

長寿医療研究開発費 平成26年度 総括研究報告

創薬モデル動物開発研究に関するプロジェクト（25-23）

主任研究者 津田 玲生 国立長寿医療研究センター
創薬モデル動物開発研究 PT (PL)

分担研究者

なし。

研究要旨

現在、国内には約500万人の認知症患者がいるといわれており、治療薬の開発が急務である。認知症のうち約6割を占めるアルツハイマー病（AD）に対する治療薬としては、症状の改善に働く疾患改善薬しか開発されていないことから、進行そのものを抑制する疾患修飾薬の開発が求められているが、これまでのところ成功していない。そこで、本研究では従来の手法とは異なる、個体レベルのスクリーニングからAD治療薬の開発を目指している。認知症などの老人性疾患の発症には長い時間を要することから、予防・治療薬を開発するためには短時間で発症を解析できるモデルシステムの導入が必須である。そこで本研究では、人と比較すると寿命が短く加齢現象の解析に優れたモデル動物であるショウジョウバエとヒトへの外挿が容易なマウスを使って、アルツハイマー病（AD）解析モデルの確立および治療薬の開発を行っている。先行研究から、AD発症原因因子の一つであるアミロイド β ($A\beta$)をショウジョウバエおよびマウスで発現する新規モデルを確立している。本年度は平成25年度から開始した本研究で確立したモデルの有効性を確かめるのと同時に、個体レベルでの薬剤スクリーニングを試みた。

ショウジョウバエによる解析の有効性としては、加齢に伴った遺伝子発現解析から細胞自食作用（オートファジー）関連遺伝子の発現低下と $A\beta$ による神経毒性効果との逆相関を明らかにすることができた。そこで、ショウジョウバエを用いた薬剤スクリーニングを行った結果、 $A\beta$ による神経機能低下を抑制する薬剤を5種類の化合物を同定することに成功した。

個体レベルでの薬剤スクリーニングを遂行する場合、ショウジョウバエで得られた候補薬剤が哺乳動物でも有効かどうかを判定することがヒトへの投与を考えた場合に重要である。本研究では薬剤評価系に資する新規モデルマウスを作製して解析を行っている。本年度は確立した系がADの発症メカニズムを反映しているかどうかに関して検討を行った。

A. 研究目的

超高齢化社会を迎える我が国において、高齢者に発症する疾患の予防・治療法の開発が急務である。しかしながら、高齢者に特有の疾患は発症までに長い時間がかかることから、これまでに治療薬の開発が遅れているのが現状であった。そこで、本研究プロジェクトでは、寿命が短く遺伝学的な操作も容易なモデル動物であるマウスとショウジョウバエを用いて、創薬開発に資するモデル系を構築することにより、認知症等の高齢者に特有な神経疾患に対する有効な治療薬の開発を最終目的としている。

B. 研究方法

ショウジョウバエ AD 解析系を用いた発症メカニズム解析

AD の発症には加齢が最大のリスクファクターだと考えられているが、詳しいメカニズムはあまり明らかになっていない。そこで、本研究では加齢に伴う遺伝子発現を検討することにより、加齢と AD 発症との関係を明らかにするために解析を行った。用いた材料としては、野生型および家族性 AD の変異を有する A β 発現系統を用いた。さらに、加齢との関係をより詳細に明らかにするため、寿命関連遺伝子である dFoxo (FoxO1 相同因子) および dSir2 (Sirtuin1 相同因子) の各変異体を用いた。これまで AD の発症との関係が報告されているオートファジー関連遺伝子(atg)の発現と加齢および A β との関係を詳細に解析した。

ショウジョウバエを用いた認知症治療薬のスクリーニング

これまでに A β 42 の変異体を温度依存的に神経細胞で過剰発現するシステムを確立している。この系では飼育温度を 18℃から 29℃に上昇させるだけで神経細胞特異的に変異型 A β の同期的な発現が保証され、発現誘導後 8 日で行動異常 (負の重力走性) が確認されている。スクリーニングとしては、100 種類から構成される植物性食品由来成分 (ファイトケミカル) を投与することにより、A β による神経機能低下に与える効果を検討した。

マウス新規 AD 解析モデル

これまでのマウス AD モデルの問題点としては、発症に時間がかかり、定量的な解析に適していないことが指摘されていた。そこで、本研究プロジェクトでは発症が短時間で見られ、定量的な解析ができる解析系の確立を行ってきた。これまでに、A β 42 あるいは家族性 AD 変異を導入した A β 42 (A β 42^{Arc}) を内耳有毛細胞で発現する Tg マウスを作成している。本年度はこの Tg マウスが AD の発症とどのように関連しているのかを明らかにする目的で Tau を内耳有毛細胞で過剰発現する系統を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究ではモデル動物を用いることから、当研究所の動物実験の指針に基づいた研究を行った。

C. 研究結果

ショウジョウバエ AD 解析系を用いた発症メカニズム解析

AD 患者では細胞自食に働くオートファジーの機能低下が生じていることが報告されている。そこで、オートファジーと AD 発症との関係を探る目的で加齢に伴うオートファジー関連遺伝子の発現レベルを定量 PCR(qPCR)で観察した。加齢に伴う遺伝子発現変化を詳細に検討した結果、オートファジー関連遺伝子 (*atg1*, *atg8*, *atg18*) の発現は、羽化後 1 週間で発現が減少し、2 週間で半減することが明らかになった。これら *atg* 遺伝子の発現と寿命制御との関係を検討した結果、*atg18* 遺伝子の発現は *dFoxo* あるいは *dSir2* 変異体バックグラウンドでは、さらに減少することが確かめられた。この結果から、*Foxo* や *Sir2* は *atg18* 遺伝子発現維持に働いていることが示唆された。加齢に伴ったオートファジーの機能低下は AD の発症に関わっている可能性が予想されていることから、*atg1* あるいは *atg18* の発現量を減少する遺伝子欠損変異体バックグラウンドで、 $A\beta 42$ 過剰発現による加齢依存的な行動異常の表現型を観察した。その結果、*atg1*, *atg18* いずれの減少でも $A\beta 42$ による加齢依存的な行動異常の表現型が増強された。この結果から、*atg* 遺伝子の発現は加齢に伴って厳密に制御され、その発現維持と AD 発症には密接な関係があることが示唆された (Omata, et al., Am J Neurodegener Dis, 3, 134-142, 2014)。

ショウジョウバエを用いた認知症治療薬のスクリーニング

$A\beta 42$ 変異体を神経細胞特異的に発現する解析系を確立して、行動異常(負の重力走性)を指標にして抑制薬の検索を行った。個体レベルのスクリーニングを行うためには、薬剤の投与方法が重要だと思われることから、色素(青色 1 号)を用いて薬剤投与方法の最適化を行った。その結果、多くの薬剤を短時間で処理できる簡便な方法を確立することができた。そこで、この投与方法を用いて植物性食品由来物質 100 種類を新規ショウジョウバエ AD 解析系に投与して、 $A\beta$ による行動異常の誘発を抑制する薬剤を検索した。その結果、 $A\beta$ による行動異常を 15~25%抑制する活性を有する化合物 5 種類の同定に成功した。

マウス新規 AD 解析モデル

本研究ではショウジョウバエのシステムを用いて薬剤探索を行うことから、候補となる薬剤が多く同定されてくることが予想される。ヒトへの適用を考えた場合、多くの候補薬剤の中から哺乳動物にも効果を示す薬剤を絞り込むことが重要である。これまでのマウス AD モデルの問題点としては、発症に時間がかかり、定量的な解析に適していないことが指摘されていた。そこで、これまでの先行研究として、AD の発症を短時間に、経時的かつ定量的に評価できる新規モデルマウスの確立に成功している。このモデルの特徴としては、神経細胞と内耳有毛細胞との共通性に注目して、 $A\beta 42$ あるいは家族性 AD 変異を導入した $A\beta 42(A\beta 42^{Arc})$ を内耳有毛細胞で発現している (特願 2011-85642)。この Tg マウスの聴覚を聴性脳幹反応(ABR)により測定した結果、 $A\beta 42^{Arc}$ を内耳有毛細胞で発現させた系統に関して、生後 4 ヶ月で高音域(32kHz)の聴力が特異的に低下していることが確認されている。高音域の聴力は加齢による影響を受け易く、 $A\beta 42$ の作用が加齢依存的であることを考える

と、確立した Tg マウスは A β 42 による加齢依存的な神経毒性効果を短時間で検知するシステムであることが示唆されている。本研究では、確立した新規 AD モデルにおける聴力低下が A β による神経毒性効果を反映しているかどうかを検討した。AD 発症過程には Tau が関与していることが予想されていることから、ヒト Tau を内耳有毛細胞で特異的に発現する Tg マウスを作製した。さらに、この Tg マウスの聴覚を経時的にモニターした結果、Tau の発現は全く聴力低下を示さないことが確認された。ところが、Tau と A β 42^{Arc} を同時に発現する Tg マウスを作製して調べた結果、生後 2 ヶ月で著しい聴力の低下が観察された。このように、Tau と A β との相乗効果が観察されたことから、確立した新規システムは AD の発症メカニズムを少なくとも一部は反映していることが示唆された。

D. 考察と結論

ショウジョウバエを用いた AD 解析系を用いて植物性食品由来成分をスクリーニングした結果、A β による神経機能低下を抑制する活性を有する薬剤 5 種類の同定に成功した。食品由来成分は安全性が担保されていることから、今後の開発において有用なシーズになることが期待される。さらに、同定した 5 種類の化合物は全てフラボノイド骨格を有していたことから共通した作用機序の存在が予想される。この 5 種類に類似した化合物の多くは抑制活性を示さなかったことから、特異的な作用である可能性が考えられる。今後はフラボノイド骨格のどの残基が重要な役割を持っているのかを明らかにすると同時に、より強い作用を示す化合物の開発につなげていきたい。

さらに本研究ではショウジョウバエモデルを用いて、AD の発症と加齢との関係を調べた結果、AD の発症には加齢に伴うオートファジー関連遺伝子の発現維持が重要な役割を持っていることが示唆された。AD の発症には加齢が関わっていることが示唆されてきたが、今回の発見は加齢と AD 発症との接点になると考えられ、新たな創薬の標的になる可能性が期待される。

本研究で確立した新規マウス AD モデルでは聴覚領域の中でも高音域を受容するシステムに異常があると考えられ、特異的な作用である可能性が予想される。高音域の聴力は加齢による影響を受け易く、A β 42 の作用が加齢依存的であることを考えると、確立した Tg マウスは A β 42 による加齢依存的な神経毒性効果を短時間で検知するシステムであることが示唆された。このシステムでは生後 4 ヶ月という短い時間での発症が確認でき、ABR という電気生理学的な測定法で判定することから、A β の毒性を定量的に判断する良いモデルになることが期待される。今回の解析では、AD の発症で観察される A β と Tau との相乗効果が観察されていることから、AD の発症に類似したメカニズムの存在が期待される。本研究を進めることにより、認知症治療薬を哺乳動物で検定する場合の有用なモデル系になると思われる。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Tsuda, L.** and Lim, Y. The regulatory system for the G1-arrest during neuronal development in *Drosophila*. *Dev Growth Diff*, 56, 358-367 (2014) (査読あり)
- 2) Amcheslavsky A, Nie Y, Li Q, **Tsuda L**, Markstein M, and Tony IP, Y. Gene expression profiling identifies the zinc-finger protein Charlatan as a regulator of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Development* 141, 2621-2632 (2014) (査読あり)
- 3) Omata, Y., Lim, Y.M., Akao, Y., and **Tsuda, L** Age-induced reduction of autophagy-related gene expression is associated with onset of Alzheimer's disease. *Am J Neurodegen* 3: 134-142 (2014) (査読あり)

2. 学会発表

- 1) **津田玲生**、小又尉広、山崎泰豊、林 永美
The effect of aging in Alzheimer disease formation.
日本基礎老化学会第37回大会、愛知県、6月4日、平成26年
- 2) **津田玲生**、小又尉広、山崎泰豊、林 永美
聴覚細胞を用いた新規アルツハイマー病解析モデルマウスの作製
日本神経化学会第57回大会、奈良県、9月30日、平成26年
- 3) 山崎泰豊、小又尉広、鈴木枝里子、林 永美、柳澤勝彦、**津田玲生**
アルツハイマー病モデルショウジョウバエにおける A β ペプチドの経時的挙動：治療薬開発のための基礎解析
第37回日本分子生物学会年会、横浜、11月26日、平成26年
- 4) **津田玲生**、小又尉広、山崎泰豊、林 永美
創薬開発に資する新規アルツハイマー解析モデルマウスの作製
第33回日本認知症学会学術集会、横浜、11月30日、平成26年

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。