

長寿医療研究開発費 平成25年度 総括研究報告

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))の病因解明と治療法開発のための疾患モデルとして、今までにない老化を加味したモデルの開発を行うため細胞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  $\alpha$ -syn の発現をベースに、長寿関連遺伝子 FOXO3 の発現低下を加味した LBD モデルの開発を行うものである。これまでの間、モデル細胞として  $\alpha$ -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てきた。FOXO3 の発現低下により細胞活性の低下と細胞毒性の上昇が見られ、SH-syn は対照の mock 細胞と比較し脆弱であることが示された。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が一つの要因になっていることが判明した。さらに、SH-syn における  $\alpha$ -synuclein モノマーは FOXO3 の発現低下により減少することがわかり、細胞毒性を示すと言われているモノマーからオリゴマーへの重合に FOXO3 の機能低下が関与することが疑われた。

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 に

においては神経伝達の改善を図ることで症状を緩和できるようになってきてはいるが他の神経変性疾患と同様に神経細胞の変性および死を抑止することはできず、その病態の解明、治癒を目指すことは高齢化社会を迎えた日本の重要な課題である。今までにいくつかの病態モデルが開発されているが、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存在しない。そこで、ゲノムワイド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、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 $\alpha$ -synの発現をベースに、老化関連遺伝子FOXO3の発現低下を加味したLBDモデルの開発を計画するものである。

## B. 研究方法

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 $\alpha$ -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、ウエスタンブロットィング、RT-PCR、免疫細胞化学などを用いて解析を行った。

モデルマウス作成のために $\alpha$ -syn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を行い、目的とするマウスの選定を行った。

さらに、上記のSH-synを用い、昨年度スクリーニングでピックアップした治療薬候補化合物についてその作用機序の探索を行った。また、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についてもその作用機序、投与方法などの検討を行った。

### (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。

今年度、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) 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。
- ii) 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

### 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も示された。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要因となっていることが判明した。さらに、SH-syn における  $\alpha$ -synuclein モノマーは FOXO3 のノックダウンにより減少することがわかり、FOXO3 の機能低下が細胞毒性を示すと言われているモノマーからオリゴマーへの重合変化に関与することが疑われた。

### 加齢を考慮した新たな LBD モデルマウス作成

現在、作成途中であるが genotyping、繁殖、交配にとくに問題なく経過している。

### LBD 新規治療薬の探索

昨年度スクリーニングによりピックアップした新規治療薬候補について予想される作用機序の探索を行いその手がかりを見出しつつある。食品由来の低分子化合物についても一連の作用機構についてその機序を見出してきている。

## 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 ノックダウンによる影響が大きい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や本年度得られた凝集体形成への関与などについても引き続き解析を行う。

加齢を考慮した新たな LBD モデルマウスは現在作成中で、今後その妥当性について表現型、生化学的、病理学的など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ていく予定である。

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して研究を続けたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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.

2. 学会発表

- 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.

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