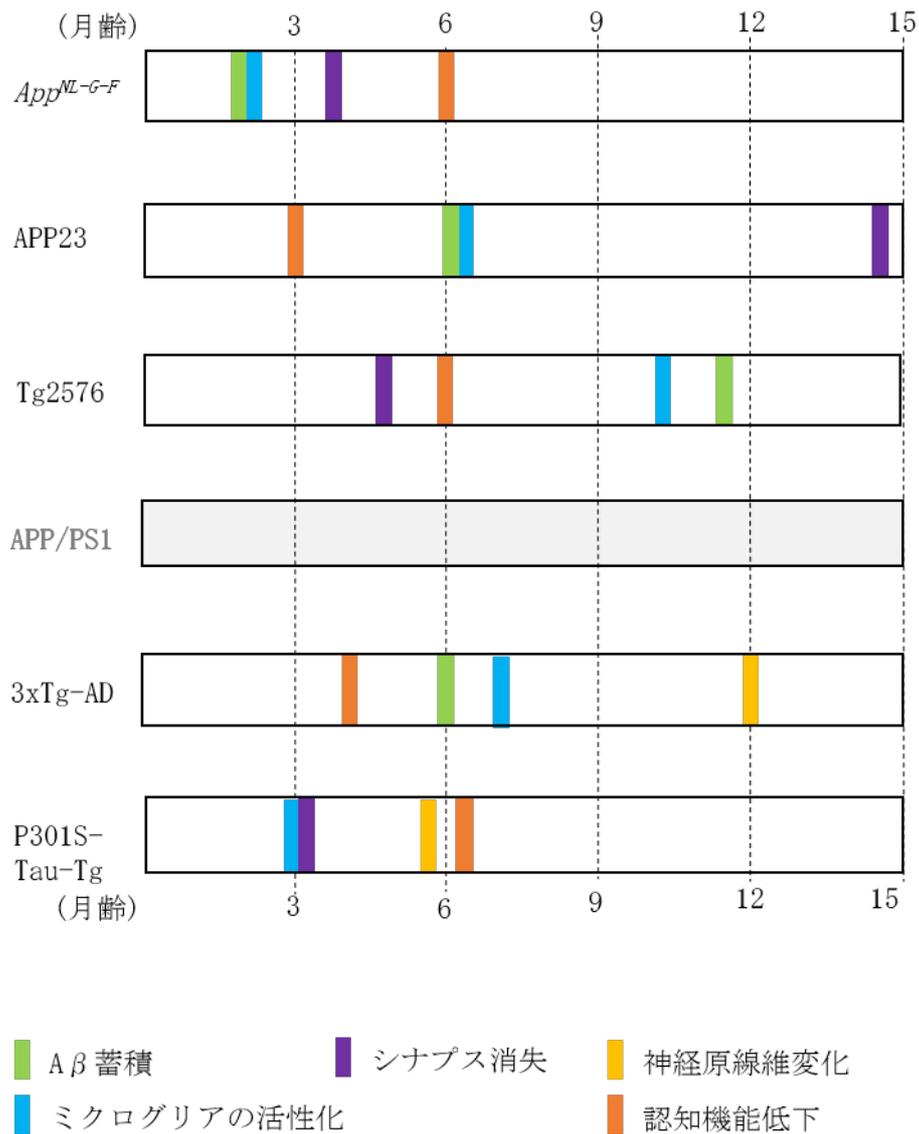


図 2-4 各 AD 病態モデルマウスにおいて病理学的変化と行動異常が認められる月齢

オンラインサイト ALZFORUM (<https://www.alzforum.org/>) のデータを元にして、本研究で使用したマウスで認められる、Aβ 蓄積、ミクログリアの活性化、シナプス消失、認知機能低下、および神経原線維変化が生じる月齢。なお、APP/PS1 は同一系統の情報が公開されていないため記載していない。

表 2-2 ウェスタンブロット解析に使用した一次抗体

標的	一次抗体の 希釈倍率	会社名・カタログナンバー(#)
APP	1:2500	Merck Millipore #MAB348 (clone 22c11)
Tau	1:2500	Thermo #AHB0042 (Tau5)
GRP78	1:5000	abcam #ab21685
CHOP	1:2500	abcam #ab11419
Phospho-eIF2 α	1:1000	Cell Signaling #3398
eIF2 α	1:5000	Cell Signaling #9722
PDI	1:5000	(Hiroi et al., 2006)
PS1	1:5000	(Tomita et al., 1999; Sato et al., 2008)
β -actin	1:5000	SIGMA #A5441

大脳皮質

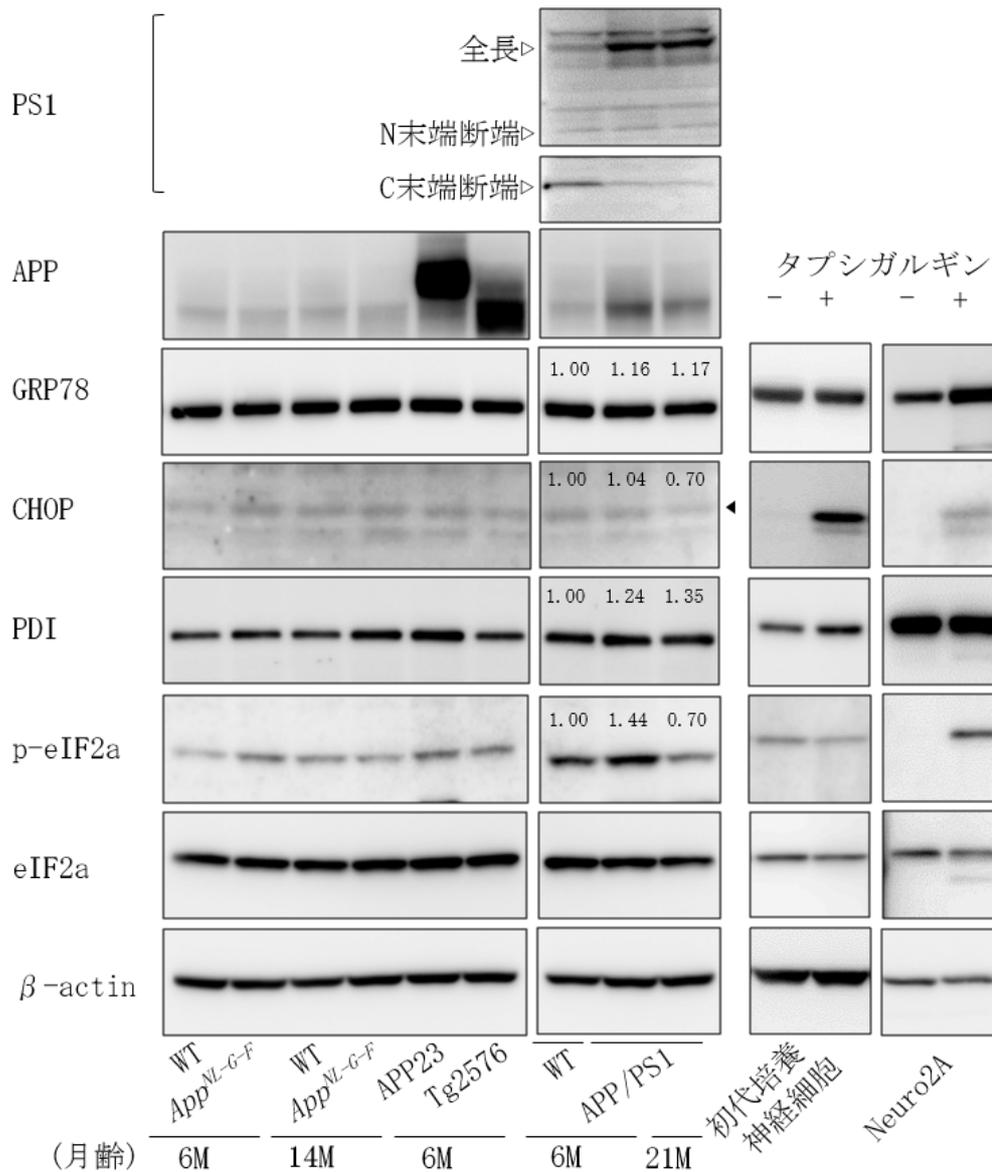


図 2-5 大脳皮質と培養細胞における小胞体ストレスマーカータンパク質の検出

ウエスタンブロット解析による各モデルマウス (WT、*App*^{N-G-F}、APP23、Tg2576、および APP/PS1) の大脳皮質、初代培養神経細胞、Neuro2A 細胞における、小胞体ストレスマーカー (GRP78、CHOP、PDI、p-eIF2α)、APP、PS1、および内在性コントロール (eIF2α、β-actin) の検出結果。WT と APP/PS1 のバンド上部に示した数字は、WT の平均値を 1.00 とし、モデルマウスはこれに対する相対値で表した。「◀」は CHOP のバンドの位置、「M」はマウスの月齢。

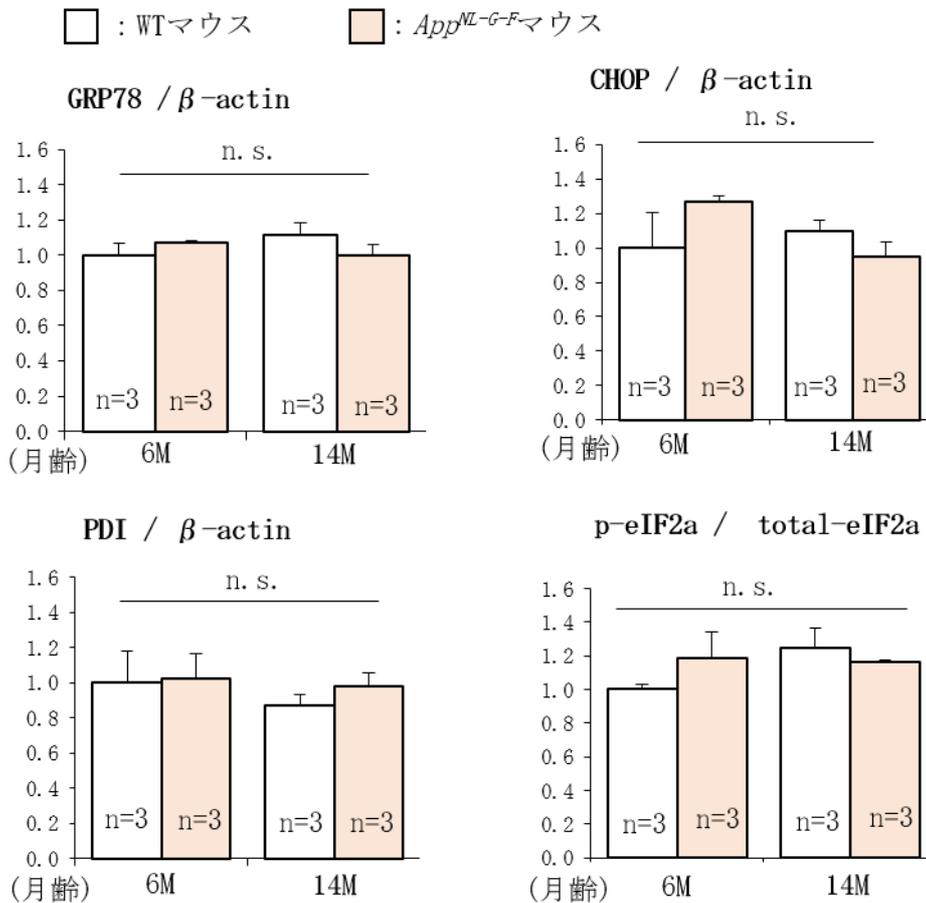


図 2-6 WT と *App^{ML-G-F}* マウス (6 と 14 ヶ月齢) 大脳皮質の小胞体ストレスの比較

ウエスタンブロット解析による結果 (図 2-5) の GRP78、CHOP、PDI、p-eIF2 α バンドの定量結果をグラフで示す。6 ヶ月齢の WT マウスの平均値を 1.0 とし、各モデルマウスはこれに対する相対値で表した (平均値 \pm 標準誤差、n. s. : 有意差なし、一元配置分散分析とデューキーの検定)。「M」はマウスの月齢。

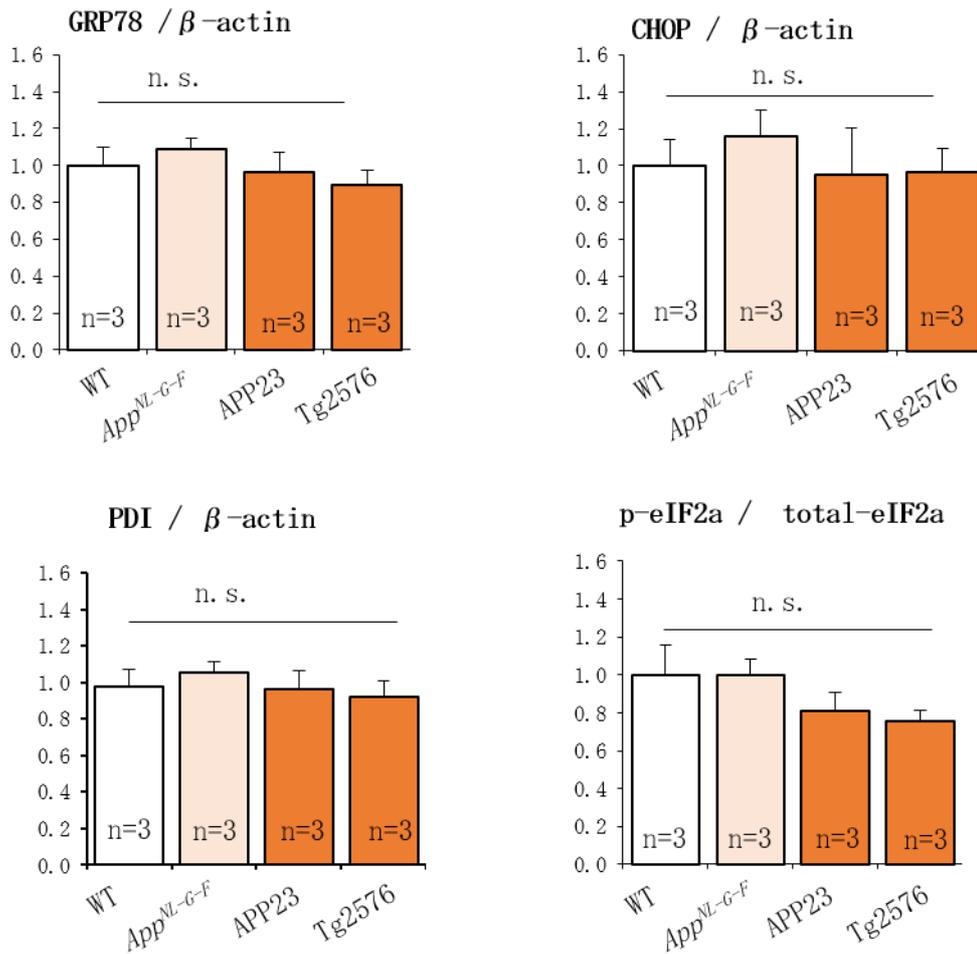


図 2-8 各モデルマウス (WT、*App^{NL-G-F}*、APP23、Tg2576 マウス、6 ヶ月齢) 大脳皮質の小胞体ストレスの比較

ウエスタンブロット解析による結果 (図 2-5) の、GRP78、CHOP、PDI、p-eIF2 α バンドの定量結果の比較。WT マウスの平均値を 1.0 とし、各モデルマウスはこれに対する相対値で表した (平均値 \pm 標準誤差、n. s. : 有意差なし、一元配置分散分析とテューキーの検定)。

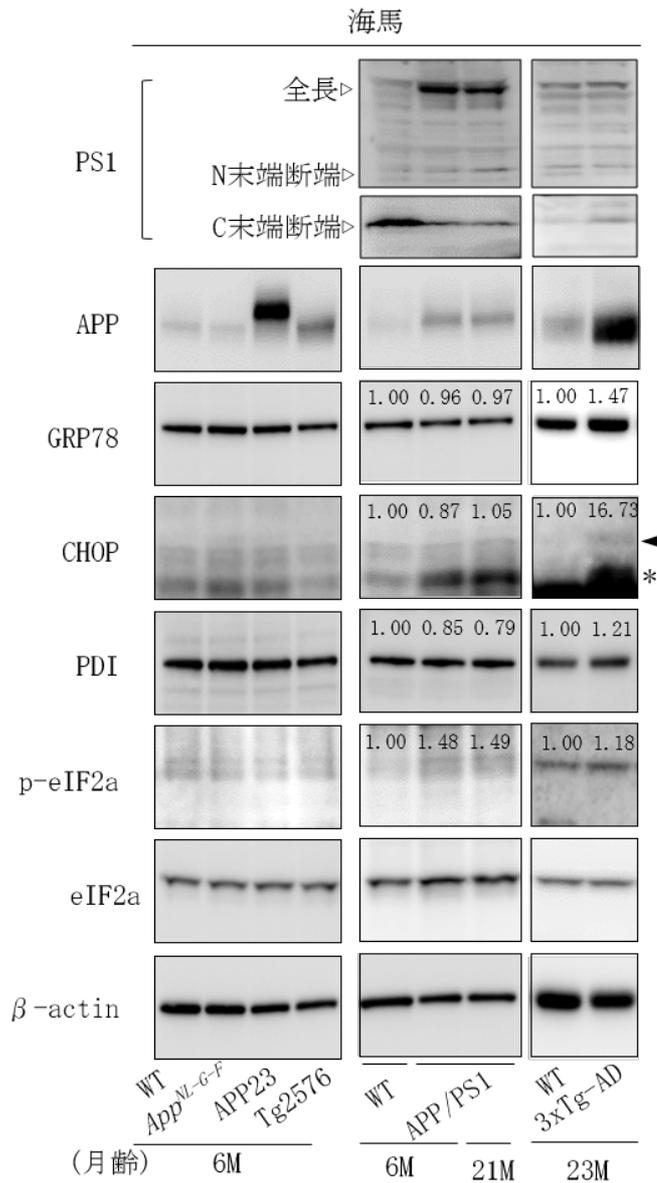


図 2-9 マウス海馬における小胞体ストレスマーカータンパク質の検出

ウエスタンブロット解析による WT、*App^{N-G-F}*、APP23、Tg2576 (いずれも 6 ヶ月齢)、APP/PS1 (6 と 21 ヶ月齢)、および 3xTg-AD (23 ヶ月齢) における、APP、PS1、小胞体ストレスマーカー (GRP78、CHOP、PDI、p-eIF2α)、および内在性コントロール (eIF2α、β-actin) の検出結果。WT、APP/PS1、3xTg-AD のバンド上部に示した数字は、WT の平均値を 1.00 とし、APP/PS1、3xTg-AD マウスはこれに対する相対値で表した。「◄」は CHOP のバンドの位置、「*」は非特異的なバンド、「M」はマウスの月齢。

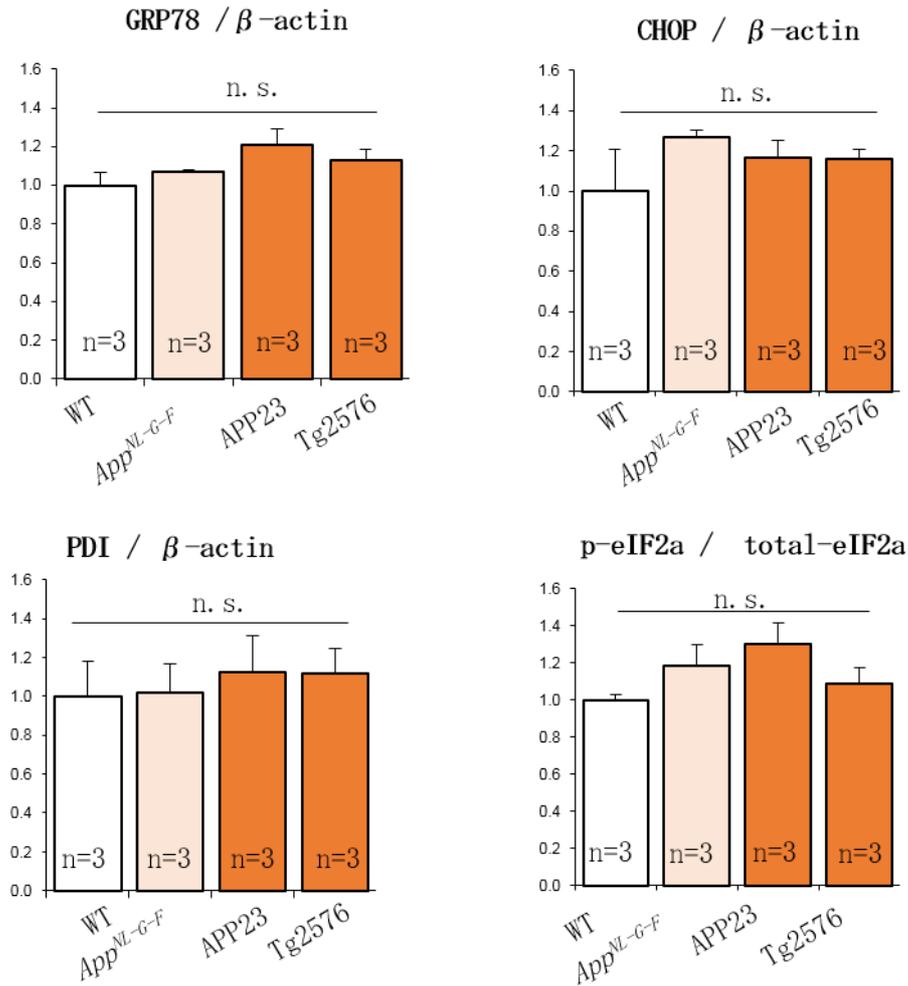


図 2-10 各モデルマウス (WT、*App^{M-G-F}*、APP23、Tg2576 マウス、6 ヶ月齢) 海馬の小胞体ストレスの比較

ウエスタンブロット解析の結果 (図 2-9) をもとにした、GRP78、CHOP、PDI、および p-eIF2 α の定量結果の比較。WT マウスの平均値を 1.0 として、各モデルマウスはこれに対する相対値で表した (平均値 \pm 標準誤差、n. s. : 有意差なし、一元配置分散分析とテューキーの検定)。

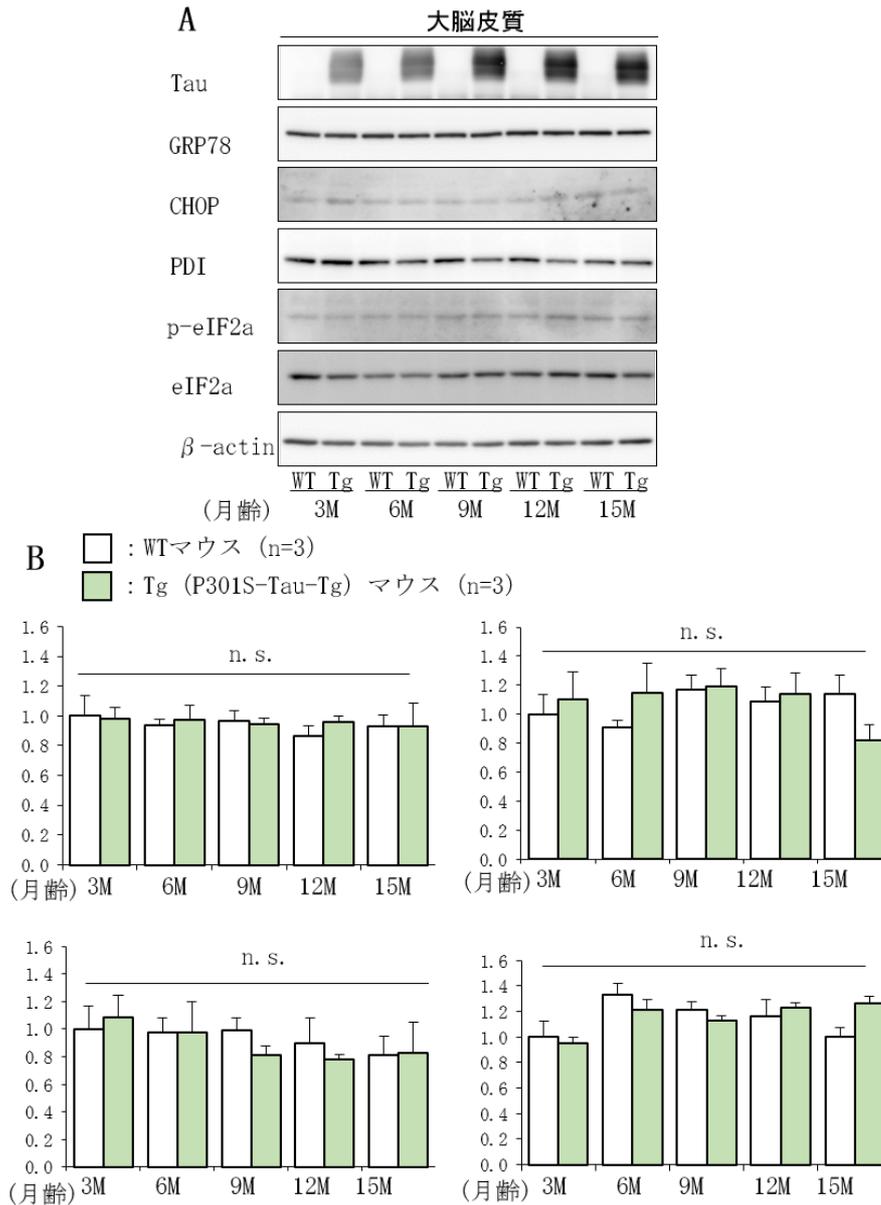


図 2-11 WT と P301S-Tau-Tg マウス (3~15 ヶ月齢) の大脳皮質における小胞体ストレスマーカータンパク質の検出

A: ウェスタンブロット解析による WT と P301S-Tau-Tg マウスの大脳皮質における Tau、小胞体ストレスマーカー (GRP78、CHOP、PDI、p-eIF2 α)、および内在性コントロール (eIF2 α 、 β -actin) の検出。**B:** A の結果をもとにした GRP78、CHOP、PDI、および p-eIF2 α の比較。グラフは 3 ヶ月齢の WT マウスの平均値を 1.0 とし、その他はこれに対する相対値で表した (平均値 \pm 標準誤差、n. s. : 有意差なし、一元配置分散分析とテューキーの検定)。「M」はマウスの月齢。

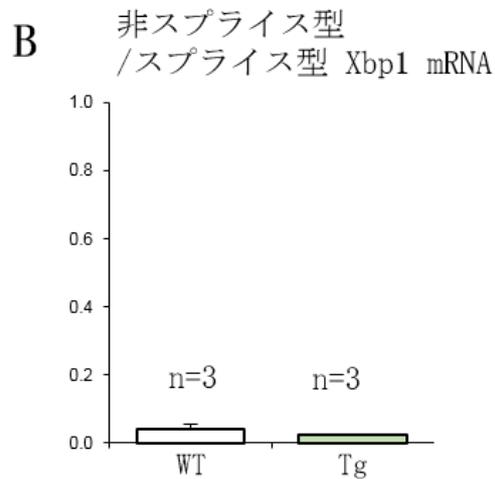
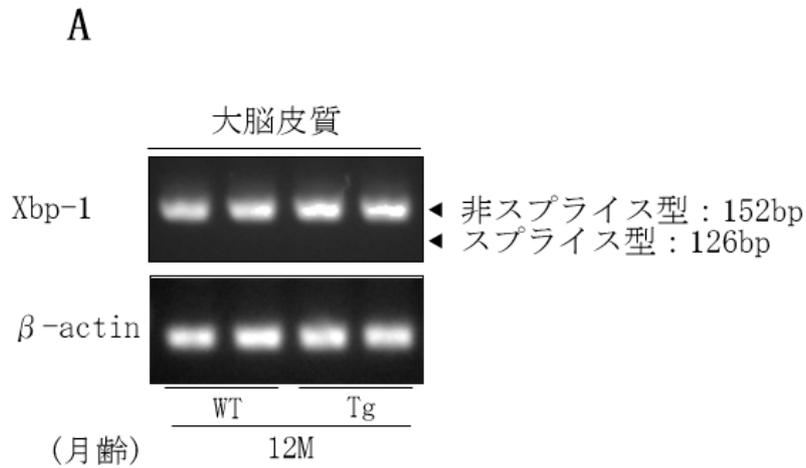


図 2-12 WT と P301S-Tau-Tg マウス (12 ヶ月齢) 大脳皮質のスプライス型 XBP1 mRNA の検出

A : 電気泳動の結果 (非スプライス型 XBP1 mRNA は 152 bp、スプライス型 XBP1 mRNA は 126 bp)。**B** : A の結果をもとにした XBP1 mRNA のスプライシング効率、非スプライス型に対するスプライス型の比で数値化してグラフで表した (平均値 \pm 標準誤差、n. s. :有意差なし、一元配置分散分析とチューキーの検定)。「M」はマウスの月齢。

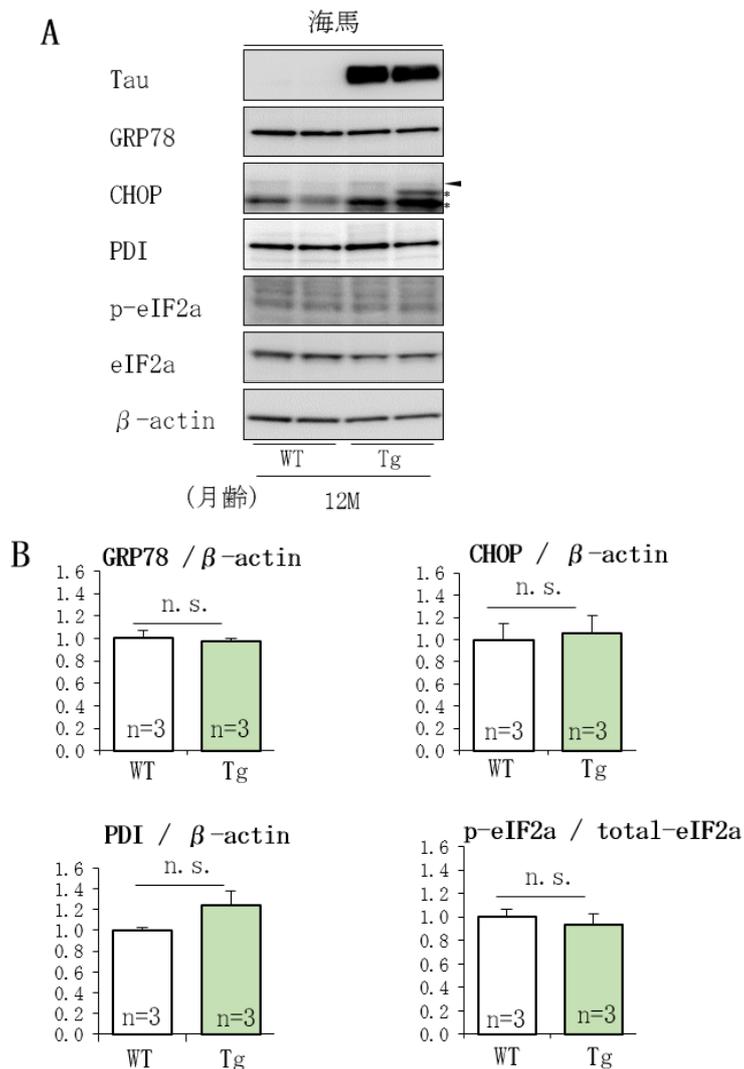


図 2-13 WT と P301S-Tau-Tg マウス (12 ヶ月齢) 海馬における小胞体ストレスマーカータンパク質の検出

A: ウェスタンブロット解析による WT と P301S-Tau-Tg マウスの海馬における Tau、小胞体ストレスマーカー (GRP78、CHOP、PDI、p-eIF2α)、および内在性コントロール(eIF2α、β-actin)の検出。**B:** Aにおける GRP78、CHOP、PDI、および p-eIF2α の比較。12 ヶ月齢の WT マウスの平均値を 1.0 とし、Tg マウスはこれに対する相対値で表した (平均値±標準誤差、n. s.:有意差なし、一元配置分散分析とテューキーの検定)。「▲」は CHOP のバンドの位置、「*」は非特異的なバンド、「M」はマウスの月齢。

第3章

研究2

Tau と相互作用が変動する PRMT8 が脳神経病理に与える影響

3-1 緒言

「アミロイド病理」「タウ病理」「神経の変性および細胞死」の各病理を繋ぐ分子機序を明らかにすることは、アルツハイマー病(AD)の病態解明および有効な治療標的を見出すための戦略の一つとなる。

タウ病理の発現部位と神経細胞の脱落部位には強い相関が見られ、タウ病理はAD病態の進行に関連すると考えられている (Gómez-Isla et al., 1997)。西道チームでは「A β が蓄積する状態において何らかの病態増悪因子が存在し、その因子が Tau と相互作用することにより、神経変性を誘導する」という仮説のもと、A β 存在下で Tau と結合性が変動する因子の探索が行われた。Tau のみを発現するマウスと Tau の発現に加えて A β 蓄積を示すマウスを用いて、Tau を標的とした免疫沈降で回収されたタンパク質を用いた質量分析により 25 因子が同定された (Saido, 未発表データ)。その中で A β 病理依存的に Tau との結合が離れる因子の一つとして同定された、タンパク質アルギニンメチル基転移酵素 8 (protein arginine methyltransferase 8 ; PRMT 8) は、中枢神経特異的に発現するタンパク質である。

PRMT8 を含む PRMT ファミリーは、S-adenosyl-L-methionine をメチル基供与体として、タンパク質のアルギニン側鎖にメチル基を転移する作用を持つ分子群である (Blanc and phane Richard, 2017)。PRMT ファミリーは、酵母からヒトまで生物界に高度に保存された酵素であり、その構造と酵素活性の違いから複数のサブタイプが存在する (Bedford and Clarke, 2009)。この PRMT ファミリーの中で、タンパク質アルギニンメチル化反応を最も強く誘導するサブタイプは PRMT1 であり、この PRMT1 と PRMT8 は 83% のアミノ酸相同性を持ち、さらに相互作用を有することが知られている。PRMT8 は他の PRMT ファミリーとは異なり、発現する組織は脳と脊髄の中枢神経系に限局されるという特徴を持つ (Lee et al., 2005; Kousaka et al., 2009)。さらに近年、PRMT8 はアルギニンメチル化作用以外にも、ホスファチジルコリンからコリンを産

生するリン脂質分解酵素作用を有し、神経活動維持に重要なアセチルコリンの産生維持に関与する可能性が示されている (Dillon et al., 2013; Kim et al., 2015)。

また、タンパク質における翻訳後修飾は生理機能や局在性などの調節に関与しているが、リン酸化やアセチル化に比べると、メチル化に関しては不明な点が多く残されている (Bedford and Richard, 2005)。近年、マウスを用いたタンパク質メチル化の質量分析により、Tau の微小管結合ドメインにおけるアルギニンが、メチル化修飾を受けていることが報告された (Guo et al., 2014)。さらに、A β 蓄積が Tau の翻訳後修飾に与える影響を検討するため、WT マウスと AD 病態モデルマウスにおける Tau の翻訳後修飾の比較が行われた (Morris et al., 2015)。その結果、AD 病態モデルマウスで特異的な Tau の翻訳後修飾が 9 つ同定され、そのうち 2 つの修飾はアルギニン残基のメチル化であった。このことから、PRMT8 は Tau のアルギニンメチル化等の作用機序を介して、AD 病態の増悪に関与する可能性も考えられた。しかし、これまでに Tau と PRMT8 が共局在することがマウス脳を用いた組織学的解析で示されているもの (Kousaka et al., 2009)、PRMT8 と A β 、Tau、さらに神経の変性および細胞死に関して詳しく解析した報告は存在しない。

そこで研究 2 では、「Tau と相互作用が変動する PRMT8 が脳神経病理に与える影響」を明らかとすることを目的に 3 つの実験を行った。研究 2 の研究概要を図 3-1 に示した。

実験 1 では、PRMT8 遺伝子欠損が AD 病態に与える影響を検討するため、AD 病態モデルマウスとして *App*^{ML-G-F} マウスと *MAPT* KI マウスを掛け合わせた double KI (dKI) マウスを使用した。CRISPR/Cas9 システムを利用し、PRMT8 遺伝子を欠損する PRMT8 欠損 dKI マウス (dKI^{PRMT8^{-/-}}マウス) を作製した。この dKI^{PRMT8^{-/-}}マウスと正常通り PRMT8 を発現する dKI マウスを用いて、PRMT 欠損が Tau のリン酸化に与える影響を生化学的に解析した。さらに、組織の形態を観察するため HE 染色を実施し、神経炎症を観察するため、アストロサイトとミクログリアを指標とした免疫組織化学を実施した。さらに、

神経の変性と細胞死を観察するために神経細胞とアポトーシス経路の活性化を指標とした免疫組織化学を行った。

実験 2 では、PRMT8 遺伝子の発現増加が AD 病態に与える影響を検討するため、シナプシンプロモーターの下流にマウス PRMT8 cDNA 配列が挿入された遺伝子導入 AAV ベクター (AAV-PRMT8) を、dKI マウスの側脳室に投与した。AAV-PRMT8 を投与した dKI マウスと、AAV 投与の比較対照として AAV-GFP を投与したマウスを用いて、実験 1 と同様の手法で解析を行った。

実験 3 では、実験 2 において AAV-PRMT8 を dKI マウスに投与することで認められた PRMT8 誘発性の病理学的変化が、Tau 病理依存的に誘導される現象であるかを検討するため、Tau-KO マウスおよび、WT マウスの側脳室に AAV-PRMT8 を投与し、実験 1 と同様の手法で解析を行った。

3-2 材料と方法

実験 1 から実験 3 の全ての実験は、「理化学研究所ガイドライン」に従って実施した（遺伝子組換え実験承認番号：2016-043 (3)、動物実験承認番号：H27-2-209 (2)）。

実験に使用した動物は、理研の実験動物飼養保管施設において、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数 15 回/時間、オールフレッシュ方式、明期 12 時間（午前 8:00～午後 8:00）、暗期 12 時間（午後 8:00～午前 8:00）の条件下で飼養保管した。給水は自由給水、飼料はペレット状固形飼料を用いた。

3-2-1

実験 1：PMRT8 欠損が dKI マウスの脳神経病理に与える影響

供試動物

APP の過剰発現を伴わない *App*^{M-G-F} マウスと、変異を持たないヒト型タウを発現する *MAPT* KI マウスを掛け合わせた double KI (dKI) から、さらに PMRT8 遺伝子を欠損させた PMRT8 欠損 dKI マウス (dKI^{PMRT8^{-/-}}マウス) を使用した。さらに、PMRT8 遺伝子を発現する dKI マウス (dKI^{PMRT8^{+/+}}マウス) を使用した (図 3-1)。いずれも、6 ヶ月齢のマウス 3 頭 (雌雄混合) を使用した。

ゲノム編集による PMRT8 欠損 dKI マウスの作製

Cas9 および single guide RNA 発現ベクター

dKI^{PMRT8^{-/-}}マウスは CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により作製した (図 3-2)。Single guide RNA (sgRNA) と Cas9 との複合体を形成して DNA 二本差を切断する Cas9 酵素を用いて、西道チームが報告した手法によって PMRT8 遺伝子を欠損させた (Nagata et al., 2018)。PMRT8 配列を標的とした sgRNA は、オンラインソフト CRISPR scan (<http://www.crisprscan.org/>) からゲノム上に類似配列の少ない PMRT8 上の標的配列を選定し、オフターゲットの影響を考慮してオリゴヌクレオチドを設計した

(図 3-2-A)。Cas9 mRNA の合成には、CBh プロモーター下に発現するプラスミド (Cat # 42230、Addgene、USA) を使用した。一本鎖 RNA と Cas9 mRNA は、RNA 合成キット (in vitro Transcription T7 Kit ; Cat # 1345、Thermo Fisher Scientific、USA) で合成し、RNA 精製キット (MEGAclean Transcription Clean-Up Kit ; Cat # 1908、Thermo Fisher Scientific) で精製した。

dKI^{PRMT8^{-/-}}マウスの作製と選別

dKI マウス受精卵の細胞質に sgRNA と Cas9 の mRNA をマイクロインジェクションして dKI^{PRMT8^{-/-}}マウスを作製した (図 3-2-B)。dKI^{PRMT8^{-/-}}マウスの選別は、DNA シーケンス解析で行った。出生後 1 ヶ月の尾部組織、および 6 ヶ月齢の脳組織から DNA を抽出した。DNA と PRMT8 の特異的プライマー (5'-gaaatctctgaagcagcggttga tg-3'、5'-gggctacacctgtcccactg-3')、および PCR 酵素 (KOD FX Neo) を用いて、96°C1 分間を 1 サイクル、96°C10 秒間・50°C5 秒間・60°C3 分間を 40 サイクルの PCR 反応を行なった。PCR 産物は、滅菌蒸留水で 5 倍希釈して PRMT8 特異的プライマー (5'-gaaatctctgaagcagcggttgatg-3') とサンガー法シーケンシングキット (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit、Cat # 4337455、Thermo Fisher Scientific) を用いて、96°C2 分間を 1 サイクル、96°C10 秒間・50°C5 秒間・60°C4 分間を 25 サイクルの PCR 反応を行なった。DNA シーケンス解析により PRMT8 遺伝子の両アレルで遺伝子欠損を認めるマウスを選別して (雌雄混合 3 頭) 使用した (図 3-2-C)。

マウス受精卵への sgRNA と Cas9 mRNA の注入と動物の飼育は、理研基盤開発部門 (RRD) ・動物資源開発支援ユニットに委託して行った。

マウス脳組織の取り出し

動物はペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg) の腹腔内投与で麻酔した。痛覚消失を確認した後、氷冷した PBS を用いて経心臓法で灌流し、素早く断頭して脳を

取り出した。摘出した脳は左右半球に分割して、右半球は生化学解析用に、左半球は組織学解析用とした。

生化学解析の標本は、小脳と延髄を取り除いた後で大脳皮質と海馬に分け、それぞれの標本を液体窒素で凍結してウエスタンブロット解析に用いるまで -80°C で保存した。組織学解析の標本は、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (4% - Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (4%-PFA) ; Cat# 09154-85、ナカライテスク) で浸漬固定して、室温で一晩振とうした後に、脳切片標本を作成した。

ウエスタンブロット解析

PRMT8 遺伝子欠損が dKI マウスの Tau のリン酸化に与える影響を解析するため、dKI^{PRMT8^{-/-}}マウスと dKI^{PRMT8^{+/+}}マウスの海馬を用いて、PRMT8、総 Tau (Tau5 抗体)、リン酸化 Tau (AT8 抗体、PHF1 抗体)、内在性コントロール (Tubulin) のタンパク質の出現量をウエスタンブロットで解析した (表 3-1)。

海馬サンプルの調整

-80°C 保存した海馬の標本を解凍し、タンパク質抽出用緩衝液 (pH 7.5、50 mM トリス塩酸緩衝液、150 mM 塩化ナトリウム、1%プロテアーゼ阻害剤、1%ホスファターゼ阻害剤、および 1% Triton-X 100) を加えた。引き続き、マルチビーズショッカーで 20 秒間の破碎を行ない、15 分間遠心 (20400g、 4°C) し、上清を抽出してタンパク質抽出液とした。抽出したサンプルのタンパク質濃度は、BCA タンパク質アッセイキット (Cat# 23227、Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。測定した濃度を元にして、タンパク質抽出液に対して 4 倍希釈になるように試料用緩衝液 (2ME+) (x4) (Cat# 191-13272、富士フイルム和光純薬、大阪) を混合し、ウエスタンブロット解析用のサンプルとした。

ウエスタンブロット解析

海馬から調製したウエスタンブロット解析用のサンプルは、7.5~15%の SDS-ポリ
アクリルアミドゲルを用いて、電気泳動 (20 mA 定電流、室温、約 90 分間)を行った。
泳動後のゲルに含まれるタンパク質は、100%メタノールで処理した 0.45 μm PVDF メ
ンブレン (Cat# IPVH00010、Merck、Germany) に、セミドライ式ブロッタターを用い
て転写した (126mA 定電流、室温、約 65 分間)。転写後のメンブレンは、ECL Prime
Blocking Reagent (Cat# RPN418、GE Healthcare、USA) を含む Tween20 含有トリス緩
衝生理食塩水 (Tris-buffered saline containing Tween 20 ; TBST、pH 7.6、Cat#
T9142、タカラバイオ、大阪) でブロッキング (室温、30 分間) を行った。ブロッキン
グ溶液で希釈した一次抗体 (表 3-1) を 4°Cで一晩反応させた。一次抗体への反応後、
メンブレンを TBST 中で 5 分間×3 回洗浄し、ブロッキング溶液で希釈した HRP 標識二
次抗体である Anti-Rabbit IgG (Cat# NA9340、GE Healthcare)と Anti-Mouse IgG (Cat#
NA9310、GE Healthcare) と 1 時間反応させた。二次抗体への反応後、メンブレンを
TBST 中で 5 分間×3 回洗浄し、ECL Select Western Blotting Detection Reagent
(Cat# RPN2235、GE Healthcare) を用いて発色反応させた。メンブレン上のバンドは、
CCD イメージセンサ (ImageQuant LAS 4000mini ; GE Healthcare) によって検出した。

ウエスタンブロット解析で得られたバンド強度の定量は、画像解析ソフト (Image
Studio Software ; LI-COR、USA) を用いて算出した。また、Tau5、AT8、PHF1 のバンド
の数値は、Tubulin のバンドの数値で補正した。

組織化学

PRMT8 遺伝子欠損マウスの脳組織を観察するため、dKI^{PRMT8^{-/-}}マウスと dKI^{PRMT8^{+/+}}マ
ウスの脳切片標本にヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色を施した。

PRMT8 の発現を確認するために PRMT8 抗体を用いて、A β 蓄積を確認するために 82E1
抗体を用いて、免疫組織化学を施した。また、神経炎症を解析するために、炎症によ
って増加するグリア細胞の存在をアストロサイトのマーカーである GFAP 抗体、ミクロ

グリアのマーカーである Iba1 抗体を使用した免疫組織化学を施した。さらに、神経変性と細胞死を解析するために、神経細胞のマーカーである NeuN 抗体、アポトーシス経路の主要プロテアーゼのマーカーである活性化 Caspase-3 に対する抗体を用いた免疫組織化学を行った（表 3-2）。

脳標本の作成

固定液（4%PFA）に一晩浸漬固定した脳組織を PBS で 3 回洗浄し、ブレインスライサー（Cat# MK-MC-01、室町機械）を用いて海馬を含む脳領域のみを切り出した後、プラスチック製サンプルカセットに入れた。アルコール系列（70%エタノール、90%エタノール、99%エタノール）で脱水処理を行い、引き続きキシレンで透徹処理を行った。その後、パラフィンの浸透処理を行なってパラフィンブロック標本とした（以下、脳標本）。脳標本は、滑走式マイクローム（HM400R ; Cat# 912020、Thermo Fisher Scientific）を用いて、海馬の尾側（The Mouse Brain Bregma in stereotaxic coordinate (Paxinos and Franklin, 2012) の Bregma -2.46 mm に相当）から頭側（Bregma -1.22mm に相当）にかけて 4 μ m の厚さで連続の脳切片を作成した。脳切片は、42°C のウォーターバスで伸展させ、MAS コートスライドガラス（MAS-GP Type A ; Cat# S9903、松浪硝子工業、大阪）に貼り付けて、37°C で一晩静置・乾燥させて脳標本とした。脳標本は、解析に使用するまで標本箱に室温保存した。

免疫組織化学

標本箱に保存していた脳標本から連続する隣接切片を含むサンプルを選び出し、各一次抗体による免疫組織化学を施した。脳標本は、脱パラフィン処理と再水和処理を行った後、抗原賦活化処理として 10 mM クエン酸緩衝液（pH 6.0）に浸漬して、オートクレーブ処理を 121°C で 5 分間行った後、水道水で水洗した。引き続き、内因性ペルオキシダーゼの不活性化をする目的で、0.3%過酸化水素を含むメタノール溶液に 30 分間室温で反応させた。再び水道水で水洗したのち、TNT 緩衝液（100 mM トリス塩酸

緩衝液、150 mM 塩化ナトリウム、0.05% Tween20、pH 7.5) に浸漬させた。非特異的な免疫反応を抑制するために、0.5%ブロッキング剤 (TSA Blocking Reagent; Cat# FP1012、PerkinElmer、USA) 含有 TNT 緩衝液に浸漬し、室温で 20 分間処理した後、TNT 緩衝液で希釈した一次抗体 (表 3-2) に 4°C で一晩反応させた。一次抗体と反応させた後に脳標本を TNT 緩衝液で洗浄し、TNT 緩衝液で希釈したビオチン標識二次抗体である Anti-Rabbit IgG (Cat# BA-1000、Vector Laboratories、USA) と Anti-Mouse IgG (Cat# BA-9200、Vector Laboratories) と室温で 1 時間反応させた。免疫組織反応を増感させるために、蛍光チラミドシグナル増幅キット (TSA 蛍光システム; Cat# NEL741001KT と NEL742001KT、PerkinElmer) を使用した。最後に、ヘキスト (1:5000) で核染色を行い、脳標本を PBS で 3 回洗浄した後で、褪色防止用封入剤 (ProLong Gold Antifade Mountant、Cat# P36934、Thermo Fisher Scientific) で封入して観察標本とした。

HE 染色

HE 染色は、免疫組織化学を施した標本と同様に、脳標本に脱パラフィンおよび再水和処理後を行った後に、HE 染色を施し、脱水・透徹処理した後に、ポリスチレン樹脂標本用封入剤 (MGK-S; Cat# FK00100、松浪硝子工業) で封入して観察標本とした。

染色脳標本の観察

免疫組織化学を施した脳標本は、デジタルカメラと接続したバーチャルスライドシステム (NanoZoomer; Cat# C12000-02、浜松ホトニクス、静岡) で観察して画像取得を行った。取得画像の解析は、市販の画像解析ソフト (Definiens Developer XD Ver. 2.3.0、Trimble、USA) を用いて行った。二次元スキャンモードで取得した画像をもとに、画像解析ソフトの面積測定プログラムを使って海馬全体における GFAP、Iba1、NeuN、Caspase-3 の各免疫陽性反応の面積の合計と、免疫組織化学を観察した海馬全体面積を算出した。さらに、海馬 CA3 領域の全面積に対して各抗体の免疫陽性反

応の合計面積が占める割合を算出し、この数値を各個体における免疫組織化学の結果とした。この数値を用いて統計処理による動物間の比較を行った。

なお、免疫組織化学、および HE 染色を施した脳標本の病理組織像は、脳標本にした海馬の全領域において同じ反応性を示していた。そのため、個体間の比較は The Mouse Brain Bregma in stereotaxic coordinate (Paxinos and Franklin) の Figure 43 (Bregma -1.46mm)

に相当する位置の標本で行った。

統計処理

ウェスタンブロット解析および免疫組織化学の結果は平均値±標準誤差で示し、dKI^{PRMT8^{+/+}}マウスの平均値を 1 とし、dKI^{PRMT8^{-/-}}マウスの数値を相対値で表した。2 群間で F 検定を行い、等分散が仮定された場合はスチューデントの t 検定、不等分散が仮定された場合はウィルチの t 検定を実施し、 $p < 0.05$ の場合は有意差ありと判定した。

3-2-2

実験 2 : PRMT8 の発現増加が dKI マウスの脳神経病理に与える影響

供試動物

AD 病態モデルマウスとして、*App^{NL-G-F}* マウスと *MAPT* KI マウスを掛け合わせた double KI (dKI) マウスを使用した (図 3-1)。実験群として、AAV-PRMT8 の脳室内投与で PRMT8 を発現させる群、AAV 投与の対照群として AAV-GFP を投与する群、実験全体の対照群として AAV を投与しない 3 群に分けて解析を行った。各群とも雌雄 15 ヶ月齢のマウスを 3 頭ずつ用いた。

dKI マウス脳への PRMT8 遺伝子導入

AAV ベクター

PRMT8 遺伝子の発現増加がマウス脳に与える影響を解析するため、ニューロン発現特異性を有するシナプシン I プロモーターの下流にマウス PRMT8 cDNA 配列が挿入された PRMT8 遺伝子導入 AAV ベクター (AAV-PRMT8) を使用した (図 3-3-A)。PRMT8 遺伝子導入の対照には、シナプシン I プロモーターの下流に GFP cDNA 配列が挿入された GFP 遺伝子導入 AAV ベクター (AAV-GFP) を使用した。

なお、AAV-PRMT8 および AAV-GFP は、自治医科大学・科学講座・神経内科学部特命教授の村松慎一博士より供与を受けた。

AAV-PRMT8 の脳室内投与

投与する AAV 溶液は、2%の PEG400 を含有する PBS で 1.0×10^{10} vg/ 5 μ L に調整した。マウスをペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg) の腹腔内投与で麻酔して、痛覚消失を確認した後、脳定位固定装置に頭部を固定した。頭蓋骨の皮膚を切開し、左右側脳室 (bregma より後方に 0.45 mm、矢状縫合より 1 mm、脳実質表層より深さ 2.0 mm) の位置にハミルトンシリンジの針を挿入した (図 3-3-B)。脳定位固定装置に装着した自動シリンジポンプ (ステレオタキシック・インジェクタ Legato130、室町機械、東京) に取り付けられたハミルトンシリンジ (50 μ L) を用いて、左右それぞれ分速 1 μ L の速度で 5 μ L ずつ AAV 溶液を注入した。

AAV-PRMT8 の投与後の PRMT8 タンパク質の発現確認

AAV-PRMT8 の脳室内投与後、PRMT8 タンパク質が海馬全体に発現するまでに要する時間を確認するために、AAV-PRMT8 の脳室内投与後、1 週間、1 ヶ月、3 ヶ月 (各期間、雌雄混合 dKI マウス 2 頭ずつを使用) における PRMT8 タンパク質の発現を免疫組織化学で確認した (図 3-3-C)。その結果、AAV 投与後 1 ヶ月で海馬全体に PRMT8 タンパク質の発現が認められたため、AAV-PRMT8 投与 1 ヶ月後のマウスで解析することにした。

マウス脳組織の取り出し

ペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg) の腹腔内投与で麻酔を行った。以下、脳組織の取り出しとその保存は、実験 1 と同じ方法で行った。

ウエスタンブロット解析

PRMT8 遺伝子の発現増加が dKI マウスの Tau のリン酸化に与える影響を解析するために、AAV-PRMT8 および AAV-GFP を投与した dKI マウスの海馬を用いて、PRMT8、総 Tau (Tau5 抗体) と、リン酸化 Tau (AT8 抗体、PHF1 抗体、AT180) と、内在性コントロール (β -actin) の各タンパク質をウエスタンブロット解析により測定した。以下、海馬組織サンプルの調整とウエスタブロット解析について、メンブレン上のバンドの検出までは実験 1 と同じ方法で行った。

ウエスタンブロット解析で得られたバンド強度の定量は、画像解析ソフト (Image Studio Software ; LI-COR、USA) を用いて算出した。また、Tau5、AT8、PHF1、AT180 のバンドの数値は、 β -actin のバンドの数値で補正した。

組織化学

PRMT8 遺伝子導入による脳の組織的変化を観察するために、AAV-PRMT8 および AAV-GFP を投与した dKI マウスの脳切片標本に HE 染色を施した。PRMT8 の発現を確認するために PRMT8 抗体を用いて、 $A\beta$ 蓄積を確認するために 82E1 抗体を用いて、免疫組織化学を施した。また、脳組織における神経炎症を解析するために、脳炎症によって増加するグリア細胞をアストロサイトのマーカーである GFAP 抗体、ミクログリアのマーカーである Iba1 抗体を使用した免疫組織化学を行った。さらに、神経変性と細胞死を解析するために、神経細胞マーカーである NeuN 抗体と、アポトーシス経路の主要プロテアーゼのマーカーである活性化 Caspase-3 抗体を用いた免疫組織化学を行った。以下、脳標本の作成、免疫組織化学、HE 染色は、実験 1 と同じ方法で行った。

染色脳標本の観察

免疫組織化学を施した脳標本は、デジタルカメラと接続したバーチャルスライドスキャナシステム (NanoZoomer ; Cat# C12000-02、浜松ホトニクス、静岡) で観察して画像取得を行った。取得画像の解析は、市販の画像解析ソフト (Definiens Developer XD Ver. 2.3.0、Trimble、USA) を用いて行った。二次元スキャンモードで取得した画像をもとに、画像解析ソフトの面積測定プログラムを使って海馬 CA3 領域における GFAP、Iba1、NeuN、Caspase-3 の各免疫陽性反応の面積の合計と、免疫組織化学を観察した海馬 CA3 領域の全面積を算出した。さらに、海馬 CA3 領域の全面積に対して各抗体の免疫陽性反応の合計面積が占める割合を算出し、この数値を各個体における免疫組織化学の結果とした。この数値を用いて統計処理による動物間の比較を行った。

なお、脳標本にした海馬の全域で反応性は均一であったため、免疫組織化学の各個体間の比較は、The Mouse Brain Bregma in stereotaxic coordinate (Paxinos and Franklin) の Figure 43 (Bregma -1.46mm) の位置で行った。

統計処理

ウエスタンブロット解析および免疫組織化学の結果は、AAV-GFP 投与 dKI マウスの平均値を 1 とし、それに対する AAV-PRMT8 投与 dKI マウスの数値の相対値で示した。結果は、平均値±標準誤差で示した。2 群間での F 検定を行い、等分散が仮定された場合はスチューデントの t 検定、不等分散が仮定された場合はウィルチの t 検定を実施して、 $p < 0.05$ の場合は有意差ありと判定した。

実験 3 : PRMT8 の発現増加が WT マウスと Tau KO の脳神経病理に与える影響

供試動物

実験 2 で認められた PRMT8 遺伝子導入による病理学的変化が、Tau 病理の存在下で誘導される現象であることを確認するために、Tau を発現しない Tau-KO マウスと野生型マウス (WT マウス) (いずれも、4 ヶ月齢の雄 3 頭) の側脳室に AAV-PRMT8 投与を行った (図 3-1)。また、AAV-PRMT8 を投与しない WT マウス (無処置) の雄 3 頭を用いた。

Tau-KO マウスは、米国ジャクソン研究所から導入後に西道グループで継代繁殖した動物を使用した。WT マウスは、日本エスエルシーより搬入後、西道チームで維持されていた C57BL/6 マウスを使用した。

Tau-KO および WT マウスへの PRMT8 遺伝子導入

AAV ベクター

PRMT8 遺伝子の発現増加が脳に与える影響を解析するため、ニューロン発現特異性有するシナプシン I プロモーターの下流にマウス PRMT8 cDNA 配列が挿入された PRMT8 遺伝子導入 AAV ベクター (AAV-PRMT8) を使用した (図 3-3)。なお、AAV-PRMT8 は、自治医科大学・内科学講座・神経内科学部特命教授・村松慎一博士より供与を受けた。

AAV-PRMT8 の脳室内投与

AAV の溶液は、2%の PEG400 を含有する PBS で 1.0×10^{10} vg/ 5 μ L に調整した。以下、AAV-PRMT8 の脳室内投与は、実験 2 と同じ方法で行った。

マウス脳組織の取り出し

ペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg) の腹腔内投与で麻酔を行った。以下、脳組織の取り出しと保存は、実験 1 と同じ方法で行った。

ウエスタンブロット解析

PRMT8 遺伝子の発現増加が WT マウスの Tau のリン酸化レベルに与える影響を解析するため、無処置および AAV-PRMT8 投与の WT マウスを用いて、PRMT8、総 Tau (Tau5 抗体)、リン酸化 Tau (AT8 抗体、PHF1 抗体)、内在性コントロール (β -actin) の各タンパク質をウエスタンブロット解析により測定した。以下、海馬組織サンプルの調整、メンブレン上のバンド検出までのウエスタンブロット解析は、実験 1 と同じ方法で行った。

ウエスタンブロット解析で得られたバンド強度の定量は、画像解析ソフト (Image Studio Software ; LI-COR, USA) で算出した。また、Tau5、AT8、PHF1 のバンドの数値は、 β -actin のバンドの数値で補正した。

組織化学

PRMT8 遺伝子導入による脳の組織的变化を観察するために、無処置および AAV-PRMT8 投与した WT マウス、AAV-PRMT8 を投与した Tau-KO マウスを用いた。各マウスの脳標本に HE 染色、PRMT8 抗体、GFAP 抗体、Iba1 抗体を使用した免疫組織化学を行った。さらに、神経細胞のマーカーである NeuN 抗体と活性化 Caspase-3 抗体を用いた免疫組織化学を行った。

以下、脳標本の作成、HE 染色、免疫組織化学は、実験 1 と同じ方法で行った。

染色脳標本の観察

各染色を施した脳標本は、デジタルカメラと接続したバーチャルスライドスキャナシステム (NanoZoomer ; Cat# C12000-02、浜松ホトニクス、静岡) で観察して画像の取得を行った。

なお、免疫組織化学および HE 染色を施した脳標本の病理組織像は、海馬の全領域で同じ反応性を示していた。そのため、個体間の比較は The Mouse Brain Bregma in stereotaxic coordinate (Paxinos and Franklin) の Figure 43 (Bregma -1.46mm) に相当する位置の標本で行った。

3-3 結果

3-3-1

実験 1 : PMRT8 欠損が dKI マウスの脳神経病理に与える影響

PRMT 遺伝子欠損マウス (dKI^{PRMT8-/-}) におけるリン酸化 Tau の発現

ウエスタンブロット解析で、dKI^{PRMT8-/-}マウスでは PRMT8 タンパク質は検出されないことが確認された(図 3-4-A)。さらに、総 Tau (Tau5)、リン酸化 Tau (AT8、PHF1)の発現量に関しても、dKI^{PRMT8-/-}マウスと dKI^{PRMT8+/+}マウスの間に有意差は認められなかった(図 3-4-B)。

PRMT 遺伝子欠損マウス (dKI^{PRMT8-/-}) における神経炎症

免疫組織化学により、海馬において蓄積した A β (82E10) の周辺にアストロサイト (GFAP) とミクログリア (Iba1) の集積が認められた (図 3-5-A)。GFAP と Iba1 の抗体の免疫陽性反応の面積平均値は、dKI^{PRMT8-/-}マウスと dKI^{PRMT8+/+}マウスの間で有意な差は認められなかった(図 3-5-B)。

PRMT 遺伝子欠損マウス (dKI^{PRMT8-/-}) における神経の変性と細胞死

HE 染色を施した海馬標本において、dKI^{PRMT8-/-}マウスと dKI^{PRMT8+/+}マウスの間に組織学的な変化は認められなかった (図 3-6-A, B)。免疫組織化学で解析した結果、これら脳の神経細胞の周辺には、アポトーシス経路の活性化 (Caspase-3) の誘導は見られず、海馬における NeuN と Caspase-3 の抗体の免疫陽性反応の面積平均値についても、dKI^{PRMT8-/-}マウスと dKI^{PRMT8+/+}マウスの間で有意な差は認められなかった(図 3-6-C-E)。

3-3-2

実験 2 : PRMT8 の発現増加が dKI マウスの脳神経病理に与える影響

PRMT8 遺伝子導入による PRMT8 タンパクの発現

PRMT8 遺伝子導入の対照実験として行った AAV-GFP の脳室内投与によって、海馬に GFP タンパク質の発現が確認された (図 3-7-B)。

そこで、AAV-PRMT8 投与でマウス脳室内に PRMT8 遺伝子導入を試みたところ、海馬に PRMT8 タンパク質の発現増加が確認された (図 3-7-F)。AAV-PRMT8 投与群では、CA3、CA1、および歯状回に PRMT8 タンパクの発現が特に強く誘導されていた。また、ウエスタンブロット解析により海馬における PRMT8 のタンパク質の発現量の増加が確認された (図 3-7-G)。

PRMT8 遺伝子導入によるリン酸化 Tau の発現

海馬組織のウエスタンブロット解析の結果、無処置群と AAV-GFP 投与群における総 Tau (Tau5)、Ser202/Thr205 リン酸化 Tau (AT8) の発現量に有意差は認められなかった (図 3-8)。そのため、AAV-GFP の投与は Tau のリン酸化レベルには影響を与えないことが示唆された。

この結果をもとに、AAV-PRMT8 投与群と AAV-GFP 投与群を比較したが、総 Tau (Tau5) の発現量には差が認められなかった (図 3-9-A、B)。Ser202/Thr205 リン酸化 Tau (AT8) の発現量にも両群間で有意差は認められなかったものの、AAV-PRMT8 投与群では発現量の高い個体が認められた (図 3-9-C)。一方、Ser396/Ser404 と Thr231 リン酸化 Tau (PHF1、AT180) の発現量は、AAV-GFP 投与群と比較して AAV-PRMT8 投与群で有意な上昇が認められた (図 3-9-D、E)。

PRMT8 遺伝子導入による神経炎症の誘導

免疫組織化学において、海馬 CA3 領域における GFAP 抗体(アストロサイト)の免疫陽性反応の面積平均値は、AAV-GFP 投与群と AAV-PRMT8 投与群の間で有意な差は認めら

れなかった (図 3-10)。一方、Iba1 抗体の免疫陽性反応の面積平均値は、AAV-PRMT8 投与群において有意に増加しており、PRMT8 による顕著なミクログリアの活性化が認められた (図 3-10-L)。

PRMT8 遺伝子導入による神経変性と細胞死の誘導

HE 染色による組織観察から、AAV-PRMT8 投与群の海馬において多数の空胞様変性の増加が観察された (図 3-11)。

海馬 CA3 領域における NeuN 抗体 (神経細胞) の免疫陽性反応の面積平均値は、AAV-GFP 投与群と AAV-PRMT8 投与群の間で有意な差は認められなかった (図 3-12)。一方、Caspase-3 抗体の免疫陽性反応の面積平均値は、AAV-PRMT8 投与群において有意に増加しており、PRMT8 によるアポトーシス経路の活性化が認められた (図 3-12、L)。

3-3-3

実験 3 : PRMT8 の発現増加が WT マウスと Tau KO の脳神経病理に与える影響

AAV-PRMT8 投与 WT マウスにおけるリン酸化 Tau の発現

ウエスタンブロット解析で無処置 WT マウスと AAV-PRMT8 投与 WT マウスの総 Tau (Tau5)、Ser202/Thr205 リン酸化 Tau (AT8) の発現量を比較したところ、両群間に有意な差は認められなかった (図 3-13)。また、Ser396/Ser404 リン酸化 Tau (PHF1) の発現量に関しても、両群間に有意な差は認められなかった。しかし、AAV-PRMT8 投与 WT マウスでは発現量が高い個体が認められた (図 3-13-D) ($p=0.057$)。

AAV-PRMT8 投与 WT マウスと Tau-KO マウスにおける神経炎症

AAV-PRMT8 の脳室内投与によって海馬に PRMT8 タンパクが発現することが確認された (図 3-14、A-C)。また、dKI マウスを使った実験と同様に、AAV-PRMT8 投与した WT マウスと Tau-KO マウスの海馬でも無処置の WT マウスと比べて、顕著なアストロサイトとミクログリアの免疫陽性反応の増加が認められた (図 3-14-D-I)。

AAV-PRMT8 投与 WT マウスと Tau-KO マウスにおける神経の変性と細胞死

AAV-PRMT8 投与した WT マウスと Tau-KO マウスの海馬において、dKI マウスを使った実験と同様に海馬における空胞様変性の増加が認められた (図 3-15-A~G)。これに加えて、AAV-PRMT8 投与した WT マウスと Tau-KO マウスでは、無処置の WT マウスと比べて、神経細胞の周囲に顕著な Caspase-3 免疫陽性反応の増加が認められた (図 3-15-H-M)。

3-4 考察

研究2では、PRMT8がAD発症機序においてアミロイド病理とタウ病理、そして神経変性を繋ぐ因子であると仮定して解析を行った。

まず実験1において、PRMT8を欠損したdKIマウス ($dKI^{PRMT8^{-/-}}$ マウス) と欠損していないマウス ($dKI^{PRMT8^{+/+}}$ マウス) を比較したところ、両群に病理学的な差は認められなかった。この結果は、PRMT8単独の遺伝子欠損は、AD病態に影響を与えない可能性を示している。 $dKI^{PRMT8^{-/-}}$ マウスで病理学的変化が認められなかった理由の一つとして、PRMT8のアルギニンメチル化作用が、同一ファミリーの中でPRMT8と相同性の高いPRMT1により補われた可能性が考えられる。PRMT1はPRMT8と同様に神経細胞にも発現しており、PRMT8とPRMT1との遺伝子相同性は97%、アミノ酸相同性は83%と極めて高い (Lee, et al, 2005)。これまで、PRMT1欠損マウスは、胎生初期に致死となるが中枢神経特異的なコンディショナルな欠損では生存可能であることが報告されている (Hashimoto et al., 2016)。このことから、AD病態とアルギニンメチル化作用の関係を解析するためには、PRMT8と同時にPRMT1を中枢神経特異的に欠損させたモデルを用いた解析も必要であると考えられる。また、本研究ではCRISPR/Cas9システムを用いてPRMT8遺伝子を欠損させたPRMT8欠損dKIマウスの選別方法としてシーケンス解析を行い、PRMT8遺伝子の両アレルに欠損を認めた個体を解析に用いた。他の研究において、Cre/loxPシステムで作製されたPRMT8欠損マウスでは、下肢反射異常と呼ばれる尻尾を持ち上げた状態にすると後肢を交差させるような姿勢をとる異常が見られるが、26頭の中9頭はこの様な異常を示さないとする報告がある (Kim et al., 2015)。PRMT8欠損による本当の病理学的影響を検証するためには、PRMT8機能欠損のスクリーニングとして下肢反射試験を行い、異常が認められた個体をPRMT8が機能的に欠損した個体として病理学的解析の対象とすることが必要になるかもしれない。

実験2では、AAVを用いてdKIマウスの脳におけるPRMT8発現を増加させたところ、Tauのリン酸化の亢進、神経炎症の誘導、アポトーシス経路の活性化、および空胞様の変性の誘導が認められた。この結果より、PRMT8は「アミロイド病理」「タウ病理」「神

経変性と細胞死」を繋ぐ因子である可能性が高いと予想した。そこで、つづく実験 3 において、PRMT8 が誘発する病理学的変化がタウ病理依存的に生じる現象であることを確認するため、WT マウスと Tau-KO マウスの脳において PRMT8 の発現を増加させた。その結果、dKI マウス同様に Tau が発現しないマウスにおいても神経炎症の誘導、アポトーシス経路の活性化、および空胞様の変性の誘導が認められた。したがって、当初の予想とは異なり、PRMT8 はタウ病理とは独立して病理学的変化を誘発する因子であるとの結論に至った (図 3-16) (石井ら、2018b)。

研究 2 では PRMT8 が誘導する病理学的変化の分子機序を明らかにするまでには至らなかった。しかし、先行研究の報告から、PRMT8 の病理学的変化誘発に関する作用機序についていくつかの仮説が考えられる。AD と同じく神経変性疾患である ALS では、通常は核内に存在する fused in sarcoma (FUS) などの RNA 結合タンパク質が、細胞質に移動して凝集体を形成することが病態進行に関連することが示されている。これまで、PRMT8 と PRMT1 は FUS のアルギニンをメチル化することで FUS の核内輸送を阻害して、最終的に細胞質内での FUS の凝集や蓄積が促進すること (Scaramuzzino et al., 2013)、PRMT1 は FUS のアルギニン残基をメチル化して核移行に関与する Transportin との結合を阻害することが示されている (Neumann et al., 2011)。さらに、FUS 遺伝子変異を有する ALS 患者から得られたリンパ芽球様細胞に対して、メチル化阻害薬 adenosine dialdehyde (AdOx) を添加した実験では、核や細胞質で FUS 蓄積が減少するとの報告がある (Scaramuzzino et al., 2013)。PRMT ファミリーによるタンパク質のアルギニンメチル化が主に生じるアミノ酸配列は、RGG/RG モチーフと呼ばれるアルギニンおよびグリシンが豊富な領域であり、これらモチーフはタンパク質の核への結合やタンパク質-タンパク質の結合を調整に関与する (Thandapani et al., 2013)。今回の実験で、AAV を用いて Tau-KO マウス海馬で PRMT8 の発現を増加させたところ、PRMT8 誘発性の神経変性が認められたが、その理由として Tau 以外の微小管結合タンパク質のアルギニンメチル化修飾が PRMT8 誘発性の神経変性に関与していた可能性も考えられる。神経細胞の中には Tau 以外にも微小管結合タンパク質が発現しており

(Dehmelt and Halpain, 2005)、その中でも Microtubule-associated protein 2 (MAP2) は Tau のホモログであり、その微小管結合ドメインも Tau と高い相同性を有することが知られている。したがって、PRMT8 が神経変性を誘発する分子機序を明らかにするために、AAV-PRMT8 投与モデルを用いて、PRMT8 でアルギニンメチル化を受けるタンパク質を同定することは有効な手段と考えられる。PRMT8 誘導性の神経変性がタンパク質のアルギニンメチル化修飾を介して生じることが明らかとなれば、メチル化阻害薬による抑制が神経変性の増悪を防ぐ手段として有効であることを示せるのでは無いかと考えられる。

一方、PRMT8 単独では無く他のタンパク質との相互作用による結果とも考えられる。PRMT8 を発現させた細胞を用いた質量分析により、PRMT8 と FUS、Ewing's sarcoma (EWS) や Tubulin を含む 20 種のタンパク質が相互作用することが報告されている (Pahlich et al., 2008)。このことより、PRMT8 が Tau 以外の他のタンパク質と相互作用することにより、神経変性を誘発している可能性が推察される。

PRMT8 誘発性の神経炎症の誘導、アポトーシス経路の活性化、および空胞様の変性の誘導は、ALS 患者および ALS 病態モデルマウスでも認められる病理学的変化である (Bucher et al., 2007; Dahlke et al., 2015)。このことから、ALS 病態における PRMT8 の機能を解明することが、PRMT8 が誘発する病理学的変化の分子機序の解明に有効だと考えられる。

本実験において認められた AAV-PRMT8 投与マウスの空胞様の変性は、AD 患者の脳で特異的に認められる病理学的変化では無かったが、他の神経変性疾患であるプリオン病や ALS でも似たような空胞様の変性が認められている。脳の水腫性壊死・軟化と呼ばれる変性では、脳の細胞全体の細胞膜イオンチャネルが障害を受け、細胞内に液体が貯留して細胞全体が膨化して空胞様の変性が誘導される。今後の研究課題として、電子顕微鏡を用いて PRMT8 が誘導する空胞様の変性の現象の本態を詳細に確認する必要があると思われる。これまでに、前頭側頭型認知症や ALS と関係がある FUS 遺伝子を欠損させたマウスにおいても、その海馬領域で空胞様の変性が生じることが報告

されている (Kino et al., 2015)。さらに、Prnp, Atrn, Mgrn1, Sp4, Gja1, Gjb6, Pnpla6 などの遺伝子も空胞様の変性の誘導に関係することが、遺伝子改変マウスの解析で明らかとなっている (He et al., 2003; Zhou et al., 2005; Chu et al., 2008; Jiang et al., 2017)。これらの遺伝子が PRMT8 によりアルギニンメチル化修飾を受けられる可能性、また PRMT8 と相互作用することにより PRMT8 誘発性の空胞変性が生じる可能性が考えられる。依然として、生体内での PRMT8 の作用には不明な点が多いことから、PRMT8 がどのような分子機序を介して病理学的変化を誘発するのかを明らかにすることが必要である (図 3-17)。

第3章 図と表

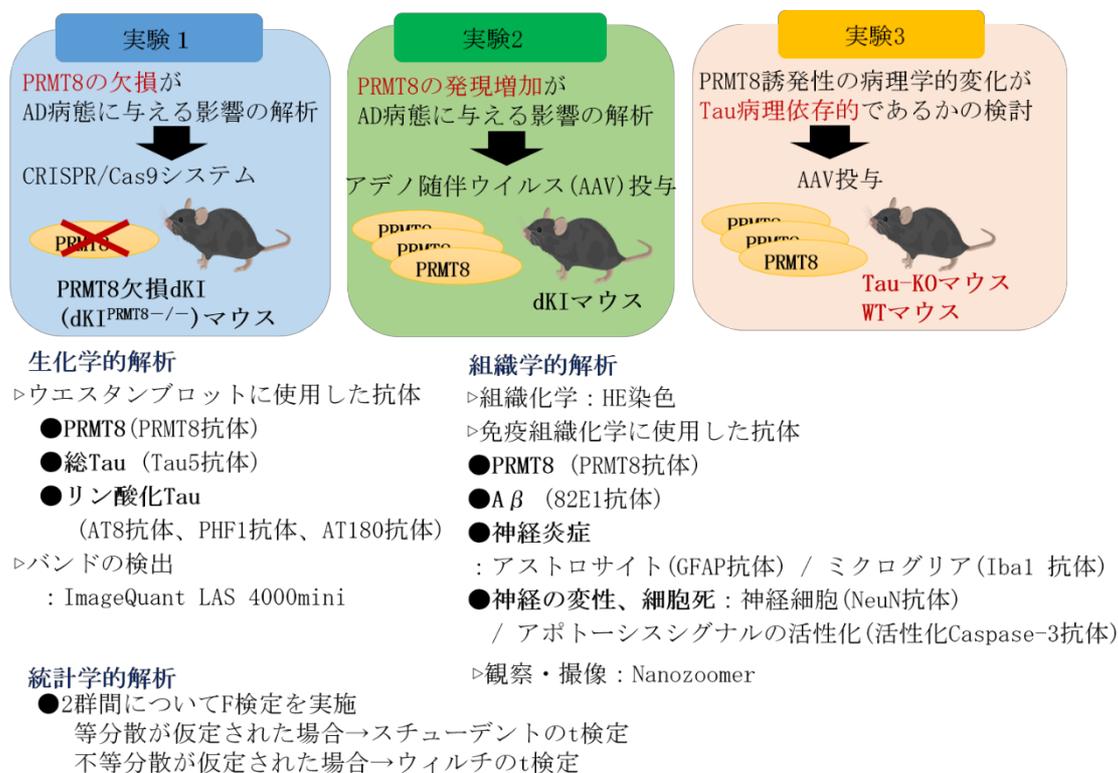


図 3-1 研究 2 の概要

上部の図は、実験 1～3 の目的および使用した供試動物の概要。下半分は、実験 1～3 で行った生化学的解析と組織学的解析の概要。

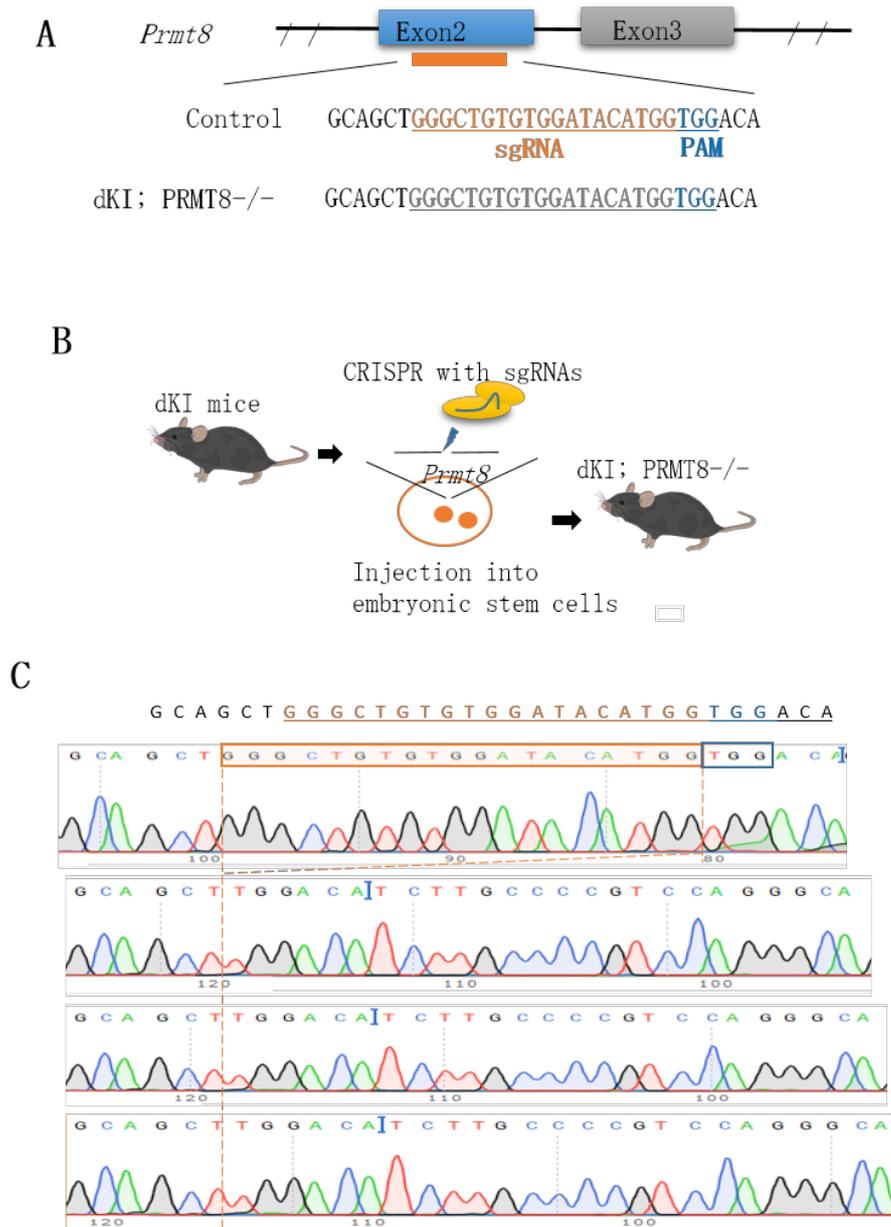


図 3-2 CRISPR/Cas9 システムによる dKI^{PRMT8^{-/-}}マウスの作製

A : PRMT8 遺伝子の配列と sgRNA の位置を示した。**B** : dKI^{PRMT8^{-/-}}マウスを作製するため、dKI マウス受精卵に PRMT8 遺伝子を標的とした sgRNA と、Cas9 RNA をマイクロインジェクションした。**C** : マイクロインジェクション操作により得られた産仔の尾部組織から抽出した DNA のシーケンス解析の結果を示す。PRMT8 遺伝子配列の欠損が確認された 3 頭を解析に使用した。

表 3-1 ウェスタンブロット解析に使用した一次抗体

一次抗体	標的	希釈倍率	会社名・商品番号
Tau5	総 Tau	1:5000	#AHB0042, Thermo Fischer Scientific
AT8	リン酸化 Tau (Ser202/Thr205)	1:2500	#90206 Innogenetics
PHF-1	リン酸化 Tau (Ser396/Ser404)	1:1000	kindly provided from Peter Davies, Albert Einstein College of Medicine
AT180	リン酸化 Tau (Thr231)	1:1000	#MN1040, Thermo Fisher Scientific
PRMT8	PRMT8 N 末端	1:2000	#R0001-1, Abiocode
β -actin	内在性コントロール	1:5000	#A5441, Sigma
Tubulin	内在性コントロール	1:5000	#ab11312, abcam

表 3-2 免疫組織化学に使用した一次抗体

一次抗体	標的	希釈倍率	会社名・商品番号
82E1	A β N 末端	1:200	#10323, IBL
AT8	リン酸化 Tau (Ser202/Thr205)	1:200	#90206, Innogenetics
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	アストロサイト	1:100	MAB3402, Millipore
Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1)	ミクログリア	1:100	#019-19741, Wako
活性化 Caspase-3 (Caspase-3)	アポトーシス経路 の活性化	1:100	#9661S, Cell Signaling Technology
NeuN	神経細胞	1:200	#ab104224, abcam
PRMT8	PRMT8	1:100	#ab168134, abcam

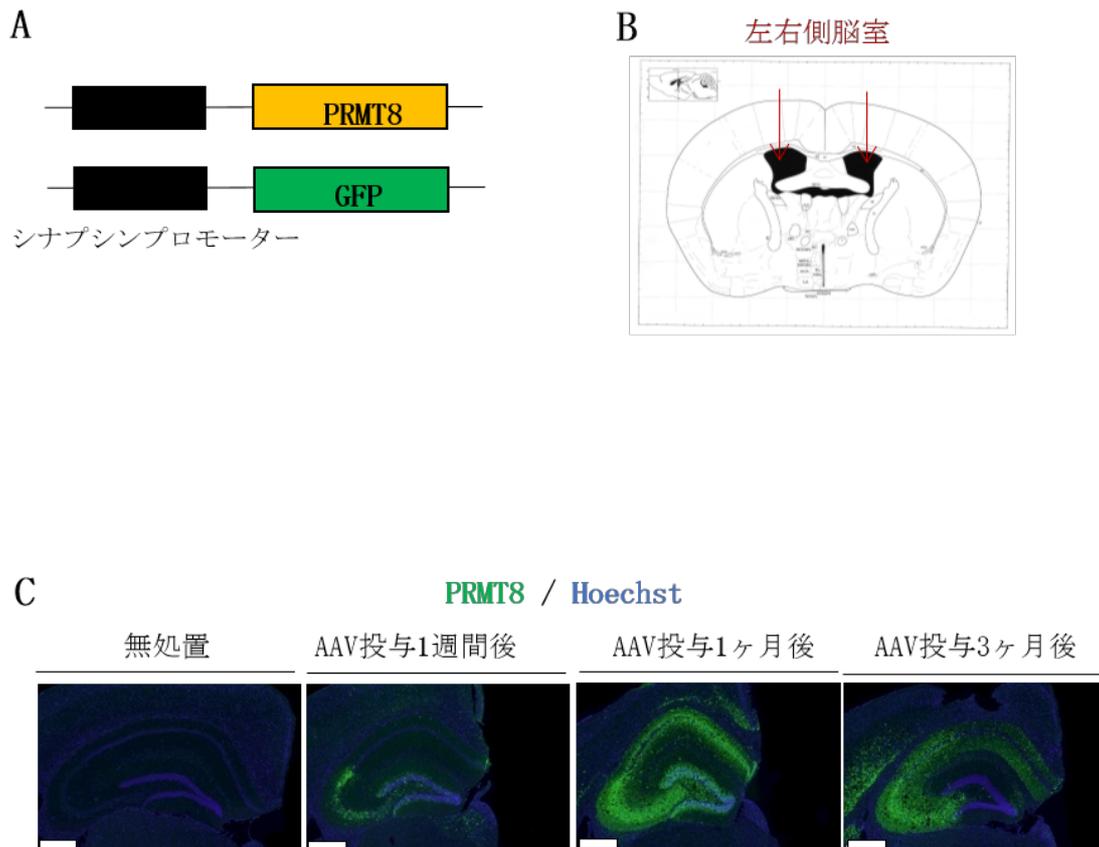


図 3-3 アデノ随伴ウイルスによる PRMT8 遺伝子の導入

A : AAV 遺伝子の配列とプロモーター配列の位置を示す。**B** : AAV の投与部位を赤矢印で表す。マウス脳に挿入した針先が、bregma から後方 0.45 mm、矢状縫合から左右に 1 mm、脳表層から深さ 2.0 mm の位置になるように固定し、AAV 溶液を投与した。**C** : 海馬領域の免疫組織化学の結果（緑は PRMT8 のタンパク質、青は Hoechst で染色された細胞の核を表す）。スケールバー：500 μ m。

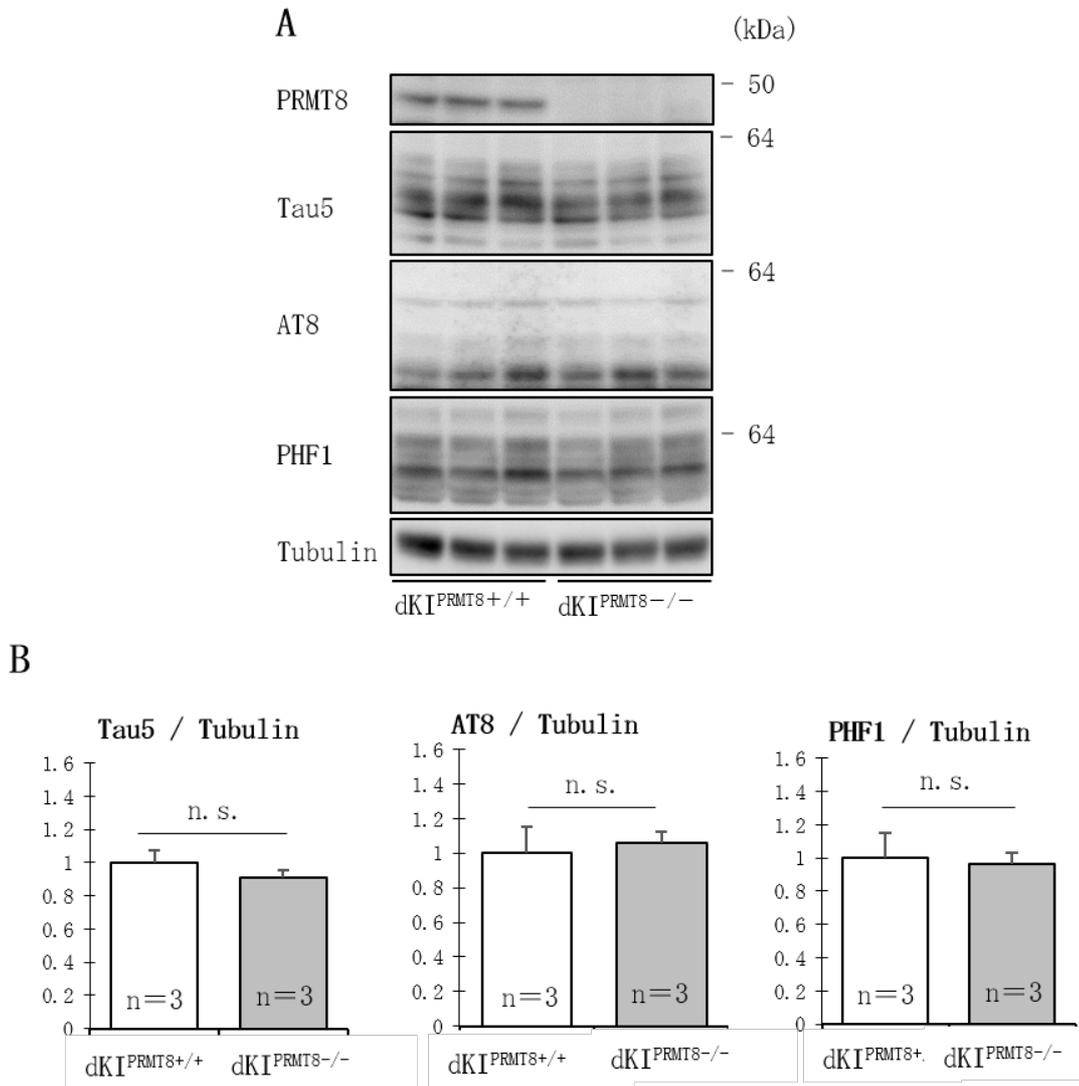


図 3-4 dKI^{PRMT8}+/+ と dKI^{PRMT8}-/- マウス海馬のリン酸化 Tau の比較

A: ウェスタンブロット解析による、PRMT8、総 Tau (Tau5)、リン酸化 Tau (AT8 と PHF1)、内在性コントロール (Tubulin) の検出。**B:** A の結果における Tau5、AT8、PHF1 の比較。グラフは dKI^{PRMT8}+/+ マウスの平均値を 1 とし、dKI^{PRMT8}-/- マウスの数値を相対的に表した (平均値 ± 標準誤差、n. s. : 有意差なし、スチューデントの t 検定もしくはウィルチの t 検定による結果)。

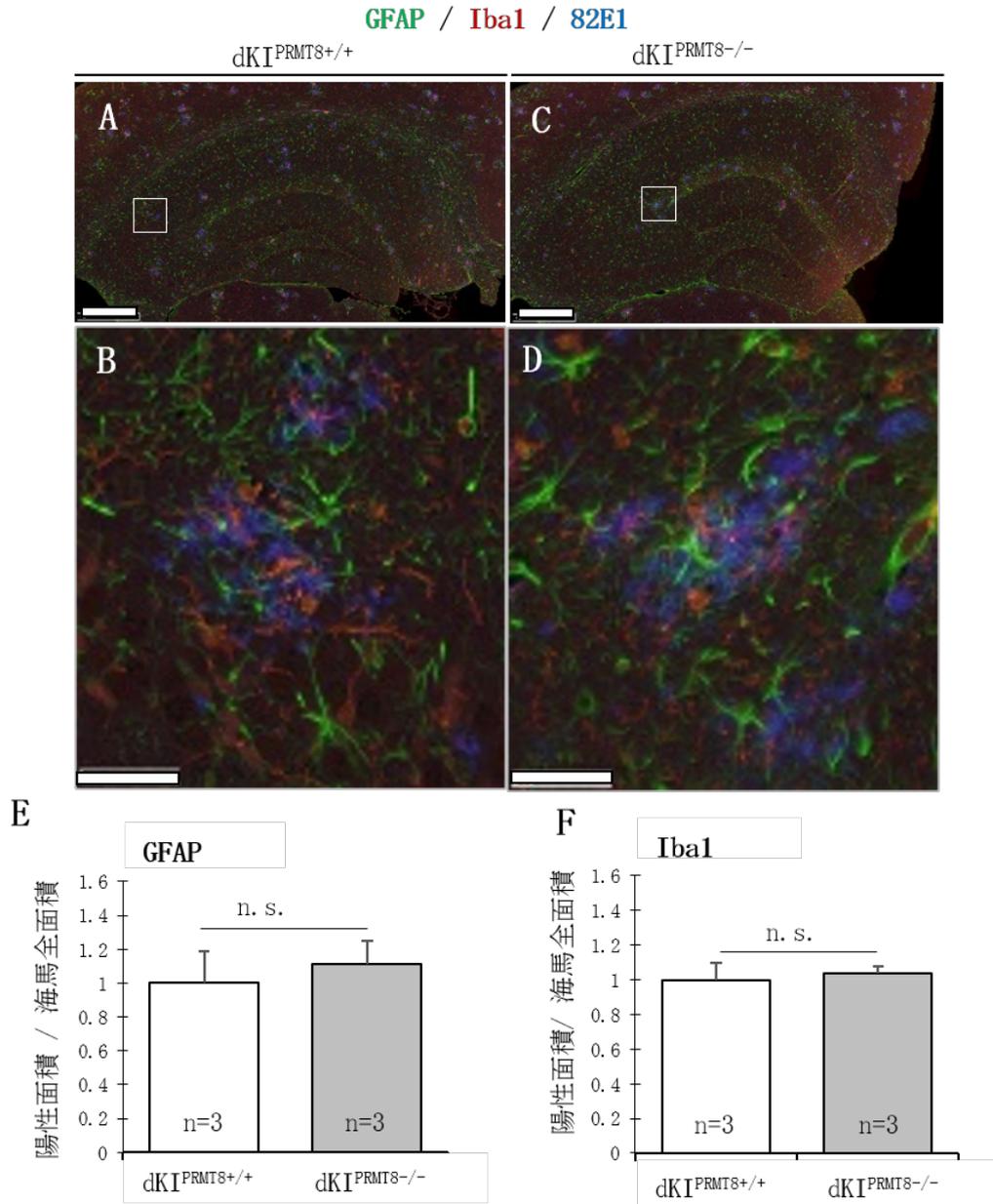


図 3-5 dKI^{PRMT8+/+} と dKI^{PRMT8-/-} マウス海馬の神経炎症の比較

A-D : 緑は GFAP (アストロサイト) の免疫陽性反応、赤は Iba1 (ミクログリア) の免疫陽性反応、青は 82E1 (A β) の免疫陽性反応を表す。A : dKI^{PRMT8+/+} マウス。C : dKI^{PRMT8-/-} マウス。B、D : A と B における四角部分の拡大図。E : 海馬全体における GFAP の免疫陽性反応の比較。F : 海馬全体における Iba1 の免疫陽性反応の比較。E、F : グラフは dKI^{PRMT8+/+} の平均値を 1 とし、dKI^{PRMT8-/-} マウスの数値を相対的に表した (平均値 \pm 標準誤差、n. s. : 有意差なし、スチューデントの t 検定もしくはウィルチの t 検定による結果)。スケールバー : A、B (500 μ m) 、C、D (50 μ m) 。

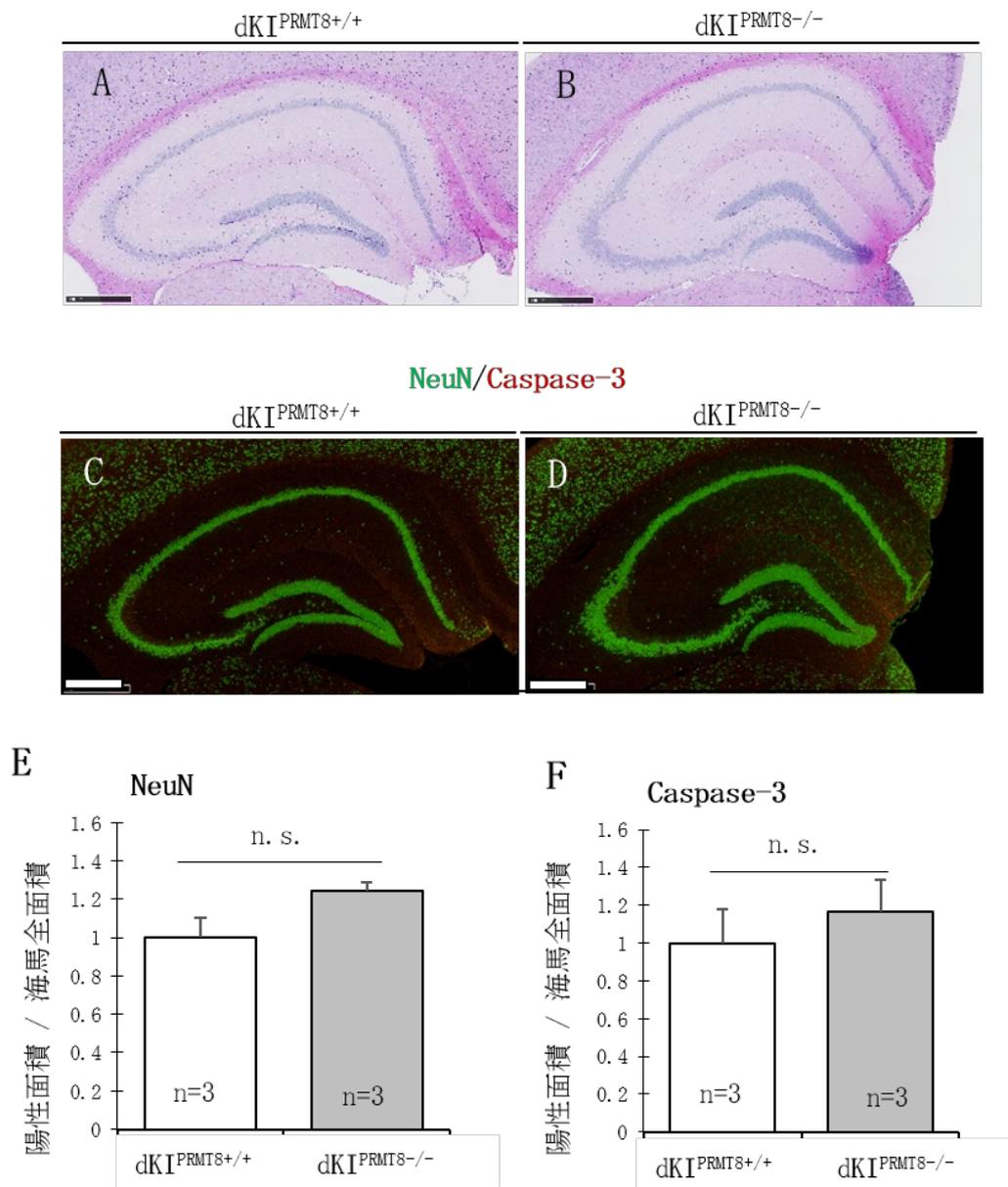


図 3-6 dKI^{PRMT8}^{+/+}と dKI^{PRMT8}^{-/-}マウス海馬の神経の変性と細胞死の比較

A、B: 海馬の HE 染色の結果。C、D: 緑は NeuN (神経細胞) の免疫陽性反応、赤は Caspase-3 (アポトーシス経路の活性化) の免疫陽性反応を表す。A、C: dKI^{PRMT8}^{+/+}マウス。B、D: dKI^{PRMT8}^{-/-}マウス。E: 海馬全体における NeuN の免疫陽性反応の比較。F: 海馬全体における Caspase-3 の免疫陽性反応の比較。E、F: グラフは dKI^{PRMT8}^{+/+}の平均値を 1 とし、dKI^{PRMT8}^{-/-}マウスの数値を相対的に表した (平均値 ± 標準誤差、n. s.: 有意差なし、学生 t 検定もしくはウィルチの t 検定による結果)。スケールバー: A-D (500 μm)。

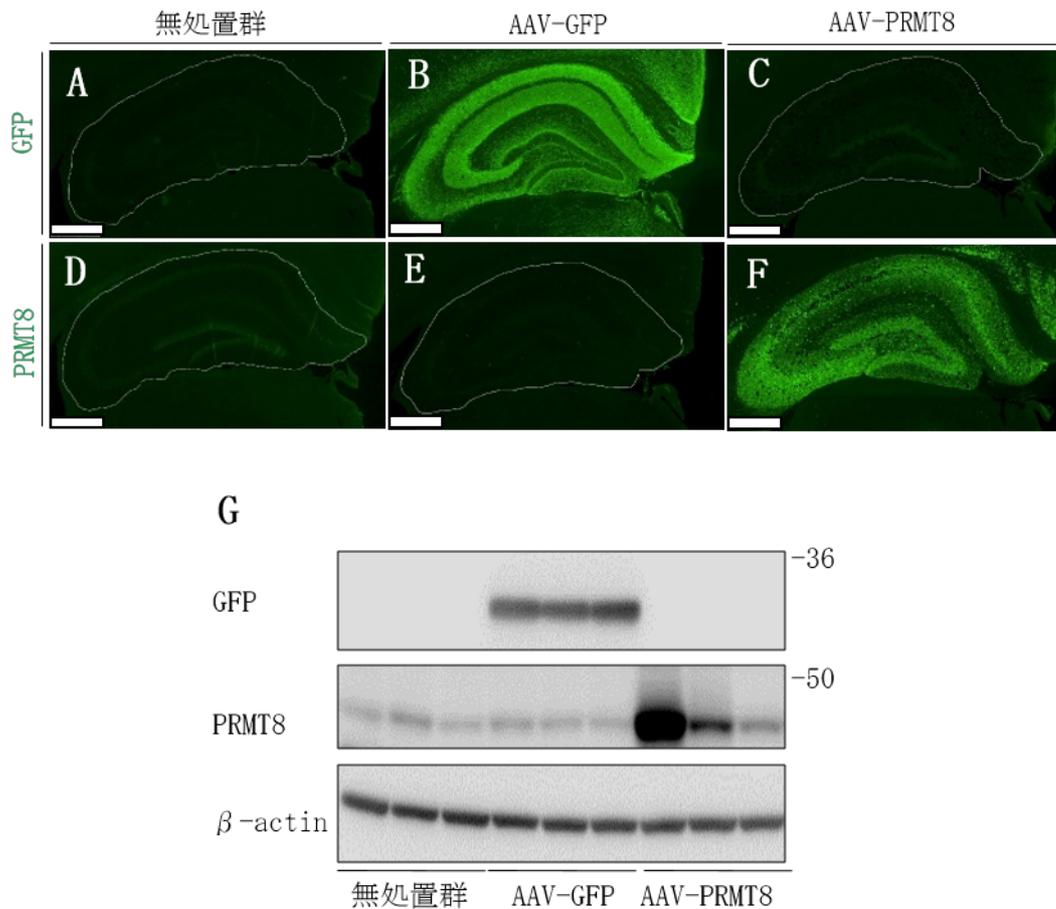


図 3-7 dKI マウスにおける AAV-PRMT8 投与による PRMT8 の発現誘導

A-C: GFP 抗体の免疫組織化学による結果。D-F: PRMT8 抗体の免疫組織化学による結果。

A、D: 無処置群。B、E: AAV-GFP 投与群。C、F: AAV-PRMT8 投与群。スケールバー: 500 μ m。

G: ウェスタンブロット解析による、GFP、PRMT8、内在性コントロール(Tubulin)の検出結果。

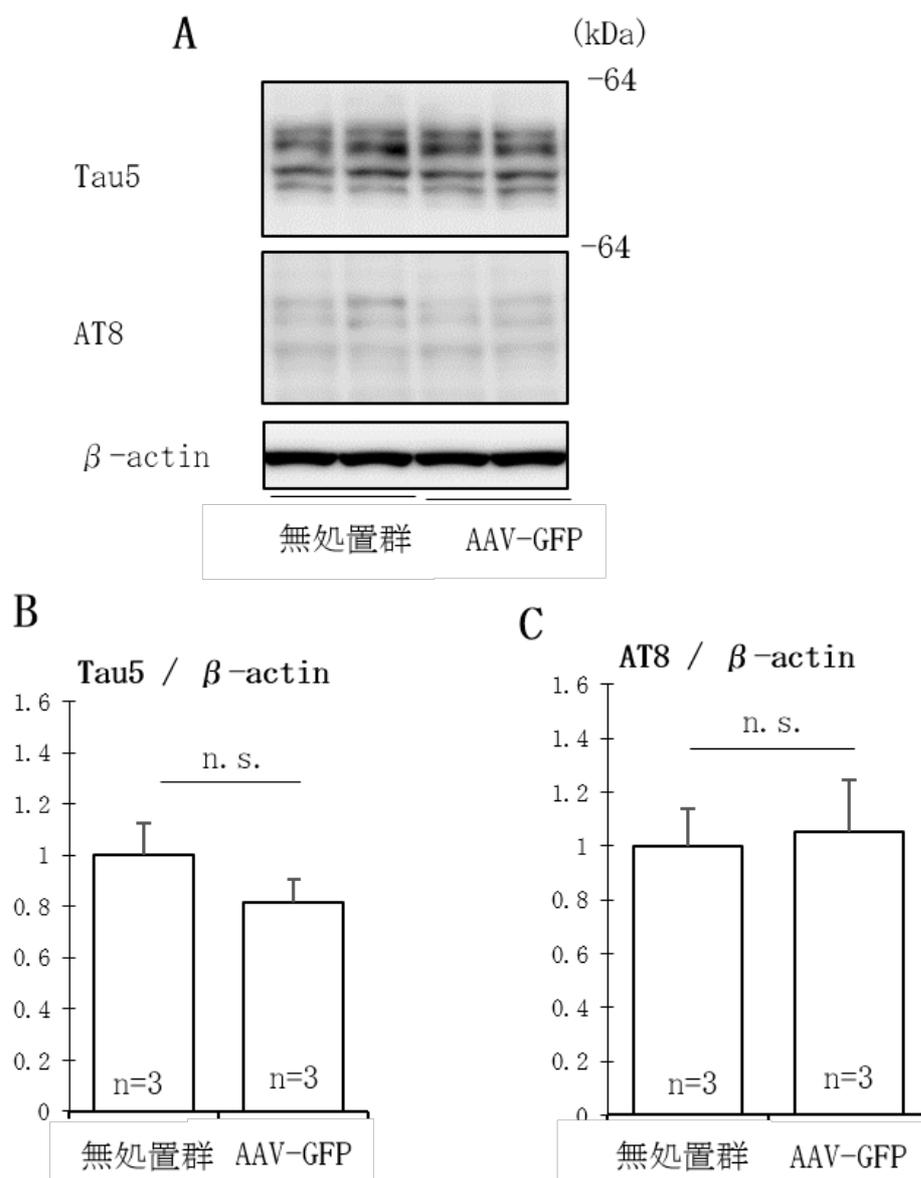


図 3-8 無処置および AAV-GFP を投与した dKI マウスのリン酸化 Tau の比較

A : ウェスタンブロット解析による、総 Tau(Tau5)、リン酸化 Tau(AT8)、内在性コントロール(β -actin)の検出。B : Tau5 の比較。C : AT8 の比較。B、C : グラフは無処置の dKI マウスの平均値を 1 とし、AAV-GFP を投与した dKI マウスの数値を相対的に表した(平均値 \pm 標準誤差、n. s. : 有意差なし、スチューデントの t 検定もしくはウィルチの t 検定による結果)。

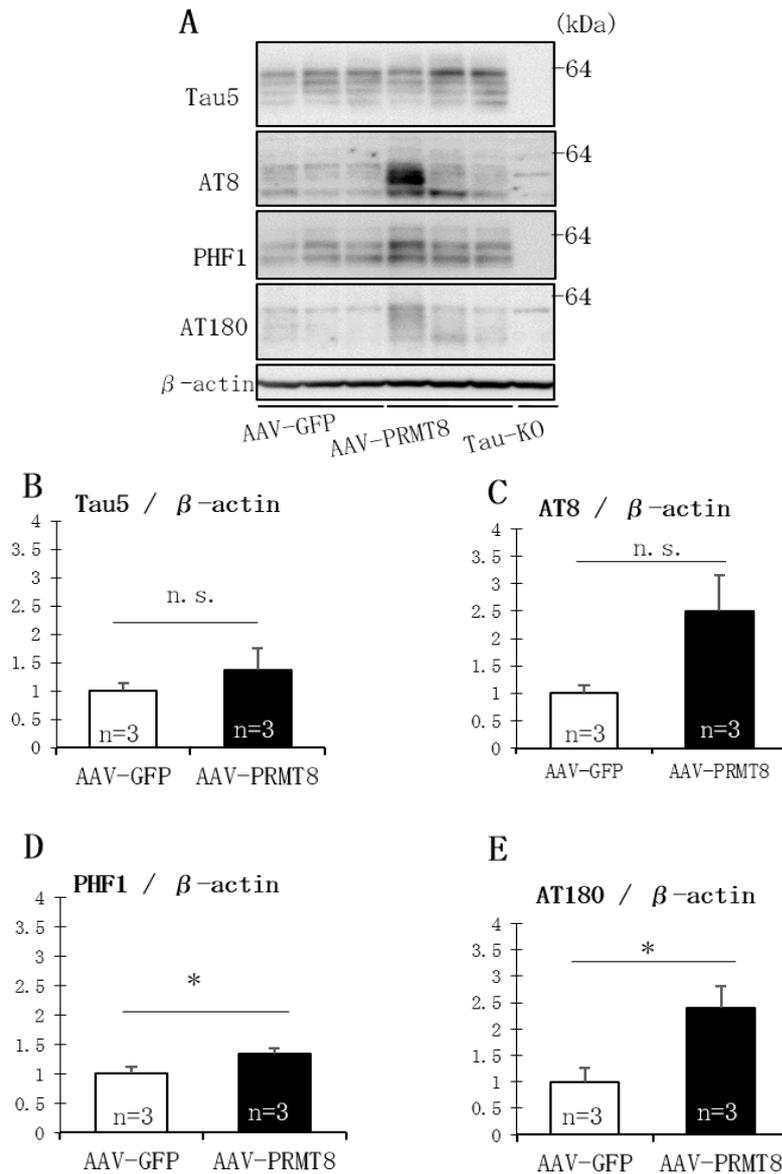


図 3-9 AAV-GFP および AAV-PRMT8 を投与した dKI マウスのリン酸化 Tau の比較

A : ウェスタンブロット解析による、総 Tau (Tau5)、リン酸化 Tau (AT8、PHF1、AT180)、内在性コントロール (β -actin) の発現 (Tau-KO : Tau 検出の陰性コントロール)。**B** : 総 Tau (Tau5) の比較。**C** : Ser202/Thr205 リン酸化 Tau (AT8) の比較。**D** : Ser396/Ser404 リン酸化 Tau (PHF1) の比較。**E** : Thr231 リン酸化 Tau (AT100) の比較。**B-E** : グラフは AAV-GFP を投与した dKI マウスの平均値を 1 とし、AAV-PRMT8 を投与した dKI マウスの数値を相対的に表した (平均値 \pm 標準誤差、n. s. : 有意差なし、* : $p < 0.05$ 、スチューデントの t 検定もしくはウィルチの t 検定による結果)。

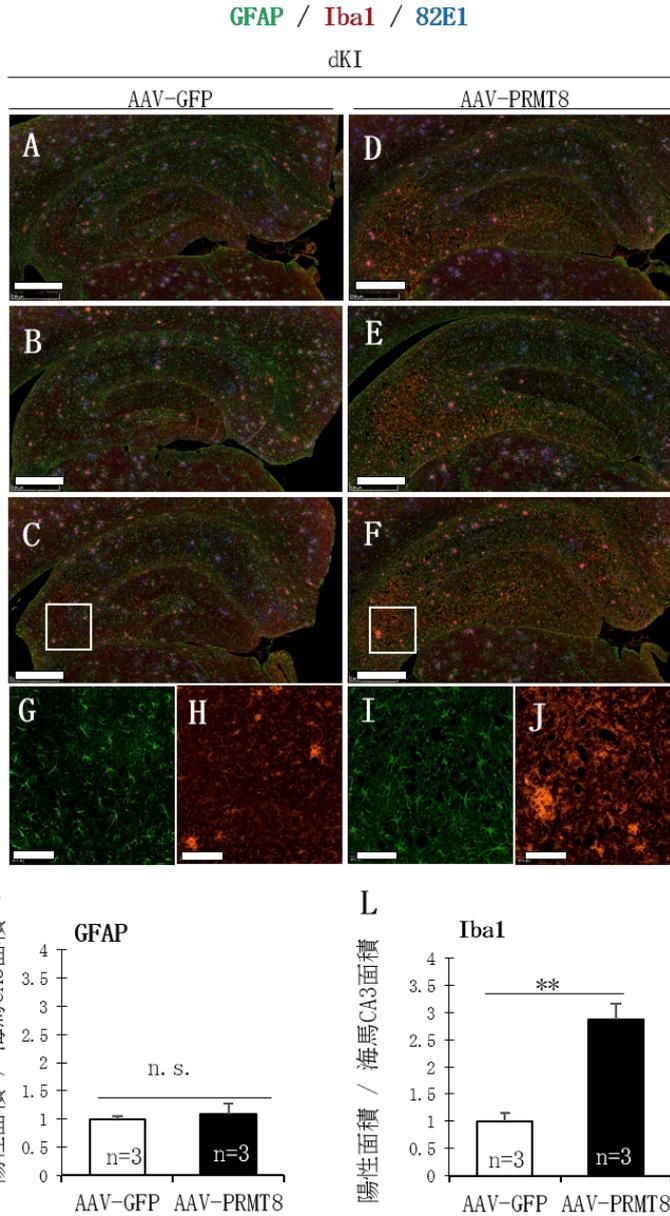


図 3-10 AAV-GFP および AAV-PRMT8 を投与した dKI マウスの神経炎症の比較

A-J : 緑は GFAP (アストロサイト) の免疫陽性反応、赤は Iba1 (ミクログリア) の免疫陽性反応、青は 82E1 (A β) の免疫陽性反応を表す。A-C : AAV-GFP 投与 dKI マウス (n=3)。D-F : AAV-PRMT8 投与 dKI マウス (n=3)。G、H : C における四角部分の拡大図。I、J : F における四角部分の拡大図。K : 海馬 CA3 領域における GFAP の免疫陽性反応の比較。L : 海馬 CA3 領域における Iba1 の免疫陽性反応の比較。K、L : グラフは AAV-GFP を投与した dKI マウスの平均値を 1 とし、AAV-PRMT8 を投与した dKI マウスの数値を相対的に表した (平均値 \pm 標準誤差、n. s. : 有意差なし、** : p<0.01、スチューデントの t 検定もしくはウィルチの t 検定による結果)。スケールバー : A-F (500 μ m)、G-J (100 μ m)。

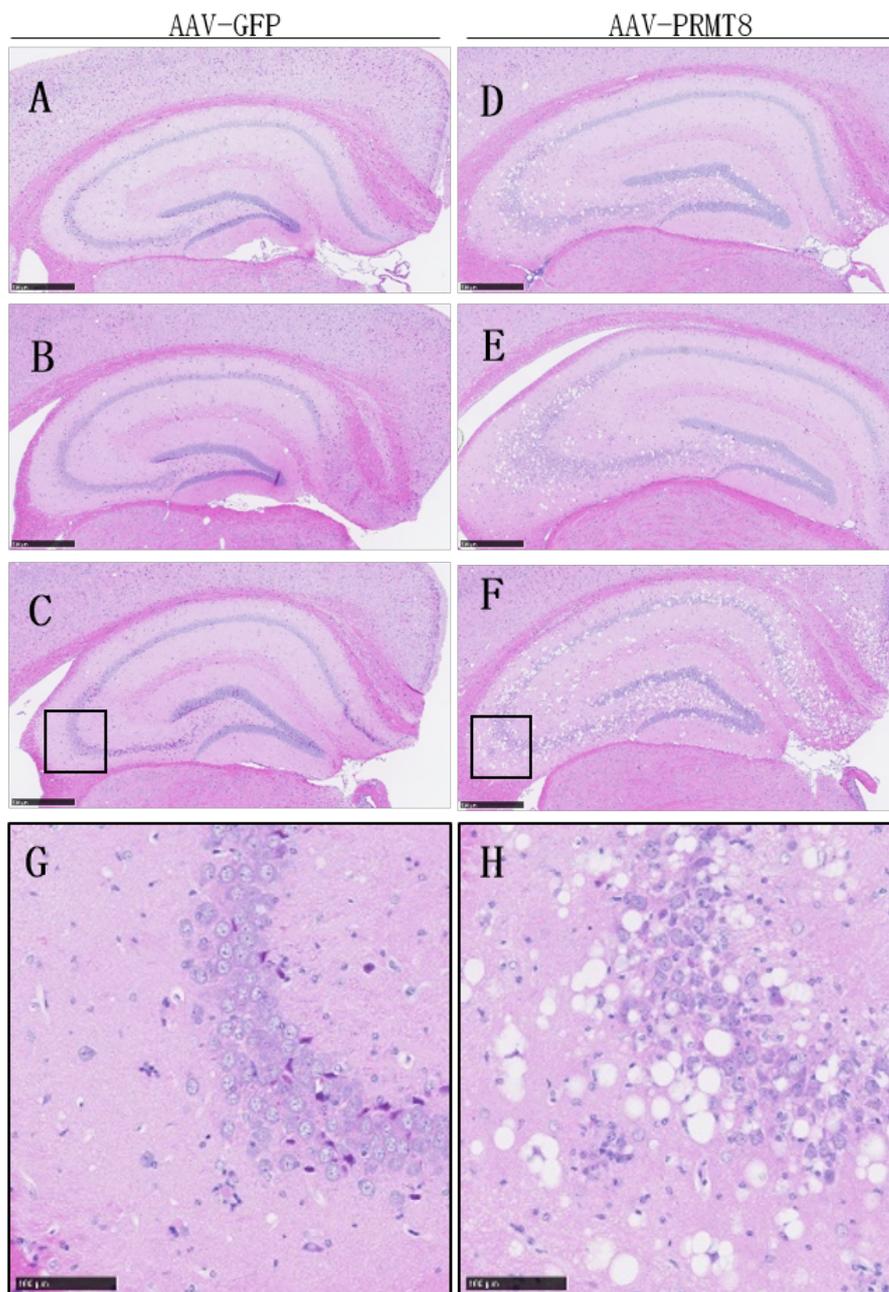


図 3-11 AAV-PRMT8 を投与した dKI マウスにおける空胞様の変性 の出現

A-H: HE 染色の結果。A-C: AAV-GFP 投与 dKI マウス (n=3)。D-F: AAV-PRMT8 投与 dKI マウス (n=3)。G: C における四角部分の拡大図。H: F における四角部分の拡大図。スケールバー: A-F (500 μ m)、G、H (100 μ m)。

NeuN/ Caspase3

dKI

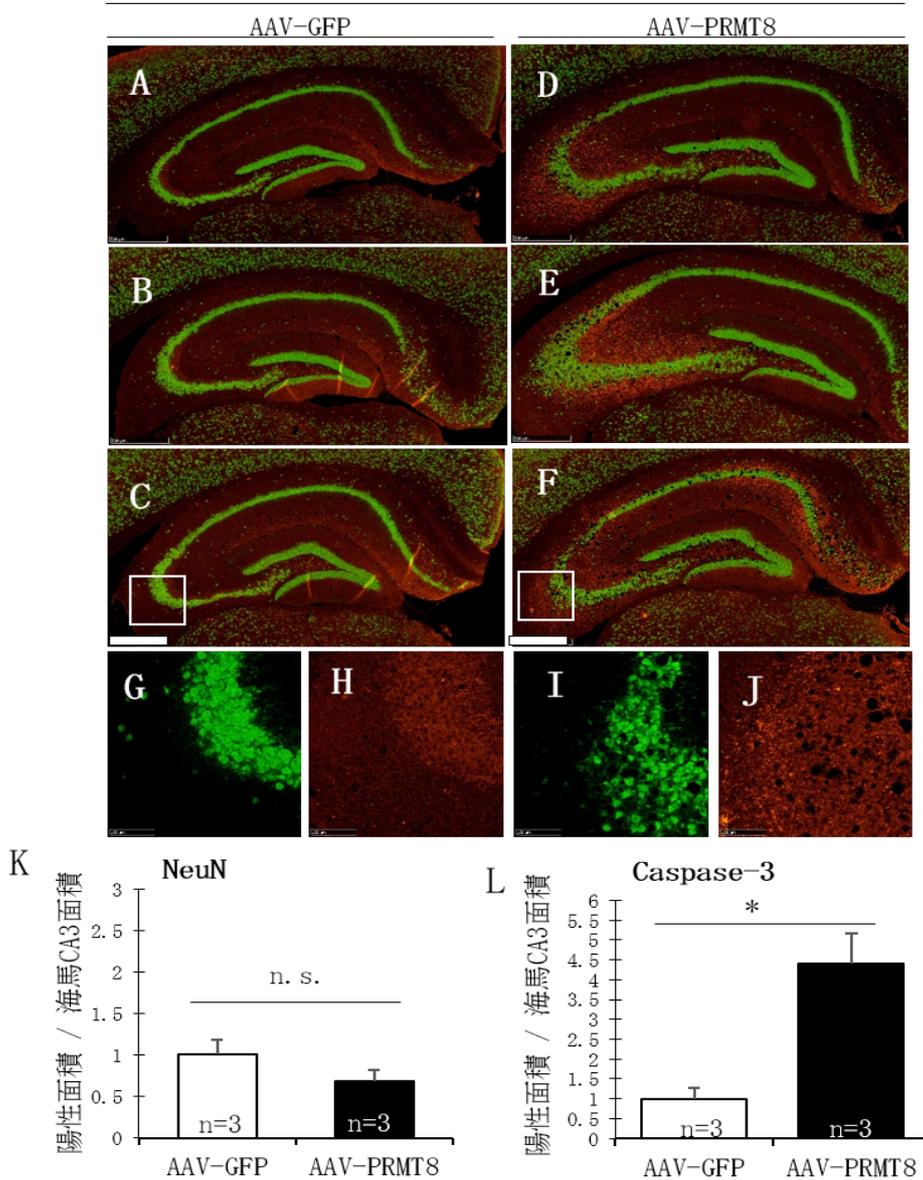


図 3-12 AAV-GFP および AAV-PRMT8 を投与した dKI マウスの神経細胞死の比較

A-J: 緑は NeuN (神経細胞) の免疫陽性反応、赤は Caspase-3 (アポトーシス経路の活性化) の免疫陽性反応を表す。A-C: AAV-GFP 投与 dKI マウス (n=3)。D-F: AAV-PRMT8 投与 dKI マウス (n=3)。G、H: C における四角部分の拡大図。I、J: F における四角部分の拡大図。K: 海馬 CA3 領域における NeuN の免疫陽性反応の比較。L: 海馬 CA3 領域における Caspase-3 の免疫陽性反応の比較。K、L: グラフは AAV-GFP を投与した dKI マウスの平均値を 1 とし、AAV-PRMT8 を投与した dKI マウスの数値を相対的に表した (平均値 ± 標準誤差、n. s.: 有意差なし、*: $p < 0.05$ 、スチューデントの t 検定もしくはウィルチの t 検定による結果)。スケールバー: A-F (500 μm)、G-J (100 μm)。

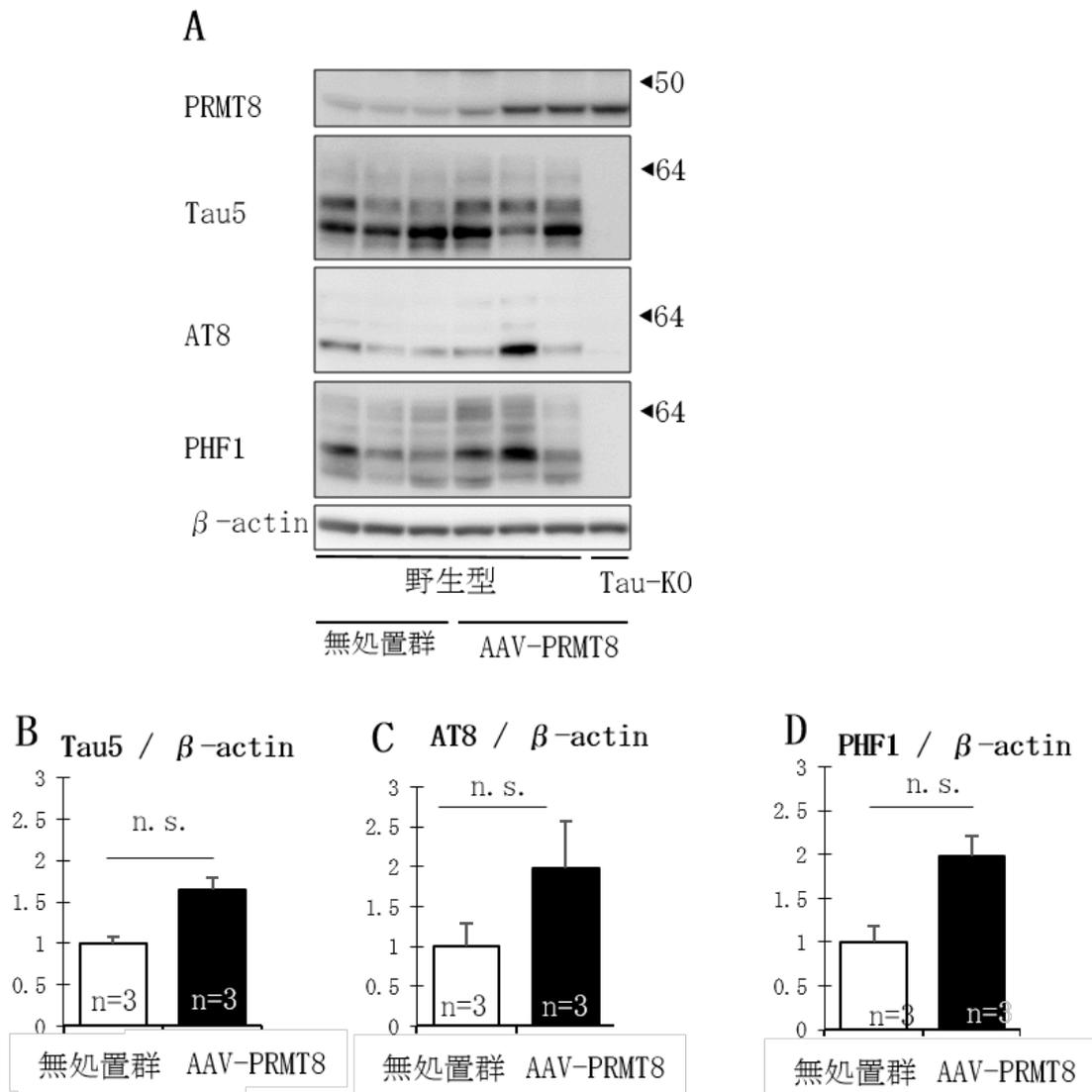


図 3-13 無処置 WT および AAV-PRMT8 投与 WT マウスのリン酸化 Tau の比較

A : ウェスタンブロット解析による、総 Tau (Tau5)、リン酸化 Tau (AT8、PHF1)、内在性コントロール (β -actin) の検出 (Tau-KO : Tau 検出の陰性コントロール)。B : 総 Tau (Tau5) の比較。C : Ser202/Thr205 リン酸化 Tau (AT8) の比較。D : Ser396/Ser404 リン酸化 Tau (PHF1) の比較。B-D : グラフは無処置の WT マウスの平均値を 1 とし、AAV-PRMT8 を投与した WT マウスの数値を相対的に表した (平均値 \pm 標準誤差、n. s. : 有意差なし、スチューデントの t 検定もしくはウィルチの t 検定による結果)。

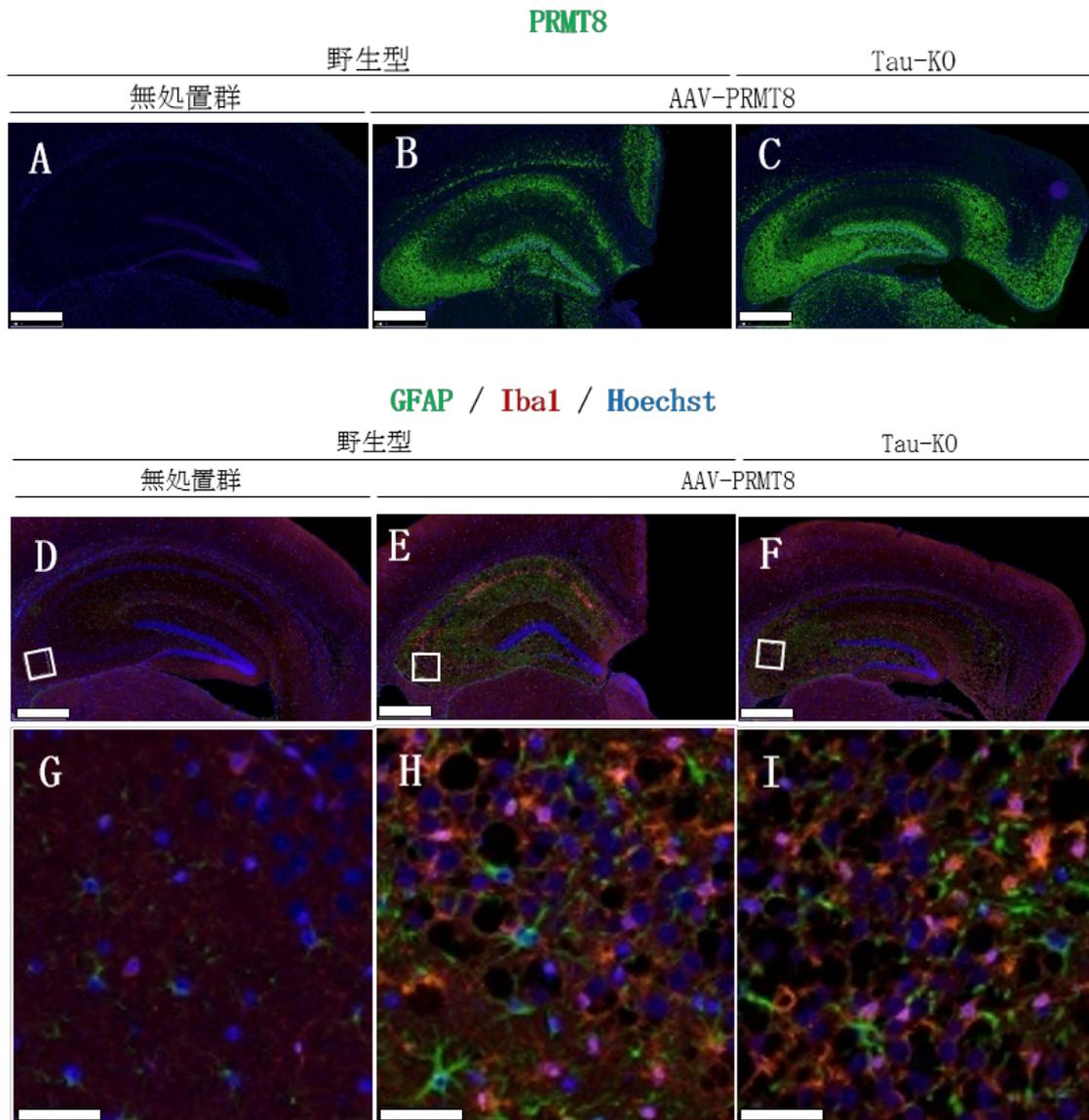


図 3-14 無処置 WT と AAV-PRMT8 を投与した WT と Tau-KO マウスの神経炎症

A-C: 緑は PRMT8 の免疫陽性反応を表す。D-I: 緑は GFAP(アストロサイト)の免疫陽性反応、赤は Iba1(ミクログリア)の免疫陽性反応、青は Hoechst (核)の免疫陽性反応を表す。G-I: D-F における四角部分の拡大図。A、D: 無処置 WT マウス。B、E: AAV-PRMT8 投与 WT マウス。C、F: AAV-PRMT8 投与 Tau-KO マウス。スケールバー: A-F(500 μ m)、G-I(50 μ m)。

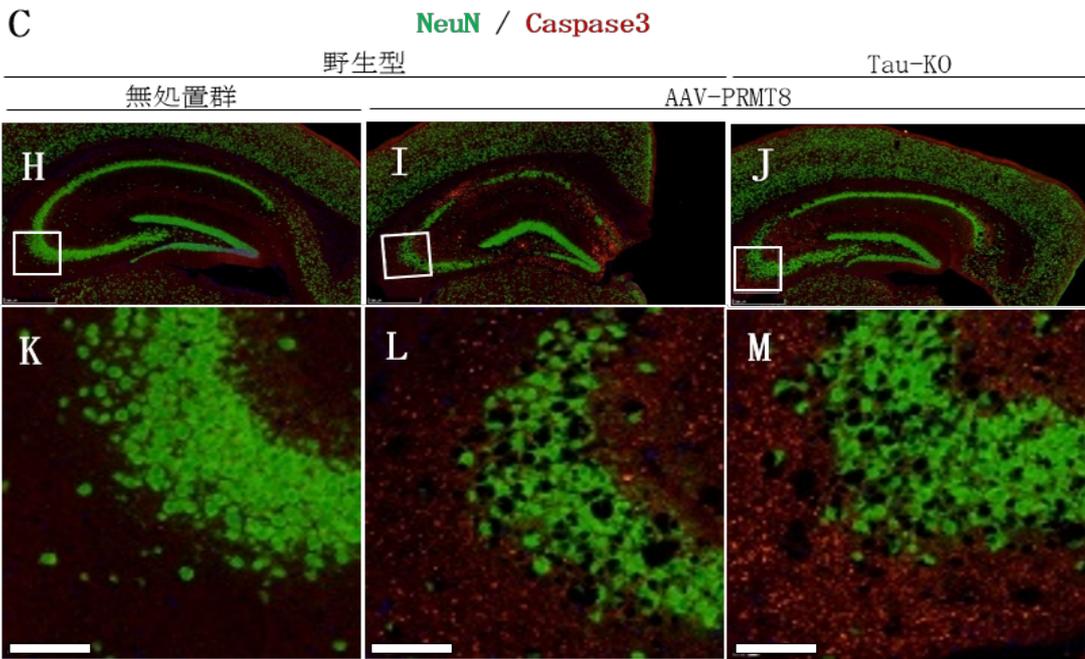
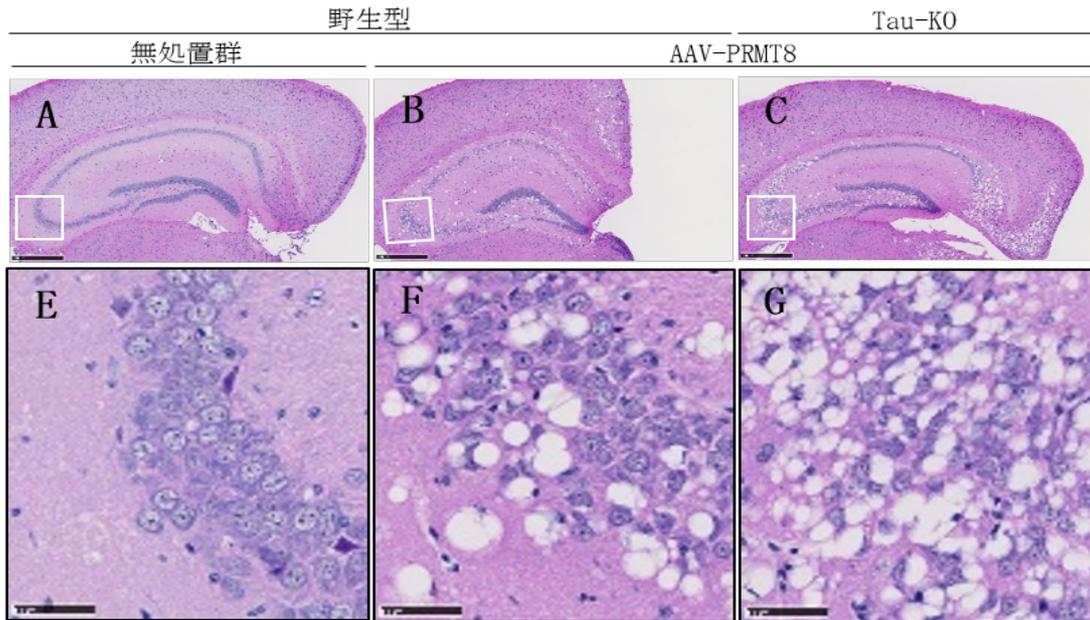


図 3-15 無処置 WT と AAV-PRMT8 投与 WT と Tau-KO マウスの空胞様の変性とアポトーシス経路の活性の誘導

A-C: HE 染色の結果。E-G: A-C の四角部分における拡大図。H-M: 緑は NeuN(神経細胞)の免疫陽性反応、赤は Caspase-3(アポトーシス経路の活性化)の免疫陽性反応を示す。K-M: H-J における四角部分の拡大図。A、H: 無処置 WT マウス。B、I: AAV-PRMT8 投与 WT マウス。C、J: AAV-PRMT8 投与 Tau-KO マウス。スケールバー: A-C、H-J (500 μ m)、E-F、K-M(100 μ m)。

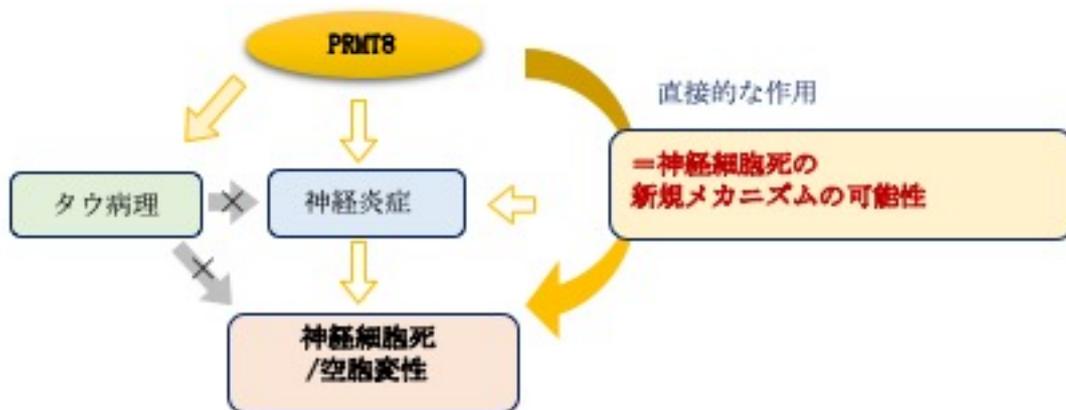


図 3-16 研究 2 のまとめ

アミロイド病理存在下で Tau と結合性が変動する PRMT8 は、タウ病理を介して神経の変性および細胞死を促進するという当初の予想とは異なり、PRMT8 はタウ病理とは独立して直接的に神経変性を誘発する因子であることが示された。

第4章

総括

アルツハイマー病 (AD) 等の神経変性疾患の治療標的を見つけ出す上で、病気進行の基盤となる病態機序を明らかにすることは重要である。特に AD 研究では、その病態とされる“アミロイドカスケード仮説”の分子機序を明らかにすることが有力な戦略となる。そこで本研究では、AD における神経変性機序の理解を深めることを目的に、従来の AD 研究によって病態悪化に関わるとされる小胞体ストレス、またタウ病理と神経変性誘導を結びつける可能性のある新規因子についての研究を行った (図 4-1)。

研究 1 では、神経変性疾患の病態悪化に関わるとされる小胞体ストレス (Paschen and Mengesdorf, 2005) と AD 病態の関係に着目して実験を行った。小胞体ストレスは、AD や ALS などの治療標的の一つとして創薬研究が進められている (Boyce et al., 2005; Kudo et al., 2008)。しかし、AD 病態と小胞体ストレス誘導の関係を示す研究結果は必ずしも一致していないことや、APP と PS1 を過剰発現させた AD モデルマウスにおける小胞体ストレス上昇は、膜タンパク質の過剰発現を原因とするアーチファクトである可能性が指摘されている。そこで、本研究では複数の AD 病態モデルマウスを用いて、小胞体ストレスマーカーの発現量を解析した。その結果、APP の過剰発現を伴わない APP ノックインマウス (*App^{N-G-F}*)、APP 遺伝子を単独で過剰発現するマウス (APP23 と Tg2576)、タウ病態のモデルマウス (P301S-Tau-Tg) では、小胞体ストレスの上昇が認められなかった。一方、APP と PS1 遺伝子の二重変異を持つマウス (APP/PS1、3xTg-AD) では、小胞体ストレス上昇が認められた。この結果より、従来の研究において AD 病態の特徴とされてきたアミロイド病理やタウ病理は、必ずしも小胞体ストレスの惹起には関与しないことが示唆された。言い換えれば、APP と PS1 の二重遺伝子変異を有するマウスで認められる小胞体ストレス上昇は、アミロイド病理の存在とは直接関係せず、変異型 PS1 が存在することによるアーチファクトであり、小胞体ストレスは AD 病態の治療標的としては適当ではない可能性を示唆している。

研究 1 の結果は、AD 研究をはじめとする病態研究において使用する病態モデル動物の特性を十分に知ることの重要性を示している。従来の家族性 AD 変異を導入した APP 遺伝子、

PS1 遺伝子を過剰発現させたマウスが AD 病態モデルマウスとして AD 発生机序の解明や治療開発の基礎研究に広く使用されてきた。これらモデルマウスで認められた病理変化や、その誘導に関与する分子が同定され、その結果を元にヒト AD 患者を対象とした臨床試験が行われてきた (Gervais et al., 2007; Abramowski et al., 2008)。しかし、AD 患者の有力な治療法開発には結びつかなかった (Mangialasche et al., 2010)。その理由の一つとして本研究で明らかにしたように、従来の AD モデルマウスで認められていた小胞体ストレスの上昇は、変異型 PS1 の発現に由来し、アミロイド病理、およびタウ病理は関係ないため、小胞体ストレスは AD の治療標的にならないという点が挙げられる。このように、使用するモデル動物の特性を見誤ると、病態研究の結果を間違った方向にシフトさせてしまう可能性がある。そのため、今回使用した *App* KI マウスのように、よりヒトの病態に近いモデル動物を使用することの重要性が改めて示されたと思われる。

研究 2 では、「 $A\beta$ が蓄積する状態において何らかの病態増悪因子が存在し、その因子が Tau と相互作用することにより、神経変性を誘導する」という新しい仮説の検証を試みた。西道チームの先行研究により、アミロイド病理依存的に Tau との相互作用が変動する新規因子として同定されたタンパク質アルギニンメチル基転移酵素 8 (PRMT8) と AD 病態の関係に着目した研究を行った。AD 病態モデルマウスとして *App*^{AL-G-F} マウスと *MAPT* KI マウスを掛け合わせた double KI (dKI) マウスを使用し、この動物の PRMT8 遺伝子を欠損もしくは発現増加させ、Tau のリン酸化に与える影響、神経炎症、神経変性および細胞死に与える影響を解析した。その結果、PRMT8 を欠損する dKI^{PRMT8^{-/-}} マウスでは、PRMT8 を欠損しない動物と比較して病理学的な差は認められなかった。一方、AAV-PRRMT8 の投与で脳内の PRMT8 を発現増加させた dKI マウスでは、Tau のリン酸化の亢進と合わせて、神経炎症の誘導、アポトーシス経路の活性化、および空胞様の変性の誘導が認められた。この結果を受けて、PRMT8 とタウ病理との関係を明らかにするために、Tau を発現しない Tau-KO マウスと WT マウスに AAV-PRMT8 を投与し PRMT8 の発現を増加させて解析を行った。その結果、Tau-KO マウスと WT マウスのいずれの海馬でも、dKI マウスと同様の病理学的変化が認め

られた。すなわち、PRMT8 は AD 病態におけるタウ病理依存的に病理学的変化を誘導する因子であるとする当初の予想に反して、タウ病理とは独立して神経病理を誘発する因子であることが示された。PRMT8 誘発性の病理学的変化は AD 病態特異的に認められるものではないが、神経変性を誘発、あるいは増悪させる新しい因子である可能性が残されており、PRMT8 が AD を含めた神経変性疾患の新しい分子機序の解明のきっかけになる期待がもたれる。

広く神経変性疾患という視点から見た場合、本研究で注目した小胞体ストレスと PRMT8 の関与が無視出来ない疾患が存在している。両者を結ぶヒントとなるのが、ヒト ALS に関する研究である。ヒト ALS は、大脳皮質の運動野、脊髄、脳幹の運動ニューロン脱落を特徴とする神経変性疾患であるが、この ALS の病態に小胞体ストレスが直接関与することが報告されている (Jaronen et al., 2014)。家族性 ALS の原因として、活性酸素の解毒に関与する Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) 1 遺伝子と、FUS を含む 20 種以上の遺伝子変異が同定されている。ヒトの ALS 病態において、変異型 SOD1 が小胞体膜貫通型タンパク質 Derlin-1 に結合すると小胞体ストレスが上昇して、運動神経の細胞死が生じることが示されている (Nishitoh et al., 2008)。近年、Derlin-1 と SOD1 のタンパク質相互作用を阻害する化合物が同定され、ALS 患者由来の iPS 細胞から作製した ALS 運動神経細胞の細胞死を抑制すること、ALS 病態モデルマウスの発症時期を遅延させることが示されている (Tsuburaya et al., 2018)。一方、家族性 ALS 患者に関連する遺伝子変異のうち、SOD1 遺伝子の次に多い変異は FUS 遺伝子である。FUS は、研究 2 で注目した PRMT8 および同じ PRMT ファミリーの PRMT1 が相互作用することにより、細胞質への異常局在を誘導して ALS の病態を促進させることが示されている。この FUS の異所化は、メチル化阻害薬の投与によって軽減され (Scaramuzzino et al., 2013)、さらに PRMT8 をはじめとする 20 種ほどのタンパク質と相互作用することが報告されている (Pahlich et al., 2008)。PRMT8 が持つ FUS への結合性と FUS のアルギニン残基をメチル化する作用が神経変性疾患の病態悪化に関係するのではないかと考えられ、これを制御することで神経変性疾患の進行を抑えられる可能性がある。したがって、小胞体ストレスを一つの標的にして、PRMT8 の相互作用に

よって神経変性作用を誘導するタンパク質を同定し、そのタンパク質による小胞体ストレスや神経変性誘導をコントロール出来れば、新しい神経変性疾患の予防・治療方の開発につながる可能性があるのではないかと期待が持てる。

ヒトのみならず伴侶動物の高齢化が進んでおり、獣医療においても認知症はじめ神経変性疾患が重要な疾患となりつつある。ヒト AD とイヌ CDS の病態が類似することから、AD の治療薬はイヌの CDS 治療にも有効だと予想される。ヒト AD の対症療法に使用されているコリンエステラーゼ阻害剤（塩酸ドネペジル）は、CDS を発症した犬の認知症症状を緩和することが報告されており（Matsunami et al., 2010）、獣医の臨床現場でも使用されている。ヒトと動物で共通の発症機序を有すると考えられる神経変性疾患の分子機構の解明は、我々獣医師にとって重要な研究課題であると考えている。

第4章 図と表

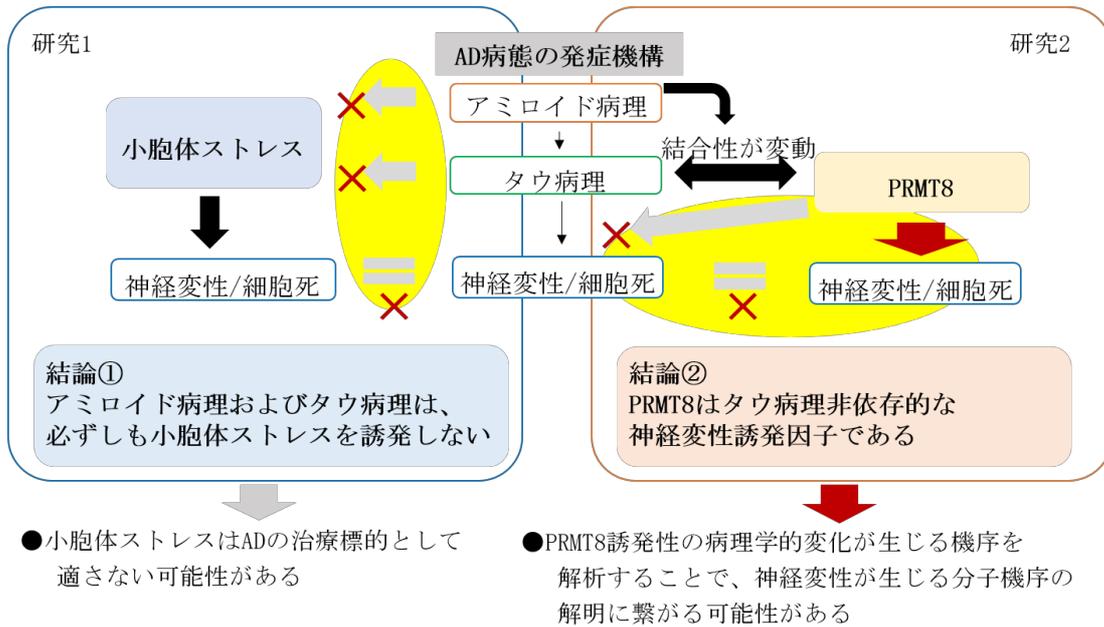


図 4-1 本研究のまとめ

研究1より、小胞体ストレスはADの治療標的として 適さない可能性が示された。研究2より、PRMT8誘発性の病理学的変化が生じる機序を解析することで、神経変性が生じる分子機序の解明に繋がる可能性が示された。「x(赤字)」は本研究で否定された結果。

参考文献

- Abramowski D, Wiederhold K-H, Furrer U, Jatou A-L, Neuenschwander A, Runser M-J, Danner S, Reichwald J, Ammaturo D, Staab D, Stoeckli M, Rueeger H, Neumann U, Staufenbiel M (2008) Dynamics of Abeta turnover and deposition in different beta-amyloid precursor protein transgenic mouse models following gamma-secretase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 327:411-424.
- Andreadis A (2005) Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1739:91-103.
- Annaert WG, Levesque L, Craessaerts K, Dierinck I, Snellings G, Westaway D, George-hyslop PS, Cordell B, Fraser P, Strooper B De (1999) Presenilin 1 Controls γ -Secretase Processing of Amyloid Precursor Protein in Pre-Golgi Compartments of Hippocampal Neurons *Wim. J Cell Biol* 147:277-294.
- Araujo JA, Studzinski CM, Head E, Cotman CW, Milgram NW (2005) Assessment of nutritional interventions for modification of age-associated cognitive decline using a canine model of human aging. *Age* 27:27-37.
- Area-Gomez E, de Groof AJC, Boldogh I, Bird TD, Gibson GE, Koehler CM, Yu WH, Duff KE, Yaffe MP, Pon LA, Schon EA (2009) Presenilins Are Enriched in Endoplasmic Reticulum Membranes Associated with Mitochondria. *Am J Pathol* 175:1810-1816.
- Barbero-Camps E, Fernández A, Baulies A, Martinez L, Fernández-Checa JC, Colell A (2014) Endoplasmic reticulum stress mediates amyloid β neurotoxicity via mitochondrial cholesterol trafficking. *Am J Pathol* 184:2066-2081.
- Bateman RJ et al. (2012) Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer' s Disease. *N Engl J Med* 367:795-804.
- Bedford MT, Clarke SG (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* 33:1-13.

- Bedford MT, Richard S (2005) Arginine methylation: An emerging regulator of protein function. *Mol Cell* 18:263-272.
- Blanc RS, phane Richard S (2017) Arginine Methylation: The Coming of Age. *Mol Cell* 65:8-24.
- Borkham-Kamphorst E, Steffen BT, Van de Leur E, Haas U, Tihaa L, Friedman SL, Weiskirchen R (2016) CCN1/CYR61 overexpression in hepatic stellate cells induces ER stress-related apoptosis. *Cell Signal* 28:34-42.
- Borràs D, Ferrer I, Pumarola M (1999) Age-related Changes in the Brain of the Dog. *Vet Pathol* 36:202-211.
- Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J (2005) A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307:935-939.
- Bucher S, Braunstein KE, Niessen HG, Kaulisch T, Neumaier M, Boeckers TM, Stiller D, Ludolph AC (2007) Vacuolization correlates with spin-spin relaxation time in motor brainstem nuclei and behavioural tests in the transgenic G93A-SOD1 mouse model of ALS. *Eur J Neurosci* 26:1895-1901.
- Canudas J, Insua D, Sarasa L, González-Martínez Á, Suárez ML, Santamarina G, Pesini P, Sarasa M (2014) Neprilysin is poorly expressed in the prefrontal cortex of aged dogs with cognitive dysfunction syndrome. *Int J Alzheimers Dis.* 2014: 483281.
- Carlson GA, Borchelt DR, Dake A, Turner S, Danielson V, Coffin JD, Eckman C, Meiners J, Nilsen SP, Younkin SG, Hsiao KK (1997) Genetic modification of the phenotypes produced by amyloid precursor protein overexpression in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 6:1951-1959.

- Chambers JK, Tokuda T, Uchida K, Ishii R, Tatebe H, Takahashi E, Tomiyama T, Une Y, Nakayama H (2015) The domestic cat as a natural animal model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 3:78.
- Chan SL, Mayne M, Holden CP, Geiger JD, Mattson MP (2000) Presenilin-1 Mutations Increase Levels of Ryanodine Receptors and Calcium Release in PC12 Cells and Cortical Neurons. *J Biol Chem* 275:18195-18200.
- Chang RCC, Wong AKY, Ng H-K, Hugon J (2002) Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha (eIF2alpha) is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 13:2429-2432.
- Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre dâ€™Hellencourt C, Ramanan P (2014) A Molecular Web: Endoplasmic Reticulum Stress, Inflammation, and Oxidative Stress. *Front Cell Neurosci* 8:1-15.
- Chishti MA et al. (2001) Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem* 276:21562-21570.
- Chu Q, Moreland R, Yew NS, Foley J, Ziegler R, Scheule RK (2008) Systemic insulin-like growth factor-1 reverses hypoalgesia and improves mobility in a mouse model of diabetic peripheral neuropathy. *Mol Ther* 16:1400-1408.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature* 360:672-674.
- Cornejo VH, Hetz C (2013) The unfolded protein response in Alzheimer's disease. *Semin Immunopathol* 35:277-292.

- Costa RO, Ferreiro E, Oliveira CR, Pereira CMF (2013) Inhibition of mitochondrial cytochrome c oxidase potentiates A β -induced ER stress and cell death in cortical neurons. *Mol Cell Neurosci* 52:1-8.
- Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ (2002) Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* 277:32046-32053.
- Dahlke C, Saberi D, Ott B, Brand-Saberi B, Schmitt-John T, Theiss C (2015) Inflammation and neuronal death in the motor cortex of the wobbler mouse, an ALS animal model. *J Neuroinflammation* 12:215.
- Davis PR, Head E (2014) Prevention approaches in a preclinical canine model of Alzheimer's disease: Benefits and challenges. *Front Pharmacol* 5:1-14.
- Dehmelt L, Halpain S (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 6:204.
- Dillon MBC, Rust HL, Thompson PR, Mowen KA (2013) Automethylation of protein arginine methyltransferase 8 (PRMT8) regulates activity by impeding S-adenosylmethionine sensitivity. *J Biol Chem* 288:27872-27880.
- Duggan SP, McCarthy J V. (2016) Beyond γ -secretase activity: The multifunctional nature of presenilins in cell signalling pathways. *Cell Signal* 28:1-11.
- Endres K, Reinhardt S (2013) ER-stress in Alzheimer's disease: turning the scale? *Am J Neurodegener Dis* 2:247-265.
- Fast R, Schütt T, Toft N, Møller A, Berendt M (2013) An Observational Study with Long-Term Follow-Up of Canine Cognitive Dysfunction: Clinical Characteristics, Survival, and Risk Factors. *J Vet Intern Med* 27:822-829.
- Games D et al. (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.

- Gervais F, Paquette J, Morissette C, Krzywkowski P, Yu M, Azzi M, Lacombe D, Kong X, Aman A, Laurin J, Szarek WA, Tremblay P (2007) Targeting soluble A β peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. *Neurobiol Aging* 28:537-547.
- Gómez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT (1997) Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41:17-24.
- Green KN, Demuro A, Akbari Y, Hitt BD, Smith IF, Parker I, LaFerla FM (2008) SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid beta production. *J Cell Biol* 181:1107-1116.
- Guardia-Laguarta C, Pera M, Clarimón J, Molinuevo JL, Sánchez-Valle R, Lladó A, Coma M, Gómez-Isla T, Blesa R, Ferrer I, Lleó A (2010) Clinical, Neuropathologic, and Biochemical Profile of the Amyloid Precursor Protein I716F Mutation. *J Neuropathol Exp Neurol* 69:53-59.
- Güntert A, Döbeli H, Bohrmann B (2006) High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience* 143:461-475.
- Guo A, Gu H, Zhou J, Mulhern D, Wang Y, Lee KA, Yang V, Aguiar M, Kornhauser J, Jia X, Ren J, Beausoleil SA, Silva JC, Vemulapalli V, Bedford MT, Comb MJ (2014) Immunoaffinity Enrichment and Mass Spectrometry Analysis of Protein Methylation. *Mol Cell Proteomics* 13:372-387.
- Guo Q, Furukawa K, Sopher BL, Pham DG, Xie J, Robinson N, Martin GM, Mattson MP (1996) Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid beta-peptide. *Neuroreport* 8:379-383.
- Guo Q, Wang Z, Li H, Wiese M, Zheng H (2012) APP physiological and pathophysiological functions: Insights from animal models. *Cell Res* 22:78-89.

- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D (2000) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 5:897-904.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-185.
- Hashimoto M, Murata K, Ishida J, Kanou A, Kasuya Y, Fukamizu A (2016) Severe Hypomyelination and Developmental Defects Are Caused in Mice Lacking Protein Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1) in the Central Nervous System. *J Biol Chem* 291:2237-2245.
- Hashimoto S, Ishii A, Kamano N, Watamura N, Saito T, Oshima T, Yokosuka M, Saido TC (2018) Endoplasmic reticulum stress responses in mouse models of Alzheimer disease: overexpression paradigm versus knock-in paradigm. *J Biol Chem*:293(9) : 3118-3125.
- Hashimoto S, Saido TC (2018) Critical review: involvement of endoplasmic reticulum stress in the aetiology of Alzheimer's disease. *Open Biol* 8:180024.
- Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10:3787-3799.
- He L, Lu XY, Jolly AF, Eldridge AG, Watson SJ, Jackson PK, Barsh GS, Gunn TM (2003) Spongiform degeneration in mahoganoid mutant mice. *Science* 299:710-712.
- Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, Takano J, Suemoto T, Maeda J, Ji B, Ono M, Staufenbiel M, Sahara T, Saido TC (2012) Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer neuropathology. *FASEB J* 26:1204-1217.

- Higuchi M, Zeng D, Shizuru J, Gworek J, Dejbakhsh-Jones S, Taniguchi M, Strober S (2002) Immune tolerance to combined organ and bone marrow transplants after fractionated lymphoid irradiation involves regulatory NK T cells and clonal deletion. *J Immunol* 169:5564-5570.
- Hiroi T, Okada K, Imaoka S, Osada M, Funae Y (2006) Bisphenol A Binds to Protein Disulfide Isomerase and Inhibits Its Enzymatic and Hormone-Binding Activities. *Endocrinology* 147:2773-2780.
- Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A β -induced cell death. *J Cell Biol* 165:347-356.
- Höfling C, Morawski M, Zeitschel U, Zanier ER, Moschke K, Serdaroglu A, Canneva F, von Hörsten S, De Simoni M-G, Forloni G, Jäger C, Kremmer E, Roßner S, Lichtenthaler SF, Kuhn P-H (2016) Differential transgene expression patterns in Alzheimer mouse models revealed by novel human amyloid precursor protein-specific antibodies. *Aging Cell* 15:953-963.
- Honarnejad K, Herms J (2012) Presenilins: Role in calcium homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 44:1983-1986.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99-102.
- Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Staufenbiel M, Muramatsu S, Saido TC (2013) Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice. *Sci Rep* 3:1472.

- Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR (2001) Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng* 17:157-165.
- Jaronen M, Goldsteins G, Koistinaho J (2014) ER stress and unfolded protein response in amyotrophic lateral sclerosis—a controversial role of protein disulphide isomerase. *Front Cell Neurosci* 8:402.
- Jiang G, Wang C, Zhang J, Liu H (2017) Mediation of insulin growth factor-1 in alzheimer' s disease and the mechanism of PRNP genetic expression and the PI3K/Akt signaling pathway. *Exp Ther Med* 13:2763-2766.
- Johnston SD (1991) Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 21:545-551.
- Jucker M, Walker LC (2013) Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501:45-51.
- Kang EB, Kwon IS, Koo JH, Kim EJ, Kim CH, Lee J, Yang CH, Lee Y Il, Cho IH, Cho JY (2013) Treadmill exercise represses neuronal cell death and inflammation during A β -induced ER stress by regulating unfolded protein response in aged presenilin 2 mutant mice. *Apoptosis* 18:1332-1347.
- Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, Morihara T, Yoneda T, Gomi F, Mori Y, Nakano Y, Takeda J, Tsuda T, Itoyama Y, Murayama O, Takashima a, St George-Hyslop P, Takeda M, Tohyama M (1999) Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 1:479-485.
- Kerridge C, Kozlova DI, Nalivaeva NN, Turner AJ (2015) Hypoxia Affects Neprilysin Expression Through Caspase Activation and an APP Intracellular Domain-dependent Mechanism. *Front Neurosci* 9:426.

- Kim JD, Park KE, Ishida J, Kako K, Hamada J, Kani S, Takeuchi M, Namiki K, Fukui H, Fukuhara S, Hibi M, Kobayashi M, Kanaho Y, Kasuya Y, Mochizuki N, Fukamizu A (2015) Neuroscience: PRMT8 as a phospholipase regulates Purkinje cell dendritic arborization and motor coordination. *Sci Adv* 1:1-9.
- Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Miyazaki H, Akagi T, Hashikawa T, Doi H, Takumi T, Hicks GG, Hattori N, Shimogori T, Nukina N (2015) FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun* 3:24.
- Kousaka A, Mori Y, Koyama Y, Taneda T, Miyata S, Tohyama M (2009) The distribution and characterization of endogenous protein arginine N-methyltransferase 8 in mouse CNS. *Neuroscience* 163:1146-1157.
- Kudo T, Kanemoto S, Hara H, Morimoto N, Morihara T, Kimura R, Tabira T, Imaizumi K, Takeda M (2008) A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. *Cell Death Differ* 15:364-375.
- Kumar-Singh S, Theuns J, Van Broeck B, Pirici D, Vennekens K, Corsmit E, Cruts M, Dermaut B, Wang R, Van Broeckhoven C (2006) Mean age-of-onset of familial alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased A β 42 and decreased A β 40. *Hum Mutat* 27:686-695.
- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima Y (1997) Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390:45-51.
- Landsberg G (2005) Therapeutic agents for the treatment of cognitive dysfunction syndrome in senior dogs. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 29:471-479.

- Lassalle JM, Halley H, Daumas S, Verret L, Francés B (2008) Effects of the genetic background on cognitive performances of TG2576 mice. *Behav Brain Res* 191:104-110.
- Lee J, Sayegh J, Daniel J, Clarke S, Bedford MT (2005) PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *J Biol Chem* 280:32890-32896.
- Lee JH, Won SM, Suh J, Son SJ, Moon GJ, Park UJ, Gwag BJ (2010) Induction of the unfolded protein response and cell death pathway in Alzheimer's disease, but not in aged Tg2576 mice. *Exp Mol Med* 42:386-394.
- Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, Mecocci P, Kivipelto M (2010) Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol* 9:702-716.
- Morris M, Knudsen GM, Maeda S, Trinidad JC, Ioanoviciu A, Burlingame AL, Mucke L (2015) Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 18:1183-1189.
- Mouton-Liger F, Paquet C, Dumurgier J, Bouras C, Pradier L, Gray F, Hugon J (2012) Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2 α pathway. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1822:885-896.
- Nagata K, Takahashi M, Matsuba Y, Okuyama-Uchimura F, Sato K, Hashimoto S, Saito T, Saido TC (2018) Generation of App knock-in mice reveals deletion mutations protective against Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Commun* 9:1-7.
- Neumann M, Bentmann E, Dormann D, Jawaid A, Dejesus-Hernandez M, Ansorge O, Roeber S, Kretschmar HA, Munoz DG, Kusaka H, Yokota O, Ang LC, Bilbao J, Rademakers R, Haass C, MacKenzie IRA (2011) FET proteins TAF15 and EWS are selective markers that distinguish FTLD with FUS pathology from amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations. *Brain* 134:2595-2609.

- Nicolas M, Hassan BA (2014) Amyloid precursor protein and neural development. *Development* 141:2543-2548.
- Nijholt DAT, de Graaf TR, van Haastert ES, Oliveira AO, Berkers CR, Zwart R, Ovaa H, Baas F, Hoozemans JJM, Scheper W (2011) Endoplasmic reticulum stress activates autophagy but not the proteasome in neuronal cells: implications for Alzheimer's disease. *Cell Death Differ* 18:1071-1081.
- Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, Stenh C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, Näslund J, Lannfelt L (2001) The "Arctic" APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nat Neurosci* 4:887-893.
- Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T, Fukutomi H, Noguchi T, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H (2008) ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev* 22:1451-1464.
- Noble W, Hanger DP, Miller CCJ, Lovestone S (2013) The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front Neurol* 4:83.
- O' Connor T, Sadleir KR, Maus E, Velliquette RA, Zhao J, Cole SL, Eimer WA, Hitt B, Bembinster LA, Lammich S, Lichtenthaler SF, Hébert SS, De Strooper B, Haass C, Bennett DA, Vassar R (2008) Phosphorylation of the Translation Initiation Factor eIF2 α Increases BACE1 Levels and Promotes Amyloidogenesis. *Neuron* 60:988-1009.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A β and Synaptic Dysfunction. *Neuron* 39:409-421.
- Ohno M (2014) Roles of eIF2 α kinases in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci* 7:22.

- Pahlich S, Zakaryan RP, Gehring H (2008) Identification of proteins interacting with protein arginine methyltransferase 8: The Ewing sarcoma (EWS) protein binds independent of its methylation state. *Proteins Struct Funct Genet* 72:1125-1137.
- Paschen W, Mengesdorf T (2005) Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium* 38:409-415.
- Reinhardt S, Schuck F, Grösgen S, Riemenschneider M, Hartmann T, Postina R, Grimm M, Endres K (2014) Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer' s disease. *FASEB J* 28:978-997.
- Rofina JE, van Ederen AM, Toussaint MJM, Secrève M, van der Spek A, van der Meer I, Van Eerdenburg FJCM, Gruys E (2006) Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer' s disease. *Brain Res* 1069:216-226.
- Rogers TB, Inesi G, Wade R, Lederer WJ (1995) Use of thapsigargin to study Ca²⁺ homeostasis in cardiac cells. *Biosci Rep* 15:341-349.
- Ross CA, Poirier MA (2005) What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:891-898.
- Ryan NS, Nicholas JM, Weston PSJ, Liang Y, Lashley T, Guerreiro R, Adamson G, Kenny J, Beck J, Chavez-Gutierrez L, de Strooper B, Revesz T, Holton J, Mead S, Rossor MN, Fox NC (2016) Clinical phenotype and genetic associations in autosomal dominant familial Alzheimer' s disease: a case series. *Lancet Neurol* 15:1326-1335.
- Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, Shimada H, Ihara Y, Kawashima S (1995) Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 14:457-466.
- 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.

- Saito T, Matsuba Y, Yamazaki N, Hashimoto S, Saido TC (2016) Calpain Activation in Alzheimer's Model Mice Is an Artifact of APP and Presenilin Overexpression. *J Neurosci* 36:9933-9936.
- Sasaguri H, Nilsson P, Hashimoto S, Nagata K, Saito T, De Strooper B, Hardy J, Vassar R, Winblad B, Saido TC (2017) APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J* 4621111:e201797397.
- Sato C, Takagi S, Tomita T, Iwatsubo T (2008) The C-Terminal PAL Motif and Transmembrane Domain 9 of Presenilin 1 Are Involved in the Formation of the Catalytic Pore of the γ -Secretase. *J Neurosci* 28:6264-6271.
- Sato N, Urano F, Yoon Leem J, Kim SH, Li M, Donoviel D, Bernstein a, Lee a S, Ron D, Veselits ML, Sisodia SS, Thinakaran G (2000) Upregulation of BiP and CHOP by the unfolded-protein response is independent of presenilin expression. *Nat Cell Biol* 2:863-870.
- Scaramuzzino C, Monaghan J, Milioto C, Lanson NA, Maltare A, Aggarwal T, Casci I, Fackelmayer FO, Pennuto M, Pandey UB (2013) Protein Arginine Methyltransferase 1 and 8 Interact with FUS to Modify Its Sub-Cellular Distribution and Toxicity In Vitro and In Vivo. *PLoS One* 8:e61576.
- Schmidt F, Willems N, Stolzing A (2015) Detection and Quantification of A β -Amyloid, Pyroglutamyl A β , and Tau in Aged Canines. *J Neuropathol Exp Neurol* 74:12.
- Sherrington R et al. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754-760.
- Shirohani K, Tsubuki S, Iwata N, Takaki Y, Harigaya W, Maruyama K, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Iwata H, Tomita T, Iwatsubo T, Saido TC (2001) Neprilysin Degrades Both Amyloid β Peptides 1-40 and 1-42 Most Rapidly and Efficiently among Thiorphan- and Phosphoramidon-sensitive Endopeptidases. *J Biol Chem* 276:21895-21901.

Smolek T, Madari A, Farbakova J, Kandrac O, Jadhav S, Cente M, Brezovakova V, Novak M, Zilka N (2016) Tau hyperphosphorylation in synaptosomes and neuroinflammation are associated with canine cognitive impairment. *J Comp Neurol* 524:874-895.

Soejima N, Ohyagi Y, Nakamura N, Himeno E, Iinuma KM, Sakae N, Yamasaki R, Tabira T, Murakami K, Irie K, Kinoshita N, LaFerla FM, Kiyohara Y, Iwaki T, Kira J (2013) Intracellular accumulation of toxic tau amyloid- β is associated with endoplasmic reticulum stress in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 10:11-20.

Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13287-13292.

Stutzmann GE, Caccamo A, LaFerla FM, Parker I (2004) Dysregulated IP3 Signaling in Cortical Neurons of Knock-In Mice Expressing an Alzheimer's-Linked Mutation in Presenilin1 Results in Exaggerated Ca²⁺ Signals and Altered Membrane Excitability. *J Neurosci* 24:508-513.

Terro F, Czech C, Esclaire F, Elyaman W, Yardin C, Baclet MC, Touchet N, Tremp G, Pradier L, Hugon J (2002) Neurons overexpressing mutant presenilin-1 are more sensitive to apoptosis induced by endoplasmic reticulum-golgi stress. *J Neurosci Res* 69:530-539.

Thandapani P, O' Connor TR, Bailey TL, Richard S (2013) Defining the RGG/RG Motif. *Mol Cell* 50:613-623.

Tomita T, Takikawa R, Koyama A, Morohashi Y, Takasugi N, Saido TC, Maruyama K, Iwatsubo T (1999) C terminus of presenilin is required for overproduction of amyloidogenic

- Abeta42 through stabilization and endoproteolysis of presenilin. *J Neurosci* 19:10627-10634.
- Tsuburaya N et al. (2018) A small-molecule inhibitor of SOD1-Derlin-1 interaction ameliorates pathology in an ALS mouse model. *Nat Commun* 9:2668.
- Verret L, Mann EO, Hang GB, Barth AMI, Cobos I, Ho K, Devidze N, Masliah E, Kreitzer AC, Mody I, Mucke L, Palop JJ (2012) Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell* 149:708-721.
- Wang Y, Mandelkow E (2015) Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci* 17:22-35.
- Winblad B et al. (2016) Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *Lancet Neurol* 15:455-532.
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107:881-891.
- Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang S, Iwata N, Saido TC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM (2007) Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model. *Neuron* 53:337-351.
- Youssef SA, Capucchio MT, Rofina JE, Chambers JK, Uchida K, Nakayama H, Head E (2016) Pathology of the aging brain in domestic and laboratory animals, and animal models of human neurodegenerative diseases. *Vet Pathol* 53:327-348.
- Zhang H, Sun S, Herreman A, De Strooper B, Bezprozvanny I (2010) Role of presenilins in neuronal calcium homeostasis. *J Neurosci* 30:8566-8580.
- Zhou X, Long JM, Geyer MA, Masliah E, Kelsoe JR, Wynshaw-Boris A, Chien KR (2005) Reduced expression of the Sp4 gene in mice causes deficits in sensorimotor gating and memory associated with hippocampal vacuolization. *Mol Psychiatry* 10:393-406.

豊倉 康夫、金沢 一郎、万年 徹 (2004) 神経内科学書、第 2 版、朝倉書店

石井 綾乃、野村 真優子、大谷 みずき、藤本 正紀、横須賀 誠、入交 眞巳 (2016) 国内飼育下犬
における質問票を用いた認知機能低下の評価を目的とした疫学調査、第 159 回日本獣医学会学
術集会、日本獣医学会講演要旨集 159th : p. 459

石井 綾乃、橋本 翔子、松葉 由紀夫、三平 尚美、高島 明彦、村松 慎一、横須賀 誠、斉藤 貴志、
西道 隆臣 (2017) アルツハイマー病モデルマウスにおけるアミロイド病理特異的に Tau と結
合するタンパク質の同定および解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、プログラム：
4LT02-03 (3P-1093)

石井 綾乃、橋本 翔子、釜野直子、綿村直人、斉藤 貴志、大島登志男、横須賀 誠、西道 隆臣 (2018a)
アルツハイマー病モデルマウスにおける小胞体ストレス応答 (過剰発現 VS ノックイン)、日本
認知症学会、Dementia Japan 32 巻 3 号 : 436

石井 綾乃、橋本 翔子、松葉 由紀夫、三平 尚美、高島 明彦、村松 慎一、横須賀 誠、斉藤 貴志、
西道 隆臣 (2018、b) 脳内においてアミロイド病理存在下で Tau と結合性が変動する新規因子
は空胞変性を誘発する。第 161 回日本獣医学会学術集会、日本獣医学会講演要旨集 161th : 477

インターネット資料

日本神経学会 (2003) 神経疾患克服に向けた研究推進の提言。

http://www.brainscience-union.jp/wp/wp-content/uploads/report20130924_2.pdf

一般社団法人ペットフード協会 (2010、2017) 全国犬猫飼育実態調査。

<https://petfood.or.jp/data/>

厚生労働省 (2015) 認知症施策推進総合戦略 (新オレンジプラン)。

<https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-12304500-Roukenkyoku->

[Ninchishougyakutaiboushitaisakusuishinshitsu/02_1.pdf](https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-12304500-Roukenkyoku-Ninchishougyakutaiboushitaisakusuishinshitsu/02_1.pdf)

厚生労働省 (2014) 特定疾患医療受給者証所持者数 <http://www.nanbyou.or.jp/entry/1356>

謝辞

本研究を進めるにあたり、基礎研究の基本的な考え方から多岐に渡り懇切なる御指導、御高配を賜りました日本獣医生命科学大学の横須賀誠先生ならびに、研究の機会を与えていただき、アルツハイマー病の基礎研究に関して御指導・御鞭撻、さらに本学位論文の副査として論文指導を賜りました、理化学研究所脳神経科学研究センター神経老化制御研究チームのチームリーダー西道隆臣先生に深謝いたします。

大学院進学のかっかけを作って頂き、伴侶動物の認知機能不全症に関する問題点について御指導いただきました、日本獣医生命科学大学獣医学部獣医学科非常勤講師の入交眞巳先生、生物学および脳神経科学等に関する様々な現象についてご指導ご鞭撻をいただきました同大学の中田友明先生に深く感謝申し上げます。

研究の遂行にあたり、基礎研究の基本的な考え方、奥深さ、そして面白さを教えていただき、論文作成に至るまで終始御指導いただきました、理化学研究所脳神経科学研究センター神経老化制御研究チームの副チームリーダーの齊藤貴志先生、同研究室チームの橋本翔子先生、ならびに同研究室チームの綿村直人先生に深く感謝申し上げます。また主な研究の場として基礎研究を行わせていただきました、同研究チームの皆さまには、技術的な御指導とアイデアの御提案など多岐にわたってお世話になり、心より感謝申し上げます。

本研究で用いた、APP/PS1 マウス、および 3xTg-AD マウスを御供与いただきました早稲田大学先進理工学部生命医科学科 大島登志男先生、ならびに AAV-PRMT8 を御供与いただきました自治医科大学内科学講座神経内科学部門特命教授の村松慎一先生、ならびに PS1 抗体を御供与いただきました東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室の富田泰輔先生に厚く御礼申し上げます。

本学位論文の副査として懇切丁寧なご指導を賜りました、日本獣医生命科学大学獣医学部獣医学科の鈴木浩悦先生、塚田晃三先生、長谷川大輔先生に御礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり、研究に供された全ての小さな命たちへ心より感謝の意を表します。

2019年初春 石井 綾乃