

アルツハイマー病の原因としての細胞内輸送障害： 遺伝子研究から見えてきたこと

森 原 剛 史

1. はじめに：アミロイド仮説に続く 学説は生まれるか？

アルツハイマー病は複雑な多因子疾患である。アミロイド仮説は大変重要な学説でアルツハイマー病理解の基盤にもなっているが、この複雑な疾患には他にも多くの発症メカニズムが存在しているはずである。多因子疾患アルツハイマー病の真の理解とその克服のためにも、アミロイド仮説に劣らない説得力を持つ学説の誕生が求められている。

アミロイド仮説はどのように発展していったのであろうか。その時、他の学説はどのような状態であったのであろうか。今からちょうど25年前、APPが家族性アルツハイマー病の原因遺伝子と報告される前年の第9回日本痴呆学会（平成2年11月14日高知 学会名は日本認知症学会に改称前）の抄録を見ると脳病理を含めた基礎研究が19演題あった。各研究がどのような分子に注目していたのか眺めてみた。APP/Aβは2演題、APOEは1演題あった。

そしてVitB12, コリン, IL-2レセプター, セルロプラスミン, ガングリオシド, α1アンチキモトリプシン, clathrin, galanin, インテグリン, CD10と多彩な分子が1演題ずつ発表されていた。アルツハイマー型認知症（当時は「アルツハイマー型痴呆」）の病因に関する学説は混とんとしていた。アルツハイマー病は多因子疾患であり、様々な要因が複雑に関与し臨床症状にも脳病理にも多彩な表現型が出現する。病因の研究は手探り状態であり、疫学調査の結果などを手掛かりに、頭部外傷、アルミニウムなどの金属、ウイルス感染、脳循環不全など様々な仮説が生まれ検討された。

このような状況の中、アミロイド仮説はこれまでにない高い説得力を持つようになっていった。老人斑の主な構成蛋白はAβである。これに加えAPP, PSEN1, PSEN2が家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として同定され、これらの遺伝子変異がAβの産生や凝集に関与していることが分かった。こうしてアミロイド仮説は脳病理、生化学そして遺伝学が合わさることで極めて説得力が高い学説となった。これに対し、アミロイド仮説以外の諸説は決定的説得力がある分子を基盤として持たず、その分子生物学的研究の方向性も定まらない状況が続いた。（タウは説得力のある学説であるが紙面の関係で本稿では割愛する。）

Dysfunction of intracellular trafficking as a cause of Alzheimer's disease : New insights from genetic studies

Takashi Morihara

大阪大学大学院医学系研究科精神医学 [〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2 D3]

Dept of Psychiatry, Osaka University Graduate School of Medicine (2-2 D3 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan)

2. 説得力のある学説が生まれる条件が揃いつつある

細胞内輸送障害、炎症、マイクログリアなどはアルツハイマー病理に「何らか」の形で含有されているのは間違いない。しかしこれらの現象はあまりに広範囲にわたるざっくりしたものであり、その概念や仮説には曖昧さが付きまとう。分子レベルの厳密な理解に至りにくい。各実験結果が提示する分子メカニズムの中に、アミロイド仮説のように広くコンセンサスが得られたものはまだないというのが現実であろう。

しかし説得力のある新たな疾患メカニズムの学説が誕生する条件が揃いつつある。ある分子が疾患メカニズムに本当に含まれている根拠として、実験室での人工的な環境下での実験成果は決定力に欠ける。これに比べ、ある分子が「現実の患者さん」の疾患原因として関わっている根拠として、遺伝子研究は高い説得力を持つ。遺伝子研究は成果の乏しい時期が、1995年の家族性アルツハイマー病の原因遺伝子 *presenilin* の同定後から2009年頃まで長期間続いた。その後ついに、孤発性アルツハイマー病のリスク遺伝子が次々と報告される時代が到来した。現在までに20余りの遺伝子（または遺伝子座）が同定されている（Bettens et al., 2013; Cruchaga et al., 2014; Hollingworth et al., 2011a, 2011b; Jonsson et al., 2013）。これらのリスク遺伝子が各学説の分子メカニズムとがっちり結びつくことができれば、これまで以上に説得力のある学説が誕生し発展するのではなかろうか。

3. 細胞内輸送障害がアルツハイマー病理に存在している

神経細胞は長い突起を持つため、細胞内輸送は特別に重要であろうと想像されている。またアルツハイマー病脳では細胞内輸送が障害されているという指摘は以前からあった。なお、ハンチントン病など他の多くの神経変性疾患でも細胞内輸送障害は認め

られており“transport-opathies”という概念も提唱されている（Millecamps & Julien, 2013）。

孤発性アルツハイマー病は多数の原因や修飾因子が何十年という経過中に複雑に絡み合って発症に至る疾患である。アルツハイマー病には未同定のものも含め多種多様な病理メカニズムが含まれる複雑な多因子疾患である。おそらく多くの研究者は、細胞内輸送障害がアルツハイマー病理に含まれていることは認めるが、それほど重要な病理ではないと認識していた（Gan et al., 2014）。その理由として以下のことが信じられていたように思う。細胞内輸送障害はアルツハイマー病の多数の病理の一つに過ぎず、アルツハイマー病への疾患特異性が低い現象であろう。因果関係という点では、細胞内輸送は病理進行の下流に生じる多数の現象の一つに過ぎないだろう。おそらくは神経細胞死の直前に生じる病理の一つではないかと。

4. 細胞内輸送障害はアルツハイマー病の原因でもある

アルツハイマー病関連遺伝子研究の最近の成果は、細胞内輸送障害も発症原因であることを示唆している。遺伝子解析能力の飛躍的進歩と超巨大規模の検体収集の賜物として、孤発性アルツハイマー病のリスク遺伝子が次々と同定されている。現在までに20余りのリスク遺伝子（または遺伝子座）が同定されている（Lambert et al., 2013）。これらの遺伝子の機能を眺めてみると、免疫・炎症、脂質代謝や細胞内輸送という特定の機能に属する遺伝子が多いように見える。広い意味で細胞内輸送に関連するアルツハイマー病リスク遺伝子を列記してみた（表1）。細胞内輸送に関連する多くの遺伝子がアルツハイマー病のリスク遺伝子であることは、細胞内輸送障害が病理過程の下流に位置するだけでなく、疾患の発症原因になっていることを示唆する。

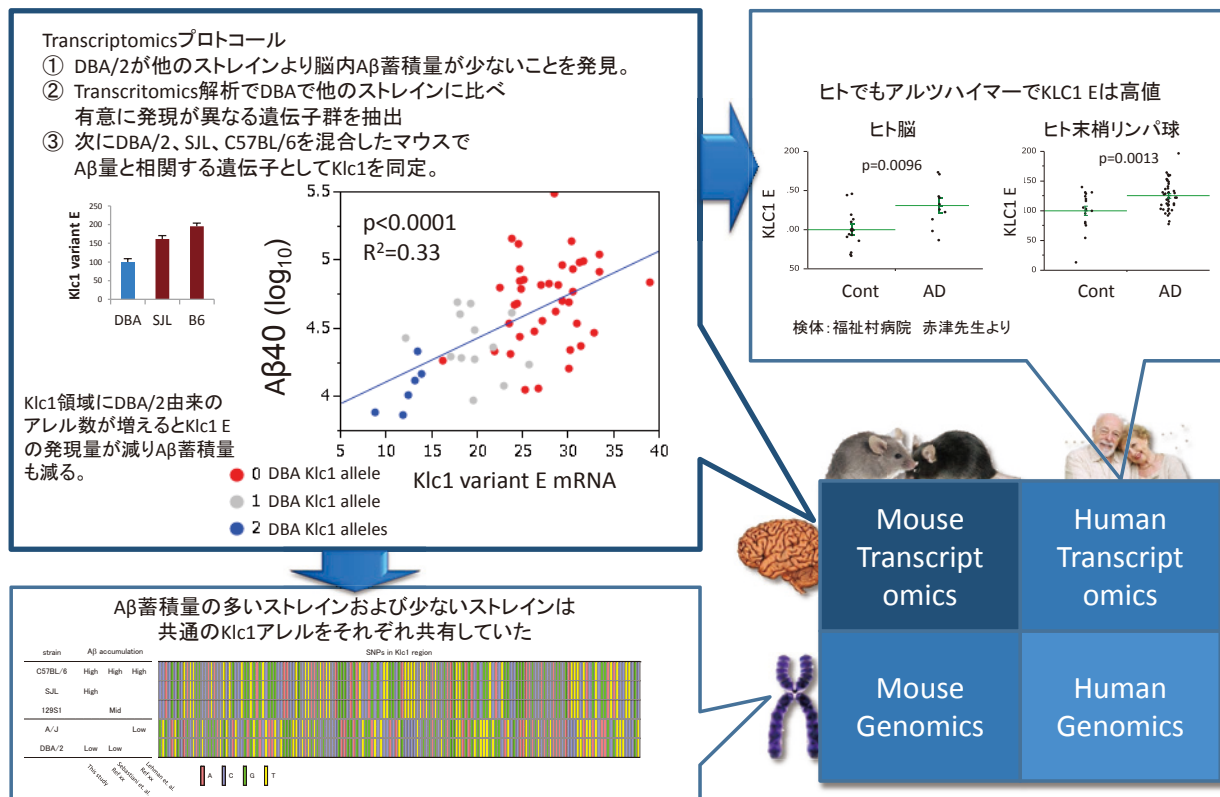
我々はヒト遺伝子解析とは全く異なる研究アプローチで、脳内Aβ蓄積量を規定する遺伝子産物 *kinesin light chain-1 splice variant E* (KLC1vE) を同定した（図1）（Moriyama et al., 2014）。KLC1も細

表 1. 細胞内輸送に関連があるアルツハイマー病リスク遺伝子

Gene	SNP	MAF	Odds Ratio	Reported or putative functions	Expression
PICALM	rs10792832	0.358	0.87	clathrin-mediated endocytosis	No change
BIN1	rs6733839	0.409	1.22	Regulation of endocytosis of synaptic vesicles	Increased
CD33	rs3865444	0.307	0.94	Immune response and trafficking ?	Increased
SORL1	rs11218343	0.039	0.77	APOE receptor, Mediates endocytosis of the lipids to which it binds	Decreased
NME8	rs2718058	0.373	0.93	Cytoskeletal function and axonal transport ? Primary ciliary dyskinesia の原因遺伝子	
CASS4	rs7274581	0.083	0.88	Cytoskeleton and axonal transport	
PLD3	rs145999145	0.008*	2.75	APP trafficking?	Increased
FERMT2	rs17125944	0.092	1.14	Actin assembly	
参考	KLC1			微小管上の順行性輸送	KLC1vE が高値

文献 Karch C Neuron 2014 v83 p11 を参考に作成

*上記文献の Table 1 (p15) の PLD3 の MAF は記載間違いと思われるので修正した。



Morihara et al. PNAS 2014

図 1. Aβ蓄積促進因子として kinesin light chain 1 (Klc1) splice variant E が同定された。

胞内輸送に重要な分子である。KLC1はアダプター蛋白として、微小管上を移動するモーター蛋白と積み荷であるカーゴをつなぐ。この積み荷の中にはAPPも含まれていることが複数の論文から報告されている (Lazarov et al., 2005) (Araki et al., 2007; Vagnoni et al., 2012)。KLC1には多数のスプライズバリエーションがあるが (McCart et al., 2003)、各バリエーションの機能はほとんど解明されていない。細胞内輸送は極めて複雑なシステムである。この複雑な制御の一端を担っているのが、このスプライシングの複雑さではないかとも想像されている。KLC1のスプライシングの違いにより積み荷のカーゴの選択や (Allan, 2006)、カーゴの細胞内の行先を (Gyoeva et al., 2000) 決めているという報告がある。

我々はマウス脳内のA β 蓄積量とKlc1vE mRNA発現量には強い相関があることを独自の網羅的解析で発見した (Moriyama et al., 2014)。またアルツハイマー病患者では脳および末梢血中のKLC1vE mRNA量が高値であった。神経系培養細胞においてKLC1vEをノックダウンするとA β 産生量が抑制されることも明らかになった。さらにゲノムを解析してみると、A β 蓄積量の多い3つのマウス系統は同一のアレルをKLC1領域に共有していた (図1左下)。A β 蓄積量の少ない2つのマウス系統は別のアレルを共有していた ((Moriyama et al., 2014) のfig S6)。現在ヒトにおいてもKLC1vE発現量及びアルツハイマー病発症の原因となっているゲノム変異があるか探索中である。

このように近年の遺伝子研究は、細胞内輸送障害がアルツハイマー病の原因でもあること明らかにしながら、その疾患メカニズムに含まれる分子を特定しつつある (Gan et al., 2014)。

5. 疾患原因遺伝子の独自の同定法：

マウスの体質を2段階トランスクリプトミクスで解析

ヒトゲノム解析による疾患研究を成功させるためには膨大な研究リソースが必要である。最近はこのプロジェクトのために、いくつもの国の主要な研

究機関で数百人の研究員が数万人分の検体を収集解析したりしている。我々は我々のような普通の研究室でも疾患関連遺伝子の同定ができないかと思案した。ゲノム研究が困難な原因は、統制のとれない環境因子や複雑な背景遺伝子などにある。これらの困難を解決するために、ヒトの代わりにマウスを用いた。さらにゲノム上のマーカーが同定されるだけで遺伝子が直接同定できないという問題を、ゲノミクスの代わりにトランスクリプトミクスを用いることで解決した (Moriyama et al., 2014)。この研究アプローチについては、2012年の認知症学会誌第26巻138-144ページの特集記事「アルツハイマー病関連遺伝子：トランスレーショナルアプローチによるA β 蓄積修飾遺伝子Klc1の同定も含めて」という拙文もご参照いただくと幸いである。我々は最初にアルツハイマー病になりやすいマウス系統は存在するか検討した。そしてDBA/2系統が背景遺伝子にあると、APP Tgマウスの脳内A β 蓄積量が1/3~1/4と大幅に少ないことを見いだした。DBA/2はアルツハイマー病になりやすいマウスであった。ではDBA/2系統のどの遺伝子がA β 蓄積量を抑制しているのだろうか。まずA β 病理が出現しないnon-Tgマウスをもちいて、DBA/2系統だけで発現量が異なる遺伝子群を抽出した。この遺伝子発現量の違いはA β 蓄積による2次的変化ではなく、純粋に背景遺伝子が原因である。次にDBA/2その他の系統を交配することで背景遺伝子を混合させたAPP Tgマウスを用意した。これらのマウスの脳内A β 蓄積量と発現量が相関する遺伝子を、先に抽出した遺伝子群の中から探した。こうして脳内A β 蓄積量を規定する遺伝子産物KLC1vEを同定した。

6. 遺伝子発現に注目した疾患遺伝子の同定という研究戦略

疾患関連遺伝子の同定とその後の機能解析の効率化が今後ますます重要になっていくであろう。ゲノム研究で同定されたLocus (遺伝子座) から遺伝子の同定がすんなりといかないことは少なくない (Albert & Kruglyak, 2015)。同定されたSNPは各遺

伝子のコーディング領域から遠く離れた場所に位置することは多い。極端な例かもしれないが、たとえば特定の遺伝子の3'UTR内 (Musunuru et al., 2010) やイントロン領域 (Smemo et al., 2014) に位置していても、真の原因遺伝子はこれらの遺伝子ではなく、原因となったSNPからずっと離れた位置にある遺伝子であったというケースもある。各SNPがこれら真の原因遺伝子の発現量を調整していることが同定につながった。このように疾患原因遺伝子の確実な同定はゲノム情報だけでいつも自動的に達成されるものではない。

一方、疾患の真の原因となるSNPsは遺伝子の発現調節領域に位置することが有意に多いことが、最近の多数の疾患ゲノム研究から経験的に明らかにされつつある (Albert & Kruglyak, 2015)。我々の研究戦略「マウス体質の2段階トランスクリプトミクス」は、発現解析をより中心においた遺伝子同定法である。マウスの遺伝的体質差をまずはトランスクリプトームで解析し、候補となりうる遺伝子を絞り込む。この中から疾患表現型と相関する遺伝子を抽出する。最後にこの遺伝子のゲノムをデータベースで検索することで、表現型との関連をゲノムでも確認する (Morihara et al., 2014) (図1)。

GWASなどのヒトゲノム研究は新しい希望をもたらした。しかし同定された遺伝子の疾患における分子メカニズム解明には次のハードルが存在する。一方、「マウス体質の2段階トランスクリプトミクス」で同定された遺伝子はその発現量が変化することで疾患を修飾することが同定時からわかっている。このことは機能解析の良いとりかかりとなる。

話は変わって、疾患モデルマウスの新たな利用法という見地で述べる。従来、疾患モデルマウスは、興味ある遺伝子や治療薬・外科処置の疾患表現型への作用を確認するためのツールであった。そのためには再現性の高い安定した疾患表現型の出現が要求される。背景遺伝子が疾患表現型を増減させることは実は少なくないが (Nadeau, 2001)、これは各疾患モデルマウスの単なる欠点として考えられることが多かった。一方、我々は背景遺伝子による疾患表現型の増減を逆手にとって疾患メカニズム解明の突

破口とした (Morihara et al., 2014)。疾患モデルマウスの新しい利用方法 (疾患モデル動物のリポジショニング) とも言える。今後、他の疾患でも応用可能かどうか実践的検証が待たれる。

7. 培養細胞を用いたAβ産生に関する検討

細胞内輸送がAβ産生量を直接的に関与していることを示唆する培養細胞実験がいくつか報告されている。例えば、鈴木利治らの研究室ではKLC1のアダプター蛋白であるJIP1bの過剰発現によるAβ産生量の減少を報告している (Araki et al., 2007)。我々はKLC1vEのsiRNAによるノックダウンでAβ産生量が抑制されることを報告した (Morihara et al., 2014)。アルツハイマー病のレアリスクバリエーションをして最近同定されたPLD3は (Cruchaga et al., 2014)、APPのトラフィックに関与しているという報告も複数ある (Cai et al., 2006)。PLD3を過剰発現するとAβ産生が減少したという (Cruchaga et al., 2014)。これらは木村展之らが提唱しているアルツハイマー病の原因としてのTraffic jam仮説も合わせて興味深い。なお、2001年にNature誌に発表されたAPP軸索内輸送とAβ産生の研究結果 (Kamal et al., 2001) は、6カ所のラボで再試されたが再現できなかった (Lazarov et al., 2005)。ゲノム研究の成果も取り込みながら、アルツハイマー病における細胞内輸送の分子メカニズムが説得力を持って明らかにされることを期待する。

8. おわりに

孤発性アルツハイマー病のリスク遺伝子の同定後、どのような有力仮説が誕生するだろうか？ Aβ仮説がさらに補強されるのであろう？ 他の現在の仮説が強固な学説へと進化するのだろうか？ まったく新しい学説も生まれるだろうか？ 今後の細胞内輸送障害の学説の進展が楽しみである。

文 献

- Albert FW, Kruglyak L (2015) The role of regulatory variation in complex traits and disease. *Nat Rev Genet* 16 : 197-212
- Allan VJ (2006) Cargo selection by specific kinesin light chain 1 isoforms. *EMBO J* 25 : 5457-5468
- Araki Y, Kawano T, Taru H, Saito Y, Wada S, Miyamoto K, Kobayashi H, Ishikawa HO, Ohsugi Y, Yamamoto T, et al. (2007) The novel cargo Alcadin induces vesicle association of kinesin-1 motor components and activates axonal transport. *EMBO J* 26 : 1475-1486
- Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C (2013) Genetic insights in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 12 : 92-104
- Cai D, Zhong M, Wang R, Netzer WJ, Shields D, Zheng H, Sisdodia SS, Foster DA, Gorelick FS, Xu H, et al. (2006) Phospholipase D1 corrects impaired betaAPP trafficking and neurite outgrowth in familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutant neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 : 1936-1940
- Cruchaga C, Karch CM, Jin SC, Benitez BA, Cai Y, Guerreiro R, Harari O, Norton J, Budde J, Bertelsen S, et al. (2014) Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. *Nature* 505 : 550-554
- Gan KJ, Morihara T, Silverman MM (2014) Atlas stumbled : Kinesin light chain-1 variant E triggers a vicious cycle of axonal transport disruption and amyloid- β generation in Alzheimer's disease. *Bioessays* 37 : 131-141
- Gyoeva FK, Bybikova EM, Minin AA (2000) An isoform of kinesin light chain specific for the Golgi complex. *J Cell Sci* 113 : 2047-2054
- Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert J-C, Carrasquillo MM, Abraham R, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, et al. (2011a) Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43 : 429-435
- Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert J-C, Carrasquillo MM, Abraham R, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, et al. (2011b) Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43 : 429-435
- Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson PV, Snaedal J, Bjornsson S, Huttenlocher J, Levey AI, Lah JJ, et al. (2013) Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 368 : 107-116
- Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS (2001) Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 414 : 643-648
- Lambert J-C, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, Jun G, Destefano AL, Bis JC, Beecham GW, et al. (2013) Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet* 45 : 1452-1458
- Lazarov O, Morfini GA, Lee EB, Farah MH, Szodorai A, DeBoer SR, Koliatsos VE, Kins S, Lee VM-Y, Wong PC, et al. (2005) Axonal transport, amyloid precursor protein, kinesin-1, and the processing apparatus : revisited. *J Neurosci* 25 : 2386-2395
- McCart AE, Mahony D, Rothnagel JA (2003) Alternatively spliced products of the human kinesin light chain 1 (KNS2) gene. *Traffic* 4 : 576-580
- Millicamps S, Julien J-P (2013) Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 14 : 161-176
- Morihara T, Hayashi N, Yokokoji M, Akatsu H, Silverman MA, Kimura N, Sato M, Saito Y, Suzuki T, Yanagida K, et al. (2014) Transcriptome analysis of distinct mouse strains reveals kinesin light chain-1 splicing as an amyloid- β accumulation modifier. *Proc Natl Acad Sci USA* 111 : 2638-2643
- Musunuru K, Strong A, Frank-Kamenetsky M, Lee NE, Ahfeldt T, Sachs KV, Li X, Li H, Kuperwasser N, Ruda VM, et al. (2010) From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature* 466 : 714-719
- Nadeau JH (2001) Modifier genes in mice and humans. *Nat Rev Genet* 2 : 165-174
- Smemo S, Tena JJ, Kim K-H, Gamazon ER, Sakabe NJ, Gómez-Marín C, Aneas I, Credidio FL, Sobreira DR, Wasserman NE, et al. (2014) Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature* 507 : 371-375
- Vagnoni A, Perkinson MS, Gray EH, Francis PT, Noble W, Miller CCJ (2012) Calsyntenin-1 mediates axonal transport of the amyloid precursor protein and regulates A β production. *Hum Mol Genet* 21 : 2845-2854

Dysfunction of intracellular trafficking as a cause of Alzheimer's disease : New insights from genetic studies

Takashi Morihara

Dept of Psychiatry, Osaka University Graduate School of Medicine

Disruption of intracellular trafficking is usually thought to be a down-stream event in Alzheimer's pathology. Recent genetic studies have revealed more than 20 genes (or loci) as Alzheimer' disease risk genes. Many intracellular trafficking related genes are involved in these risk genes. We identified kinesin light chain-1 splice variant E (KLC1vE) as an Abeta accumulation modifier (PNAS 2014 v111 p2638). KLC1 is an adaptor protein of motor protein. These studies suggests causative role of intracellular trafficking in Alzheimer's disease.

Address correspondence to Dr. Takashi Morihara, Dept of Psychiatry, Osaka University Graduate School of Medicine (2-2 D3 Yamadaoka, Suitashi, Osaka 565-0871, Japan)