

特集1 ブレークスルーを目指した多様な脳研究の今とこれから

1. モデル動物を利用したアルツハイマー病基礎研究最前線

笹栗 弘貴*

抄録：近年のゲノム編集技術の進歩により、アルツハイマー病（AD）を含むヒト疾患をより正確に再現する洗練された動物モデルの開発が可能となった。本稿では、次世代型ADマウスマルモセットに加え、最近筆者らが開発に成功した世界初の非ヒト霊長類のADモデルについて解説する。マーモセットは、ヒトと類似した生理機能、脳構造、複雑な行動特性を有しており、優れたADモデル動物となることが期待される。

日本生物学的精神医学会誌 36 (4) : 131-135, 2025

Key words : Alzheimer's disease, mouse, marmoset, genome editing, APP, Presenilin

1. アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) とは

ADは記憶障害を中心に、多様な進行性の認知機能障害を呈する疾患であり¹⁸⁾、病理学的には脳の細胞外にアミロイドβ (Aβ) ペプチドが蓄積することにより形成される老人斑、神経細胞内に異常リン酸化タウタンパクが凝集することにより形成される神経原線維変化、大脑皮質および海馬を中心とした広範な神経細胞脱落、そしてグリア細胞による神経炎症が特徴的な所見である²⁾。

Aβは、アミロイド前駆体タンパク (amyloid precursor protein : APP) がβセクレターゼ (β-site APP cleaving enzyme 1 : BACE1) とγセクレターゼにより切断されることによって產生される。ADの99%以上は明らかな遺伝性のない孤発性ADであり、加齢に伴うAβの分解やクリアランスの低下が脳内Aβの蓄積を招くと考えられている¹²⁾。一方で、ごく一部に常染色体顕性遺伝形式をとる家族性AD患者が報告されている³⁾。これらの家族性ADの原因遺伝子としては、APPをコードするAPP遺伝子、γセクレターゼの酵素活性を担う構成因子プレセニリンタンパク質 (PS1, PS2) をコードするプレセニリン遺伝子 (PSEN1, PSEN2) が知られている (Alzforum, <https://www.alzforum.org/>)。家

族性ADでみられるAPP遺伝子およびPSEN遺伝子の変異は、Aβの產生プロファイルを病的なパターンに変化させ、凝集性の高いAβが脳内で増加することでADを発症すると考えられている⁴⁾。一方、タウは微小管結合タンパク質の一つであり、主に神経細胞で発現し、微小管を安定化させる作用を有する。ADでは、タウのリン酸化により微小管との結合性が影響を受け、局在が変化するとともにオリゴマー形成を経て凝集体を形成すると推測されている⁷⁾。ADにおいてアミロイド病理は、皮質タウ病理や神経細胞脱落、および臨床的なAD発症の約20年前には脳内に出現していると考えられており、AD発症の引き金となっているというアミロイドカスケード仮説として広く支持されている¹⁹⁾。

2. ADマウスマルモセット

ADのモデル動物作製にあたっては、主に家族性疾患でみられる遺伝子変異をモデル動物に導入する手法が用いられている。これは、ADでは、アミロイド病理、タウ病理をはじめとする病理学的所見や、発症年齢を除いた臨床経過、検査所見は、孤発性ADと家族性ADで類似しており、ある時点からの主要な病態経路は共有されていると推測されることに基づく^{1, 5)}。

The forefront of basic research on Alzheimer's disease using model animals

*理化学研究所脳神経科学研究センター 認知症病態連携研究ユニット (〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1) Hiroki Sasaguri : Dementia Pathophysiology Collaboration Unit, RIKEN Center for Brain Science, 2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan
【笹栗 弘貴 E-mail : hiroki.sasaguri@riken.jp】

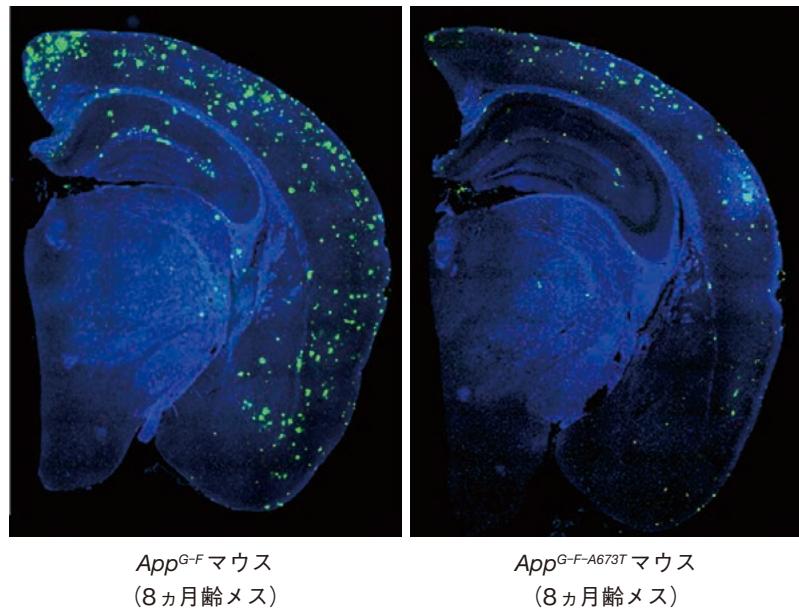


図1 アイスランド変異 (APP-A673T) の効果
 App -KI マウス (左) にアイスランド変異 (A673T) を導入した結果 (右),
脳内アミロイド病理が有意に減少した。

モデル動物としてはマウスがもっともよく用いられるが、約2年の寿命の中でADの病態を再現するためには、病態を促進させる何らかの操作を加える必要がある。これまでもっともよく用いられてきた手法が、APPやPSEN1など、疾患に関連する遺伝子の過剰発現法である。しかし、過剰発現によるトランスジェニック (Tg) マウスでは、使用するプロモーターによる非生理的な発現パターンや、過剰に発現されたタンパク質やその副産物による効果、遺伝子挿入部位での内在性遺伝子の破壊などさまざまな問題により、疾患に関連しないさまざまなアーチファクトが出現する可能性がある^{6, 14, 16)}。一方、疾患関連遺伝子変異をマウス内因性遺伝子に導入したノックイン (KI) マウスは、Tgマウスでみられるさまざまな欠点を回避できるが、ADの原因遺伝子変異の効果は一般的にあまり強くないため、単独でマウスに導入しても病態が再現できないことも多かった¹⁶⁾。そこでSaitoらは、マウス内在性 App 遺伝子に、家族性ADの原因となる複数の点変異を導入したマウスモデルを作製した(App -KIマウス)¹³⁾。その結果、APPの過剰発現手法によるさまざまなアーチファクトを回避したうえでアミロイド病理を脳内に再現することに成功し、現在AD研究界において標準的なモデルとして広く使用されている。筆者らはこれらの App -KIマウスを利用し、ADの病態解析や新規治療法の開発を行っている。アイスランドで発見されたAPP遺伝子A673T変異の保有

者はAD発症のリスクが低いことが報告されていたが、その生体内におけるAD病理に対する影響はこれまで明らかにされていなかった。そこで筆者らは、 App -KIマウスにA673T変異を導入したマウスを作製し、同変異がAPPに対する β 切断を抑制することにより $A\beta$ 産生量を減少、脳内アミロイド病理を軽減させ、AD発症を抑制する可能性があることを示した(図1)²⁰⁾。

加えて、ADにおけるタウ病理を再現するべく、Saitoらはマウス $Mapt$ 遺伝子をヒト microtubule associated protein tau (MAPT) 遺伝子に置換した $MAPT$ -KIマウスを作製したのち、 App -KIマウスと掛け合わせ、ダブルノックイン (dKI) マウスを作製した⁸⁾。dKIマウスを解析した結果、明らかなヒトADでみられるタウ病理や神経細胞変性を再現することはできなかったが、ヒトAD患者脳から抽出したタウタンパク質をdKIマウス脳に接種することで、 App -KIマウスと比較してタウ病理がより顕著にみられることが示され、タウをヒト化することでADのタウ病理をより再現しやすくなることが示された¹⁵⁾。さらに筆者らは、原発性年齢関連タウオパチー (primary age-related tauopathy: PART) の患者脳試料からタウタンパク質を抽出し、dKIマウスに接種したところ、AD患者脳由来のタウと同様にタウ病理が脳内を広がることを確認した。この結果から、加齢に伴って脳内に出現するタウ病理がADのタウ病理の初期病理 (シード) である可能性



図2 アルツハイマー病マーモセットモデル
ゲノム編集技術により作製した変異 *PSEN1* マーモセット。

を実験的に示すことに成功した¹⁰⁾。

3. 世界初の非ヒト霊長類 AD モデル

上記のように Saito らが作製した次世代型 AD マウスは優れたモデル動物であるが、マウスでは AD のすべての病態を再現することは困難であり、より優れた AD 動物モデルの作製が望まれる。そこで筆者らは、小型の非ヒト霊長類であるコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*, 以下マーモセット) を利用して新たな AD モデル作製を試みることとした(図2)。マーモセットは新世界サルに属する霊長類で、ブラジルの森林地帯に生息し、体長 180mm 程度、体重 250g 前後である。10 匹程度の大家族の群れを形成し、主に一夫一妻制で夫婦と兄弟で仔育てをするなど、ヒトと類似した行動をとる。生物学的にヒトに近縁であり、生理学的・解剖学的特徴、代謝・免疫機能もヒトに近い。また、非ヒト霊長類の中では繁殖効率が高く、性成熟まで約 1 年半で、1 匹の雌から年間 5 ~ 6 匹、生涯 40 ~ 80 匹の産仔を得ることが可能である。小型であるため、飼育や実験上の取り扱いが比較的容易で、危険な人獣共通感染症の自然感染の報告はない。脳の構造もヒトに近く、げっ歯類と比較して前頭前野や連合線維も発達しており、ヒトに類似した社会的行動、認知機能を有し、視覚・聴覚を利用したコミュニケーションをとる⁹⁾。

免疫機能・代謝機能、睡眠パターンもヒトと類似している。さらに、野生型マーモセットでも加齢とともに 7 歳ごろから A β が沈着し、超高齢の個体ではリン酸化タウも神経細胞内に蓄積する¹¹⁾。老化研究に適した長い寿命をもち(～20 歳)、体液試料を繰り返し採取が可能、薬物代謝がヒトと類似していることなどから、AD モデルとして最適な動物である可能性がある。また、マウスと比較し、脳も大きいため画像診断に適し、ゲノム配列情報、解剖アトラス・磁気共鳴画像法(magnetic resonance imaging: MRI)アトラスが確立していることも大きな利点である。

PSEN1 遺伝子は上述のとおり家族性 AD の原因遺伝子の一つとして知られており、これまでに 300 種類以上の変異が報告されている。PS1 は γ セクレターゼ複合体の構成成分であり、APP のプロセシングにおいて A β を产生するための切断を担うが、*PSEN1* 遺伝子に変異があると γ セクレターゼ複合体の機能に影響を及ぼし、より凝集性の高い A β が产生されやすくなる。筆者らは、すでにマーモセットで有効性が確認されているゲノム編集技術 Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN) を使用することで、*PSEN1* 遺伝子の 9 番目のエクソン(exon 9) の欠失変異(*PSEN1*- Δ E9)を導入することを試みた¹⁷⁾。この変異は家族性 AD の中でも数少ない欠失変異の 1 つであり、ヒトでの発症年齢は 36 ~ 80 歳で多くは 45 歳前後である。exon 9 を含む大規模な欠失変異や、exon 9 に隣接するイントロン(intron 8) の 3' スプライス部位に点変異があることでスプライシングの際に exon 9 がスキッピングされる変異も報告されている。筆者らは、intron 8 の 3' スプライス部位を欠失させることで exon 9 をスキッピングさせることができると考え、3' スプライス部位の欠失を標的とする TALEN を設計した。TALEN の mRNA を導入した卵子と野生型の精子で体外受精を行った後、胚移植により産仔を獲得した。産仔のゲノム DNA 配列を解析したところ、期待どおり intron 8 の 3' スプライス部位が欠失しており、mRNA から逆転写 polymerase chain reaction (PCR) によって得られた相補的 DNA の配列解析において、期待どおりに exon 9 が欠失していることを確認し、3' スプライス部位を欠失させることでエクソンスキッピングを起こせることを確認した。獲得された変異 *PSEN1* 個体から初代線維芽細胞を樹立し、培養液中の A β の定量を行った結果、A β 42 の产生比率が野生型よりも高くなっていること、*PSEN1*- Δ E9 が A β

產生に病的な影響を及ぼすことを確認した。

現在、これらの変異 *PSEN1* マーモセットにおける網羅的な解析を進めており、機能的 MRI やアミロイド陽電子放出断層撮影 (positron emission tomography : PET), fluorodeoxyglucose-PET (FDG-PET) などの技術を駆使し、脳構造や機能の変化、A β の蓄積、脳糖代謝の分布などを評価している。また、微量のタンパク質やバイオマーカーを高感度に測定できるデジタル enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 装置 Simoa™ (single-molecule array) を用いて、AD に関連した体液バイオマーカーの解析も行っている。今後、光遺伝学的操作や *in vivo* イメージングなどの侵襲的解析、経時的な病理学的・生化学的解析を行い、またすでに確立されたマーモセット脳の構造的・機能的マッピングを活用することにより、脳構造、神経細胞活動、神経回路機能と病理学的变化の関連性の評価を行っていくこととしている。

おわりに

モデル動物作製の技術の発展に加え、近年ではシングルセル解析、spatial transcriptomics、生体分子イメージング、光遺伝学 (optogenetics) などさまざまな解析技術も進歩しており、目的に沿った研究デザインと正しいモデル選択がこれまで以上に重要なってきたといえる。ヒトでみられるすべての病態を単一の動物モデルに再現することは困難であるが、病態の中で異なる側面を再現したモデルを複数組み合わせることで新たな知見が得られることも期待できる。AD マーモセットモデルは、よりヒト AD 患者に近い状態を生体内に再現し、AD 研究が直面している問題を打開する新たな動物モデルとなることが期待される。今後、マウスやマーモセットなどの多数のモデル動物と、ゲノム編集技術など成熟してきたさまざまな技術をうまく組み合わせることで、AD 病態の解明が進み、臨床的に有用なバイオマーカーの同定、革新的な治療方法が開発されることを期待したい。

本論文に記載した筆者らの研究においてすべて倫理的配慮を行っている。開示すべき利益相反は存在しない。

文 献

- 1) Bateman RJ, Aisen PS, De Strooper B, et al (2011) Autosomal-dominant Alzheimer's disease : a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, 3 : 1.
- 2) Braak H and Braak E (1991) Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol*, 1 : 213-216.
- 3) Cacace R, Sleegers K and Van Broeckhoven C (2016) Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement*, 12 : 733-748.
- 4) Chávez-Gutiérrez L, Bammens L, Benilova I, et al (2012) The mechanism of γ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J*, 31 : 2261-2274.
- 5) Dawson TM, Golde TE and Lagier-Tourenne C (2018) Animal models of neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*, 21 : 1370-1379.
- 6) Gamache J, Benzow K, Forster C, et al (2019) Factors other than hTau overexpression that contribute to tauopathy-like phenotype in rTg4510 mice. *Nat Commun*, 10 : 2479.
- 7) Guo T, Noble W and Hanger DP (2017) Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol*, 133 : 665-704.
- 8) Hashimoto S, Matsuba Y, Kamano N, et al (2019) Tau binding protein CAPON induces tau aggregation and neurodegeneration. *Nat Commun*, 10 : 2394.
- 9) Miller CT, Freiwald WA, Leopold DA, et al (2016) Marmosets : a neuroscientific model of human social behavior. *Neuron*, 90 : 219-233.
- 10) Nagata K, Hashimoto S, Joho D, et al (2024) Tau accumulation induces microglial state alterations in Alzheimer's disease model mice. *eNeuro*, 11 : ENEURO.0260-24.2024.
- 11) Rodriguez-Callejas JD, Fuchs E and Perez-Cruz C (2016) Evidence of tau hyperphosphorylation and dystrophic microglia in the common marmoset. *Front Aging Neurosci*, 8 : 315.
- 12) Saido TC and Iwata N (2006) Metabolism of amyloid beta peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease. Towards presymptomatic diagnosis, prevention and therapy. *Neurosci Res*, 54 : 235-253.
- 13) Saito T, Matsuba Y, Mihira N, et al (2014) Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, 17 : 661-663.
- 14) Saito T, Matsuba Y, Yamazaki N, et al (2016) Calpain activation in Alzheimer's model mice is an artifact of APP and presenilin overexpression. *J Neurosci*, 36 : 9933-9936.
- 15) Saito T, Mihira N, Matsuba Y, et al (2019) Human-

ization of the entire murine *Mapt* gene provides a murine model of pathological human tau propagation. *J Biol Chem*, 294 : 12754–12765.

16) Sasaguri H, Nilsson P, Hashimoto S, et al (2017) APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J*, 36 : 2473–2487.

17) Sato K, Sasaguri H, Kumita W, et al (2024) Production of a heterozygous exon skipping model of common marmosets using gene-editing technology. *Lab Anim (NY)*, 53 : 244–251.

18) Scheltens P (2016) Alzheimer's disease. *Lancet*, 388 : 505–517.

19) Selkoe DJ and Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*, 8 : 595–608.

20) Shimohama S, Fujioka R, Mihira N, et al (2024) The Icelandic mutation (APP-A673T) is protective against amyloid pathology in vivo. *J Neurosci*, 44 : e0223242024.

■ ABSTRACT

The forefront of basic research on Alzheimer's disease using model animals

Hiroki Sasaguri

Dementia Pathophysiology Collaboration Unit, RIKEN Center for Brain Science

Recent advancements in genome editing technologies like TALEN and CRISPR/Cas9 have facilitated the development of sophisticated animal models that better mimic human diseases, including Alzheimer's disease (AD). While traditional transgenic mouse models overexpressing disease-related proteins exhibit AD pathology, newer mouse models with humanized sequences and clinical mutations in the endogenous App gene (App knock-in (KI) mice) show A β accumulation without unrelated phenotypes. Moreover, reproducing later-stage pathologies such as tau pathology and neurodegeneration remains challenging in rodents due to species differences. To address this, we have created the world's first non-human primate (NHP) models of AD by introducing familial AD-causing mutations into common marmosets. Marmosets possess physiological functions, brain structures, and complex behaviors similar to humans, making them ideal for modeling AD. These AD marmoset models, combined with advanced imaging and genetic techniques, offer a promising platform for studying AD pathogenesis, neural circuit alterations, and identifying novel biomarkers and therapeutics.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 36 (4) : 131–135, 2025)