

老化制御転写因子 Foxo3 とパーキンソン病病因遺伝子 alpha-synuclein を用いた新たな
レビー小体病モデルの作成に関する研究（24-15）

主任研究者 南山 誠 国立長寿医療研究センター 加齢健康脳科学研究部
(病態制御研究室長)

研究要旨

3年間全体について

レビー小体病(Lewy body disease (LBD))の病因解明と治療法開発のためには疾患モデルが必要であるが、神経変性の重要な因子である老化を加味したモデルがこれまでになく、より疾患に忠実なモデル作成のため細胞とマウスのレベルでの検討を行ってきた。孤発性および一部の遺伝性パーキンソン病(PD)の関連遺伝子である α -synuclein (α -syn)の発現をベースに、長寿関連遺伝子 FOXO3 の発現低下を two-hit とした LBD モデルとしての妥当性を問うものである。モデル細胞として α -syn を強制発現させた SH-SY5Y (SH-syn)を用いて FOXO3 を RNAi にて発現低下させたときの細胞レベルでの影響を検討した。FOXO3 の発現低下により細胞活性の低下と細胞毒性の増悪が見られ、SH-syn は対照の細胞と比較し FOXO3 の発現低下に脆弱であることが示された。この FOXO3 の発現低下による細胞障害の機序について探索を行ったところ、オートファジーの機能低下と酸化ストレスの上昇が要因になっていることが判明した。 α -syn の強発現系マウスと Foxo3 ノックアウトマウスの交配により α -syn 強発現、Foxo3 ノックアウトのマウスを作出し本マウスが LBD モデルマウスとしての妥当性を検討するため表現型を評価したところ、学習記憶障害と運動障害を有することが示唆され LBD モデルとしての妥当なマウスを作出できた可能性がある。

平成26年度について

FOXO3 の機能低下による細胞障害の機序について SH-syn のモデル細胞を用いてさらに探索し、オートファジーの機能低下に p62 の発現低下が関与していることが判明した。また、酸化ストレスについても検討したところ、FOXO3 の発現低下によりグルタチオンの酸化比率の上昇を確認したが、MnSOD やニトロチロシンの関与は認められなかった。

上述の如く α -syn 強発現、Foxo3 ノックアウトの各マウスの交配による新たな LBD モデルを作成し、表現型の評価を行った。学習記憶障害を示唆する所見が得られ運動機能の拙劣さも示唆された。

主任研究者

南山 誠 国立長寿医療研究センター 加齢健康脳科学研究部 (病態制御研究室長)

分担研究者

なし

A. 研究目的

LBD はアルツハイマー病に次ぐ認知症を伴う神経変性疾患である。LBD のうち、PD を代表として神経伝達の改善を図ることで症状の緩和が図れるようになってきているが神経細胞の変性および死を抑止することは他の神経変性疾患と同様に依然できていない。今までにいくつかの LBD モデルが開発されてきたが、これらは神経毒物の投与や病因遺伝子の改変導入によるもので、LBD の大きな病因であるはずの加齢を加味したものはまだ存在しない。そこで、孤発性 PD の発症リスクに関与することが報告され、LBD の病理学的特徴であるレビー小体の主要成分でもある α -syn の発現をベースに、老化関連遺伝子 FOXO3 の発現低下を two-hit として加味した LBD モデルの妥当性を評価するものである。

B. 研究方法

3年間全体について

主に最初の2年間は、加齢を考慮した新たな LBD モデルマウス作成のための基礎となる細胞実験を行ってきた。LBD 関連遺伝子である α -syn をヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y に定常発現させた細胞 (SH-syn) を LBD モデル細胞とし、RNAi 技術を用いて老化/ストレス関連転写因子である FOXO3 をノックアウトしたときの生化学的、病理形態学的変化について、LDH assay、Cell viability assay、ウエスタンブロッティング、RT-PCR、免疫細胞化学などを用いて解析を行った。

3年間の後半は、モデルマウス作成のための α -syn 強発現 (トランスジェニック) マウスを購入し、当施設所有の Foxo3 ノックアウトマウスとの交配、選別を行い、目的とするマウス (α -syn トランスジェニック、Foxo3 ノックアウト) を作出した。本マウスを LBD モデルマウスとし、Wild type、Foxo3 ノックアウト、 α -syn トランスジェニックの3系統と表現型の比較を行った。表現型として、体重、rotarod、pole test を用いて評価した。

さらに、上記の SH-syn を用い、オリジナルな発想による化合物の治療薬スクリーニングを LDH assay と Cell viability assay と cell カウントを用いて行った。

平成26年度について

上述の如く、LBDモデル細胞である SH-syn が FOXO3 の機能低下をきたした時の毒性機序についてさらに深く検討を行った。昨年度までに判明したオートファジーの関与にさらなる関連物質の関与がないかをウエスタンブロッティング、RNAi、RT-PCR などを用いた。また、酸化ストレスの関与についてグルタチオン以外の関連物質について同様の手法を用いて探索を行った。また、LBDモデルマウスの作出に PCR を用いた genotyping を行い量産させ、表現型の評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究課題には利益相反の問題はない。

遺伝子組換え実験については当施設の遺伝子組換え実験安全委員会の許認可のもとに実験安全性の配慮を行った。

動物を使った実験系については当施設の動物実験倫理委員会、実験動物委員会の許認可のもとに動物愛護上の配慮を行った。

C. 研究結果

3年間全体について

LBDモデル細胞を用いた FOXO3 の病態機構解析

SH-syn の FOXO3 を siRNA にてノックダウンを行うと、cell viability の低下、LDH release の上昇が見られ、対照の mock 細胞と比較し脆弱であることが示された。FOXO3 のノックダウンによる細胞障害の機序について周辺のパスウェイを探索したところ、オートファジーの機能低下が一つの要因となっていることが判明した。LC3-II の発現低下が確認されたとともに、p62 の発現が低下することも確認された。また、細胞障害の機序として酸化ストレスにも注目した。グルタチオンアッセイにより還元型グルタチオンの比率が低下していることがわかり、酸化ストレス上昇が示唆された。しかし、MnSOD やニトロクロシンについても評価を行ったが、FOXO3 の機能低下においてその発現量に差は見られなかった。

加齢を考慮した新たな LBD モデルマウス作成

α -syn トランスジェニックマウスと Foxo3 ノックアウトマウスとの交配により α syn トランスジェニック、Foxo3 ノックアウトのマウスを得ることができた。本マウスを LBD モデルマウスとし、その表現型の評価を行ったところ、LBD モデルは運動機能検査を習得することが拙劣で記憶学習障害を呈していることが示唆された。また、pole test の結果から、

LBDモデルおよびFoxo3ノックアウトマウスではturnが拙劣である傾向が得られている。Pole testにおけるturnはマウスにおけるPDの運動機能障害の評価に近いものと考えられており、本LBDモデルマウスは記憶学習障害と運動機能障害を併せて有していると推察される。LBDに類似した症状を持つ新たなタイプのモデルマウスと考えられ、今後病理学的、生化学的検討を行い、LBDモデルマウスとしての妥当性をさらに検討する予定である。

LBD新規治療薬の探索

上記方法のスクリーニングにより新規治療薬候補をオリジナルに3剤ピックアップした。LDH放出の抑制、viability assayの改善、死細胞数の減少が確認された。

平成26年度について

上述のように、本年度はLBDモデルマウスの作出とその妥当性の検討を主に行った。記憶学習障害が示唆され運動機能障害が見られ、LBDモデルマウスとして良好な表現型を確認することができた。細胞についてはオートファジーの検討をさらにを行い、関連物質であるp62がFOXO3のノックダウンによって減少することが確認された。FOXO3のノックダウンと酸化ストレスの関与についてグルタチオン以外の有名なMnSODやニトロチロシンについて調べてみたが、これら2つの物質の関与は見られなかった。

D. 考察と結論

LBDモデル細胞を用いたFOXO3の病態機構解析では、FOXO3のノックダウンによる機能低下がオートファジーの機能低下に関与することを見出した。ただし、オートファジーマーカーであるLC3-IIまでの結果によるものであり、FOXO3がさらに先のライソゾームに関与するかについて今後検討していく必要がある。また、SH-synが対照のSH-mockよりもFOXO3ノックダウンに対し脆弱であることがわかっており、その成因についてオートファジー一連の経路のウェスタンブロットや免疫細胞化学的手法を用いた比較検討をさらに行う必要がある。また、FOXO3の機能から推察される抗酸化作用についても引き続きさらなる解析を行えるとよい。

加齢を考慮した新たなLBDモデルマウスは、表現型においてその妥当性を見出しつつある。今後、行動学習を含めたさらなる表現型の評価と、生化学的、病理学的な評価について解析を進め、LBDモデル細胞における結果と比較検討を押し進める必要がある。

LBD新規治療薬の探索であるが、本題より派生した研究となるため今後は別テーマとなる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

平成24年度

- 1) Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Doi H, Kondo N, Iida M, Ishigaki S, Fujioka Y, Matsumoto S, Miyazaki Y, Tanaka F, Kurihara H, Sobue G:
Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by an expanded polyglutamine repeat tract.
Nat Med, Sep 30; 18(10): 1531-8, 2012.
- 2) Qiang Q, Adachi H, Huang Z, Jiang YM, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Sobue G:
Genistein, a natural product derived from soybeans, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron disease.
J Neurochem, Jan 30; [Epub ahead of print], 2013.
- 3) Kondo N, Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Ishigaki S, Fujioka Y, Watanabe H, Tanaka F, Nakai A, Sobue G:
Heat shock factor-1 influences pathological lesion distribution of polyglutamine-induced neurodegeneration.
Nat Commun, Jan 29(4): 1405, 2013.
- 4) Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Jiang YM, Huang Z, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Tanaka F, Muramatsu S, Sobue G:
Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2.
Nat Med, Jul; 18(7): 1136-41, 2012.

平成25年度

- 1) Doi H, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Qiang Q, Tanaka F, Yanagawa T, Warabi E, Ishii T, Sobue G.
p62/SQSTM1 differentially removes the toxic mutant androgen receptor via autophagy and inclusion formation in a spinal and bulbar muscular atrophy

mouse model.

J Neurosci, 33(18): 7710-27, 2013.

- 2) Qiang Q, Adachi H, Huang Z, Jiang YM, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Sobue G.
Genistein, a natural product derived from soybeans, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron disease.
J Neurochem, 126(1): 122-30, 2013.

平成 26 年度

なし

2. 学会発表

平成 24 年度

- 1) 南山 誠, 勝野雅央, 足立弘明, 土井英樹, 近藤直英, 田中章景, 祖父江元, 栗原裕基.
ナラトリプタンは球脊髄性筋萎縮症(SBMA)の病態を改善する.
第 53 回日本神経学会, 2012 年 5 月 23 日、東京.
- 2) Minamiyama, M., Katsuno, M., Adachi, H., Doi, H., Kondo, N., Iida, M., Ishigaki, S., Fujioka, Y., Matsumoto, S., Miyazaki, Y., Tanaka, F., Kurihara, H., Sobue, G.
Naratriptan ameliorates SBMA pathogenesis by downregulating CGRP1.
第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 19 日、名古屋.
- 3) Minamiyama, M., Katsuno, M., Adachi, H., Doi, H., Kondo, N., Iida, M., Ishigaki, S., Fujioka, Y., Matsumoto, S., Miyazaki, Y., Tanaka, F., Kurihara, H., Sobue, G.
CGRP1 is the new therapeutic target for SBMA (Spinal and Bulbar Muscular Atrophy).
Asia-Pacific Society for Neurochemistry, Oct 1, 2012, Kobe, Japan.
- 4) Minamiyama, M., Katsuno, M., Adachi, H., Doi, H., Kondo, N., Iida, M., Ishigaki, S., Fujioka, Y., Matsumoto, S., Miyazaki, Y., Tanaka, F., Kurihara, H., Sobue, G.
Naratriptan ameliorates SBMA pathology by the repression of CGRP1-activated JNK pathway.
Neuroscience 2012, Oct 17, 2012, New Orleans, USA.

平成 25 年度

- 1) 南山 誠、龍 訥、能勢 弓、本山 昇、永井雅代、茨木京子、早川智久、山田洋美、直井 信、丸山和佳子

加齢を考慮したレビー小体病モデルの検討

日本生化学会大会、2013年9月11日、横浜.

- 2) Makoto Minamiyama, Ne Long, Yumi Kurokawa-Nose, Noboru Motoyama, Masayo Shamoto-Nagai, Kyoko Ibaraki, Tomohisa Hayakawa, Hiromi Yamada, Makoto Naoi, Wakako Maruyama

The creation trial of the new Lewy body disease model considered aging.

Neuroscience2013、2013年11月10日、San Diego, USA.

- 3) Makoto Minamiyama, Ne Long, Yumi Kurokawa-Nose, Noboru Motoyama, Masayo Shamoto-Nagai, Kyoko Ibaraki, Tomohisa Hayakawa, Hiromi Yamada, Makoto Naoi, Wakako Maruyama

The development of the new Lewy body disease model considered aging.

第36回日本分子生物学会年会、2013年12月4日、神戸.

平成26年度

- 1) 南山 誠、龍 訥、能勢 弓、本山 昇、永井雅代、茨木京子、早川智久、山田洋美、金森久美子、直井 信、丸山和佳子

レビー小体病モデル細胞における長寿関連遺伝子 FOXO3 の病態機構

第55回日本神経学会学術大会、2014年5月24日、福岡.

- 2) Makoto Minamiyama, Ne Long, Yumi Kurokawa-Nose, Noboru Motoyama, Masayo Shamoto-Nagai, Kyoko Ibaraki, Tomohisa Hayakawa, Hiromi Yamada, Kumiko Kanamori, Akiko Yamaoka, Makoto Naoi, Wakako Maruyama

The downregulation of longevity-related gene, FOXO3 induces the neurodegeneration of the Lewy body disease model cells.

第37回日本神経科学大会、2014年9月13日、横浜.

- 3) Ne Long, Yumi Kurokawa-Nose, Makoto Minamiyama, Noboru Motoyama, Masayo Shamoto-Nagai, Kyoko Ibaraki, Tomohisa Hayakawa, Hiromi Yamada, Kumiko Kanamori, Akiko Yamaoka, Makoto Naoi, Wakako Maruyama

The Involvement of Longevity-Related Gene, FOXO3, in the Lewy Body Disease Model.

Neuroscience2014、2014年11月19日、Washington DC, USA.

- 4) 龍 訥、南山 誠、能勢 弓、本山 昇、永井雅代、茨木京子、早川智久、山田洋美、金森久美子、直井 信、丸山和佳子

長寿関連遺伝子 FOXO3 のレビー小体病発症における役割の解析

第37回日本分子生物学会年会、2014年11月26日、横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし