

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 (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

レビー小体病 (Lewy body disease, LBD、特発性自律神経障害、パーキンソン病 (PD)、  
瀰漫性レビー小体病あるいはそれらの合併したもの)の病態は未解明な部分が多く、特に患者の大多数を占める孤発性 LBD は特定の遺伝子異常が原因となる家族性のものに比べそのヘテロさゆえに研究は立ち遅れている。LBD の中でも PD に関しては L-DOPA や dopamine agonist による対症療法が可能であるが、他の加齢に伴って生ずる神経変性疾患同様、神経変性、神経細胞死の進行を抑制することはできない。こうした神経変性疾患の病因解明と治療法の開発のためには疾患モデルの作製が必要急務である。PD の病態にはミトコンドリアの機能障害が関与し、ミトコンドリア呼吸鎖 complex 1 阻害剤である rotenone を慢性投与することで PD モデルを作製できること、孤発性および一部の家族性 PD の原因遺伝子がミトコンドリア機能障害を引き起こすことが知られている。一方、alpha-synuclein ( $\alpha$ -syn) はゲノムワイドの連鎖解析によって孤発性 PD の発症リスクに関与することが報告されているだけでなく、LBD の病理学的特徴であるレビー小体の主要構成成分でもある。本研究課題では、LBD の新たなモデルとして「神経老化」の役割に着目して研究を行っている。老化/ストレス関連転写因子である FOXO3 はヒト剖検脳でレビー小体に共存するとの報告があり、LBD 発症に何らかの役割を果たしている可能性がある。本年度は LBD マウスモデル作成のための基礎研究として、 $\alpha$ -syn を過剰発現させた培養神経系を用いて、FOXO3 の RNAi によるノックダウンまたは rotenone の投与による新たな LBD モデル創出の妥当性を細胞レベルにて検討した。

また、 $\alpha$ -syn を過剰発現させた LBD モデル細胞に対し、細胞毒性の軽減効果および細胞増殖性の改善効果を示す可能性のある低分子化合物をスクリーニングしたところ、数種類の新規活性物質を得ることができ、その作用機構を解析中である。

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

レビー小体病(LBD)はアルツハイマー病に次いで頻度の高い神経変性疾患である。従来のレビー小体病、特にパーキンソン病(PD)に関する研究は遺伝性 PD の解析による特定の遺伝子変異に関するものが殆どであり、大多数を占める孤発性 PD の病因解明は未だ進んでいないとは言えない。本研究課題は孤発性 PD の病因解明と治療法の開発に必須である疾患モデル作成を目的とする。

従来の PD 関連遺伝子を導入あるいはノックアウトした遺伝子改変動物(哺乳類)においては、PD の特徴であるレビー小体の形成を伴う神経細胞死が再現できたものはない。一方、ミトコンドリア呼吸鎖 complex I の阻害剤である rotenone あるいは MPTP 投与により、ヒト PD と類似の病像が得られることが報告されている。しかしながら、薬剤性の PD モデルはヒト PD における細胞死の機序を完全に再現しているのかについては明らかになっていない。孤発性 PD あるいは LBD の病態には「脳神経の老化とそれに伴う脆弱性の増加」が決定的な役割を果たしている。しかしながら、これまでの PD モデルには加齢という観点が欠如している。

本研究では、老化の中心的なシグナルである PTEN/PI3K/Akt の下流に存在する転写因子である Foxo3 のノックアウトマウスに rotenone を投与する。その結果神経系における老化シグナルの LBD 発症における役割を明らかとする。FOXO3 がヒト LBD 剖検脳のレビー小体、Lewy neurite に蓄積していることが報告されているが、その病態への関与は不明である(Su B. et al., Mol. Neurodegener. 2009)。本研究課題はレビー小体形成あるいは細胞死における FOXO3 の役割についても検討する。初年度である今年、LBD マウスモデル作成のための基礎実験として、培養神経系、 $\alpha$ -syn 過剰発現細胞に対し rotenone 投与や FOXO3 ノックダウンを施行し、LBD モデル細胞としての妥当性について検討した。

また、これら LBD モデル細胞の病態を改善する可能性のある低分子化合物をスクリーニングし、LBD 治療のための治療薬を創出し、その作用機序の解析により有効な治療ターゲットの探索を行う。

## B. 研究方法

ヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y に rotenone を投与することで LBD 細胞モデルを製作した。RNAi 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、以下の点について検討した。Rotenone に対する神経細胞の感受性(脆弱性)が変化するかどうかを LDH assay、Cell viability assay などを用いた生化学的な検討、免疫細胞化学による病理学的な検討。Rotenone によるミトコンドリア障害、生体分子に対する酸化障害と

FOXO3の活性化に及ぼす影響をウエスタンブロッティング、RT-PCRを用いた生化学的検討を行った。

同時に、SH-SY5Yに $\alpha$ -synを強制発現させたLBDモデル細胞に対し、FOXO3をノックアウトし、rotenone投与実験と同様の解析を行い新たなLBDモデル細胞としての比較検討を行った。

さらに、上記の $\alpha$ -syn強制発現細胞モデルを用い、tetrahydrocurcuminなどのFOXO3シグナルの活性に影響を及ぼす可能性のある低分子化合物や、神経細胞毒性の軽減作用の期待できる新規化合物をスクリーニングし、新たなターゲット分子に対する神経保護薬開発の可能性を探った。

(倫理面への配慮)

本研究課題には利益相反の問題はない。

本年度においては、動物実験、臨床研究、ヒトサンプルを用いた研究は行わなかったが、以下の配慮を念頭に置いた。

- i) 動物を使った実験系については各施設の動物実験倫理委員会、実験動物委員会の許可の基に動物愛護上の配慮を行う。
- ii) 臨床研究については、各施設の臨床研究倫理委員会の許可と指導の基に行い、プライバシー保護には細心の注意を払う。
- iii) ヒトサンプルを用いた研究については各施設の臨床疫学倫理委員会の許可を受ける。

## C. 研究結果

### SH-SY5YにおけるFOXO3の機能解析とrotenoneの与える影響

ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Yにおいてウエスタンブロットによる内在性FOXO3の同定が可能であることを確認し、RNAiによるFOXO3ノックダウン下でrotenone投与が細胞に与える影響をLDH assay, cell viability assayにて解析した。FOXO3ノックダウンの影響は、rotenoneの濃度に応じて強く出ることが予想されたが、1~1000nMのrotenoneの濃度を用いた本実験系では対照のsiRNAと同じパターンを示した。一方、 $\alpha$ -syn過剰発現SH-SY5YのFOXO3をノックダウンしその影響を解析したところ、対照SH-SY5Yをノックダウンした場合に比べて強い細胞毒性とcell viabilityの低下を示すことが判明した。FOXO間の機能相補性が懸念されたため、FOXO1&3、pan FOXOについてもノックダウンした実験を行ったが同様の結果であった。これらの現象がartifactではないことを確認するためのRT-PCR, Westernblotting実験を現在施行中である。

また、FOXO3の機能を解析するため、FOXO3強制発現SH-SY5Yを作製し、酸化ストレスとして過酸化水素水を投与したところ耐性を示す結果を得た。

#### $\alpha$ -syn 過剰発現 SH-SY5Y を用いた治療薬スクリーニング

レビー小体病細胞モデルである  $\alpha$ -syn 過剰発現 SH-SY5Y を用いた予備実験中に、既存の化合物ではあるがこれまでに報告のない系統の物質が本細胞の神経毒性を改善する作用があることを見出した。3種類の化合物において細胞毒性、Cell viability の改善を認めている。現在最も活性の強かった物質に対し、ELISA、Westernblotting、免疫細胞化学を用いて予想される作用機序を検討中である。

#### D. 考察と結論

FOXO3 は老化／ストレスに伴う遺伝子発現制御を行う転写因子である。FOXO3 が LBD におけるレビー小体形成と細胞死にどのような役割を果たすかを解明することで病因解明に結びつく結果を得ることができる。本年度の結果から FOXO3 は rotenone や過酸化水素のような酸化ストレス等の細胞傷害刺激に対して保護的に働く機能を持つことが神経系培養細胞において確認された。また、FOXO3 のノックダウンによる発現低下は  $\alpha$ -syn 強制発現下の SH-SY5Y にとってより強い細胞毒性を呈することがわかり、LBD 発症に FOXO3 の loss of function、ひいては「老化」が関与している可能性が示唆された。一方、FOXO3 には他にも細胞分化、増殖、細胞死などの細胞周期に働き細胞の生死を決定づける機能も持ち合わせている。FOXO3 の機能を今後さらに明らかにすることは加齢と神経変性の関係を知る上で重要な意味を持つものと思われる。LBD において変性に陥った神経細胞に特徴的な病理所見であるレビー小体、Lewy neurite の主成分は alpha-synuclein であるが、そこに FOXO3 が共存するメカニズムについて、来年度に細胞モデル系で形態学的に明らかとすべく実験を予定している。ポリグルタミン病のように、Lewy 小体の凝集体中に FOXO3 が巻き込まれ機能低下を起こしている可能性がある。Foxo3 ノックアウトマウスと  $\alpha$ -syn トランスジェニックマウスとの交配や Foxo3 ノックアウトマウスへの rotenone 投与による PD モデルマウスの作製は、神経系培養細胞の実験の結果を基に、できるだけ効率の良い方法で着手の予定である。

また本年度の成果として、 $\alpha$ -syn を神経系培養細胞に強制発現させた LBD モデル細胞に対し毒性軽減作用を示す化合物を見出すことができた。これら化合物の薬理作用を解析することにより、治療ターゲットを見出すとともに、本化合物を治療薬もしくはリード化合物として新たな LBD 治療薬の開発へと導きうる可能性がある。特許取得の可能性から詳述できないが、他の神経変性疾患に対し共通の作用機序を有する可能性があり本研究の意義は大きい。他にも、加齢健康脳科学研究部では、FOXO3 の活性化を制御する天然物由来成分(食品、生薬)について既に解析を行ってきており(Xiang L. et al., Ageing, 2011)、本研究の成果を発展させ、LBD の予防介入に有用な低分子化合物の開発も進行中である。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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.

2. 学会発表

- 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.

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