

論文審査の結果の要旨

申請者氏名：石井綾乃

【緒論】 神経変性疾患の中でも、アルツハイマー病（AD）は発症数が最も多い疾患であり、予防法・治療法の開発が望まれる難治性疾患である。ADの発生機序として、細胞外のアミロイドβペプチド（Aβ）の蓄積を引き金に、神経細胞内へのTauタンパク質の過剰リン酸化と凝集（タウ病理）、そして神経細胞死に至るアミロイドカスケード仮説（Aβ仮説）が提唱されている。しかし、Aβ仮説の機序は完全には解明されていない。家族性AD患者ではAβ前駆タンパク質であるアミロイドβ蛋白前駆体（APP）や、Aβの切り出しに関与するプレセニリン1（PS1）遺伝子に変異が認められることから、APPおよびPS1遺伝子を過剰発現させた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、これらのモデル動物では、膜タンパク質の過剰発現の影響と考えられる小胞体ストレス上昇などアーチファクトの存在が問題視されている。従来AD病態モデルマウスの問題点を解決するため、理究・西道チームは、マウスAPP遺伝子にAβ凝集性を増加させる等の遺伝子変異を加えた *App^{NL-F}* マウスと *App^{NL-G-F}* マウス、遺伝子変異がないヒト型Tauを発現する *MAPT* KI マウス、さらにこれらを掛け合わせた double KI（dKI）マウスを作製した。その結果、dKIマウスではタウ病理や神経細胞死の増悪を認めず、AD病理の再現には至らなかった。このことから、Aβ蓄積の状態働く未知の病態増悪因子が存在し、Tauと相互作用することで神経変性を誘導するという“新しい仮説”を提案した。

本研究では、従来AD病態モデルマウスが示す病態変化がアーチファクトであることの検証、および“新しい仮説”の検証を目的にして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の再検証」として、アミロイド病理とタウ病理を示す複数系統のモデルマウスを対象に小胞体ストレス惹起が生理的なAD病理であるか否かの検討を行った。研究2では、Tauとの相互作用が変動する因子として同定されたアルギニンメチ

ル基転移酵素 8 (PRMT8)が、Tau 病理存在下で特異的に神経変性を誘導する AD 病態増悪因子としての役目を持つのか否かの検証を行った。

[材料と方法] 研究 1・AD 病態と小胞体ストレスの関係の再検証：小胞体ストレスは、小胞体に異常タンパク質蓄積等の負荷が掛かることで生じる細胞の機能障害である。生体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。これを指標に研究 1 では、2 つの実験を行った。実験 1では「A β 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」を検証した。野生型 (WT) マウス、APP の過剰発現を伴わない *App^{NL-G-F}* 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」を検証するため、APP と PS1 を過剰発現する APP/PS1 マウスと 3xTg-AD マウスを用いた。実験陽性群として、小胞体ストレスを誘導する薬剤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 (P301S-Tau-Tg) マウスを用いた。

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：西道チームの先行研究によって、A β 病理に付随して Tau との結合性が変動する因子として同定された 25 因子の中で、PRMT8 は中枢神経特異的に発現するタンパク質である。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 は各 AD 病態を繋ぐ新規因子である可能性が考えられた。研究 2 では、この仮説を検証するために 3 つの実験を行った。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、CRISPR/Cas9 システムを用いて dKI マウスから PRMT8 遺伝子を欠損させ (dKI^{PRMT8^{-/-}}マウス)、この動物で Tau のリン酸化レベルの上昇が起こるかを検証した。さらに、PRMT8 欠損による神経炎症と神経細胞死への影響を免疫組織化学で検証した。実験 2では、PRMT8 の発現増加が AD 病態に与

える影響を検証した。PRMT8 cDNA 配列が挿入された AAV ベクター (AAV-PRMT8) を dKI マウスの脳室内に注入して PRMT8 遺伝子導入を行った。解析は実験 1 と同様の手法で行った。実験 3では、実験 2 の PRMT8 遺伝子導入 dKI マウスで認められた PRMT8 誘発性病理変化が、Tau 病理存在下で特異的に誘導される現象であるか否かを検討するため、Tau を発現しない (Tau-KO) マウスと野生型 (WT) マウスに AAV-PRMT8 を投与して、Tau 非依存性の PRMT8 の影響を検証した。解析は実験 1 と同様の手法で行った。

[結果] 研究 1: AD 病態と小胞体ストレスの関係の再検証: 野生型 (WT) マウス、各種 AD 病態マウスの脳において、小胞体ストレスマーカー (GRP78、PDI、CHOP、p-eIF2 α 、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。また、タウ病態モデルの P301S-Tau-Tg マウスでも小胞体ストレス上昇は認められなかった。一方、変異型 PS1 を発現する APP/PS1 や 3xTg-AD マウスでは、小胞体ストレス誘導薬剤を添加した培養細胞と同様の小胞体ストレス上昇が認められた。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誘導しないことが示された。本研究と先行研究を考え合わせると、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生理的な AD 病態を反映した現象では無く、旧来の AD 病態モデルマウスにおける小胞体ストレスはアーチファクトであると考えられる。

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: PRMT8 遺伝子を欠損した dKI^{PRMT8^{-/-}}マウスと PRMT8 遺伝子を維持する dKI^{PRMT8^{+/+}}マウスの間で脳の病理学的な差は認められなかった。一方、PRMT8 を遺伝子導入した dKI マウスでは、Tau リン酸化レベルの上昇、ミクログリアの活性化、空胞変性様の病理変化、アポトーシス経路の活性化が認められた。そこで、PRMT8 で誘発される病理学的変化がタウ病理に依存的であるかを検討するため、タウを発現しない (Tau-KO) マウスと野生型 (WT) マウスの脳に AAV-PRMT8 を注入して PRMT8 の影響を解析した。その結果、Tau-KO および WT マウスにおいて dKI マウスと同様の病理変化が誘導された。以上より、PRMT8

による神経変性誘導は必ずしも Tau 病理の存在は必要無く、Tau とは独立して神経変性を誘導する因子である可能性が示された。これまでに PRMT8 は、AD と同じく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や、FUS の凝集性を高めることで病態を悪化させる因子であることが報告されている。また、PRMT8 が誘発する神経炎症やアポトーシス経路の活性化および空胞変性は、ALS 患者や ALS 病態モデルマウスでも報告されている。よって、ALS 病態の増悪因子として PRMT8 の作用を解明することで、新しい神経変性疾患の発生機序解明につながる可能性がある。

[考察] 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と深く関係すると考えられ AD の治療標的の一つとされてきた。しかし、本研究の結果は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を示唆している。このことは、小胞体ストレスは AD の治療標的としては適さないことを示している。一方、家族性 ALS の 1 原因である 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おり、ALS では小胞体ストレスは依然として治療標的になる可能性がある。このように、小胞体ストレスは神経変性疾患の疾患特異性が強い現象と考えられ、疾患別に治療標的を再考することが重要と考えられる。研究 2 で着目した PRMT8 は、当初 AD の病理学的特徴を繋ぐ因子である予想した。しかし、結果としては、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。PRMT8 誘発性の病理学的変化は AD 病態特異的ではないものの、その分子機序を明らかにすることで神経変性疾患発症の新しい分子機序の解明に繋がる可能性がある。

以上のように、本論文は従来の AD 病態モデルマウスにおける問題点の原因を明らかにし、神経変性疾患増悪因子として PRMT8 の存在を示した。これらの成果は AD を含む神経変性疾患の基礎研究として、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。