

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19486

研究課題名(和文)メダカを用いたパーキンソン病の遺伝学的研究

研究課題名(英文)Genetic research on Parkinson's disease using medaka fish

研究代表者

上村 紀仁(Uemura, Norihito)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：90749045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病のリスク遺伝子であるGBA - / - メダカは、脳内神経炎症を伴った神経細胞死と  $\alpha$ -Syn蓄積を示す。本研究では、同変異メダカにおいて、神経炎症の病態への関与を解析した。CRISPR/Cas9により、TLRsのアダプター分子であるメダカMyD88とTRIF遺伝子の破壊に成功した。MyD88 - / -、TRIF - / - メダカ共に、明らかな表現型の異常を認めなかった。そこで、GBA - / - MyD88 - / -、GBA - / - TRIF - / - メダカの解析を行ったが、GBA - / - メダカと比較して神経細胞脱落や生存期間の改善を認めず、MyD88とTRIFを介したシグナル経路の病態への関与は明らかでなかった。

研究成果の概要(英文)：GBA mutations are the strong risk factor of Parkinson's disease. We have developed GBA - / - medaka which display neuronal loss and alpha-synuclein accumulation accompanied with neuroinflammation. In this study, we analyzed the association of neuroinflammation with the pathophysiology in GBA - / - medaka. MyD88 and TRIF are the adaptor molecules of TLRs. We successfully established MyD88 and TRIF knock-out medaka by CRISPR/Cas9. MyD88 - / - and TRIF - / - medaka did not show any apparent abnormal phenotypes. Therefore, we analyzed GBA - / - MyD88 - / - and GBA - / - TRIF - / - medaka, but any improvement in the neuronal loss or life span was not observed in those double mutant medaka compared to GBA - / - medaka. These results suggest that signal pathways via MyD88 and TRIF do not associate with the pathophysiology in GBA - / - medaka.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 ゴーシェ病 自然免疫 メダカ

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は運動障害を主徴とする進行性の神経変性疾患であり、病理学的には  $\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ -Syn) の凝集体であるレヴィ小体形成を伴うドパミン神経細胞死を特徴とする。我が国の患者数は 15 万人以上であり、病態解明と治療法開発は急務である。近年、遺伝学的研究から、ゴーシェ病の原因遺伝子である *glucocerebrosidase* (*GBA*) の変異が強力な PD のリスクとなることが明らかとなった。我々は最近、*GBA* を欠失するゴーシェ病モデル (*GBA*<sup>-/-</sup>) メダカに、脳内に神経炎症と神経細胞死を伴い、 $\alpha$ -Syn が蓄積することを見出した。PD の病態においても、神経炎症の重要性が考えられているが、機序や治療標的としての可能性については不明な点が多い。

PD において、脳内、特に中脳黒質において炎症が起こっていることが示されているが (Hirsch EC, et al. *Lancet Neurol* 2009)、病態への関与については不明な点が多い。このため、我々は *GBA*<sup>-/-</sup> メダカにおいて神経炎症の病態への関与を調べることを想起した。これまでにゴーシェ病モデルマウスの解析により、神経炎症は receptor-interacting protein kinase-3 (RIP3) 依存的に起こっていることが報告されている (Vitner EB, et al. *Nat Med* 2014)。RIP3 は Toll-like receptors (TLRs) の下流にあり、これはゴーシェ病の神経炎症が TLRs シグナルを介していることを示唆する。一方、TLR4 を介して炎症を惹起する lipopolisaccharide を投与した野生型マウスにおいて、神経炎症、神経細胞死と脳内  $\alpha$ -Syn 凝集体形成が認められ、 $\alpha$ -Syn 欠失マウスでは神経細胞死が抑制されたとの報告がある (Gao HM, et al. *J Neurosci* 2008)。これは、神経炎症が  $\alpha$ -Syn を介してドパミン神経細胞に対して毒性を持ち、細胞死を引き起こすことを示唆する。

### 2. 研究の目的

本研究では、*GBA*<sup>-/-</sup> メダカにおいて、神経炎症が病態にどのように関与しているかを解明することを目的とする。具体的には、TLRs を介する神経炎症を遺伝学的に抑制することにより、生存期間、神経細胞死や  $\alpha$ -Syn 蓄積への影響を観察し、ゴーシェ病とパーキンソン病の病態機序を解明する。

### 3. 研究の方法

まずはメダカの *MyD88*, *TRIF* のクローニングと塩基配列決定を行う。次に CRISPR/Cas9 system にてこれら遺伝子破壊を試みる。*MyD88*, *TRIF* それぞれの欠失体作製が成功すれば、これら単独のホモ接合型変異体 (*MyD88*<sup>-/-</sup>, *TRIF*<sup>-/-</sup>) の表現型の確認を行う。これらが、研究継続が困難な表現型を示さないことが確認されれば、*GBA* 変異メダカとの交配により *GBA*<sup>-/-</sup>*MyD88*<sup>-/-</sup>, *GBA*<sup>-/-</sup>*TRIF*<sup>-/-</sup> メダカを作製し、それらの表現型を解析する。両

二重変異体で何らかの表現型の改善所見が見られた場合は、三重変異体 *GBA*<sup>-/-</sup>*MyD88*<sup>-/-</sup>*TRIF*<sup>-/-</sup> の作製と解析も試みる。

### 4. 研究成果

まず、メダカ *MyD88* と *TRIF* をクローニングし、コーディングリージョンの塩基配列を決定した。メダカ *MyD88* は 288 アミノ酸、メダカ *TRIF* は 577 アミノ酸よりなる蛋白質であった。次に CRISPR/Cas9 system による遺伝子破壊を試みた。いずれの遺伝子についても 3 種類の crRNA を設計し、一細胞期の受精卵にマイクロインジェクションした。Heteroduplex Mobility Assay にて double strand break を起こす効率を確認したところ、いずれの遺伝子についても良く機能する crRNA を得ることができた。最終的に、*MyD88* に関しては 4 塩基欠失により 51 番目のアミノ酸からフレームシフト変異を起こす変異体が、*TRIF* に関しては 10 塩基欠失により 40 番目のアミノ酸からフレームシフト変異を起こす変異体が得られた (図 1)。いずれの遺伝子に関しても、蛋白質の前半部分からフレームシフト変異を起こしており、機能は欠失していることが予想された。

図 1. MYD88とTRIF欠失メダカの作出



いずれの変異体においてもヘテロ接合型変異体同士を交配し、ホモ接合型変異体 (*MyD88*<sup>-/-</sup>, *TRIF*<sup>-/-</sup>) を得た。*MyD88*<sup>-/-</sup>, *TRIF*<sup>-/-</sup> 共に、懸念された易感染性は問題にはならず、いずれも成魚になり得た。また、外観や泳ぎ方からは、明らかな表現型の異常は観察されなかった。*MyD88* 変異メダカ、*TRIF* 変異メダカ共に蛋白質レベルで欠失していることを確認するため、メダカ *MyD88* とメダカ *TRIF* に対するウサギポリクローナル抗体を作製し、野生型、*MyD88*<sup>-/-</sup>, *TRIF*<sup>-/-</sup> メダカ脳を用いて蛋白質レベルでの欠損の確認を試みたが、ウェスタンブロッティングでは、野生型メダカ脳でもいずれの蛋白質の発現も確認できなかった。脳におけるこれら蛋白質の発現が低い可能性を考えて、今後 whole body を用いての解析を予定している。

次に、*GBA*<sup>-/-</sup>*MyD88*<sup>-/-</sup>, *GBA*<sup>-/-</sup>*TRIF*<sup>-/-</sup> メダカ同士の交配を開始して *GBA*<sup>-/-</sup>*MyD88*<sup>-/-</sup>, *GBA*<sup>-/-</sup>*TRIF*<sup>-/-</sup> メダカの解析に着手した。*GBA*<sup>-/-</sup> メダカの特徴として、約 2 か月齢から異常回転運動が観察される。これは中枢神経の変性

を反映していると考えており、まずは異常回転運動発現時期に違い(改善)が見られるかを観察した。しかし、 $GBA^{-/-}MyD88^{-/-}$ 、 $GBA^{-/-}TRIF^{-/-}$ メダカ共に、 $GBA^{-/-}$ メダカと比較して異常回転運動発現時期に違いは見られなかった。さらに、神経細胞死の程度に改善が見られるか、視床ドパミン神経細胞(ヒト中脳黒質ドパミン神経細胞に相当)と青斑核ノルアドレナリン神経細胞を3ヵ月齢にてカウントした。サンプル数が少なく結論が出せていないものの、現在のところ、いずれの神経細胞群においても脱落の改善に乏しいという結果である(図2、3)。

図2.  $GBA^{-/-}MYD88^{-/-}$ 二重欠失メダカのドパミン・ノルアドレナリン神経細胞数

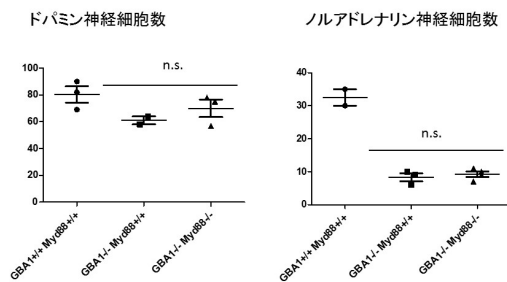
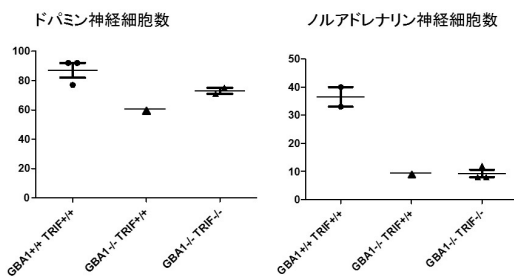
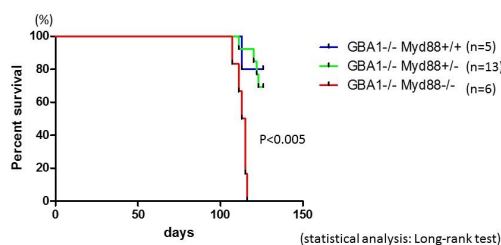


図3.  $GBA^{-/-}TRIF^{-/-}$ 二重欠失メダカのドパミン・ノルアドレナリン神経細胞数



また、 $GBA^{-/-}MyD88^{-/-}$ メダカの生存期間を解析したが、 $GBA^{-/-}$ と比較してむしろ短縮するという結果であった(図4)。

図4.  $GBA^{-/-}MYD88^{-/-}$ 二重欠失メダカの生存曲線



今後、 $GBA^{-/-}TRIF^{-/-}$ メダカの生存曲線、上記神経細胞のカウントのサンプル追加、炎症抑制効果の評価(魚類ミクログリアのマーカーである APOE の in situ hybridization、炎症性サイトカイン mRNA 定量測定)、 $\alpha$ -Syn 蓄積の評価(免疫組織染色、ウェスタンブロット)を行い、何らかの所見に改善が見られ

ないか、解析を予定している。

しかしながら、これまでに得られた結果からは、 $GBA^{-/-}$ メダカ、すなわち神経型ゴーシェ病においては、TLRs シグナルの阻害は病態を改善しないと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Uemura N, Koike M, Ansai S, Kinoshita M, Ishikawa-Fujiwara T, Matsui H, Naruse K, Sakamoto N, Uchiyama Y, Todo T, Takeda S, Yamakado H, Takahashi R. "Viable Neuronopathic Gaucher Disease Model in Medaka (*Oryzias latipes*) Displays Axonal Accumulation of Alpha-Synuclein", *PLoS Genet.* 2015, 11: e1005065, 査読有

Sawamura M, Uemura N, Takahashi R. "Innate immunity regulates  $\alpha$ -synuclein clearance", *Mov Disord.* 2016, 31:638, 査読無

上村紀仁、パーキンソン病の動物モデル、Pharma medica、2015、33、25-29、査読無

上村紀仁、メダカのパーキンソン病モデル、細胞工学、2015、34、1166-71、査読無

上村紀仁、メダカを用いたパーキンソン病研究、実験医学(増刊)、2016、34、187-194、査読無

[学会発表](計 12 件)

Norihito Uemura, Gaucher disease model in medaka displays axonal accumulation of alpha-synuclein, 第56回神経学会学術大会、2015年5月20日、新潟

Norihito Uemura, Etsuro Nakanishi, Masato Kinoshita, Hodaka Yamakado, Shun-ichi Takeda, Ryosuke Takahashi, Pathological role of the innate immune system in neuronopathic Gaucher disease model in medaka, 第38回日本神経科学学会、2015年7月30日、神戸

Norihito Uemura, Gaucher disease model in medaka displays axonal accumulation of alpha-synuclein, 第58回日本神経化学学会大会、2015年9月12日、さいたま

Norihito Uemura, Ryosuke Takahashi, Medaka fish model of Parkinson's disease, 10th GEO-PD、2015年10月2日、東京

上村紀仁、神経型ゴーシェ病メダカは軸

索にアルファシヌクレイン蓄積を示す、  
BMB2015、2015年12月3日、神戸

Seiji Kaji, Norihito Uemura, Takakuni Maki, Makoto Urushitani, Ryosuke Takahashi Pathological studies in Parkinson's disease, Symposium for Young Neurologists and Emerging Researchers Grooming for Interaction and Excellence in Science (SYNERGIES)、2016年3月10日、マニラ

Masanori Sawamura, Norihito Uemura, Ryosuke Takahashi, Does endogenic alpha-synuclein have protective property in human alpha-synuclein transgenic models?, 5th Asian and Oceanian Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress, 2016年3月13日、マニラ

Norihito Uemura, Ryosuke Takahashi, Viable neuronopathic Gaucher disease model in medaka (*Oryzias latipes*) displays axonal accumulation of alpha-synuclein, International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research, 2016年3月18日、名古屋

Etsuro Nakanishi, Norihito Uemura, Hisako Akiyama, Masato Kinoshita, Hodaka Yamakado, Takdeda Shunichi, Yoshio Hirabayashi, Ryosuke Takahashi, Pathological role of GBA2 in GBA1-deficient neuronopathic Gaucher's disease model of medaka, 第57回日本神経学会学術大会、2016年5月21日、神戸

Etsuro Nakanishi, Norihito Uemura, Hisako Akiyama, Masato Kinoshita, Hodaka Yamakado, Takdeda Shunichi, Yoshio Hirabayashi, Ryosuke Takahashi Pathological role of GBA2 in GBA1-deficient neuronopathic Gaucher's disease model of medaka, 第39回神経科学大会、2016年7月20日、横浜

Masanori Sawamura, Norihito Uemura, Ryosuke Takahashi, 内因性 alpha synuclein はヒト alpha synuclein transgenic 動物において表現型の出現を阻害するか?, 第39回神経科学大会、2016年7月20日、横浜

中西悦郎、上村紀仁、秋山央子、木下政人、山門穂高、武田俊一、平林義雄、高橋良輔、神経型ゴーシェ病モデルメダカの中枢神経における GBA2 の役割、第10回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres、2016年10月6日、京都

上村紀仁、神経型ゴーシェ病モデルメダカは軸索にアルファシヌクレイン蓄積を示す、日本放射線影響学会 - 第59回大会 -、2016年10月28日、広島

〔図書〕(計1件)

上村紀仁他、「パーキンソン病・パーキンソニズムの運動症状の治療」エキスパートに学ぶパーキンソン病・パーキンソニズム Q&A、南山堂、2017、pp86-91

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ:

パーキンソン病の解明に役立つメダカの作製に成功 - メダカが神経変性疾患の研究に貢献できる可能性 -

[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research\\_results/2015/150403\\_1.html](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2015/150403_1.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上村 紀仁 (UEMURA, Norihito)

京都大学・大学院医学研究科・特定助教  
研究者番号: 90749045

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

木下 政人 (KINOSHITA Masato)

京都大学・大学院農学研究科・助教

中西 悦郎 (NAKANISHI, Etsuro)

京都大学・大学院医学研究科・大学院生