

長寿医療研究開発費 平成24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（22-17）

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（プロジェクトリーダー）

分担研究者

なし。

研究要旨

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る。そこで、本研究プロジェクトでは高齢者に特有の疾患のうち認知症および老人性難聴に着目して、ショウジョウバエとマウスを使ったモデル動物の確立を行なった。モデル動物の利点としては、発症を経時的かつ定量的に評価できる系の確立が可能になり、発症メカニズムの解明ばかりではなく治療薬の開発にも優れている点である。本研究プロジェクトの成果としては、老人性難聴の発症に関わる加齢性難聴疾患のモデルをショウジョウバエとマウスで確立することに成功し、騒音曝露等のストレス応答を軽減するためのシステムの発見に至っている。さらに、認知症に関してはアルツハイマー病の原因因子である A β 42 の毒性を経時的かつ定量的に評価できるシステムの確立に成功している。このシステムを用いる事により、アルツハイマー型認知症が重篤化するメカニズムの解明に向けて新たな知見が得られた。また、ショウジョウバエを用いた個体レベルでの抑制薬のスクリーニング系を立ち上げる事にも成功している。

A. 研究目的

認知症や老人性難聴は罹患率が非常に高いにもかかわらず、発症メカニズムの解明および予防・治療薬の開発が遅れている。この主な要因としては、これら加齢性疾患の発症には長い時間がかかることが挙げられ、短時間で定量的な解析が行えるモデルシステムの開発が求められている。本研究では、個体レベルでの解析に優れるショウジョウバエおよびヒトへの外挿が容易なマウスを用いて、老人性難聴および認知症に焦点を絞り、発症メカニズム解析から治療・予防薬の開発までを行えるモデルシステムの構築を目的としている。

B. 研究方法

① 老人性難聴の発症メカニズム解明

老人性難聴の発症原因としては感覚細胞である内耳有毛細胞の生存維持が大きく関わっていることが予想されている。本研究では、老人性難聴のモデルと考えられている加齢性難聴疾患の一つ OASD (Ocular albinism with late-onset sensorineural deafness) に注目して、解析モデルの確立および発症メカニズムの解明を目指して研究を行なった。これまで、OASD の発症には TBL1 と呼ばれる転写抑制因子の変異が関わることを示されており、TBL1 が感覚細胞の生存維持に機能していることが予想されているが詳細は明らかになっていない。TBL1 に関してショウジョウバエおよびマウスで感覚細胞の生存維持とどのように関わっているのかを調べる目的で TBL1 の機能を感覚細胞特異的に阻害することにより、生存維持及び機能をモニターした。

② アルツハイマー型認知症の重篤化メカニズムに関する研究

本研究では AD の発症に重要な関与が考えられているアミロイド β 蛋白質 ($A\beta$) および凝集性が異なるさまざまな変異を導入した $A\beta$ の計 7 種類をラット enkephalin 分泌シグナルに結合したコンストラクトを作成した。これら変異 $A\beta$ を持つショウジョウバエおよびマウス Tg 動物を作製して、 $A\beta$ による神経毒性効果および AD の重篤化に関わるメカニズムを解析する。

③ 個体レベルでの AD 治療薬のスクリーニング

個体レベルで AD 治療薬をスクリーニングするため、②の解析で得られた情報に従って、最も神経毒性が高い $A\beta$ を選別して、神経細胞特異的に発現させる。このとき、 $A\beta$ 変異体を成虫神経細胞で同期的に発現させる目的で、Gal4/UAS システムに加え温度感受性変異が入った Gal80^{ts} を用いる。

(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

① 老人性難聴の発症メカニズム解明

ヒト加齢性難聴疾患 OASD の発症原因因子である TBL1 のショウジョウバエホモログ *ebi* について、機能欠損を感覚細胞特異的に作成して調べた結果、*ebi* の機能を欠損した光受容細胞は羽化後 4 週間で光受容細胞の変性が確認された。さらに、マウス TBL1 に OASD 変異を導入した変異 TBL1 を内耳有毛細胞特異的に発現する Tg マウスの解析から、このマウスは 100dB 2 時間の騒音曝露により聴力の低下を誘導する感音性難聴の表現型を示した。

② アルツハイマー型認知症の重篤化メカニズムに関する研究

変異 $A\beta$ を神経細胞に発現させて神経変性および機能低下を指標として解析した結果、N 末端がピログルタミル化させるフォーム ($A\beta$ 3Q42) およびリン酸化に類似したフォーム (A

β 42^{S8D})で強い活性が観察された。

③ 個体レベルでの AD 治療薬のスクリーニング

②の解析から $A\beta$ 42^{S8D} が強い神経毒性活性を示すことが明らかになったので、この変異 $A\beta$ を Gal4/UAS/Gal80^{ts} を用いて成虫神経細胞で同期的に発現させる系を確立した。その結果、 $A\beta$ 42^{S8D} を 29°C で同期的に誘導することにより約 1 週間で負の重力走性を指標とした行動異常が観察された。この系は個体間のばらつきも小さく、短期間で変異 $A\beta$ を誘導することができることから、薬剤スクリーニングに適した系であることが予想される。

D. 考察と結論

感音性難聴は老人性難聴や加齢性難聴の表現型に共通する部分が多く、モデルシステムと考えられている。今回、TBL1^{OASD} の過剰発現系統が感音性難聴の表現型を示したことから、TBL1^{OASD} は老人性難聴の発症メカニズム解析の有用なツールになることが示唆された。今後は、ショウジョウバエで得られた知見をマウスモデルに応用することにより、老人性難聴の発症メカニズム解明および治療薬の開発を行なっていきたい。

認知症に関しては、ショウジョウバエを用いた解析から強い神経変性効果および行動異常の表現型が同期して現れる系の確立に成功した。これらを用いることにより AD の発症を経時的かつ定量的に解析することができ、個体レベルの薬剤スクリーニングにも資する系になることが期待される。今後は、化合物および天然物ライブラリーを用いて発症を抑制する低分子化合物をスクリーニングしたい。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Lim, Y.M., Hayashi, S., and Tsuda, L. : Ebi/AP-1 suppresses pro-apoptotic gene expression and permits long-term survival of *Drosophila* sensory neurons. **PLoS ONE**, 7: e37028, 2012.

2) 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）。

2. 学会発表

1) Lim YM, Omata Y, Yamasaki Y, Tsuda L. Molecular study of age-related hearing disorders. 54th *Drosophila* Research Conference, April 2013, Washington DC, USA

2) Tsuda L., Omata Y, Yamasaki Y, Lim YM. Chemical Genetic approach to evaluate the toxicity of Amyloid-beta using *Drosophila*. 11th International Conference on

Alzheimer's & Parkinson's Diseases (AD/PD 2013). March 2013, Florence, Italy

- 3) 林 永美、山崎泰豊、津田玲生
増殖停止における遺伝子発現抑制の役割
第35回日本分子生物学会年会・ワークショップ
福岡、12月11日、平成24年
- 4) 山崎泰豊、林永美、津田玲生
成熟ニューロンにおける **Chn** スプライシングバリエントの機能解析
第35回日本分子生物学会年会
福岡、12月14日、平成24年
- 5) 津田玲生、林 永美
Molecular Study of hearing disorders using Drosophila
Japanese Drosophila Research Conference 10, Tokyo, Oct 15, 2012
- 6) 林 永美、山崎泰豊、津田玲生
Post-translational modification of Charlatan, a Drosophila NRSF/REST-like repressor, is required for neuron specific genes expression
Molecular Study of hearing disorders using Drosophila
Japanese Drosophila Research Conference 10, Tokyo, Oct 15, 2012
- 7) 吉池裕二、小又尉広、津田玲生
HDAC 制御によるタウ代謝機構の解析
第31回日本認知症学会・学術集会、筑波、12月10日、平成24年
- 8) Lim, YM, Yamasaki, Y., Tsuda L., Post-translational modification of Charlatan, a Drosophila NRSF/REST-like repressor, is required for neuron specific genes expression. British Society for Developmental Biology, British Society for Cell Biology and Japanese Society of Developmental Biologists Joint meeting, Bermingham, UK, April 17, 2012

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