

Graduate School of Advanced Science and Engineering
Waseda University

博士論文審査報告書
Screening Results Report

論文題目
Thesis Theme

Pathological and Functional Analysis of Combined Mutations
Associated with Alzheimer's Disease in Mice

アルツハイマー病の複合変異が生体にもたらす
病理学のおよび機能的影響の解析

申請者
(Applicant Name)
Kaori SATO
佐藤 香織

Department of Life Science and Medical Bioscience Research on Molecular Brain Science

February, 2022

Alzheimer 病(AD)は Alois Alzheimer による最初の報告以来 100 年以上に渡りその病因について研究が行われてきた。同疾患は、進行性に認知機能が障害される疾患であり、近年ではその病理学的特徴である Amyloid beta ($A\beta$)の蓄積を減少させる抗 $A\beta$ 抗体が治療薬として開発され、FDA から条件付き承認されている。 $A\beta$ が 20 年以上かけて脳内に蓄積することで発症すると考えられ、 $A\beta$ の前駆タンパク質である Amyloid Precursor Protein(APP)とその分解酵素の構成要素の Presenilin1(PSEN1)の遺伝子変異が若年発症の発症原因となることが、家族性 AD の研究から明らかになっている。病態解明や治療法の開発に有用なモデルマウスも、*APP* や *PSEN1* 遺伝子に患者由来の変異を導入し、これを強発現したトランスジェニック (Tg)マウスが開発され、研究に用いられて来た。しかしながら、AD 患者脳ではこれらの Tg マウスで増加している APP の C 末側や細胞内ドメインも高レベルで発現するため、これらの発現による変化がある点が問題となる。これらの問題を解決すべくマウスの *App* 遺伝子座にヒト変異を導入したマウスが開発されて研究に使用されてきた。その代表的なものが Swedish(KM670/671NL)変異と Beyreuther/Iberian(I716F)変異を導入した *App^{NL-F}* と *App^{NL-F}* に Arctic(E693G)変異を導入した *App^{NL-G-F}*であり、E693G 導入により $A\beta$ の凝集性が強くなり、3 箇所の変異がある *App^{NL-G-F}*では早期の $A\beta$ 蓄積が見られる。一方、*App^{NL-F}*は発症が遅く、病態の発症に時間がかかる点が問題であった。

本研究では、*App^{NL-F}*と *PSEN1* のヒト変異 P117L をマウス *Psen1* 遺伝子座に導入した *Psen1^{P117L}* を交配して作製した 2 重変異マウスと、*App^{NL-G-F}* の NL 変異を CRISPR/Cas9 によるゲノム編集により除いた *App^{G-F}*マウスを作製して解析している。前者は、孤発例の AD 患者の脳で蓄積する $A\beta$ と同様に G 変異の無い $A\beta$ が蓄積し、なおかつ早期に発症するため、研究に使いやすいメリットがあり、*App^{G-F}*は β -secretase(BACE1)の切断部位の変異である NL 変異がないため、AD 治療薬として期待されている BACE1 阻害作用を有する治療薬開発に用いることが可能となる。

本博士論文は 5 章からなり、第 1 章ではアルツハイマー病研究について、マウスモデルを中心にその問題点を挙げつつ概説している。第 2 章は本研究で用いられている実験方法について記載している。第 3 章において研究結果を記述している。先ず *App^{NL-F}* と *Psen1^{P117L}* を交配して得られる 2 重変異マウスの作製と解析について記載している。この 2 重変異マウスでは、 $A\beta$ の蓄積が *App^{NL-F}*に比べ早期に見られることから、AD 研究に用いるモデルマウスとしての有用性を示している。次に *App^{G-F}*マウスの作製について述べ、*App^{G-F}*が BACE1 阻害薬の効果判定に有用であることを示している。さらに

APP から A β が産生される過程で作られる C-Terminal Fragment(CTF) β 量を endosome のサイズと比較したところ、野生型に比べ、一連の App knock-in(KI)マウスでは CTF β 量の増加の程度に関わらず、endosome サイズが増加していることが明らかとなった。これは、生体での研究においては初めて得られた結果であり、新規の知見と言える。第4章では、これら新規に開発されたモデルマウスを従来のモデルマウスと比較しながら、その有用性と問題点について議論している。第5章では、これらの内容をまとめるとともに、将来展望について記載している。

2022年1月13日午後1時より行なわれた公聴会では、博士論文の内容についてスライドを用いて発表された。その後に行なわれた質疑の内容は以下の通りである。

1. 本日の発表スライド及び博士論文の免疫染色像のうちのいくつかは、免疫染色の陽性シグナルが判別しづらいのがある。例えば A β 43 を染色した像はどうか、という質問があり、オリジナルの画像では、陽性のシグナルは判別出来るが、分かりやすくすべきとの指摘はその通りなので、工夫をした修正を博士論文本体に行なう、との回答がなされ、最終版では修正された。
2. BACE1 阻害薬の特異性はどうか、という問いに対して、特異性については十分な検討が出来ていないが、使用した薬剤は多くの先行研究で使用されているものであり、in vivo での使用例もあり、本研究でも使用したとの回答であった。
3. BACE1 阻害薬を投与していないグループの平均値を1として投与群の値を算出したグラフになっているが、この実験において非投与群の A β の値は変異マウスで予想される高い値を示したのか、という問いに対して、予想通り高い値だったので、その点を明確にする修正を行ないたい、との回答がなされ、最終版では修正された。
4. endosome のサイズを示したデータで、数が増加していたか、そのデータはあるか、との問いに対して、数をカウントしたデータがあるので Supplemental data として博士論文に追加する、との回答であり、最終版では修正された。
5. 今回開発されたモデルマウスは孤発例の AD 患者の病態モデルとなるか、との問いに対して、これまでの孤発例にも有用な A β 産生を抑制する AD 治療薬の開発とそ

の難しさが説明された。 β -secretase, γ -secretase とともに APP 以外の基質が多くあるため、これらの阻害剤の開発にも今回開発したモデルマウスは有用であると考
えるとの回答であった。この点について博論に考察を加えたほうがよいとのコメン
トがあった。

6. CTF β と endosome の関連について確認させて欲しい、との問いに対して、先行研
究は細胞レベルの研究で、今回示したのはマウス生体の結果であり、CTF β が増加す
ると endosome のサイズが大きくなる異常があるという先行研究の結果は、生体
を用いた今回の結果では必ずしも再現されなかったが、野生型に比べ一連の変異マウ
スでは CTF β 増加の程度に関わらず endosome の異常があることを示している、と
の説明であった。

質疑の後の協議では、博士論文の内容は十分にオリジナリティーのある内容であり、今
後研究の進展が望まれるアルツハイマー病研究において優れたモデルマウスを開発し、
考察した内容を含み、当該研究分野の発展に寄与するものと評価できる。また、質疑を
通して、十分な当該研究分野の学識があることが確認されたことから、博士（理学）を
与えるに相応しいとの結論に至った。博士論文の最終版は、適切な修正を加えたもので
あることも確認した。

2022年2月

主査 早稲田大学教授 医学博士 山梨医科大学 大島 登志男

早稲田大学教授 博士（理学） 早稲田大学 朝日 透

早稲田大学教授 博士（医学）大阪大学 井上 貴文