

長寿医療研究開発費 平成25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

認知症や老人性難聴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。これまでの先行研究で、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マウスを使って、老人性難聴およびアルツハイマー病（AD）に対する新規解析モデルシステムの確立に成功している。そこで、本年度はこれまでの研究を発展させ、発症メカニズムの解明だけではなく、個体レベルのスクリーニングによる治療薬の開発を目指した。その結果、老人性難聴の発症においては酸化ストレス応答と炎症応答が相互に抑制することにより感覚細胞の生存維持が保たれていることが解ってきた。認知症に関しては、ショウジョウバエ AD モデルを用いた個体レベルでの薬剤探索を開始したところ、アミロイドベータ（ $A\beta$ ）の神経毒性効果を抑制する薬剤候補が得られてきた。さらに、新たに開発した AD マウスモデルが $A\beta$ の毒性を短時間で経時的かつ定量的に判定できることが明らかになった。

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、老人性難聴や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

老人性難聴の発症メカニズム

これまで、老人性難聴の発症には酸化ストレス応答や炎症応答が関わっていることが示唆されてきているが、これらストレス応答同士の関係に関してはあまり解っていない。我々は、これまで老人性難聴を研究するモデルとして、加齢性難聴疾患である **ocular albinism with late-onset sensorineural deafness (OASD)**の原因因子として知られるヒト **TBL1**に注目して研究を行ってきた。これまでに、ショウジョウバエ **TBL1** ホモログである **Ebi** のドミナントネガティブ型を複眼で過剰発現するシステムを確立し、老人性難聴の解析モデルを構築している (Lim et al. 2012)。Ebi の作用としては酸化ストレス応答の下流で働く **AP-1** と共役することにより細胞死関連遺伝子の発現を抑制していることを明らかにしている。本年度では炎症応答シグナルとして知られる **TNF-alpha** シグナルと **Ebi/AP-1** との関係を詳しく解析した。

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°C** から **29°C** に上昇させるだけで神経細胞における変異型 **A β** の同調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。そこで、これらの系統に企業から提供を受けた天然物由来のライブラリーを投与することにより、行動異常を回復する薬剤のスクリーニングを行った。

ショウジョウバエを用いた AD 重篤化メカニズムの解明

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** 等の産生に続き、**A β 42** の N 末端がピログルタミル化 (pE 化) 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。AD 患者では pE 化に必須な酵素であるグルタミルシクラーゼ (QC) の遺伝子発現が高まっていることが観察されていることから、QC の発現と AD 発症との間には密接な関係があることが疑われているが、詳しいことは解っていない。そこで、ショウジョウバエに **A β 42** を発現するモデル系を用いて、**A β** と QC 遺伝子発現との関係を遺伝学的な解析手法で詳細に検討した。

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 マウスにおける **A β** の発現を確認するとともに、聴覚の異常に関して聴性脳幹反応 (ABR) を用いて検出することにより、AD モデル系としての有効性を確かめた。

(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

老人性難聴の発症メカニズム

Ebi による転写制御機構を解析したところ、Ebi は AP-1 ばかりではなく NF-kappaB の転写にも関わり、AP-1 と NF-kappaB との相互作用に関与していることが示唆された。そこで、NF-kappaB と AP-1 の上流で機能する TNF-alpha シグナルに注目して ebi との関係を詳しく解析した結果、ebi は TNF-alpha によるアポトーシスの誘導を抑制していることが確かめられた (Lim *et al.* 投稿中)。

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

これまで確立したショウジョウバエ AD 解析モデルに対する薬剤投与方法を検討して、多量の薬剤を取り込ませる条件を確立した。そこで、企業から提供を受けた 88 種類の天然物ライブラリーを AD モデルショウジョウバエに投与することにより、行動異常に対する影響を観察した。これまでに、20 種類の薬剤を検定して、この中から行動異常を約 15% 回復する薬剤を同定している。

ショウジョウバエを用いた AD 重篤化メカニズムの解明

Aβ42 の過剰発現により QC 遺伝子発現が誘導されることを見いだした。この Aβ42 による QC 遺伝子発現誘導は Tau の機能欠損型変異で抑制されることから、Tau 依存的であることが予想された。これを支持する結果として、FTDP-17 の疾患で見つかった変異型 Tau (Tau^{R406W}) 単独でも QC 遺伝子発現の上昇が確認された。

マウス新規 AD 解析モデル

Aβ42^{Arc} を内耳有毛細胞で発現する系統の蝸牛切片を作成して、免疫電顕により Aβ の局在を検討したところ、Aβ は有毛細胞の内外に観察された。そこで、聴性脳幹反応 (ABR) により聴力を測定した結果、生後 4 ヶ月で高音域 (16~32kHz) の聴力が特異的に低下していることが確認された。

D. 考察と結論

これまでの研究からショウジョウバエを用いてアルツハイマー病の原因因子であるアミロイドベータ蛋白質の毒性を短時間 (8 日) でアッセイするシステムの確立に成功している。この系では多くの個体が同調的に発症するので薬剤スクリーニングに優れた系であることが予想される。この系を用いて同定されている天然物化合物に関しては、作用点を確認すると同時に、当研究室で確立された新規 AD マウスモデルに投与して、効果を検定していきたい。

AD 重篤化におけるメカニズムの一つとして QC 発現制御が予想されていることから、今回の研究結果は AD 重篤化を理解するために重要になることが期待される。今後は、Aβ42 から QC 発現誘導に至るシグナル伝達について詳しく解析することにより、AD に対する新たな創薬ターゲットとしての可能性を探っていきたい。

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に影響を与えていることから、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 $A\beta 42$ 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、 $A\beta$ 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。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) 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)

2. 学会発表

- 1) 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、平成 25 年 12 月 4 日 (水)、神戸
- 2) **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
- 3) 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

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。