

長寿医療研究開発費 平成27年度 総合研究報告

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 木村 展之 認知症先進医療開発センター
アルツハイマー病研究部（室長）

分担研究者 津田 玲生 認知症先進医療開発センター
治療薬探索研究部（研究技術員）

研究要旨

現在、国内では300万人を超えるアルツハイマー病(AD)患者がいると云われ、治療薬の開発を含めた対策が急がれている。これまでに、AD治療薬の開発を目指して、多くの研究機関で開発が進められてきているが、いまだに成功していない。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た。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、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進めた。

ショウジョウバエモデルに関しては、アミロイド β を神経細胞で同期的に過剰発現する系を確立することにより、表現型を短時間で同期的に評価することに成功した。このシステムを用いることにより、神経細胞死の誘導メカニズムを明らかにすることに成功した。さらに、本システムを用いて約100種類からなる天然物ライブラリーをスクリーニングした結果、神経機能低下を抑制する活性を有する5種類の化合物同定に成功した。

マウスモデルに関しては、創薬開発に資する新規ADマウスモデルを確立した。具体的には内耳有毛細胞特異的にA β を過剰発現することにより、聴覚異常としてA β による毒性をモニターすることに成功した。このシグナルの発症メカニズムを明らかにするため、内耳有毛細胞を観察したところ、高音域を制御する基底側の有毛細胞が脱落していることが観察できた。これらに関しては科学論文への掲載および特許の取得に至っている。

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 解析系を用いた神経変性誘導メカニズム解析

AD の発症過程において、アミロイド前駆体(APP)からの A β 42 産生に続き、A β 42 の N 末端が切断およびピログルタミル化(pE 化)修飾されることが、AD 重篤化につながる可能性が指摘されている。この場合、pE 化された A β (pE 化 A β) が強い神経毒性効果を持つことが予想されていることから、AD おける神経変性の誘導に関与している可能性が予想されている。そこで、pE 化 A β を発現するショウジョウバエモデル (A β p3E-42) を作成し、A β 42 と比較することにより、神経変性における役割を検討した。

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 N 末端がリン酸化されたフォームに類似した変異型 A β をショウジョウバエの神経細胞で同期的に発現することにより、短期間(約 8 日)で行動異常(負の重力走性)が観察されている。この系統を使って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たことから、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、一度に多くの薬剤を扱える簡便な方法を確立することができた。そこで、このショウジョウバエシステムを用いて、機能未知の化合物から抑制薬の同定を試みた。国内製薬企業から提供を受けた機能性食品由来化合物ライブラリー(100 種類)を使って、A β により誘導される行動異常(歩行速度の減少)を回復する薬剤を検索した。

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^{Arø}) を内耳有毛細胞で発現する Tg マウスを作成した。

(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 解析系を用いた神経変性誘導メカニズム解析

A β p3E-42 と A β 42 をほぼ同量発現する条件で比較したところ、A β p3E-42 だけで羽化後 4 週間で神経変性が観察された。この表現型はカスパーゼ阻害剤である p35 の発現により、完全に抑制されたことから、アポトーシスによる変性であることが確認された。さ

らに、各種ストレスマーカーを検討した結果、 $A\beta$ p3E-42 の発現により小胞体ストレス応答 (ER-ストレス応答) が誘導されることが確かめられた。Tau との関係を検討した結果、 $A\beta$ p3E-42 と Tau を同時に発現させると ER-ストレス非依存的な経路 (JNK シグナル依存的) で神経変性を誘導していることが確かめられた。

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

機能性食品由来の化合物ライブラリーの中から、ショウジョウバエ $A\beta$ による行動異常の誘発を抑制する活性を有する 5 種類の化合物同定に成功した。これら 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、類似した作用点が予想される。さらに、これら 5 種類の化合物と $A\beta$ との直接の相互作用について、表面プラズモン共鳴を利用した分子間相互作用解析装置を用いて検討した結果、4 種類が $A\beta$ 42 に直接結合することが確かめられた。

マウス新規 AD 解析モデル

内耳有毛細胞に $A\beta$ 42Arc を発現する Tg マウスの聴覚を聴性脳幹反応 (ABR) により測定した結果、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た。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 $A\beta$ 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る。さらに、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 マウスを作製して相互作用を検討した。その結果、Tau の発現は全く聴力低下を誘導しない一方で、Tau と $A\beta$ 42Arc を同時に発現する Tg マウスでは、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 $A\beta$ 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

これまで AD の発症に伴う神経変性の誘導に関しては分子メカニズムが明らかになっていなかったが、本研究により $A\beta$ の N 末端がピログルタミル化されたものが ER-ストレス応答を誘導することにより進行性の神経変性が誘導されることが明らかになってきた。今後、ピログルタミル化 $A\beta$ がどのようにして ER ストレス応答を誘導しているのかを突き止めることにより、AD に伴う神経変性の誘導を抑制する活性を有する薬剤の開発に繋がることが期待される。

AD に対する薬剤としては、ショウジョウバエにおける $A\beta$ で誘導される行動異常を抑制する活性を有する 5 つの化合物を同定した。これらの内、4 種類に関しては $A\beta$ への直接の結合が示唆されていることから、AD 治療薬としての可能性が期待される。今後、マウスモデルを用いて作用検定していくことにより、これまで開発が困難だった疾患修飾薬の開発に繋がることが期待している。

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、 $A\beta$ 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と考えられる。当システムは、A β の発現による神経機能低下を電気生理学的に直接観察することができる点で、記憶・学習の行動試験を指標とする従来の方法とは異なり、①A β による毒性効果を経時的かつ定量的に判定でき、②A β による細胞変性の誘導が観察でき、③A β と Tau の相互作用がモニターできる、といった特徴を有し、AD 治療薬開発に資すると思われる。今後は、ショウジョウバエによるスクリーニングで同定された治療薬候補化合物を当システムで検証しすることにより、AD 治療薬の開発を行う。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表 [論文]

- 1) Lim, YM., Yamasaki, Y., and **Tsuda, L.** Ebi alleviates excessive growth signaling through multiple epigenetic functions in *Drosophila*. *Genes to Cell*, 18, 909-920 (2013). (査読あり)
- 2) Yagi, Y., Lim, YM., **Tsuda, L.**, and Nishida, Y. *fat facets* induces polyubiquitination of Imd and inhibits the innate immune response in *Drosophila*. *Genes to Cell*, 18, 935-945 (2013). (査読あり)
- 3) **津田玲生**、林 永美、「G1 期抑制因子による感覚細胞の長期生存維持メカニズム解析」、ヒトと医学のステージへ拡大する細胞周期、実験医学(増刊)31, 235-243, 羊土社(2013). (査読なし)
- 4) **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)
- 5) 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)
- 6) Seik Mohideen, S., Yamasaki, Y., Omata, Y., **Tsuda, L.**, Yoshiike, Y. Nontoxic singlet oxygen generator as a therapeutic candidate for treating tauopathies. *Scientific Reports*, 5, 10821 (2015). (査読あり)
- 7) **Tsuda, L.**, Yagi, Y., Lim, YM. Cellular Defense and Sensory Cells Survival Require Distinct Functions of *ebi* in *Drosophila*. *PLOS ONE*, 10: e0141457, 2015 (査読あり)
- 8) Lim, YM., **Tsuda, L.** Ebi, a *Drosophila* homologue of TBL1, regulates the balance between cellular defense responses and neuronal survival. *American Journal of Neurodegenerative diseases*, 5: 62-68, 2016 (査読あり)
- 9) Omata, Y., Tharasegaran, S., Lim, YM., Yamasaki, Y., Ishigaki, Y., Tatsuno, T., Maruyama, M., and **Tsuda, L.** Expression of amyloid- β in mouse cochlear hair cells caused early-onset auditory defect against high frequency sound stimulation. *Aging*,

8: 427-440, 2016 (査読あり)

2. 学会発表

- 1) Tsuda L., Lim YM. Post-translational modification of Charlatan, a *Drosophila* NRSF/REST-like repressor, is required for neuron specific genes expression. 2nd Asia Pacific *Drosophila* Research Conference, May 14, 2013, Seoul, Korea
- 2) Lim YM, Omata Y, Yamasaki Y, Tsuda L. Molecular study of age-related hearing disorders. 54th *Drosophila* Research Conference, April 3, 2013, Washington DC, USA
- 3) 小又尉広、山崎泰豊、林 永美、津田玲生
アルツハイマー重篤化メカニズムの解析
第32回日本認知症学会学術集会
松本、11月9日、平成25年
- 4) 津田玲生、山崎泰豊、林 永美
神経成熟過程におけるダイナミックな遺伝子発現変化のメカニズム
第36回日本分子生物学会年会
神戸、12月4日、平成25年
- 5) 山崎泰豊、小又尉広、鈴木枝里子、林永美、柳澤勝彦、津田玲生
ショウジョウバエを用いたアルツハイマー病治療薬の定量的評価系
第36回日本分子生物学会年会
神戸、12月4日、平成25年
- 6) 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
- 7) 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
日本神経化学学会第57回大会、奈良県、9月30日、平成26年
- 8) 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、平成26年
- 9) 津田玲生、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、奈良、12月、平成26年
- 10) Tsuda L., Lim YM. Ab_{pE3-42} induces progressive degeneration of photoreceptor neurons through ER-stress/Caspase dependent pathway in *Drosophila*. 3rd Asia Pacific *Drosophila* Research Conference, May 13, 2015, China
- 11) Tsuda L., Post-translational modification of Charlatan, a *Drosophila* NRSF/REST, is required for neuron specific genes expression. 第58回日本神経化学学会大会、大宮、2015年

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許第 5876664 号

発明者：津田 玲生、林 永美

発明の名称：アルツハイマー病の治療薬のスクリーニング方法、及び、トランスジェニック非ヒト動物

出願人：国立研究開発法人国立長寿医療研究センター

出願日：平成 23 年 (2011 年) 4 月 7 日

登録日：平成 28 年 1 月 29 日

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。