

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)

学位論文の内容の要約

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

石井 綾乃

(指導教授：横須賀 誠)

**【緒論】** 神経変性疾患とは、アルツハイマー病 (AD) や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) など神経細胞を中心とする様々な退行性変化を呈する難治性の疾患群である。中でも AD は患者数が最も多い疾患であり、認知症の原因のうち 6 割以上を占めるため、予防法・治療法の早期開発が望まれる。AD の発生機序として、「細胞外におけるアミロイド  $\beta$  ペプチド ( $A\beta$ ) の蓄積 (アミロイド病理) を引き金に、神経細胞内の Tau タンパク質の過剰リン酸化・凝集 (タウ病理) が生じ、最終的に神経の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 ( $A\beta$  仮説) が提唱されている。しかし、これら AD で認められる病理学的変化を繋ぐ分子機序は解明されていない。家族性 AD 患者では、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 遺伝子や、 $A\beta$  の切り出しに関与するプレセニリン (PS) 遺伝子に変異が認められることから、APP や PS1 を過剰に発現させた AD 病態モデルマウスが作製され、AD 研究に用いられている。しかし、これらのマウスでは、膜タンパク質の過剰発現の影響であると予想される小胞体ストレスの惹起などのアーチファクトが問題視されている。このような過剰発現による問題を解決するため、理化学研究所・脳神経科学研究センターの西道隆臣研究チームにより、遺伝子を置き換えるノックイン (KI) 手法を用いてマウス *App* 遺伝子に複数の家族性 AD の変異を導入した *App<sup>N-F</sup>* マウス、および *App<sup>N-F</sup>* マウスに  $A\beta$  の凝集性を増加させる遺伝子変異を加えた *App<sup>N-G-F</sup>* マウスが作製された。さらに、AD 患者と同様に遺伝子変異がないヒト型 Tau を発現する *MAPT* KI マウスが作製され、*App<sup>N-G-F</sup>* マウスと *MAPT* KI マウスを掛け合わせた double KI (dKI) マウスが作製され研究が行われた。その結果、dKI マウスにおいてもタウ病理や神経細胞死の増悪は認められず、ヒト AD 患者の病理再現には至らなかった。このことより、「 $A\beta$  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」という新しい仮説が発案された。この仮説に基づき同定されたアミロイド病理に付随して Tau との相互作用が変動する 25 因子のうち、中枢神経特異的に発現するタンパク質は、アルギニンメチル基転移酵素 (Protein arginine methyl transferase 8 ; PRMT8) のみであった。

このような研究背景より本研究では、AD 病態における神経変性の発症機序の解明を進めるために 2 つの研究を行った。研究 1 では、「AD 病態と小胞体ストレスの関係を再検証する」ことを目的として、複数系統のアミロイド病理とタウ病理の病態モデルマウスを用いて、 $A\beta$  蓄積、APP の過剰発現、変異型 PS1 の発現、およびタウ病理

が小胞体ストレスに与える影響を検討した。研究 2 では、アミロイド病理に付随して Tau との相互作用が変動する因子である PRMT8 に注目し、「Tau と相互作用が変動する PRMT8 が脳神経病理に与える影響の解明」を目的に、AD 病態モデルマウス (dKI) において PRMT8 遺伝子を欠損・発現を増加させ、Tau のリン酸化レベル、神経炎症、神経の変性と細胞死に与える影響を検討した。

## 研究 1 : AD 病態と小胞体ストレスの関係の再検証 (第 2 章)

[ 材料と方法 ] 小胞体ストレスとは、小胞体に異常タンパク質の蓄積等の負荷が掛かることにより小胞体の機能障害が生じる状態である。生体では、小胞体ストレスを回避するために小胞体ストレス応答を活性化させ、タンパク質の折りたたみ不全の是正を図る。そのため、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。この現象を指標として研究 1 では以下の 2 つの実験を行った。

**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」を検討するため、野生型 (WT) マウス、APP の過剰発現を伴わない *App*<sup>NL-G-F</sup> マウス、APP 単独の過剰発現モデルである APP23 と Tg2576 マウスを用いて、小胞体ストレスマーカーの発現量を測定し、統計学的に比較した。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、変異型 APP と PS1 を発現する APP/PS1 と 3xTg-AD マウスを用いた。さらに、検出系の陽性コントロールとして、小胞体ストレスを誘導する薬剤 (タプシガルギン) を添加した初代培養神経細胞と Neuro2A 細胞を用いた。

**実験 2** では、「タウ病理が小胞体ストレスに与える影響」を検討するため、WT マウスとタウ病態モデルである P301S-Tau-Tg マウスを用いた。

[ 結果 ] WT、*App*<sup>NL-G-F</sup> マウス、APP23、および Tg2576 マウス的大脑皮質と海馬において、小胞体ストレスマーカー (GRP78、PDI、CHOP、p-eIF2 $\alpha$ 、およびスプライス型 XBP1 mRNA) の発現量に有意差は認められなかった (**実験 1**)。さらに、P301S-Tau-Tg マウスにおいても WT マウスと比較して小胞体ストレスマーカーの上昇は認められなかった (**実験 2**)。一方、変異型 APP に加えて変異型 PS1 を発現する APP/PS1、3xTg-AD マウス、さらに薬剤を添加した培養細胞では小胞体ストレスマーカーの上昇が認められた。これらの結果より、「アミロイド病理とタウ病理は、必ずしも小胞体ストレスを惹起しない可能性」が示唆された。本実験と他の研究報告を合わせると、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、アミロイド病態とは直接関係せず、変異型 PS1 の発現により生じると考えられる。

## 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の検討(第 3 章)

[ 材料と方法 ] AD の発症機序の解明および治療法開発の戦略の一つとして、AD で認められる各病理学的特徴を繋ぐ分子機序の解明が重要である。先行研究において、脳内で A $\beta$  病理に付随して Tau との相互作用 (結合性) が変動する因子として同定された PRMT8 は、中枢神経特異的に発現するタンパク質であり、アセチルコリン産生に関与するリン脂質分解作用も有する。また、Tau の翻訳後修飾としてアルギニンのメチル化が報告されている。よって、PRMT8 は 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考えられた。研究 2 では以下の 3 つの実験を行った。

**実験 1** では、PRMT8 欠損が AD 病態に与える影響を検討するため、AD 病態モデルとして *App*<sup>NL-G-F</sup> マウスと *MAPT* KI マウスを掛け合わせた dKI マウスにおいて、CRISPR/Cas9 システムにより PRMT8 遺伝子を欠損させた。PRMT8 欠損 dKI マウス (dKI<sup>PRMT8<sup>-/-</sup></sup> マウス) を用いて、Tau のリン酸化レベルを比較するため、総 Tau とリン酸化 Tau の発現量をウエスタンブロットで測定した。また、PRMT8 欠損が神経炎症と神経変性に与える影響を検討するため、アストロサイト、ミクログリア、神経細胞、活性化 Caspase-3 (アポトーシス経路の活性化) を標的とした免疫組織化学を行った。

**実験 2** では、PRMT8 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) を使用し、dKI マウスの側脳室に投与することで PRMT8 遺伝子の導入を行った。AAV-PRMT8 投与の比較対照として AAV-GFP を投与し、dKI マウスに誘導される病理学的変化を実験 1 と同様の手法で解析した。

**実験 3** では、実験 2 において AAV-PRMT8 を投与した dKI マウスで認められた PRMT8 誘発性の病理学的変化が、Tau 病理を介して生じる現象であるかを検討するため、Tau を発現しない Tau-KO マウスと WT マウスの側脳室に AAV-PRMT8 を投与し、マウスに誘導される病理学的変化を実験 1 と同様の手法で解析した。

[ 結果 ] PRMT8 遺伝子を欠損した dKI<sup>PRMT8<sup>-/-</sup></sup> マウスと、正常に PRMT8 を発現する dKI<sup>PRMT8<sup>+/+</sup></sup> マウスの海馬において病理学的な差は見られなかった (**実験 1**)。一方、PRMT8

遺伝子を導入した dKI マウスの海馬では、Tau リン酸化レベルの上昇、ミクログリアの活性化、および空胞変性とアポトーシス経路の活性化が認められた（**実験 2**）。そこで PRMT8 誘発性の病理学的変化が、タウ病理に依存的であることを検討するため、Tau-KO と WT マウスに AAV-PRMT8 を投与して解析を行った。その結果、Tau-KO および WT マウスの海馬においても dKI マウスと同様に病理変化が誘導された（**実験 3**）。これらの結果より、PRMT8 が誘導する神経変性に必ずしもタウ病理は必要なく、PRMT8 は直接的に神経変性を誘発する因子である可能性が示された。本研究では、PRMT8 が神経変性を誘発するその分子機序の解明までには至らなかったが、これまでに PRMT8 は他の神経変性疾患である ALS の原因遺伝子 FUS のアルギニンメチル化、また相互作用を介して FUS の凝集性を高め ALS 病態を悪化させることが示されている。また、PRMT8 誘発性のミクログリアとアポトーシス経路の活性化、および空胞変性は ALS 患者と ALS 病態モデルマウスでも認められるため、今後は ALS 病態における PRMT8 の発現および機能の解析も必要と考える。

【**総括**】 本研究では、AD 病態における神経変性の発症機序の解明を進めることを目的に 2 つの研究を行った。**研究 1** では小胞体ストレスに注目した。小胞体ストレスは、アポトーシスの原因となることから神経変性疾患の病態進行に関与する可能性が示唆され、治療標的の一つと考えられている。しかし、本研究に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を誘発しないことが示された。このことより、小胞体ストレスは AD の効果的な治療標的としては適さない可能性が考えられる。他方、家族性 ALS の原因の 1 つである *SOD1* 遺伝子変異は、小胞体ストレスを惹起することが示されている。このことより、小胞体ストレスの上昇という病態変化は、疾患特異性が強いと考えられる。**研究 2** では、“PRMT8 は AD で認められる各病理学的特徴を繋ぐ因子である”という当初の予想に反して、PRMT8 はタウ病理非依存的に神経変性を誘発する因子であることが示された。このことより、PRMT8 誘発性の病理学的変化は AD 病態特異的な現象ではないものの、その分子機序を明らかにすることで神経変性疾患が生じる分子機序の解明に繋がる可能性があると考えられる。

本研究は、難治性である AD を含む神経変性疾患の基礎研究として新しい所見を提供するものであり、学術上および応用上貢献することが出来たと考えている。