

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 LIU Lixin
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1048 号
学位授与の日付 令和 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 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 関連シグナル伝達カスケードの解析

論文審査委員 主査 教授 島田 斉
副査 教授 笹岡 俊邦
副査 准教授 杉江 淳

博士論文の要旨

背景と目的 :

アポリポタンパク E (APOE) は脂質代謝に関与する。脂質と結合してリポタンパクを形成し、血中を流れ、細胞表面の APOE 受容体を介して細胞内へ取り込まれる。APOE をエンコードする遺伝子 APOE に認められるコモン (マイナーアレル頻度 [MAF] が 1%以上)、あるいはレア (MAF が 1%未満) なミスセンスバリエーションは、APOE の機能変化をもたらす、脂質異常症やアルツハイマー病 (AD) などの疾患感受性を左右する。また、ヒト人工多能性幹細胞由来の神経細胞において、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遺伝子 APP の遺伝子発現を、細胞内シグナル伝達タンパクを介して、制御することが近年報告された。そこで、申請者は APOE の関与する分子メカニズムを解明することを目的として、APOE 高発現細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) し、RNA シーケンシング (RNA-seq) を行った。その RNA-seq データを用いて 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伝子 (MAP3K12、MAP2K7、MAPK1、FOS) の発現量を比較した。APOE と連動して発現変動する遺伝子を同定するために、網羅的な比較解析も行なった。

方法 :

CRISPR-Cas9 システムより HepG2 細胞の APOE KO を試みた。その成否を判定するために、ゲノム DNA、全 RNA、全細胞溶解液を抽出し、様々な解析を行なった。具体的には、PCR によって APOE KO アレルの検出を試みた。定量的逆転写 PCR とウェスタンブロッティングによって APOE の遺伝子発現量とタンパク量を測定した。さらに、APOE KO の影響を網羅的に調べるために、RNA-seq を実施し、発現変動遺伝子を選抜した。APOE から APP へ至る細胞内シグナル伝達に関与する遺伝子 (上述) の発現量を RNA-seq データから抽出し、解析した。

結果 :

1) APOE KO 細胞株の樹立 : APOE KO 細胞株から抽出したゲノム DNA に対する PCR によって、APOE KO アレルの増幅を認めた。次に、RNA レベル、タンパクレベルで APOE KO を評価した。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 7 割減少) は共に有意に低下していることが分かった。以

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

2) APOE KO 細胞株における APP の発現量解析：APOE の KO によって、APP の遺伝子発現量、タンパク発現量が変動するかを調べた。遺伝子発現量に関して、対照群に比べ KO 群で有意な低下を認めた。タンパク発現量に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。

3) 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：APOE KO によって、APOE 関連シグナル伝達に関与するタンパクをエンコードする遺伝子（「背景と目的」の項を参照）の発現は影響を受けるのかを明らかにするために、RNA-seq データを用いて、KO 群と対照群の遺伝子発現量を比較した。KO 群では APOE、APP に加え、FOS の遺伝子発現量が有意に低下していることが分かった。

4) RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析：35,965 個の RNA-seq 解析対象遺伝子のうち、多重比較補正 (FDR) をクリアして有意となった遺伝子は 3,208 個であった (PFDR<0.001)。その上位 20 遺伝子の中に 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 (MID1IP1、ENPP2、FADS2)。

考察：

APOE KO 細胞株を用いて、APP の発現変動を精査した。遺伝子発現量では有意な減少を認めた。タンパク量は統計学的な有意差を認めなかったものの減少傾向にあった。既報通り APOE は APP の遺伝子発現調節に関与することが示唆された。APOE の遺伝子発現量を抑制することで、APP の遺伝子発現量が減少し、結果として、APP から切り出されるアミロイドベータタンパク (A \cdot) の産生を減少させる可能性がある。今後は A \cdot の発現量を定量し、APOE \rightarrow APP \rightarrow A \cdot の流れを詳細に検証する必要がある。

結論：

APOE 高発現細胞である HepG2 細胞において、APOE を KO した。APOE の発現量低下と共に、APP の発現量低下を認めた。APOE 依存的な APP の遺伝子発現調節機構は存在するものと推察される。

審査結果の要旨

申請者は、その機能変化がアルツハイマー病などの疾患感受性を左右するアポリポタンパク E (APOE) のアミロイド前駆体タンパク遺伝子 APP の遺伝子発現に関与する分子メカニズムを解明することを目的とした一連の基礎的検討を行った。①APOE 高発現細胞株であるヒト肝癌由来の HepG2 細胞を用いて APOE ノックアウト (KO) 細胞株を樹立し、②・③RNA シーケンシング (RNA-seq) で APP (②)、APOE およ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伝子 (③) の発現量が、対照群に比べ KO 群で有意に低下していることを示し、さらに④RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析で、その発現が有意に影響を受ける遺伝子の上位 20 遺伝子の中に、APOE および APOE 以外の脂質代謝関連遺伝子 3 個が含まれることなどを示した。

本研究は APOE 依存的な APP の遺伝子発現調節機構の存在を示唆するものであり、アルツハイマー病の病態解明ならびに治療・予防戦略の確立に寄与する意義深い研究である。よって博士論文として価値あるものと認められる。