

1 ***APOE* ノックアウト細胞株における遺伝子発現プロファイリング：*APP* へ至る *APOE***  
2 **関連シグナル伝達カスケードの解析**

3  
4 劉 李歆 (リュウ リキン)

5  
6 新潟大学脳研究所 附属生命科学リソース研究センター

7 バイオリソース研究部門 遺伝子機能解析学分野

8 (指導：池内健教授)

9  
10 **Gene expression profiling in *APOE* knockout cell lines: Analysis of *APOE*-related signaling**  
11 **cascades leading to *APP***

12  
13 Lixin LIU

14 Department of Molecular Genetics, Brain Research Institute, Niigata University

15 (Director: Prof. Takeshi Ikeuchi)

16  
17  
18 **要旨**

19 アポリポタンパク E (*APOE* : apolipoprotein E) は脂質代謝に関与し、その遺伝子 *APOE*  
20 はアルツハイマー病 (AD : Alzheimer's disease) の強力な感受性遺伝子として知られて  
21 いる。しかし、どのような分子メカニズムを介して AD 発症に寄与するのかは十分に解  
22 明されていない。そこで本研究では *APOE* を取り巻く遺伝子を網羅的に同定する目的  
23 で、*APOE* 高発現細胞であるヒト肝癌由来 HepG2 細胞を対象に、*APOE* をノックアウト  
24 (KO : knockout) し、RNA シーケンシング (RNA-seq : RNA sequencing) を行った。近年、ヒト人工多能性幹細胞由来の神経細胞を用いた研究によって、*APOE* が若年発症型  
25 家族性 AD の原因遺伝子であるアミロイド前駆体タンパク (*APP* : amyloid beta precursor  
26 protein) 遺伝子 *APP* の転写を間接的に制御することが報告された。そこで、上述の RNA-  
27 seq データを用いて *APP*、及び *APOE* から *APP* へ至る 4 個の細胞内シグナルカスケー  
28 ド関連遺伝子 *MAP3K12* (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12)、*MAP2K7*  
29 (mitogen-activated protein kinase kinase 7)、*MAPK1* (mitogen-activated protein kinase 1)、  
30 *FOS* (Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit) の発現量を *APOE* KO 群と対  
31 照群で比較した。その結果、*APOE* KO 群において、*APP* と *FOS* の遺伝子発現量が有意  
32

33 に低下していることが分かった。APOE は細胞種を超え *APP* の転写に最終的に影響を  
34 与えるものと推察される。RNA-seq データの網羅的比較解析では有意な発現変動を示す  
35 遺伝子を 3,208 個同定した (多重比較補正後の *P* 値は 0.001 未満)。その上位 20 遺伝子  
36 の中に *APOE* は含まれ、*APOE* 以外の脂質代謝に関わる遺伝子をさらに 3 個確認した  
37 ( *MIDIIP1* : MID1 interacting protein 1 、 *ENPP2* : ectonucleotide  
38 pyrophosphatase/phosphodiesterase 2、*FADS2* : fatty acid desaturase 2)。APOE 依存的な遺伝  
39 子発現調節機構を制御することによって、将来的には、AD の発症や進行を遅延させる  
40 可能性が示唆された。

41

42 **キーワード** : *APOE*, *APP*, Alzheimer's disease, HepG2, RNA-seq, CRISPR-Cas9, knockout

43

44 別刷請求先 : 〒951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757

45 新潟大学脳研究所・附属生命科学リソース研究センター・バイオリソース研究部門・遺  
46 伝子機能解析学分野

47 劉 李歆

48

49 Reprint requests to: Lixin LIU

50 Department of Molecular Genetics, Brain Research Institute, Niigata University

51 1-757 Asahimachi, Chuo-ku, Niigata 951-8585, Japan

52 **はじめに**

53 アポリポタンパク E (APOE : apolipoprotein E) は脂質代謝に関与するタンパクである。  
54 末梢器官では肝臓、中枢神経系ではアストロサイトで主に産生・分泌される。317 個の  
55 アミノ酸から成る未成熟型として合成されるが、N 末端側の 18 個のアミノ酸はシグナ  
56 ルペプチドとして切断され、最終的に 299 個のアミノ酸 (34-kDa) から成る成熟型へと  
57 変化する (文献 1)。通常、脂質と結合してリポタンパクを形成し、血液中を流れ、細胞  
58 表面の APOE 受容体を介して細胞内へ取り込まれる (文献 2-3)。興味深いことに、末梢  
59 器官と中枢神経系の APOE は血液脳幹門を境にそれぞれ独立したプールとして存在し、  
60 往来することはないとされる (文献 4-6)。これは APOE と疾患の関連を解明する上で、  
61 無視することのできない重要な知見である。

62 APOE は染色体 19 番長腕に位置する 4 つのエクソンから成る遺伝子 APOE に  
63 よってエンコードされている (文献 7-8)。マイナーアレル頻度が 1%以上のアミノ酸置  
64 換を伴う 2 ヶ所のミスセンスコモンバリエント rs429358 (T>c) と rs7412 (C>t) の組み  
65 合わせによって、APOE- $\epsilon$ 2 (T-t)、 $\epsilon$ 3 (T-C)、 $\epsilon$ 4 (c-C) の 3 種類のアレルが存在する。  
66 人種によって各アレルの頻度は異なるものの、APOE- $\epsilon$ 3 アレルは最も頻度が高く、野  
67 性型アレルとして中立的な位置付けである (文献 9-10)。次いで頻度が高いのは APOE-  
68  $\epsilon$ 4 アレルである (文献 9-10)。APOE- $\epsilon$ 4 アレルはアルツハイマー病 (AD : Alzheimer's  
69 disease) の発症年齢を若年化させるリスクアレルとしてこれまでに数々の報告 (文献 11)  
70 があり、動脈硬化 (文献 12) や冠状動脈性心疾患 (文献 13) との関連も指摘されてい  
71 る。APOE- $\epsilon$ 2 アレルは最も頻度が低く (文献 9-10)、長寿命との関連を示す (文献 14)  
72 と共に、AD の発症リスクを軽減する効果がある (文献 15)。しかし一方で、脂質異常  
73 症との関連が示唆されており、ホモ接合体に至っては動脈硬化を高頻度に合併する III  
74 型高脂血症を発症するとの報告もある (文献 16)。このように APOE と疾患との関連は  
75 これまで数多く提示され、議論されてきたが、その背景となる分子メカニズムは未だに  
76 十分分かっていない。

77 近年、APOE が家族性 AD の原因遺伝子であるアミロイド前駆体タンパク (APP :  
78 amyloid beta precursor protein) 遺伝子 APP の発現を間接的に制御していることが明らか  
79 にされた (文献 17-18)。図 1 にその細胞内シグナルカスケードの模式図を示す。APOE  
80 はその受容体に結合した後、MAP3K12 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12)、  
81 MAP2K7 (mitogen-activated protein kinase kinase 7)、MAPK1 (mitogen-activated protein  
82 kinase 1)、FOS (Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit) から成る細胞内シグ  
83 ナルカスケードを介して、APP の発現を惹起する。そこで、本研究では APOE 高発現細

84 胞株であるヒト肝癌由来の HepG2 細胞を対象に *APOE* をノックアウト (KO:knockout)  
85 し、RNA シーケンシング (RNA-seq:RNA sequencing) を行った。その RNA-seq データ  
86 を用いて *APOE* と *APP*、及びこれら細胞内シグナル伝達タンパクをエンコードする遺  
87 伝子 (*MAP3K12*、*MAP2K7*、*MAPK1*、*FOS*) の発現量を比較解析した。さらに、*APOE*  
88 を取り巻く遺伝子を同定することを目的として、網羅的な比較解析を行なった。

89

90

## 91 材料と方法

### 92 細胞

93 *APOE* を高発現するヒト肝癌由来細胞株 HepG2 (JCRB 細胞バンク [日本]:cat# JCRB1054)  
94 を本実験に用いた。培地はダルベッコ改変イーグル培地 (サーモフィッシャーサイエン  
95 ティフィック [TFS:Thermo Fisher Scientific]:cat# 11885084) にウシ胎児血清 (ICN:  
96 cat# 29-177-54) を終濃度 10% (v/v) で添加したものを用いた。培養は温度 37°C、CO<sub>2</sub>  
97 濃度 5% に設定した加湿機能付きのインキュベーター内で行った。

98

### 99 *APOE* のノックアウト

100 CRISPR-Cas9 システム (Origene:cat# KN200395) を適用し、HepG2 細胞の *APOE* を KO  
101 した。Cas9 タンパクと標的ガイド RNA (gRNA:guide RNA) を共発現するプラスミド  
102 DNA (PL001 [標的配列:5'-tcaggagactactcgggg-3']) と *APOE* を KO するための tGFP-  
103 Puro カセット (緑色蛍光タンパク [tGFP:turbo Green Fluorescent Protein] と抗生物質ピ  
104 ユーロマイシン [Puro:Puromycin] を発現する) を有するドナープラスミド DNA (PL003)  
105 を、HepG2 細胞に同時にトランスフェクションした。対照として、Cas9 タンパクとス  
106 クランブル gRNA を共発現するプラスミド DNA (PL004 [スクランブル配列:5'-  
107 gcactaccagagtaactca-3']) を PL003 と共にトランスフェクションした。

108 トランスフェクション試薬は JetPRIME (Polyplus-transfection:cat# 101000027)  
109 を用い、付属のマニュアル (CPT114 vK:November 2016) に従って細胞へプラスミド  
110 DNA を導入した。その後、終濃度 2.0 µg/mL (w/v) のピューロマイシン (Sigma-Aldrich:  
111 cat# P8833-25MG) を含有する培地を用いて、薬剤選抜を実施した。ピューロマイシン  
112 耐性を示した細胞集団全体 (バルク) を用いて、以後の実験を行った。細胞株 (導入プ  
113 ラスミド) とサンプル ID の対応、各解析に用いたサンプル数を表 1 にまとめた。

114

### 115 核酸抽出:ゲノム DNA と全 RNA

116 *APOE* KO (サンプル c)、対照 (=スクランブル [サンプル b])、及び、未処理 (=プラス  
117 ミド DNA 未導入 [サンプル a]) の HepG2 細胞株全てを対象に、ゲノム DNA と全 RNA  
118 を抽出した (表 1)。

119 ゲノム DNA に関して、10 cm 培養皿で培養された HepG2 細胞をペレットとし  
120 て回収し、QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen : cat# 51194) を用いて、抽出した。濃  
121 度は分光光度計 Nanodrop One<sup>c</sup> (TFS) により測定した。品質は Agilent 4200 TapeStation  
122 システム (アジレントテクノロジー) で電気泳動し、DIN (DNA integrity number) を算  
123 出することで評価した。DIN は 1 から 10 までのスコアで表され、スコアが高いほど  
124 DNA は分解されておらず、品質が良いことを意味する (1 = 完全に分解、10 = 分解な  
125 し)。

126 全 RNA は、TRIzol Plus RNA Purification Kit (TFS : cat# 12183555) を用いて、  
127 6 穴培養皿で培養された HepG2 細胞から抽出した。濃度測定は Quant-it RiboGreen RNA  
128 Kit (TFS : cat# R11490) を用いた蛍光分析法で実施した。品質は Agilent 4200 TapeStation  
129 システムを用い、RIN<sup>e</sup> (RNA integrity number equivalent) を算出することで評価した。  
130 DIN と同様に RIN<sup>e</sup> も 1 から 10 までのスコアで表される。RNA の分解が少ないほどス  
131 コアは高く、高品質であること意味する (1 = 完全に分解、10 = 分解なし)。

132

### 133 PCR

134 抽出したゲノム DNA を用いて、*APOE* アリルが KO されているかどうかを PCR によっ  
135 て検証した。*APOE* の野性型アリル、KO アリルを検出するためのプライマーセットと  
136 して、それぞれ 1 セット (PCR-a05)、3 セット (PCR-a02、PCR-a06、PCR-a08) を用い  
137 た (表 2)。図 2A に各プライマーセットの増幅領域を示す。PCR 産物の大きさを測定す  
138 るために、Agilent 4200 TapeStation システム (アジレント) を用いた。

139

### 140 RT-qPCR

141 *APOE* KO (n=6)、及び対照 (n=6) の両 HepG2 細胞株を対象に、*APOE* と *APP* の定量  
142 的逆転写 PCR (RT-qPCR : reverse transcription quantitative PCR) を行った。0.5 µg の全  
143 RNA に対して、PrimeScrip 1st strand cDNA Synthesis キット (TaKaRa : cat# 6110A) によ  
144 り逆転写を行い、1 本鎖 cDNA を合成した。逆転写反応液は滅菌蒸留水によって 10 倍  
145 希釈し、TaqMan アッセイ (TFS) による定量的リアルタイム PCR の鋳型 (2.0 µL) と  
146 して使用した。*APOE* の遺伝子発現量を定量するための TaqMan アッセイとして、  
147 Hs00171168 (エクソン 3-4 を検出) と Hs04194724 (エクソン 4 を検出) を用いた。*APP*

148 には Hs00169098 (エクソン 11-12 を検出) と Hs01552282 (エクソン 16-17 を検出) を  
149 用いた。内在性コントロール遺伝子として *GUSB* (glucuronidase beta [Hs99999908]) を  
150 用いた。 $\Delta\Delta$ Ct 法 (文献 19-20) により、対照群に対する KO 群の相対的な遺伝子発現  
151 量を算出し、比較した。

152

### 153 RNA-Seq

154 TruSeq Stranded mRNA Library Prep (Illumina : cat# 20020594) を用いて、0.5  $\mu$ g の全 RNA  
155 から RNA-seq 用 cDNA ライブラリーを調製し、次世代シーケンサー NextSeq 500 (Illumina)  
156 で配列を決定した。長さ 75 bp のペアエンドリードが約 4000 万本得られた。これらの  
157 リードは Salmon (文献 21) を用いてヒト参照配列 (hg38) にマッピングし、DESeq2 (文  
158 献 22) を用いて遺伝子発現変動解析を行った。False Discovery Rate (FDR) 法 (文献 23)  
159 による多重比較補正後の  $P$  値 ( $P_{FDR}$ ) が 0.05 未満を示した遺伝子を統計的に有意とみ  
160 なした。

161

### 162 タンパク抽出とウエスタンブローディング

163 *APOE* KO (n=4)、及び対照 (n=4) の両 HepG2 細胞株から全タンパクを抽出した (表  
164 1)。細胞培養皿で数日間培養した細胞に、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Abcam : cat#  
165 ab201111 [1:200]) を添加した細胞溶解液 (1 $\times$ IP バッファー [終濃度] : 50 $\mu$ M Tris-HCl  $\cdot$   
166 pH7.4、150  $\mu$ M NaCl、0.5% NP-40、0.5% DOC、5mM EDTA) を加え、全て回収した。  
167 16,000 $\times$ g で 5 分間冷却 (4 $^{\circ}$ C) 遠心した後、上澄みを全細胞溶解液 (WCL : whole cell  
168 lysate) として回収し、ウエスタンブローディング (WB : Western blotting) に用いた。

169 得られた WCL に 3 $\times$ サンプルバッファー (終濃度 : 176.5 $\mu$ M Tris-HCl  $\cdot$  pH6.8、  
170 7.1% SDS、35.3% Glycerol、0.12% BPB) と  $\beta$ -メルカプトエタノールを加え、96 $^{\circ}$ C で 3  
171 分間熱変性処理を行った。その後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりタンパ  
172 クを分離し、ポリフッ化ビニリデン膜に転写した。

173 *APOE* を検出するための 1 次抗体として ERP19392 (Abcam : cat# ab183597  
174 [1:5000])、*APP* を検出するための 1 次抗体として A8717 (Sigma-Aldrich [1:5000]) を  
175 用いた。ACTB (actin beta) をローディングコントロールとするために、8H10D10 (Cell  
176 Signaling Technology : cat# 3700 [1:10000]) を 1 次抗体として用いた。

177 2 次抗体は西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP : Horseradish peroxidase) で標識  
178 されたマウス (DAKO : cat# P0447)、あるいはウサギ (DAKO : cat# P0448) の免疫グロ  
179 ブリンを使用した。イモビロンウエスタン化学発光 HRP 基質 (Millipore : cat#

180 WBKLS0500) により可視化し、ImageQuant LAS 800 (GE Healthcare) を用いて半定量解  
181 析を行った。

182

### 183 統計解析

184 *APOE*KO 群と対照群の 2 群間の比較解析には、対応のない *t* 検定を行った。本解析に  
185 は GraphPad Prism ソフトウェアのバージョン 9.0d (GraphPad Software) を用いた。  
186  $P < 0.05$  を統計学的に有意とした (多重比較補正を伴う RNA-seq については上記参  
187 照)。

188

189

### 190 結果

#### 191 *APOE* KO 細胞株の樹立

192 *APOE* 高発現細胞である HepG2 細胞を対象に、CRISPR-Cas9 システムを用いて、*APOE*  
193 KO を試みた。本システムが機能した場合、ドナーベクター (DV: donor vector, PL003)  
194 に由来する tGFP-Puro カセットが *APOE* のイントロン 1 に組み込まれる (図 2-A,B)。  
195 その結果、細胞は tGFP 陽性を示すと共に、ピューロマイシン耐性を獲得する。*APOE* の  
196 両野性型アリルが KO されたホモ接合細胞では、*APOE* の転写産物、タンパクはほぼ完  
197 全に失われると考えられる。ヘテロ接合細胞では、通常の半分量になると推定される。  
198 本実験では細胞のクローニングは行っていない。すなわち、ホモ接合細胞、ヘテロ接合  
199 細胞、さらには DV がホストゲノムにランダムに組み込まれた細胞が混在する状態で、  
200 各種実験を行った。

201       まず、ピューロマイシン耐性細胞株・サンプル c (導入プラスミド DNA: PL001  
202 [*APOE* 標的 gRNA] + PL003 [DV]) において、*APOE* 野性型アリルのゲノム編集が実  
203 際に起こったかどうかを、DNA レベルで検証した (図 2-A,B, 表 1)。その結果、tGFP-  
204 Puro カセットの組み込まれた *APOE* KO アリルを検出することができた (PCR-a02: レ  
205 ーン 10、PCR-a08: レーン 13) (図 2-C)。未処理のサンプル a (導入プラスミド DNA:  
206 なし) と対照のサンプル b (導入プラスミド DNA: PL004 [スクランブル] + PL003 [DV])  
207 では、*APOE* KO アリルを検出することができなかった (PCR-a02: レーン 8/9、PCR-a08:  
208 レーン 11/12) (図 2-C)。

209       次に、RNA レベル (図 3-A)、タンパクレベル (図 3-B,C) で *APOE* KO を評価  
210 した。対照群に比べ、KO 群の *APOE* 遺伝子発現量 (約 4 割減少)、タンパク発現量 (約  
211 7 割減少) は共に有意に低下していることが分かった。



212 以上の結果から、本 CRISPR-Cas9 システムは *APOE* 野性型アリルを標的とし  
213 て機能し、結果として、*APOE* KO 細胞株を樹立することができたと考えられる。

214

#### 215 ***APOE* KO 細胞株における *APP* の発現量解析**

216 *APOE* が細胞内シグナル伝達系を介して、*APP* の遺伝子発現調節に関与することが近年  
217 報告された (文献 17-18)。そこで、*APOE* の KO によって、*APP* の遺伝子発現量、タン  
218 パク発現量が変動するかを調べた。その結果、遺伝子発現量に関して、対照群 (サン  
219 プル b) に比べ KO 群 (サンプル c) で有意な低下を認めた (図 4-A)。タンパク発現量に  
220 ついては統計学的な有意差を認めなかったものの、KO 群で減少する傾向を認めた (図  
221 4-B,C)。

222

#### 223 ***APOE* 関連シグナルカスケードに関与する遺伝子群の遺伝子発現量**

224 ヒト人工多能性幹 (iPS : induced pluripotent stem) 細胞由来の神経細胞では、*APOE* が  
225 *APP* の転写を間接的に調節することが報告された (文献 17-18)。その細胞内シグナルカ  
226 スケードを、関連する分子と共に図 1 に示す。*APOE* KO によって、これらタンパクを  
227 エンコードする遺伝子の発現は影響を受けるのかを明らかにするために、RNA-seq デー  
228 タを用いて、KO 群 (n=6 : サンプル c) と対照群 (n=6 : サンプル b) の遺伝子発現量を  
229 比較した。*APOE* (図 5-A) と *APP* (図 5-B) に関して、上述の RT-qPCR の結果 (*APOE* :  
230 図 3-A、*APP* : 図 4-A) と同様に、KO 群で有意に減少していることを確認した。*APOE*  
231 と *APP* の間にある介在遺伝子群については、*FOS* (図 5-F) でのみ KO 群の有意な減少  
232 を認めた。他の 3 遺伝子については、両群間に有意差を認めなかった (*MAP3K12* : 図 5-  
233 C、*MAP2K7* : 図 5-D、*MAPK1* : 図 5-E)。

234

#### 235 **RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析**

236 *APOE* KO によって、どのような遺伝子の発現が影響を受けるのかを網羅的に  
237 調べるために、RNA-seq 解析を行った。*APOE* KO 細胞株 (サンプル c) の比較対照とし  
238 て、スクランブル gRNA を発現するプラスミド DNA (PL004) が導入された細胞株 (サ  
239 ンプル b) を用いた。平均リード数が 10 以上の遺伝子を「発現遺伝子」と定義した。そ  
240 の結果、解析対象である 35,965 遺伝子のうち、発現遺伝子は 12,729 個であった。この  
241 12,729 遺伝子に対して、KO 群 (n=6) と対照群 (n=6) の遺伝子発現量を比較した。 $P_{FDR}$   
242 が 0.05 未満、0.01 未満、0.001 未満を示した遺伝子は、それぞれ 5,542 個、4,304 個、  
243 3,208 個であった。以後、 $P_{FDR}$  が 0.001 未満を示した 3,208 遺伝子に着目し、解析を進め



244 た。有意差ランキング ( $P_{FDR}$  の低い順) 上位 20 の遺伝子については表 3 に示す。予想  
245 通り *APOE* の遺伝子発現量は KO 群で有意に低下しており (順位 = 11、倍数変化 = -  
246 0.93、 $P_{FDR} = 2.0E-165$ )、TaqMan アッセイを用いた RT-qPCR の結果 (図 3-A) を支持す  
247 る結果となった。上位 20 の中に *APOE* 以外にも脂質代謝に関与する遺伝子を 3 個確認  
248 した (*MIDIIP1* : MID1 interacting protein 1、*ENPP2* : ectonucleotide  
249 pyrophosphatase/phosphodiesterase 2、*FADS2* : fatty acid desaturase 2)。

250 3,208 遺伝子の内訳を調べたところ、対照群に比べ KO 群の発現量が増加して  
251 いた遺伝子は 1,481 個、減少していた遺伝子は 1,727 個であった。KO 群、対照群に加  
252 え未処理群 (サンプル a : n=6) を加えた 3 群に対して、3,208 遺伝子によるクラスター  
253 解析を行なった。その結果、3 群を異なる 3 つのクラスターに分けることができた (図  
254 6)。すなわち、対照群と未処理群は似たような発現変動パターンを示し、同一クラスター  
255 に分類された (クラスター B)。一方、KO 群は対照群・未処理群とは明らかに異なる  
256 発現変動パターンを示し、異なるクラスターに分類された (クラスター A)。

257

258

## 259 考察

260 AD の強力な感受性遺伝子として知られている *APOE* (文献 24-26) が *APP* の転写制御  
261 に関与するとの報告が近年 Huang らによってなされた (文献 17-18)。*APOE* の機能喪失  
262 (KO)、あるいは発現量の低下は *APP* の発現量低下を惹起する可能性が推察される。  
263 そこで、本研究では *APOE* 依存的な *APP* の転写調節を検証する目的で、*APOE* 高発現  
264 細胞であるヒト肝癌由来の HepG2 細胞を対象に、CRISPR-Cas9 システムを用いて *APOE*  
265 KO を試みた。PCR により *APOE* KO アリルを検出し (図 2)、RT-qPCR、WB の両発現  
266 解析を通して *APOE* の遺伝子発現量、タンパク量の低下を認めた (図 3)。このことから、  
267 CRISPR-Cas9 システムにより、*APOE* KO 細胞株 (プール) を樹立したと考えた。

268 本細胞株を用いて *APP* の発現変動を検証した。遺伝子発現量では有意な減少  
269 を認め、タンパク量は統計的な有意差を認めなかったものの減少傾向にあった (図 4)。  
270 Huang らの報告通り、*APOE* は *APP* の遺伝子発現調節に関与することが示唆された。  
271 *APOE* の遺伝子発現量を抑制することで、*APP* の遺伝子発現量は減少し、結果として、  
272 *APP* から切り出されるアミロイドベータタンパク ( $A\beta$  : amyloid beta) の産生が減少す  
273 る可能性がある。今後 *APOE* KO 細胞株の  $A\beta$  を定量することで、*APOE*→*APP*→ $A\beta$  の一  
274 連の流れを検証し、考察することができると考えられる。

275 *APOE* KO によって、一体どのような遺伝子の発現が影響を受けるのかを網羅

276 的に探索するために、RNA-seq を実施した。KO 群 (n=6) と対照群 (n=6) との間で発  
277 現量に有意差を認める遺伝子を複数 ( $P_{FDR} < 0.001$ : 3,028 個) 同定した (図 6, 表 3)。  
278 KO 群では予想通り *APOE* (図 5-A, 表 3) と *APP* (図 5-B) の遺伝子発現量低下を認め  
279 た。さらに、Huang ら (文献 17-18) が報告した細胞内シグナルカスケード (図 1) の一  
280 部の遺伝子についても、その発現変動に有意差を認めた (*FOS*: 図 5-F)。有意差の得ら  
281 れなかった遺伝子 (*MAP3K12*: 図 5-C, *MAP2K7*: 図 5-D, *MAPK1*: 図 5-E) に関しては、  
282 解析対象の細胞が異なることが原因かも知れない。すなわち、細胞の種類によって、  
283 *APOE* から *APP* へ至る経路に関与するタンパクは異なると考えられる。本研究ではヒ  
284 ト肝癌由来の HepG2 細胞、Huang ら (文献 17-18) はヒト iPS 細胞を誘導・分化して作  
285 出した神経細胞をそれぞれ用いている。

286 本研究の限界 (limitation) としては、HepG2 細胞は正常細胞とは核型や性質が  
287 明らかに異なる癌細胞であり、しかも神経系 (ニューロblastomaやグリオーマ) で  
288 はなく肝臓由来の細胞である点を挙げることができる。脳の病気である AD を *APOE* と  
289 の関連で論じるに際し、本研究で得られた結果を適用する場合には、十分な注意を払う  
290 必要がある。今後はヒト剖検脳を対象とした解析を行い、脳内における *APOE* 依存的な  
291 *APP* の遺伝子発現調節メカニズムの解明を目指す。

292

293

## 294 結論

295 *APOE* 高発現細胞である HepG2 細胞の *APOE* を KO した。RNA-seq により有意な発現  
296 変動を示す遺伝子を 3,000 個以上同定した。*APOE* の発現量低下と共に、*APP* の発現量  
297 低下を認めた。従って、既報と同様、*APOE* 依存的な *APP* の遺伝子発現調節メカニズム  
298 は存在すると考えられる。*APOE* から *APP* へ至る細胞内シグナルカスケード関連遺伝  
299 子は細胞ごとに異なると推察されるので、今後、複数の細胞に対して、*APOE* の機能喪  
300 失実験、発現抑制実験を行うことで、細胞種を超えた共通の遺伝子が同定できるものと  
301 期待される。

302

303

## 304 謝辞

305 本研究の御指導を頂いた新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野の池内健先生、宮下哲  
306 典先生、春日健作先生、原範和先生に厚く御礼申し上げます。また、本研究を遂行する  
307 にあたり研究室の皆様にも大変お世話になりました。改めて御礼申し上げます。

308

309

310 文献

- 311 1. Rall SC Jr, Weisgraber KH, Mahley RW: Human apolipoprotein E. The complete amino acid  
312 sequence. *J Biol Chem* **257**:4171-4178, 1982.
- 313 2. Goldstein JL, Brown MS: A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to  
314 statins. *Cell* **161**:161-172, 2015.
- 315 3. Liu CC, Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G: Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk,  
316 mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol* **9**:106-118, 2013.
- 317 4. Kraft HG, Menzel HJ, Hoppichler F, Vogel W, Utermann G: Changes of genetic  
318 apolipoprotein phenotypes caused by liver transplantation. Implications for apolipoprotein  
319 synthesis. *J Clin Invest* **83**:137-142, 1989.
- 320 5. Linton MF, Gish R, Hubl ST, Bütler E, Esquivel C, Bry WI, Boyles JK, Wardell MR, Young  
321 SG: Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation. *J Clin*  
322 *Invest* **88**:270-281, 1991.
- 323 6. Li Z, Shue F, Zhao N, Shinohara M, Bu G: APOE2: protective mechanism and therapeutic  
324 implications for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **15**:63, 2020.
- 325 7. Lusis AJ, Heinzmann C, Sparkes RS, Scott J, Knott TJ, Geller R, Sparkes MC, Mohandas T:  
326 Regional mapping of human chromosome 19: organization of genes for plasma lipid  
327 transport (APOC1, -C2, and -E and LDLR) and the genes C3, PEPD, and GPI. *Proc Natl*  
328 *Acad Sci U S A* **83**:3929-3933, 1986.
- 329 8. Das HK, McPherson J, Bruns GA, Karathanasis SK, Breslow JL: Isolation, characterization,  
330 and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem* **260**:6240-  
331 6247, 1985.
- 332 9. Singh PP, Singh M, Mastana SS: APOE distribution in world populations with new data from  
333 India and the UK. *Ann Hum Biol* **33**:279-308, 2006.
- 334 10. Eisenberg DT, Kuzawa CW, Hayes MG: Worldwide allele frequencies of the human  
335 apolipoprotein E gene: climate, local adaptations, and evolutionary history. *Am J Phys*  
336 *Anthropol* **143**:100-111, 2010.
- 337 11. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses  
338 AD, Haines JL, Pericak-Vance MA: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk  
339 of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**:921-923, 1993.
- 340 12. Hofman A, Ott A, Breteler MM, Bots ML, Slooter AJ, van Harskamp F, van Duijn CN, Van  
341 Broeckhoven C, Grobbee DE: Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia

- 342 and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* **349**:151-154, 1997.
- 343 13. Xu M, Zhao J, Zhang Y, Ma X, Dai Q, Zhi H, Wang B, Wang L: Apolipoprotein E Gene  
344 Variants and Risk of Coronary Heart Disease: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int*  
345 **2016**:3912175, 2016.
- 346 14. Deelen J, Evans DS, Arking DE, Tesi N, Nygaard M, Liu X, Wojczynski MK, Biggs ML,  
347 van der Spek A, Atzmon G, Ware EB, Sarnowski C, Smith AV, Seppälä I, Cordell HJ, Dose  
348 J, Amin N, Arnold AM, Ayers KL, Barzilai N, Becker EJ, Beekman M, Blanché H,  
349 Christensen K, Christiansen L, Collerton JC, Cubaynes S, Cummings SR, Davies K,  
350 Debrabant B, Deleuze JF, Duncan R, Faul JD, Franceschi C, Galan P, Gudnason V, Harris  
351 TB, Huisman M, Hurme MA, Jagger C, Jansen I, Jylhä M, Kähönen M, Karasik D, Kardia  
352 SLR, Kingston A, Kirkwood TBL, Launer LJ, Lehtimäki T, Lieb W, Lyytikäinen LP, Martin-  
353 Ruiz C, Min J, Nebel A, Newman AB, Nie C, Nohr EA, Orwoll ES, Perls TT, Province MA,  
354 Psaty BM, Raitakari OT, Reinders MJT, Robine JM, Rotter JI, Sebastiani P, Smith J,  
355 Sørensen TIA, Taylor KD, Uitterlinden AG, van der Flier W, van der Lee SJ, van Duijn CM,  
356 van Heemst D, Vaupel JW, Weir D, Ye K, Zeng Y, Zheng W, Holstege H, Kiel DP, Lunetta  
357 KL, Slagboom PE, Murabito JM: A meta-analysis of genome-wide association studies  
358 identifies multiple longevity genes. *Nat Commun* **10**:3669, 2019.
- 359 15. Reiman EM, Arboleda-Velasquez JF, Quiroz YT, Huentelman MJ, Beach TG, Caselli RJ,  
360 Chen Y, Su Y, Myers AJ, Hardy J, Paul Vonsattel J, Younkin SG, Bennett DA, De Jager PL,  
361 Larson EB, Crane PK, Keene CD, Kamboh MI, Kofler JK, Duque L, Gilbert JR, Gwirtsman  
362 HE, Buxbaum JD, Dickson DW, Frosch MP, Ghetti BF, Lunetta KL, Wang LS, Hyman BT,  
363 Kukull WA, Foroud T, Haines JL, Mayeux RP, Pericak-Vance MA, Schneider JA,  
364 Trojanowski JQ, Farrer LA, Schellenberg GD, Beecham GW, Montine TJ, Jun GR,  
365 Alzheimer's Disease Genetics Consortium: Exceptionally low likelihood of Alzheimer's  
366 dementia in APOE2 homozygotes from a 5,000-person neuropathological study. *Nat*  
367 *Commun* **11**:667, 2020.
- 368 16. Wardell MR, Brennan SO, Janus ED, Fraser R, Carrell RW: Apolipoprotein E2-Christchurch  
369 (136 Arg → Ser). New variant of human apolipoprotein E in a patient with type III  
370 hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest* **80**:483-490, 1987.
- 371 17. Huang YA, Zhou B, Wernig M, Südhof TC: ApoE2, ApoE3, and ApoE4 Differentially  
372 Stimulate APP Transcription and Aβ Secretion. *Cell* **168**:427-441, 2017.
- 373 18. Huang YA, Zhou B, Nabet AM, Wernig M, Südhof TC: Differential Signaling

- 374 Mediated by ApoE2, ApoE3, and ApoE4 in Human Neurons Parallels Alzheimer's  
375 Disease Risk. *J Neurosci* **39**:7408-7427, 2019.
- 376 19. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time  
377 quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* **25**: 402-408, 2001.
- 378 20. Schmittgen TD, Livak KJ: Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T)  
379 method. *Nat Protoc* **3**: 1101-1108, 2008.
- 380 21. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C: Salmon provides fast and bias-  
381 aware quantification of transcript expression. *Nat Methods* **14**:417-419, 2017.
- 382 22. Love MI, Huber W, Anders S: Moderated estimation of fold change and dispersion  
383 for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**:550, 2014.
- 384 23. Benjamini Y, Hochberg Y: Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful  
385 Approach to Multiple Testing. *J Roy Statist Soc Ser B* **57**: 289–300, 1995.
- 386 24. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-  
387 Vance MA, Risch N, van Duijn CM: Effects of age, sex, and ethnicity on the association  
388 between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and  
389 Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* **278**:1349-1356, 1997.
- 390 25. Rubinsztein DC, Easton DF: Apolipoprotein E genetic variation and Alzheimer's disease. a  
391 meta-analysis. *Dement Geriatr Cogn Disord* **10**:199-209, 1999.
- 392 26. Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE: Systematic meta-analyses of  
393 Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet* **39**:17-23,  
394 2007.

395 図の説明文

396 図 1 : APOE による APP の遺伝子発現調節機構

397 ヒト人工多能性幹細胞由来の神経細胞において、APOE は細胞表面の APOE 受容体に結  
398 合し、DLK/MAP シグナルカスケードを介して、cFOS をリン酸化する。リン酸化され  
399 た cFOS は、APP のプロモーター領域にある AP-1 転写因子結合配列に結合し、APP の  
400 転写を惹起する。本研究では、RNA-seq によって得られた APOE、APP、MAP3K12(=DLK)、  
401 MAP2K7(=MKK7)、MAPK1(=ERK/MAPK)、FOS(=cFOS) の各遺伝子の発現量を、APOE  
402 KO 群 (n=6) と対照群 (スクランブル : n=6) で比較した。結果は図 5 に示す。なお、  
403 本図は Huang らの報告 (文献 17) を元に作成した。

404 APOE, apolipoprotein E ; DLK, dual leucine zipper kinase ; MAP3K12, mitogen-activated protein  
405 kinase kinase kinase 12 ; MKK7, mitogen-activated protein kinase kinase 7 ; MAP2K7, mitogen-  
406 activated protein kinase kinase 7 ; ERK, extracellular signal-regulated kinase ; MAPK, mitogen-  
407 activated protein kinase 1 ; cFOS, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit ; APP,  
408 amyloid beta precursor protein ; P, phosphate group ; AP-1, activator protein 1。

409

410 図 2 : CRISPR-Cas9 システムによる APOE KO

411 A : APOE の野性型アレルとノックアウト (KO : knockout) アレル、及び、tGFP-Puro カ  
412 セットを有するドナーベクター (DV : donor vector)。ガイド RNA の標的部位 (\*) は  
413 イントロン 1 に位置し、そこに相同配列を有する DV の tGFP-Puro カセットが組み込ま  
414 れる。APOE の野性型アレル (PCR-a05)、KO アレル (PCR-a08、PCR-a02)、及び DV  
415 (PCR-a06) を検出するために、4 種類の PCR セットを準備した。

416 B : ガイド RNA 標的領域の塩基配列。A のアスタリスク (\*) に相当する。プラスミド  
417 DNA 「PL001」には「5'-tcaggagagctactcgggggt-3'」の DNA 配列が組み込まれている。PAM  
418 配列 (5'-cgg-3') 上流の Cas9 タンパクで切断される部位を灰色の矢頭で示す。

419 C : 4 種類の PCR セットによる HepG2 細胞株の評価。レーン 1 にはサイズスタンダー  
420 ド、レーン 2 からレーン 13 には各 HepG2 細胞株 (サンプル a~c : 表 1) の PCR 産物  
421 が電気泳動されている。PCR-a05 セットでは 249 bp、PCR-a06 セットでは 513 bp、PCR-  
422 a02 セットでは 674 bp、PCR-a08 セットでは 654 bp の PCR 産物がそれぞれ検出される。  
423 PL001 (Cas9 タンパクと APOE を標的とするガイド RNA を共発現するプラスミド DNA)  
424 と PL003 (tGFP-Puro カセットを有する DV) をトランスフェクションされた細胞株 (サ  
425 ンプル c : KO 細胞株) でのみ、PCR-a02 と PCR-a08 の増幅バンドが検出され、想定通  
426 り APOE の野性型アレルに tGFP-Puro カセットが組み込まれたことが分かる。KO 細胞

427 株 (サンプル c) はクローニングされていないので、*APOE* KO アリルのヘテロ接合体や  
428 ホモ接合体の細胞、さらには PL003 (DV) が宿主ゲノムにランダムに挿入され、ピ  
429 ューロマイシン耐性を獲得した細胞が混在している。従って、野性型アリルを検出する  
430 ための PCR-a05 セットでも増幅バンドを認める。

431 Ex, エクソン ; HR, 相同領域 (homologous region) ; PGK, *PGKI* (phosphoglycerate kinase  
432 1) プロモーター ; pA, ポリ A 付加シグナル ; PAM, プロトSpacer隣接モチーフ  
433 (protospacer adjacent motif)。

434

### 435 図 3 : *APOE* KO 細胞株の評価

436 A : *APOE* の遺伝子発現量を対照群 (スクランブル : n=6) と KO 群 (n=6) で比較した。  
437 2 種類の TaqMan アッセイ 「Hs00171168」 (エクソン 3-4 を検出) と 「Hs04194724」 (エ  
438 クソン 4 を検出) を用いて、*APOE* の遺伝子発現量をリアルタイム PCR で定量した。  
439 内在性コントロール遺伝子として *GUSB* を用い、*APOE* の遺伝子発現量を補正した。対  
440 照群に比べ、KO 群の *APOE* 遺伝子発現量は有意に低下していた。

441 B : *APOE* のタンパク発現量を対照群 (スクランブル : n=4) と KO 群 (n=4) とで比較  
442 するために、WB を行った。内在性コントロールタンパクとして、ACTB を定量し、補  
443 正に用いた。

444 C : B の WB で検出されたバンドを定量し、比較した。KO 群の *APOE* タンパク量は、  
445 対照群に比べ、有意に低下していた。

446 対応のない *t* 検定 : \*\*,  $P < 0.01$  ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$

447

### 448 図 4 : *APOE* KO 細胞株における *APP* の評価

449 A : *APOE* KO 群 (n=6) と対照群 (スクランブル : n=6) の間で、*APP* の遺伝子発現量  
450 を比較した。2 種類の TaqMan アッセイ 「Hs00169098」 (エクソン 11-12 を検出) と  
451 「Hs01552282」 (エクソン 16-17 を検出) を用いて、リアルタイム PCR を行い、*APP* の  
452 遺伝子発現量を定量した。内在性コントロール遺伝子として、*GUSB* を用いた。対照群  
453 に比べ、*APOE* KO 群では *APP* の遺伝子発現量が有意に低下していることが分かった。

454 B : *APP* のタンパク発現量を、対照群 (スクランブル : n=4) と *APOE* KO 群 (n=4) と  
455 で比較するために、WB を行った。ACTB を内在性コントロールタンパクとして定量し、  
456 補正に用いた。

457 C : B の WB で検出されたバンドを定量し、比較した。統計的な有意差は認められな  
458 かったものの、*APOE* KO 群の *APP* タンパク量は、対照群に比べ、減少する傾向が認めら



459 れた。  
460 ns, not significant.  
461 対応のない  $t$  検定：\*,  $P < 0.05$ ；\*\*,  $P < 0.01$ 。

462

463 **図 5：APOE 関連シグナルカスケードに関与する遺伝子群の遺伝子発現量**

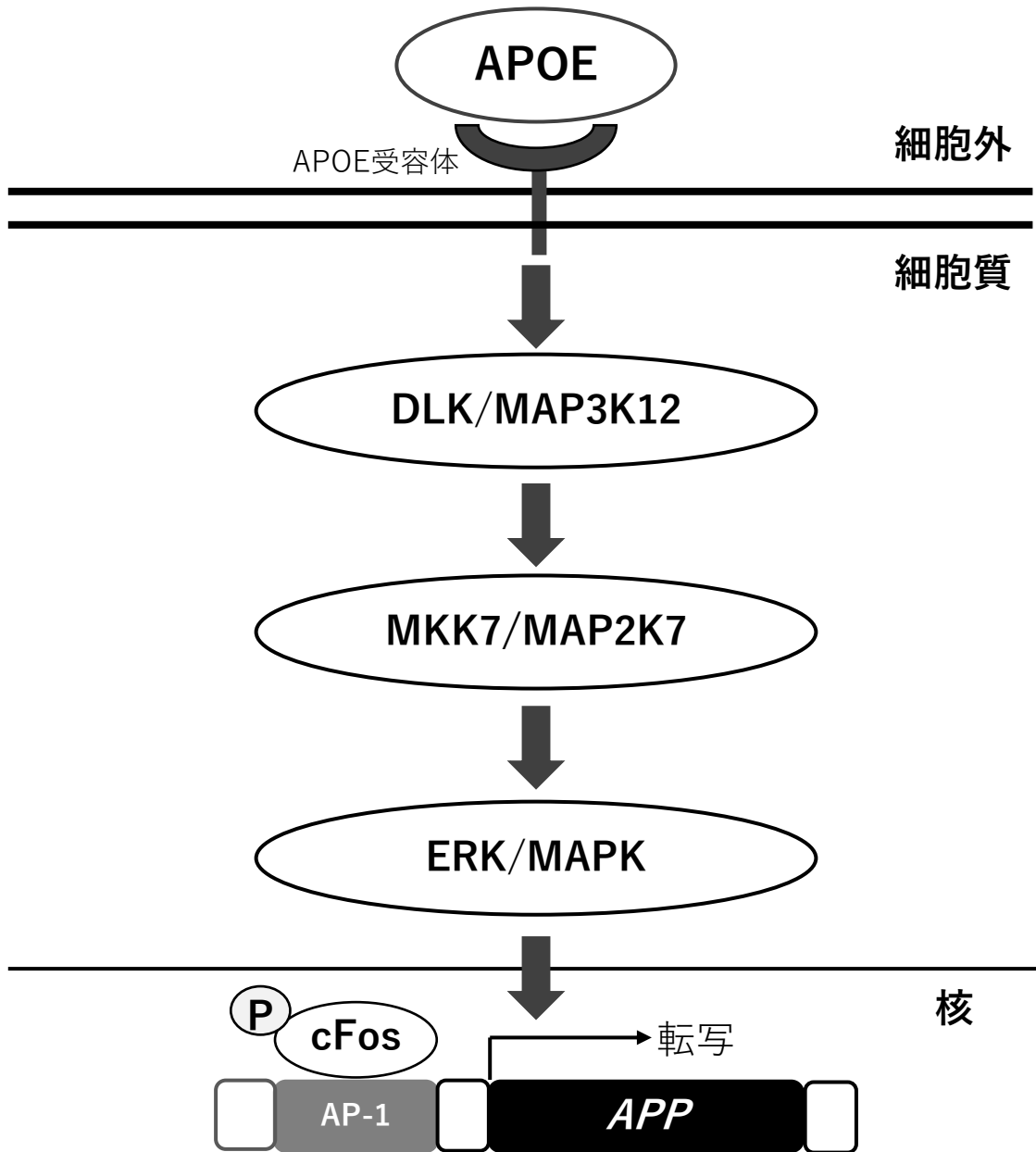
464 RNA-seq で得られた *APOE* (A)、*APP* (B)、*MAP3K12* (C)、*MAP2K7* (D)、*MAPK1* (E)、  
465 *FOS* (F) の遺伝子発現量を、*APOE*KO 群 (n=6) と対照群 (スクランブル：n=6) との  
466 間で比較した。*APOE*KO に伴って有意な発現変動を示した遺伝子は、*APOE* (A) の他  
467 に、*APP* (B) と *FOS* (F) であった。いずれも、対照群と比較して減少していた。一方、  
468 有意に上昇する遺伝子は認められなかった。

469 ns, not significant.  
470 対応のない  $t$  検定：\*,  $P < 0.05$ ；\*\*,  $P < 0.01$ 。

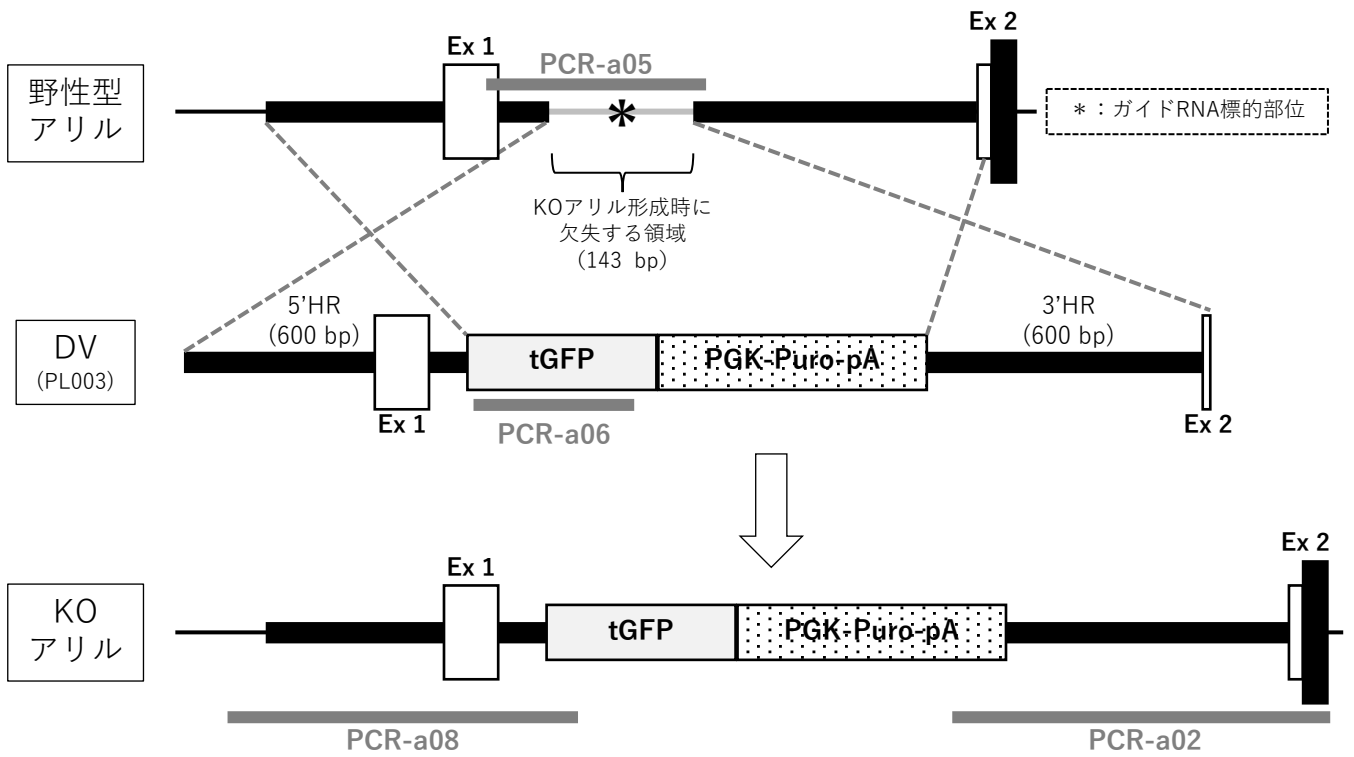
471

472 **図 6：RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析**

473 *APOE*KO 群 (n=6) と対照群 (スクランブル：n=6) との比較で得られた有意な 3,208 遺  
474 伝子 ( $P_{\text{FDR}} < 0.001$ ) を用いて、KO 群、対照群、未処理群 (プラスミド未導入：n=6) の  
475 クラスタ解析を行った。3群がそれぞれグループ化され、選別されているのが分かる。  
476 また、対照群と未処理群は比較的同じような遺伝子発現パターンを示し (クラスタ-B)、  
477 KO 群 (クラスタ-A) とは明らかに異なることが分かる。



A



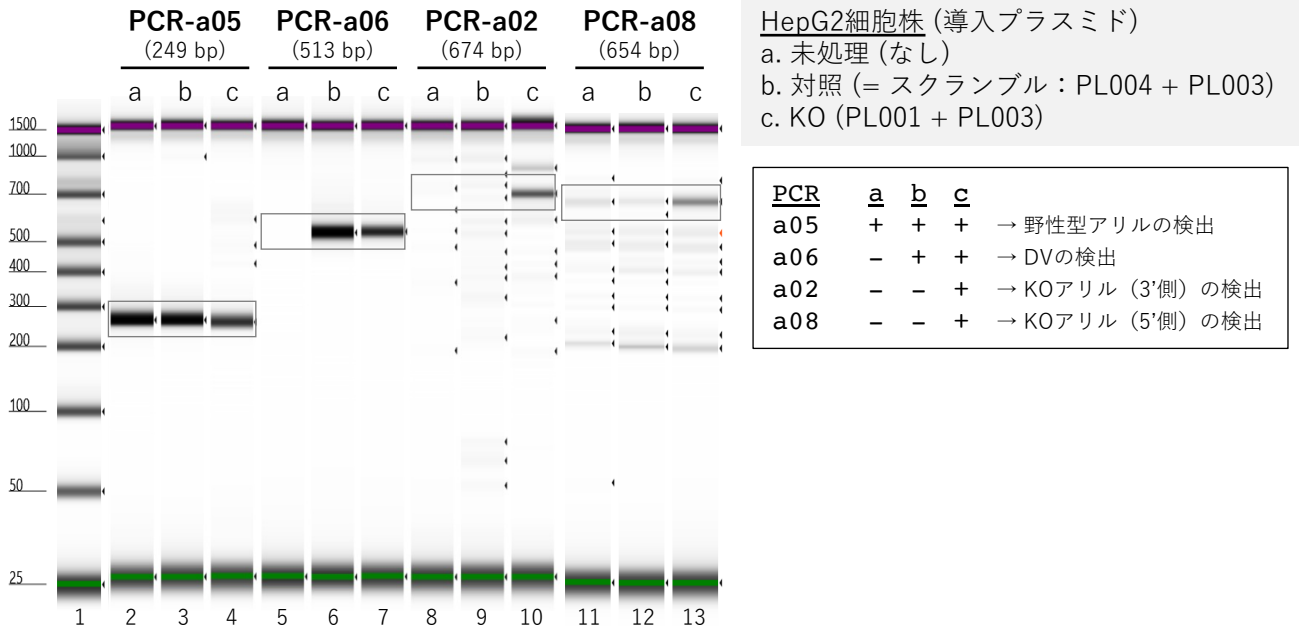
B

PL001 PAM

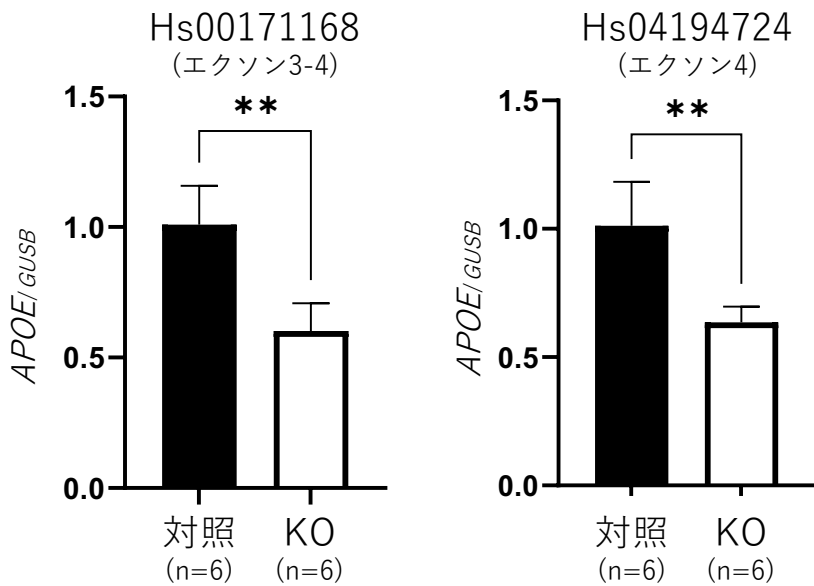
5' -ggcctccaggtagtctcaggagagctactcggggtcgggcttggggagaggag-3'

3' -ccggaggtccatcagagtcctctcgatgagccccagcccgaaccctctctc-5'

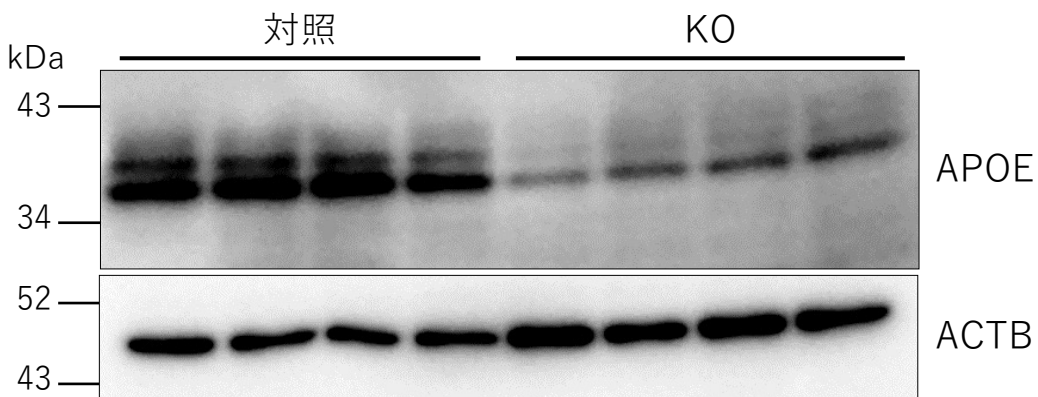
C



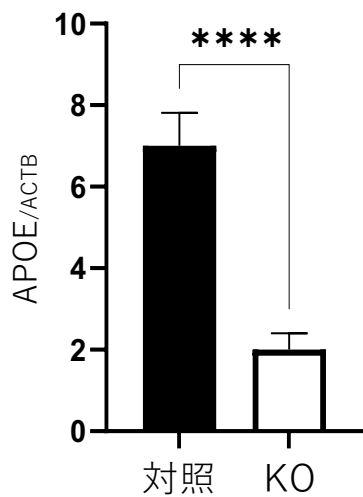
A



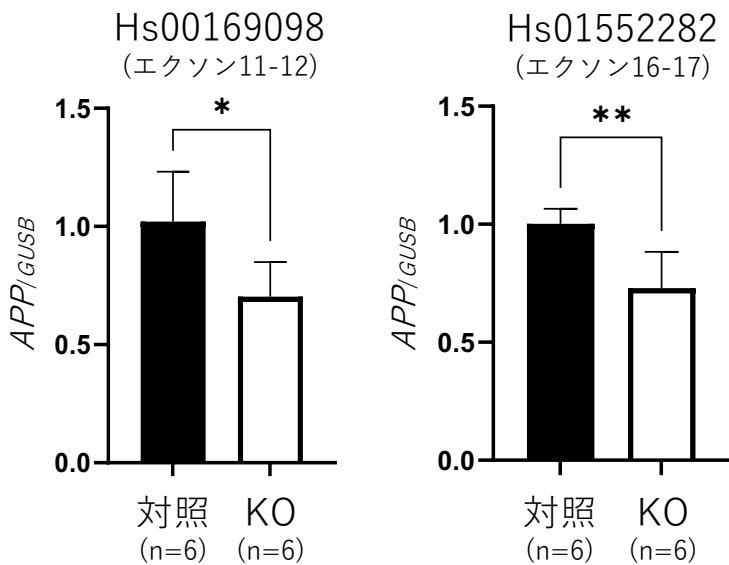
B



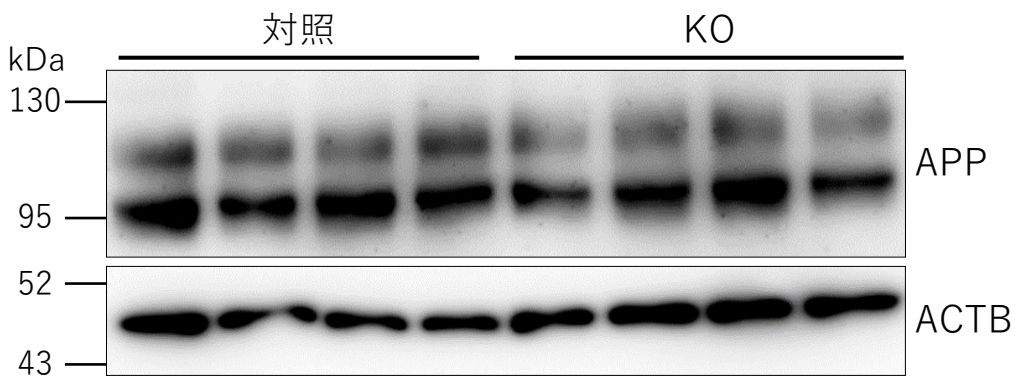
C



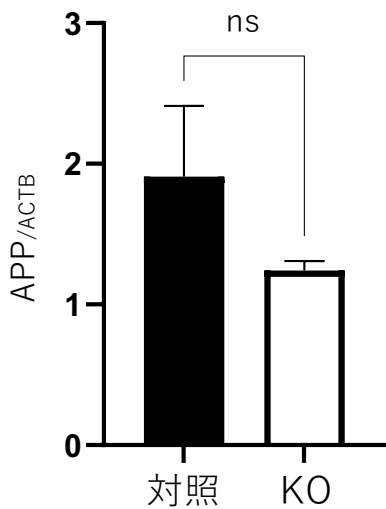
A



B



C



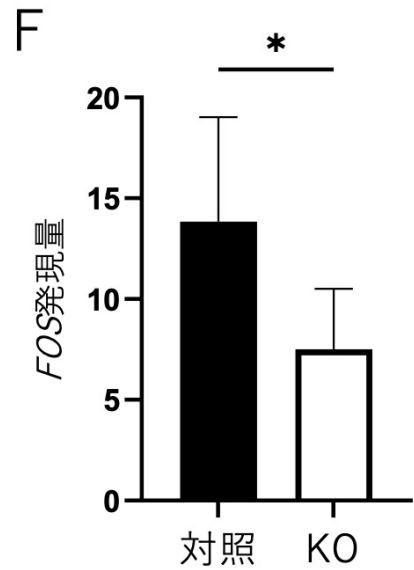
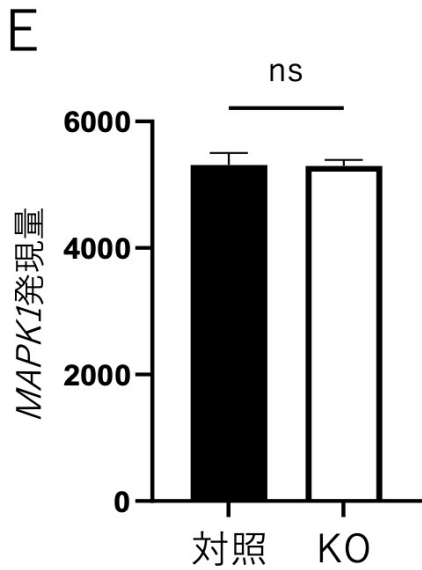
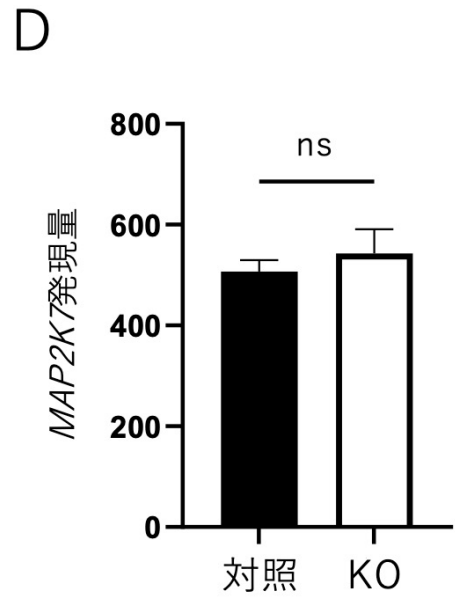
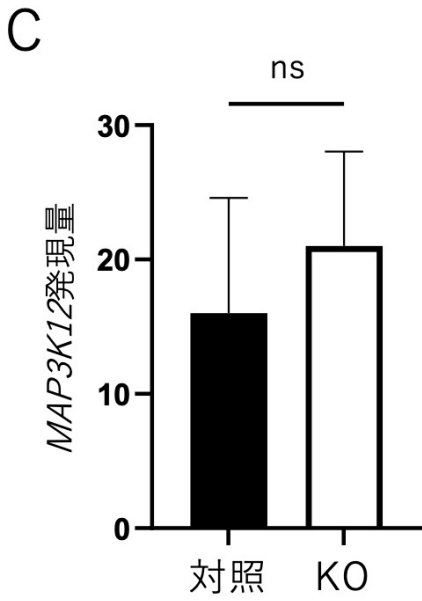
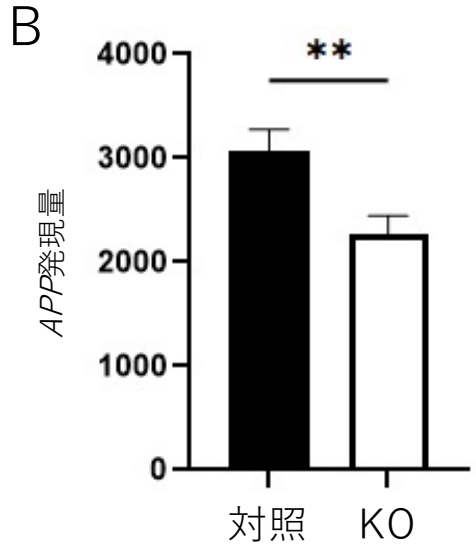
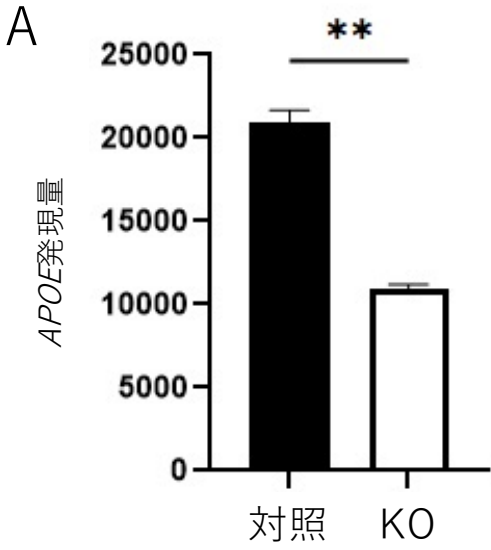


図6

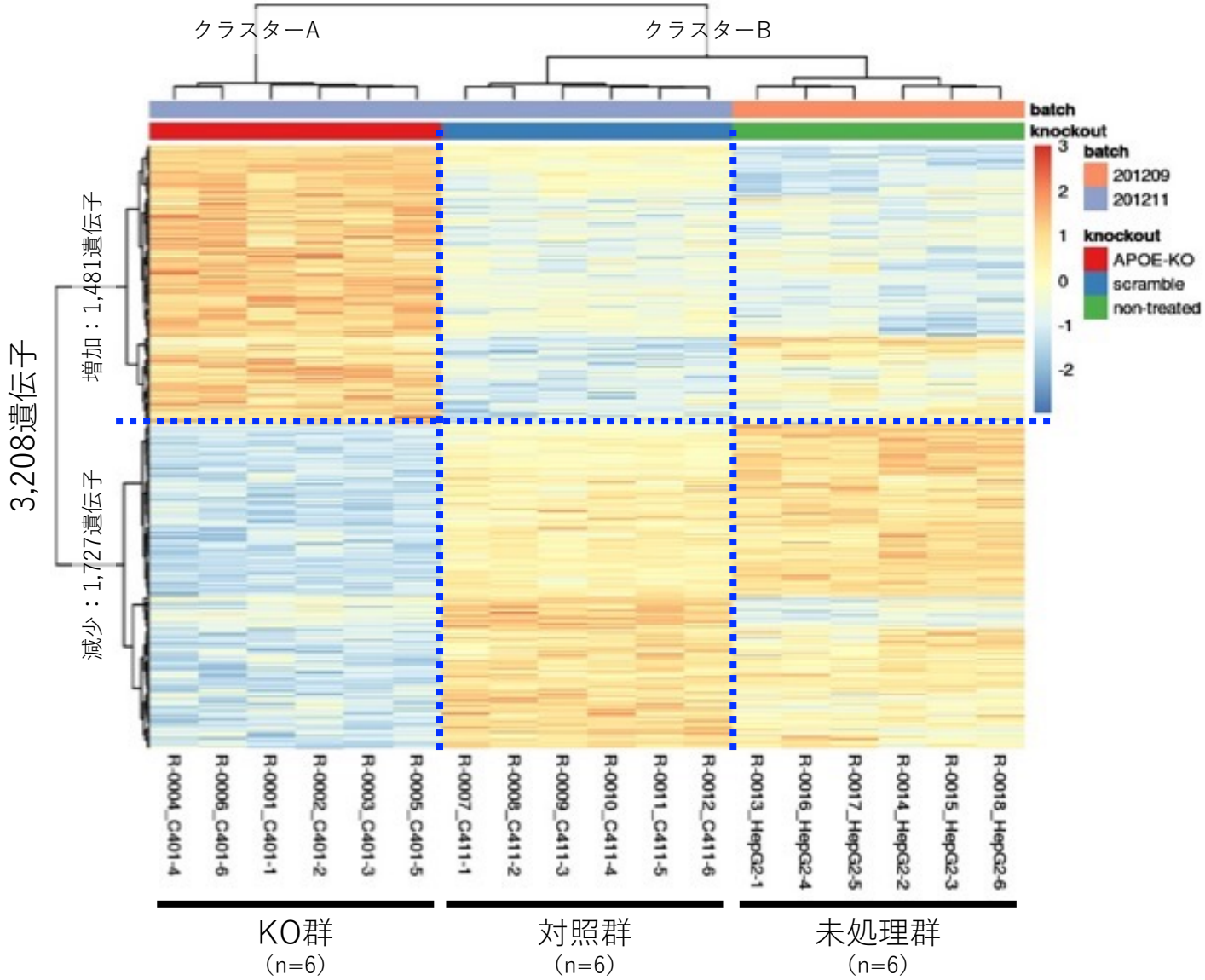




表1. 解析に用いた細胞株

細胞株	導入プラスミドDNA		→	サンプルID	→	解析に用いたサンプル数			
	gRNA+Cas9	tGFP+Puro				DNA (PCR)	RNA		タンパク (WB)
							RT-qPCR	RNA-seq	
未処理	-	-	→	a	→	1	-	6	-
対照	PL004 <sup>†</sup>	PL003	→	b	→	1	6	6	4
KO	PL001 <sup>#</sup>	PL003	→	c	→	1	6	6	4

<sup>†</sup>, スクランブル配列を有するgRNAを発現する

<sup>#</sup>, *APOE*のイントロン1を標的とするgRNAを発現する

表2. APOE野性型アリのKOを評価するためのPCRプライマーセット

標的アリル	検出領域	プライマーセット <sup>†</sup> (Taq)	プライマー名	鎖	配列 (5'-3')	増幅サイズ (bp)
野性型	イントロン1	PCR-a05 (Ampli)	1232-APOE-WT-F-3	センス	CCAGGAGCCGGTGAGAAG	249
			1233-APOE-WT-R-3	アンチセンス	GCTTACATCCCAGTCCAGCT	
KO	DV-tGFP	PCR-a06 (Ampli)	1234-APOE-DV-tGFP-F-1	センス	CCGCATGACCAACAAGATGA	513
			1235-APOE-DV-tGFP-R-1	アンチセンス	TTGCTGTGATCCTCCTCCAC	
	DV-5'	PCR-a08 (LA)	1262-APOE-KO-F-3	センス	CACGCCTGGCTAACTTTTGT	654
			1263-APOE-KO-R-3	アンチセンス	GCTCTCGTCGCTCTCCAT	
DV-3'	PCR-a02 (LA)	1226-APOE-KO-F-2	センス	AAGAGGTTCACTAGGCGCG	674	
		1227-APOE-KO-R-2	アンチセンス	CCAGGAATGTGACCAGCAAC		

<sup>†</sup>, いずれの反応もアニーリング温度は62°C、サイクル数は33サイクル

DV, ドナーベクター (donor vector); tGFP, ターボ緑色蛍光タンパク (turbo Green Fluorescent Protein) ; 5', DVの5'領域; 3', DVの3'領域; Taq, Taqポリメラーゼ; Ampli, AmpliTaq Gold 360 master mix (TFS, cat# 4398876); LA, LA Taq Hot Start Version (TaKaRa, cat# RR042A)

表3. RNA-seq解析によって有意差を認めたトップ20遺伝子

遺伝子		染色体	遺伝子発現量 (標準化済み)	倍数変化 <sup>†</sup>	P		
シンボル	名称				未補正	補正済み <sup>§</sup>	
1	<i>CYP24A1</i>	cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1	20	570	-3.07	0.0E+00	0.0E+00
2	<i>TSPAN7</i>	tetraspanin 7	X	556	-3.27	0.0E+00	0.0E+00
3	<i>GPC3</i>	glypican 3	X	37,046	-0.73	1.9E-290	8.2E-287
4	<i>DEPP1</i>	DEPP1 autophagy regulator	10	3,077	-1.37	1.8E-259	5.7E-256
5	<i>FADS2</i> <sup>%</sup>	fatty acid desaturase 2	11	1,219	4.63	1.1E-237	2.7E-234
6	<i>BEX1</i>	brain expressed X-linked 1	X	348	2.31	4.2E-232	8.9E-229
7	<i>ENPP2</i> <sup>%</sup>	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	8	572	1.90	1.0E-230	1.9E-227
8	<i>PLP1</i>	proteolipid protein 1	X	484	2.09	7.8E-219	1.2E-215
9	<i>FKBP11</i>	FKBP prolyl isomerase 11	12	633	-1.81	6.2E-201	8.8E-198
10	<i>TMEM45B</i>	transmembrane protein 45B	11	703	-2.15	2.0E-175	2.5E-172
11	<b><i>APOE</i><sup>#</sup></b>	apolipoprotein E	<b>19</b>	<b>17,040</b>	<b>-0.93</b>	<b>1.7E-168</b>	<b>2.0E-165</b>
12	<i>MEP1A</i>	mepirin A subunit alpha	6	592	-2.86	2.0E-165	2.1E-162
13	<i>IER3</i>	immediate early response 3	6	1,019	-1.06	4.7E-161	4.6E-158
14	<i>AKAP12</i>	A-kinase anchoring protein 12	6	1,375	-1.68	3.2E-159	2.9E-156
15	<i>SUSD2</i>	sushi domain containing 2	22	912	-1.76	1.1E-155	9.3E-153
16	<i>MID1IP1</i> <sup>%</sup>	MID1 interacting protein 1	X	222	-3.11	1.3E-152	1.1E-149
17	<i>IMPDH2</i>	inosine monophosphate dehydrogenase 2	3	2,140	1.04	3.5E-152	2.7E-149
18	<i>ITPR3</i>	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	6	499	-2.13	4.9E-143	3.5E-140
19	<i>SQOR</i>	sulfide quinone oxidoreductase	15	233	-2.87	4.4E-137	3.0E-134
20	<i>OSMR</i>	oncostatin M receptor	5	2,601	-0.85	4.1E-136	2.6E-133

<sup>†</sup>, 対照群に対するKO群の遺伝子発現量の倍数を算出。Log<sub>2</sub>変換済み

<sup>§</sup>, FDR法 (文献23) によって多重比較補正を行ったP値

<sup>#</sup>, KO対象となったAPOEは太字で強調

<sup>%</sup>, 脂質代謝関連遺伝子