

Title	Transcriptome analysis of distinct mouse strains reveals kinesin light chain-1 splicing as an amyloid- β accumulation modifier
Author(s)	横小路, 美貴子
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34213
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名 Name	横小路美貴子
論文題名 Title	Transcriptome analysis of distinct mouse strains reveals kinesin light chain-1 splicing as an amyloid- β accumulation modifier (マウス背景遺伝子に着目したトランスクリプトーム解析によるA β 蓄積修飾遺伝子Klclの同定)
論文内容の要旨	<p>〔目的〕</p> <p>アルツハイマー病 (AD) は多因子疾患であり、その発症には、加齢、環境要因、ヒトの遺伝子の多様性が複雑にからみあっている。メンデルの法則に従うような家族性アルツハイマー病は全体の1%以下とされており、原因遺伝子APP, PSEN1, PSEN2が基盤となり、広く受け入れられているアミロイドβ仮説により、病態解明が行われてきた。アルツハイマー病の大多数を占める孤発性でも家族集積性があることは古くから指摘されており、発症に対する遺伝的要因が大きいとされている。このリスク遺伝子としてAPOEが特に孤発性のアルツハイマー病と関連が強いとされている。さらなるリスク遺伝子を探すため、ヒトゲノム研究では10000ものサンプルが使われているが、同定されたリスク遺伝子の相対リスクは低く、すぐに診断に役立つものではない。rare variantであっても、発症リスクの高い遺伝子変異を同定できれば新たに多くの分子やカスケードの解明につながり診断、治療につながると期待される。そのため我々は動物モデルとTranscriptomicsとを組み合わせ、新たなリスク遺伝子を探索した。</p> <p>〔方法ならびに成績〕</p> <p>APP Tgマウス (Tg2576) をC57BL6/J (B6)、SJL/J (SJL)、DBA2/J (DBA) の3種のinbredマウスと交配することにより、さまざまな割合の背景遺伝子をもつ12カ月令のAPP Tgを作成した。脳皮質からTritonX、GuHCl分画のAβ40、Aβ42の値をELISAにより測定したところ、DBAの背景遺伝子がAbeta蓄積量を減少させることがわかった。特に75%DBAアレルをもつマウスは0%DBAマウスに比べてAbeta量が著明に減少した (-74.7~-57.7% P<0.0001~0.0002)。海馬のmRNA発現量は発現アレイ (Illumina Mouse-Ref-8) で測定し網羅的解析を施し、Abeta蓄積量を修飾する遺伝子Klclを同定した。さらにそのスプライシングバリエーションに着目した。</p> <p>それぞれのAPP Tgから抽出したKlcl遺伝子のそのスプライシングバリエーションのmRNAの発現量を測定できるprimerを構築し、さまざまなスプライシングバリエーションの発現量とAbeta蓄積量との関係を考察した。KlclのスプライシングバリエーションEのmRNA発現量がAbeta蓄積量と相関していた。(Triton fraction : Abeta40 R²=0.39, p<0.0001, Abeta42 R²=0.24, p<0.0001) (GuHCl fraction : Abeta40 R²=0.33, p<0.0001, Abeta42 R²=0.21, p=0.0002)</p> <p>またKlcl遺伝子はDBAの背景遺伝子に着目してAbeta蓄積量を変えて、同定した遺伝子であるので、それぞれのAPP Tgマウスで、Klcl領域のゲノムがどのマウス由来か調べたところ、DBAアレル由来のKlclアレルのコピー数が増えるにしたがってKlclEの発現量も減少し、Abeta蓄積量も少ないことがわかった。</p> <p>次にKlcl遺伝子スプライシングバリエーションのコンストラクトを作成し、Neuro2A細胞にトランスフェクションし、培養液中のAβ40、Aβ42の値をELISAにて測定した。そしてKlclのスプライシングバリエーションEをoverexpressionすると、Abeta蓄積量が増加 (Aβ40 +18.4\pm3.4% P=0.0009, Aβ42 +9.27\pm2.7% P=0.024) し、siRNAでknockdownすると、Abeta蓄積量が減少 (Aβ40 -44.7\pm2.6% P<0.0001, Aβ42 -39.3\pm0.6% P<0.0001) した。</p> <p>最後にヒト剖検脳とヒト末梢リンパ球の発現解析により、KLC1遺伝子が本当にヒトのアルツハイマー病理に関与があるかどうかを確認した。ヒトの海馬からmRNAを抽出し、AD群 (n=10)、control群 (n=14) においてKLC1Eの発現量を測定したところ、AD群は1.3倍高値をしめした。(p=0.0096)。同じくヒトの末梢リンパ球中のKLC1Eの発現量においてもコントロール群 (n=17) との比較においてAD群 (n=47) は1.25倍高値 (p=0.0013) を示した。</p> <p>〔総括〕 ヒトの病気であるアルツハイマーのAbeta蓄積量を修飾する遺伝子 Klclをさまざまな背景遺伝子をもつAPP-Tgを用いて同定した。同定されたKlclのスプライシングバリエーションEはin vitro系でもAbeta産生量を増加させていた。ヒトの脳、リンパ球でもAD群でKLC1 スプライシングバリエーションEが増加しており、ヒトのアルツハイマー病理にも影響を与えていることが示唆された。多因子疾患の関連遺伝子探索に、背景遺伝子の異なる動物モデル動物と発現解析の組み合わせは、ヒトサンプルを用いたGWASや従来のQTL解析よりも特定の遺伝子を同定することができる有力な方法である。</p>

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 横小路美貴子

	(職)	氏名
論文審査担当者	主査	大阪大学教授 武田雅彦
	副査	大阪大学教授 望月秀樹
	副査	大阪大学教授 竹田啓二

論文審査の結果の要旨

アルツハイマー病 (AD) は多因子疾患であり、その発症には、加齢、環境要因、ヒトの遺伝子の多様性が複雑にからみあっているため、原因遺伝子同定が困難である。そのために動物モデルとTranscriptomicsとを組み合わせて、新たなリスク遺伝子を探索した。

[方法ならびに成績]

APP Tgマウス (Tg2576) をC57BL6/J (B6)、SJL/J(SJL)、DBA2/J (DBA) の3種のinbredマウスと交配することにより、さまざまな割合の背景遺伝子をもつ12カ月令のAPP Tg を作成した。脳皮質からTritonX、GuHCl分画のA β 40、A β 42の値をELISAにより測定したところ、DBAの背景遺伝子がAbeta蓄積量を減少させることがわかった。特に75%DBAアレルをもつマウスは0%DBAマウスに比べてAbeta量が著明に減少した。海馬のmRNA発現量は発現アレイ (Illumina Mouse-Ref-8) で測定し網羅的解析を施し、Abeta蓄積量を修飾する遺伝子Klcl1を同定した。さらにそのスプライシングバリエントに着目した。それぞれのAPP Tgから抽出したKlcl1遺伝子のそのスプライシングバリエントのmRNAの発現量を測定できるprimerを構築し、さまざまなスプライシングバリエントの発現量とAbeta蓄積量との関係を考察した。Klcl1のスプライシングバリエントEのmRNA発現量がAbeta蓄積量と相関していた。またKlcl1遺伝子はDBAの背景遺伝子に着目してAbeta蓄積量を変えることで、同定した遺伝子であるので、それぞれのAPPTgマウスで、Klcl1領域のゲノムがどのマウス由来か調べたところ、DBAアレル由来のKlcl1アレルのコピー数が増えるにしたがってKlcl1Eの発現量も減少し、Abeta蓄積量も少ないことがわかった。次にKlcl1遺伝子スプライシングバリエントのコンストラクトを作成し、Neuro2A細胞にトランスフェクションし、培養液中のA β 40、A β 42の値をELISAにて測定した。そしてKlcl1のスプライシングバリエントEをoverexpressionすると、Abeta蓄積量が増加し、siRNAでknockdownすると、Abeta蓄積量が減少した。最後にヒト剖検脳とヒト末梢リンパ球の発現解析により、KLC1遺伝子が本当にヒトのアルツハイマー病理に関連があるかどうかを確認した。ヒトの海馬からmRNAを抽出し、AD群 (n=10)、control群 (n=14) においてKLC1Eの発現量を測定したところ、AD群は1.3倍高値をしめした。(p=0.0096)。同じくヒトの末梢リンパ球中のKLC1Eの発現量においてもコントロール群 (n=17) との比較においてAD群 (n=47) は1.25倍高値 (p=0.0013) を示した。

[総括] ヒトの病気であるアルツハイマーのAbeta蓄積量を修飾する遺伝子 Klcl1をさまざまな背景遺伝子をもつAPP-Tgを用いて同定した。同定されたKlcl1のスプライシングバリエントEはin vitro系でもAbeta産生量に関与していた。ヒトの脳、リンパ球でもAD群でKLC1 スプライシングバリエントEが増加しており、ヒトのアルツハイマー病理にも影響を与えていることが示唆された。

以上、遺伝子KLC1Eはアルツハイマー病の原因を制御することが明らかになったため、学位に値するものと認める。