

Title	HtrA1→A $\beta$ 経路をターゲットとした加齢黄斑変性症の病態解明
Author(s)	
Citation	令和4（2022）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書．2023
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/90980">https://hdl.handle.net/11094/90980</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 令和4年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな氏名	そのだ あやと 園田 彩斗	学部 学科	医学部 保健学科	学年	3年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	辻川元一	所属	医学系研究科保健学専攻		
研究課題名	HtrA1 → Aβ 経路をターゲットとした加齢黄斑変性症の病態解明				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

## 【1. 研究概要】

難病にも指定されている加齢黄斑変性症 (AMD) は、欧米においては中途失明原因の第1位であり、日本においても罹患者が増えている重要な眼科疾患である。

すでに、AMD 発症にアルツハイマー病発症にも関わるタンパク Aβ の沈着が関連しているという報告が複数されている[1, 2]。そこで我々は、昨年 Aβ タンパクとその前駆体である APPb-202 (ここからは APP) を中心とした AMD の病態経路解明に向けて研究を開始した。AMD 発症に関わる因子としては RPE (Retinal Pigment Epithelium) 細胞で発現する *HTRA1* と呼ばれるセリンプロテアーゼの発現と活性も挙げられ[3, 4]、本研究室では *Tg rh1::hsa.Htra1 Zebrafish* (ここからはモデル型) を保有していることから、これを用いて Aβ と AMD の関連性について研究を行った。昨年までの研究 (<https://hdl.handle.net/11094/85610>) で判明したこととしては以下が挙げられる。

- ・ APP 発現量は神経組織 (眼・脳) において過剰である。
- ・ 野生型ゼブラフィッシュ (ここからは WT 型) の APP 発現量はいずれの部位 (眼・脳・筋 (腸管含む尾部)) においても加齢で減少している。

しかし、いずれもサンプル数が十分ではないことからデータとしての信頼性が低いため、本年度はサンプル数を増やしこれらのデータに信頼性を持たせることを一つの課題として研究を進めることとした。また、これに加えて本研究では新たにモデル型を加えて、AMD モデル型の場合の APP 発現量変化ならびに *HTRA1* 発現との相関性、モデル型と WT 型の発現量の比較を転写レベルで詳細に行うと同時に、組織におけるタンパクレベルでの発現についても研究を行うこととした。

## 【2. 研究方法】

「APP 発現・*HTRA1* 発現の種々の比較」

APP 遺伝子と *HTRA1* 遺伝子をターゲットとし、これの部位別 RT-qPCR を実施した。

Zf から眼 (眼球全体)、脳、筋 (腸管含む尾部) を取り出し、ニッポンジーン の ISOGEN II に浸した後、破碎を行い total RNA の単離を製造元のプロトコルに従い実施した。単離後は一定量の RNase フリ

一水に再懸濁した。

次に、RT-qPCR については、タカラバイオの One Step TB Green® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit を用いて 1step 法で APP 発現量の計測を実施した。この時のプライマー設定について、A $\beta$  は APP 遺伝子の残基 40 または 42 によって構成されるという特徴も考慮して、その残基部位にいずれかのプライマーが結合するように設定するようにした。これらを踏まえて、今回は以下の塩基配列のプライマーを用いて RT-qPCR を行った (Table1)。

Table 1.

Gene	Forward primer	Reverse primer
APPb-202	5'- ATGTTCTCTCGCGGAGGACAT -3'	5'- GTTCTGCATTTGCTCAAAGA -3'
<i>HTRA1</i>	5'- AACTTTATCGCGGACGTGGT -3'	5'- CTTTGACCCGGTGCTTGTTG -3'
GAPDH	5'- GTGGAGTCTACTGGTGTCTTC -3'	5'- GTGCAGGAGGCATTGCTTACA -3'

計測対象となった Zf の個体数は、生後 4 週±1 週 WT 型については n=6、生後 4 週±1 週モデル型については n=6、生後 2 年以降 WT 型については n=8、生後 2 年以降モデル型については n=4 であり、いずれの個体についても複数回 PCR を実施した。解析は、APP と GAPDH の、*HTRA1* と GAPDH の発現量の相対定量を用いて、結果で得られた外れ値は解析対象から除外した。また、各 Table に表記された平均値は、対 GAPDH 比を表す。

#### 「A $\beta$ 翻訳レベルでの解析」

RT-qPCR により、APP 遺伝子発現を確認したとしても実際にこの APP がどの程度 A $\beta$  として切り出され、どの程度網膜に沈着しているかが分からないため、実際に A $\beta$  タンパクを免疫組織化学染色 (凍結切片) することにより、それぞれの群における沈着量の比較を定性的に実施した。

はじめに、RT-qPCR を行う際と同様に、Zf から眼 (眼球全体)、脳、筋 (腸管含む尾部) を取り出し、PBS 溶液で 3 回洗浄した。その後、4%PFA でおよそ 3 時間固定を行った後、手早く冷 PBS 溶液で 2 回洗浄し、30%スクロース溶液に浸透後、Neg50 コンパウンドにて凍結マウントした。凍結切片は 16 $\mu$ m を基準に作成し、800 倍希釈済 A $\beta$  一次抗体 (※1)、1000 倍希釈済二次抗体 (※2) にて洗浄後、OLYMPUS 社の FLUOVIEW FV1200 にて観察を行った。

※1 「 $\beta$ -Amyloid (D54D2) XP® Rabbit mAb」を使用。Zf との交差性が低いため標準より濃度を多少濃く設定

※2 「Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG, F(ab')<sub>2</sub> Fragment Specific」を使用

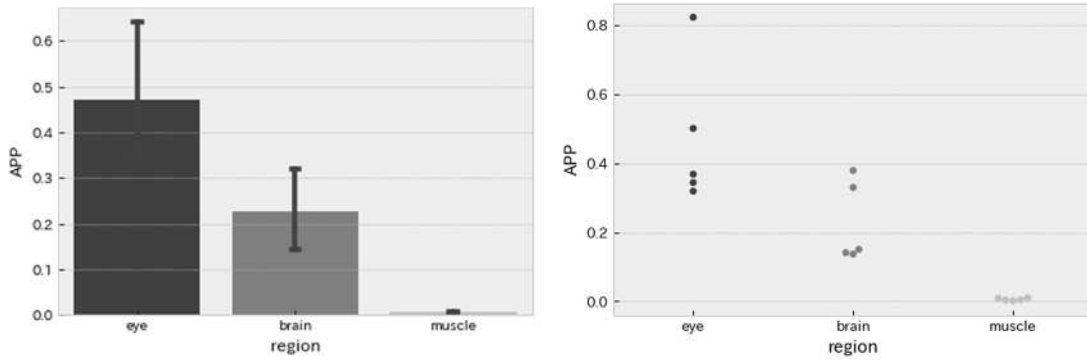
#### 「統計」

統計解析は Python を用いて行った。なお、2 群間の有意差検定は全て Mann-Whitney の U 検定で、3 群間の有意差検定は全て ANOVA で計算している。また、有意水準について、p<0.05 のとき有意差ありとする。

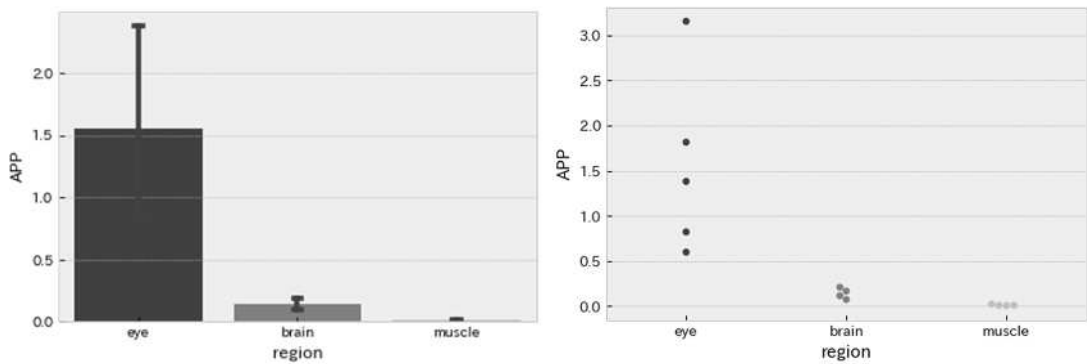
**【3. 研究結果】**

「部位別の APP 発現量」

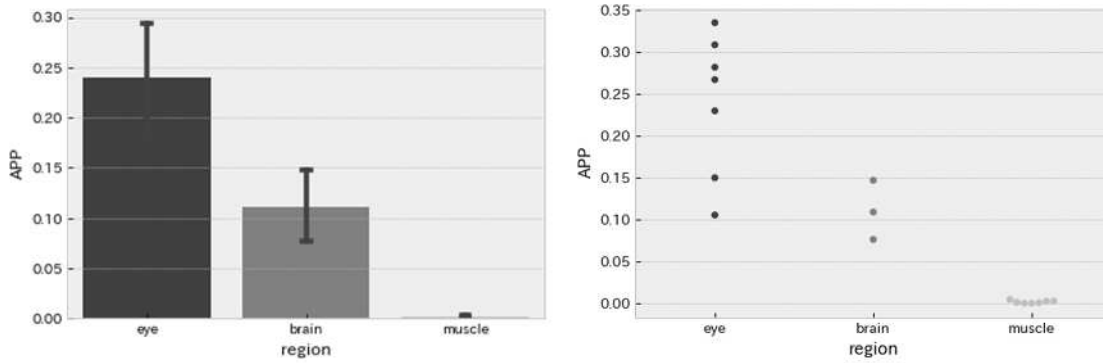
A: 生後 4~5 週間の WT 型の部位別 APP 発現量



B: 生後 4~5 週間のモデル型の部位別 APP 発現量



C: 生後 2 年以降の WT 型の部位別 APP 発現量



D: 生後 2 年以降のモデル型の部位別 APP 発現量

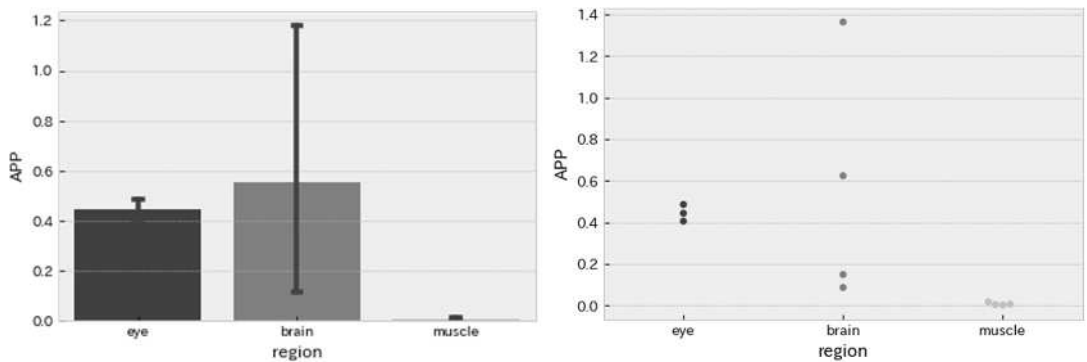


Figure 1.

Table 2.

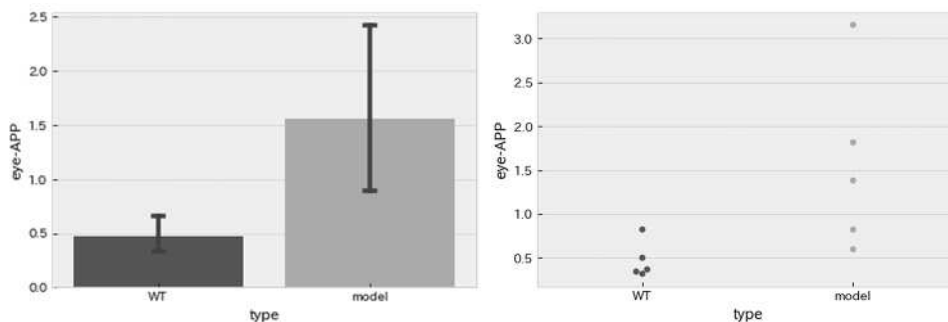
	A			B		
	eye	brain	muscle	eye	brain	muscle
Count (個体数)	5	5	5	5	4	4
Mean (平均)	0.471	0.227	5.66e-3	1.55	0.141	7.94e-3
SD (標準偏差)	0.209	0.117	3.63e-3	1.01	0.0591	2.66e-3
SE (標準誤差)	0.0934	0.0525	1.62e-3	0.453	0.0296	1.53e-3
P-Value (p 値)	6.99e-4			7.00e-6		
	C			D		
	eye	brain	muscle	eye	brain	muscle
	7	3	7	3	4	4
	0.240	0.111	2.15e-3	0.445	0.556	7.88e-3
	0.0841	0.0353	1.62e-3	0.0401	0.589	6.99e-3
	0.0318	0.0204	6.12e-4	0.0232	0.295	3.49e-3
	6.99e-4			0.142		

Figure 1.ならびに Table 2.より、A, B, C の Zf については 3 部位間で有意差があることが確認でき (A:  $p=6.99e-4$ , B:  $p=7.00e-6$ , C:  $p=6.99e-4$ )、神経組織（ここでは眼、脳）では APP 発現量が筋に比べて平均およそ 100 倍またはそれ以上に上昇している事が示された。また、同じ神経組織の中でも眼と脳について比較すると、eye vs brain (A:  $p=0.0952$ , B:  $p=0.0159$ , C:  $p=0.0667$ )となったように、全てが有意差を示したわけではないものの、図よりこれはサンプル数の問題であり、実際は平均 2~10 倍ほど眼の方が脳に比べて APP 発現量が多いように解釈できる。D についても 3 部位全てに有意差があることは示せなかったが、2 部位間で比較すると、eye vs muscle ( $p=0.0571$ )、brain vs muscle ( $p=0.0286$ )といったように神経組織の方が筋に比べて有意に APP 発現量が多いことを示すことができた。ただし、D のみは眼と脳の間には有意差を確認することは出来なかった ( $p=1.0$ )。

#### 「WT 型とモデル型の APP 発現量」

##### ◆眼における APP 発現について

A: 生後 4~5 週間の Zf のタイプ別 APP 発現量



B: 生後 2 年以降の Zf のタイプ別 APP 発現量

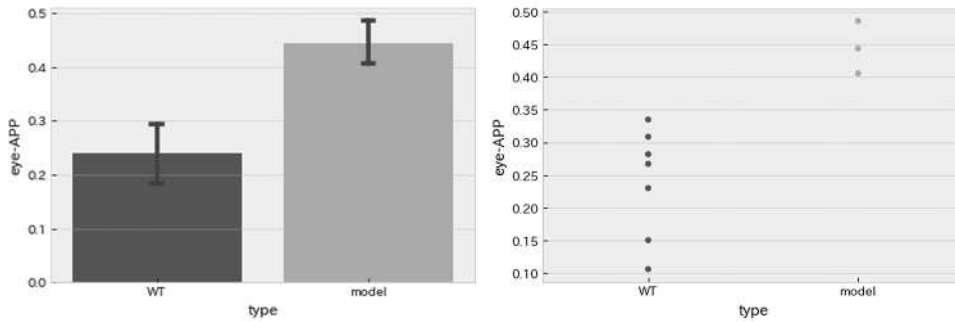


Figure 2.

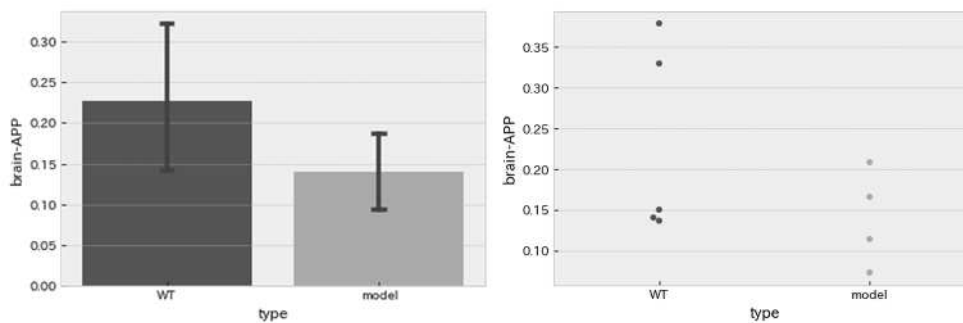
Table 3.

	A		B	
	WT	model	WT	model
Count	5	5	7	3
Mean	0.471	1.55	0.240	0.445
SD	0.209	1.01	0.0841	0.0401
SE	0.0934	0.453	0.0318	0.0232
P-Value	0.0317		0.0167	

Figure 2.ならびに Table 3.より、A はモデル型の方が WT 型に比べて有意に発現量が上昇しており (p=0.0317)、その差は平均約 3 倍である事が分かった。一方 B は、こちらについてもモデル型の方が WT 型に比べて有意に発現量が上昇しており (p=0.0167)、その差は平均約 2 倍である事が分かった。

◆脳における APP 発現について

A: 生後 4~5 週間の Zf のタイプ別 APP 発現量



B: 生後 2 年以降の Zf のタイプ別 APP 発現量

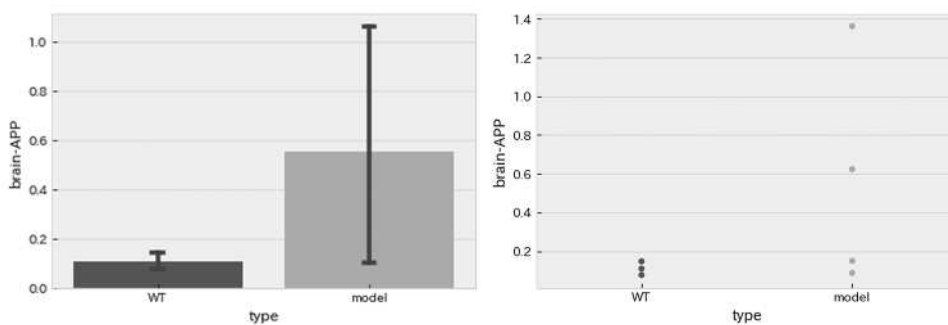


Figure 3.

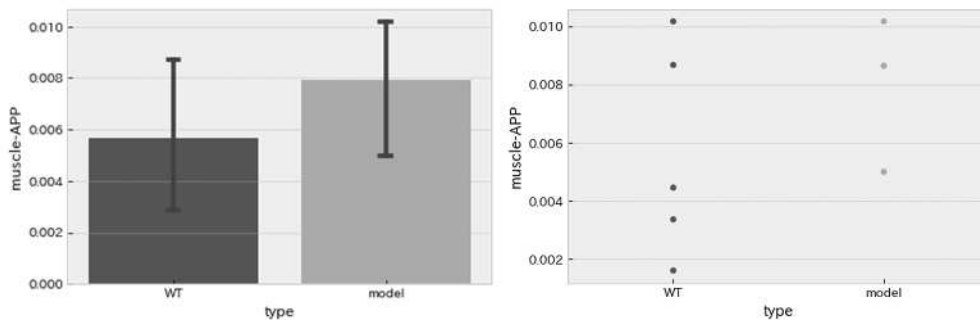
Table 4.

	A		B	
	WT	model	WT	model
Count	5	4	3	4
Mean	0.227	0.141	0.111	0.556
SD	0.117	0.0591	0.0353	0.589
SE	0.0525	0.0296	0.0204	0.295
P-Value	0.413		0.229	

Figure 3.ならびに Table 4.より、A はタイプ間に有意差は見られなかった ( $p=0.413$ )。しかし、見た目上モデル型の方が、発現量が低い傾向にも見える。一方 B はこちらも有意差は見られなかったが ( $p=0.229$ )、モデル型において WT 型に比べて APP が過剰に発現している個体も確認できた。

◆筋（腸管含む尾部）における APP 発現について

A: 生後 4~5 週間の Zf のタイプ別 APP 発現量



B: 生後 2 年以降の Zf のタイプ別 APP 発現量

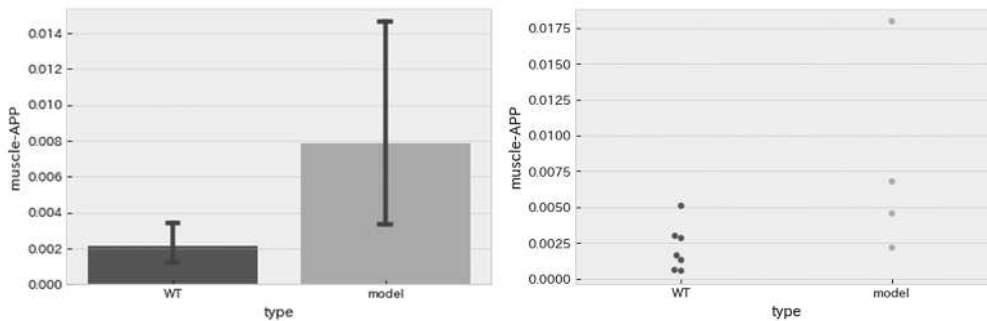


Figure 4.

Table 5.

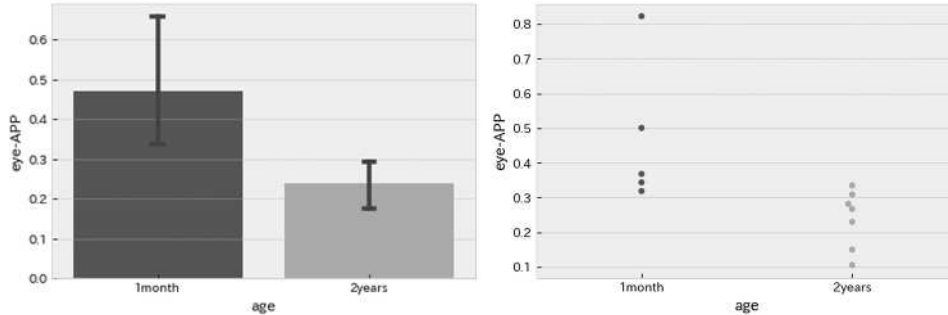
	A		B	
	WT	model	WT	model
Count	5	3	7	4
Mean	5.66e-3	7.94e-3	2.15e-3	7.88e-3
SD	3.63e-3	2.66e-3	1.62e-3	6.99e-3
SE	1.62e-3	1.53e-3	6.12e-4	3.49e-3
P-Value	0.453		0.0727	

Figure 4.ならびに Table 5.より、A はタイプ間に有意差は見られなかった ( $p=0.453$ )。一方 B は、こちらにも有意差は見られなかったが ( $p=0.0727$ )、若干モデル型の方が WT 型に比べて発現量が上昇しているように見える。

「加齢による APP 発現量」

◆眼における APP 発現量変化について

A: WT 型の加齢による APP 発現量の変化



B: モデル型の加齢による APP 発現量の変化

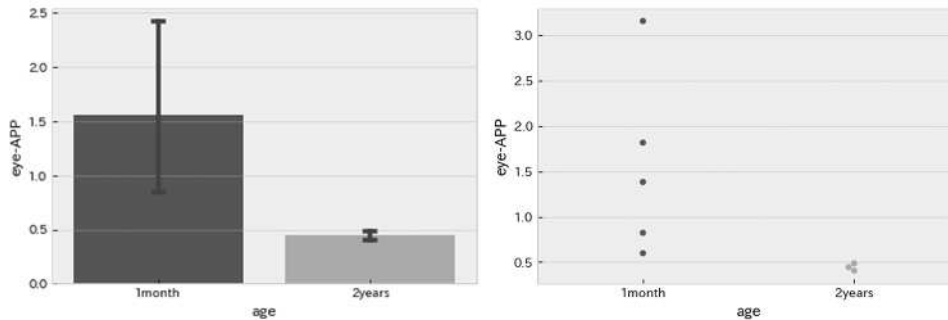


Figure 5.

Table 6.

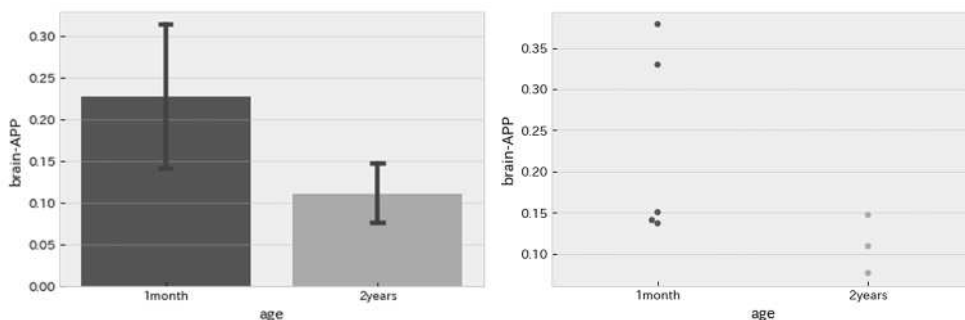
	A		B	
	1month	2years	1month	2years
Count	5	7	5	3
Mean	0.471	0.240	1.55	0.445
SD	0.209	0.0841	1.01	0.0401
SE	0.0934	0.0318	0.453	0.0232
P-Value	5.05e-3		0.0357	

Figure 5.ならびに Table 6.より、A は加齢により APP 発現量が平均して 1/2 程度有意に減少している事が分かった ( $p=5.05e-3$ )。一方 B についても加齢で APP 発現量が平均して 1/3 程度有意に減少していることが示された ( $p=0.0357$ )。

◆脳における APP 発現量変化について



A: WT 型の加齢による APP 発現量の変化



B: モデル型の加齢による APP 発現量の変化

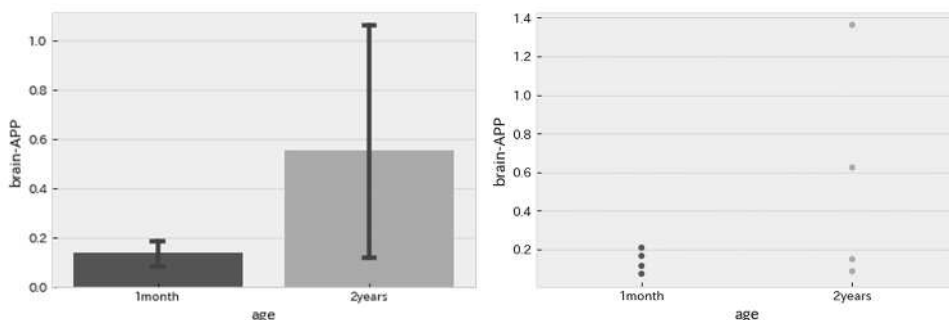


Figure 6.

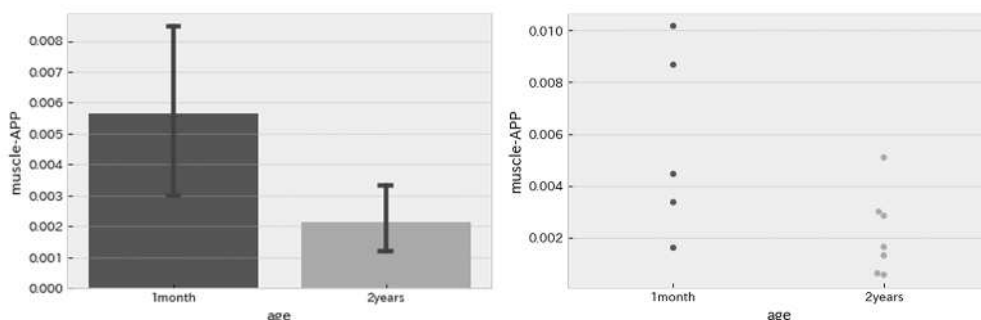
Table 7.

	A		B	
	1month	2years	1month	2years
Count	5	3	4	4
Mean	0.227	0.111	0.141	0.556
SD	0.117	0.0353	0.0591	0.589
SE	0.0525	0.0204	0.0296	0.295
P-Value	0.143		0.486	

Figure 6.ならびに Table 7.より、A は加齢による APP 発現量に有意差は示されなかった ( $p=0.143$ )。しかし、プロット図を見ると、加齢により APP 発現量が 1/2 ほど減少する傾向があるようにも見られ、サンプル数の関係上この可能性を否定することはできない。一方 B についても加齢で APP 発現量に有意差は確認されなかったが ( $p=0.486$ )、図より明らかにモデル型の方が加齢により APP 発現量が 3~7 倍ほど上昇している場合もあることが確認された。

◆筋（腸管含む尾部）における APP 発現量変化について

A: WT 型の加齢による APP 発現量の変化



B: モデル型の加齢による APP 発現量の変化

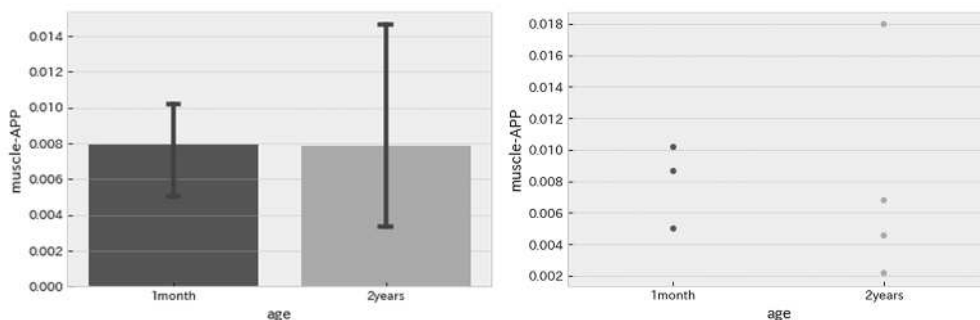


Figure 7.

Table 8.

	A		B	
	1month	2years	1month	2years
Count	5	7	3	4
Mean	5.66e-3	2.15e-3	7.94e-3	7.88e-3
SD	3.63e-3	1.62e-3	2.66e-3	6.99e-3
SE	1.62e-3	6.12e-4	1.53e-3	3.49e-3
P-Value	0.0732		0.628	

Figure 7.ならびに Table 8.より、A は加齢による APP 発現量に有意差はないということが確認された ( $p=0.0732$ )。しかし、プロット図を見ると若干ではあるが、加齢による APP 発現量の減少傾向が見られた。一方 B は、こちらについても加齢で APP 発現量に有意差は無いということが確認された ( $p=0.628$ )。

「HTRA1 発現量と APP 発現量の相関性」

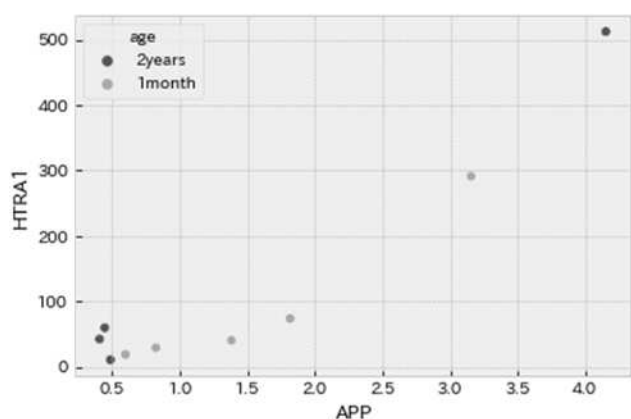


Table 9.

	HTRA1 vs APP ( $r=$ )	p-value
All	0.944	1.27e-4
1month (n=4)	0.950	0.0135
2years (n=4)	0.995	4.77e-3

Figure 8.

Figure 8. ならびに Table 9. は、モデル型の眼における HTRA1 と APP 発現量の相関を表したものであり、p 値から全群 ( $p=1.27e-4$ )、1month 群 ( $p=0.0135$ )、2years 群 ( $p=4.77e-3$ )いずれも統計的に有意とは言えるものの、いずれも今回は外れ値処理をしないかつサンプル数の関係もあるため、参考程度のデータとして見る。その上で分析すると HTRA1 が過剰発現するほど、APP 発現量も上昇する傾向はあり得ると言える。特に極端な HTRA1 発現ではこれが顕著であった。

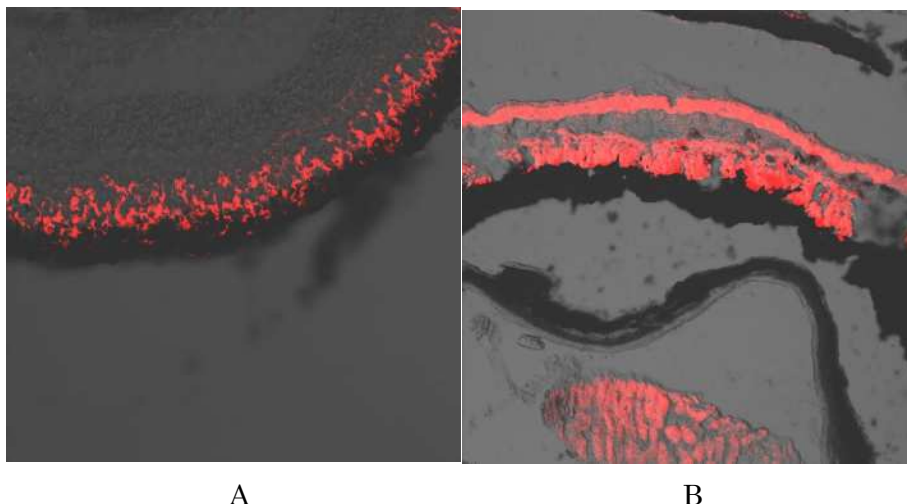
「A $\beta$  沈着量比較」

Figure 9.

A $\beta$  IHC 染色については、サンプル不足の影響により現在一部しか染色しておらず、沈着量の比較を行うことが出来ない。Figure 9. は実際の免疫組織化学染色像であり、A が生後 4~5 週間の WT 型の染色像で、B が生後 2 年以降のモデル型の染色像である。ネガティブコントロールを用意していないかつ、組織像が若干潰れているが、いずれも RPE 細胞領域に A $\beta$  が沈着していることは確かであると言えそうである。

## 【4. 考按】

昨年と異なり、今回はサンプル数を増やした上での解析結果であることから、一部外れ値としての削除データはあるものの、信頼性の高いデータであると言える。

まず Figure 2. より、眼では年齢に関わらずモデル型の方が、APP 発現量が上昇する。つまり *HTRA1* は、APP 発現量の上昇に関与していることが予想される。Figure 4. より、有意差は確認できなかったものの、筋においてもモデル型については APP 発現量が若干上昇傾向にも見え、眼における *HTRA1* 発現が何らかの影響を与えている可能性もあるが、上昇率も加味してここについてはゼブラフィッシュ解剖時のコンタミが影響したものであると現状は推測する。

次に Figure 1. より、部位別の APP 発現量は昨年同様、いずれの Zf においても APP 発現量は筋に比べて神経組織でおおよそ 10~100 倍有意に上昇している事が示されたため、APP は神経組織特有に発現する物質である可能性が高いことが推測される。また、その特異性から APP は神経組織で何かしらの重要な役割を担っていることが推察されるが、現状 APP の存在理由がほとんど解明されていないことからこの理由は謎である。ここで Figure 5-7. A より、WT 型において加齢で APP 発現量が減少傾向にあった、つまり幼年期では発現量が多量であったことを踏まえると、APP は成長に何らかの作用をもたらしていることが一つ考えられる。こちらについては APP 遺伝子ノックアウト Zf を作成し、WT 型との成長過程の違いを観察することにより、APP が幼年期に重要な物質である否か、強いてはどのような働きをしているかを解明することが可能となってくるであろう。もう一つこの APP について考えられる仮説として、特に生体に必要な物質では無いが、加齢でこの発現量が減少しないことがアルツハイマー病の原因になり得るというものである。これは、Figure 6 B のプロット図より、AMD モデル型の方が、APP 発現量が上昇もしくは一定を示しており、WT 型と正反対の発現傾向を示すことから推測したものである。仮にこの仮説が真であった場合、APP 発現量変化に他の遺伝的背景が関わってくることを推察されるかつその原因遺伝子の一つとして *HTRA1* が考えられるため、今

後検討が必要となってくる。いずれにせよ、APPに関する身体への働きは今後解明する必要があるであろう。

次に Figure 3. B より、結果としては有意差を確認できなかったものの、1/2 の確率で大幅な APP 発現量上昇が確認されたことから全くの無関係とは言い難い。つまり、生後 2 年以降のモデル型について脳においても APP の過剰発現が見られる可能性があるわけであるが、本来 APP 発現に影響を与える可能性があり得るであろう *HTRA1* 遺伝子はロドプシン遺伝子の上流、つまり眼でのみ発現されるように組換えられているはずであるため、このように脳でも APP 発現量に通常とは異なる変化が起きることは非常に不思議である。ここで、私は以下三つの仮説を立てた。

- ①セリンプロテアーゼとしての *HTRA1* がパラクラインにより脳の一部移動し、APP 発現を促進させている。このとき、脳はほかの部位に比べて APP 発現抑制機構が弱いいため、Figure3 B のような結果になった。
- ②Aβ タンパクがパラクラインにより脳の一部移動し、ゼブラフィッシュ *HTRA1* 発現を促進させ、産生された *HTRA1* の働きで APP 産生が再度促進されるため、Figure3 B のような結果になった。
- ③誤って脳にも *HTRA1* 遺伝子が挿入された。

以上三つの仮説のうち、③については *HTRA1* をターゲットとした RT-qPCR を行うことで証明可能なため、今回実施した。対象はモデル型全てであり、RT-qPCR の結果に再現性があまり見られなかつたこと、個体差が大きかったことからデータとして明示することが出来ないが、いずれの個体、計測結果においても眼における *HTRA1* 発現量から眼における APP 発現量の範囲内に収まっていた。そのため、これはコンタミの影響ではなく明らかに脳内で発現する遺伝子にヒト *HTRA1* が挿入されているということが推測される。つまり、ロドプシン遺伝子が脳内にも存在することになる。ここで、過去にロドプシン遺伝子が松果体においても発現しているという報告[5, 6]が多く挙げられている。したがって、この松果体で発現するロドプシン遺伝子にヒト *HTRA1* 遺伝子が挿入されたことから今回このような結果になったことが考えられる。さらに、松果体におけるロドプシン遺伝子発現は網膜でのそれと異なり少し複雑な仕組みを持つ[7]。これが *HTRA1* 発現に個体差を生んだ要因の一つであるのでは無いかと我々は推測する。これより、③の仮説が真であり、①②の可能性は否定される結果となったが、①②については完全に否定されたわけでは無いため、今後これについても、まずは *HTRA1* 抗体を用いて脳の免染、または *HTRA1* 遺伝子挿入部位を変更し、新しいトランスジェニック Zf を作成することによりパラクライン機構が存在するかを確かめる必要がある。仮にここでパラクライン機構が発見された場合、AMD 発病とアルツハイマー病発病が直接的関連性を持つ可能性があることを示唆することが出来るため、今後病態経路の解明を進めていく上で非常に重要な発見となる。

次に Figure8 より、*HTRA1* の発現量が上昇すると APP 発現量も上昇することについて。Aβ は脳内では神経細胞障害を引き起こす働きがあるという報告[8, 9]が複数上げられている (Aβ 仮説)。一方、Aβ は正常でも同程度沈着し神経細胞傷害には関与しないという報告[10]もある (Aβ 否定説)。ここで、過去に *HTRA1* が神経障害に働いているという報告[11]があることから、APP 遺伝子のノックアウトもしくは Aβ 沈着のブロックをした Zf を用意すると仮定する。すると、*HTRA1* のみが網膜に作用する状態としたときの RPE 細胞障害度と Aβ 沈着時の RPE 細胞障害度の比較をすることが出来るため、いずれが神経細胞傷害に寄与しているか、もしくはいずれも寄与しているかが判断することが出来る。これは、*HTRA1* による視細胞障害の詳細経路解明に繋がるかつ、これまで議論が続いてきた Aβ 仮説に一石を投ずる研究になることが予測されるため、今後研究を進めていきたいと考える。

最後に Aβ 沈着について。こちらについては今後免染ならびに評価を進めていく必要があるが、現段階ですでに APP 発現の傾向と異なる傾向を示していることが示唆されていることから、これが真で

あった場合、APP→A $\beta$  経路に関わる種々の因子の発現量等について検討する必要がある。

#### 【5. 結語】

今回一連の研究を通して出た結論は以下の通りである。

- ・ APP は神経組織に特異的に発現し、特に眼で発現が強い傾向にある。
- ・ HTRA1 は APP 発現を促進させている。ただし、APP 発現と A $\beta$  沈着量が必ずしも同期しているとは限らない。
- ・ WT 型、モデル型いずれにおいても基本的に加齢で APP 発現量は減少していく。
- ・ HTRA1 発現量が過剰に上昇すると APP 発現量も過剰になる。

今後は免染を継続し、APP 発現と A $\beta$  沈着の整合性を確認後、実際に A $\beta$  仮説は AMD に適用されるか、種々の実験を通して証明していく予定である。

#### 【6. 謝辞】

本論文の作成にあたり、大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻教授 辻川元一先生には指導教官として終始多大なご指導ご鞭撻を賜りました。ここに感謝の意を表します。また、研究遂行にあたりゼブラフィッシュの提供並びにその他ご助言くださった辻川研究室の皆様には厚く御礼申し上げます。

#### 【7. 参考文献】

- [1] Jiying Wang, Kyoko Ohno-Matsui, Ikuo Morita; Amyloid  $\beta$  enhances expression and activity of HTRA1 in retinal pigment epithelial cells, a mechanism of wet age-related macular degeneration development from drusen. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013;54(15):335.
- [2] Lynn, Savannah A.1; Keeling, Eloise1; Munday, Rosie1; Gabha, Gagandeep1; Griffiths, Helen1; Lotery, Andrew J.1,2; Ratnayaka, J. Arjuna B.Sc., M.Phil., Ph.D.1,\* . The complexities underlying age-related macular degeneration: could amyloid beta play an important role?. *Neural Regeneration Research*: April 2017 - Volume 12 - Issue 4 - p 538-548 doi: 10.4103/1673-5374.205083
- [3] Oura Y, Nakamura M, Takigawa T, Fukushima Y, Wakabayashi T, Tsujikawa M, Nishida K. High-Temperature Requirement A 1 Causes Photoreceptor Cell Death in Zebrafish Disease Models. *Am J Pathol.* 2018 Dec;188(12):2729-2744. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.08.012. Epub 2018 Sep 29. PMID: 30273602.
- [4] Jiying Wang, Kyoko Ohno-Matsui, Ikuo Morita; Amyloid  $\beta$  enhances expression and activity of HTRA1 in retinal pigment epithelial cells, a mechanism of wet age-related macular degeneration development from drusen. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013;54(15):335.
- [5] Magnoli D, Zichichi R, Laurà R, et al. Rhodopsin expression in the zebrafish pineal gland from larval to adult stage. *Brain Research.* 2012 Mar;1442:9-14.
- [6] Ichsan AM, Kato I, Yoshida T, Takasawa K, Hayasaka S, Hiraga K. Rhodopsin promoter-EGFP

fusion transgene expression in photoreceptor neurons of retina and pineal complex in mice. *Neurosci Lett.* 2005 May 6;379(2):138-43.

- [7] Mano, H., Asaoka, Y., Kojima, D. et al. Brain-specific homeobox Bsx specifies identity of pineal gland between serially homologous photoreceptive organs in zebrafish. *Commun Biol* 2, 364 (2019). <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0613-1>
- [8] Bhattarai P, Thomas AK, Zhang Y, Kizil C. The effects of aging on Amyloid- $\beta$ 42-induced neurodegeneration and regeneration in adult zebrafish brain. *Neurogenesis (Austin)*. 2017 May 2;4(1):e1322666.
- [9] Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW: Neurodegeneration induced by  $\beta$ -amyloid peptides in vitro: The role of peptide assembly state. *J Neurosci* 1993, 13: 1676–1687.
- [10] Chételat G, La Joie R, Villain N, Perrotin A, de La Sayette V, Eustache F, Vandenberghe R: Amyloid imaging in cognitively normal individuals, at-risk populations and preclinical Alzheimer's disease. *Neurol Clin* 2013, 2: 356–365.
- [11] Oura Y, Nakamura M, Takigawa T, Fukushima Y, Wakabayashi T, Tsujikawa M, Nishida K. High-Temperature Requirement A 1 Causes Photoreceptor Cell Death in Zebrafish Disease Models. *Am J Pathol.* 2018 Dec;188(12):2729-2744.