

令和元年6月14日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09668

研究課題名(和文)新規オートファジーに着目した神経変性疾患の病態解明・治療法開発

研究課題名(英文) Analysis of neurodegenerative diseases by focusing on the alternative autophagy

研究代表者

藤掛 伸宏 (FUJIKAKE, Nobuhiro)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロジェクト助教

研究者番号：60467595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、

1) 脳特異的Aag4KOマウスを作成し、解析したところ、運動障害が生じることが明らかとなった。2) Atg5の欠損した培養細胞(Neuro2A Atg5 KO)において、TMD-2Bを培地に添加するとAtg5非依存型新規オートファジーを誘導することを明らかにした。3) Neuro2A Atg5 KO細胞では、tauタンパク質の分解は抑制されていなく、かつ、オートファジーを薬で止めると抑制されていた。4) そして、アルツハイマー病のモデルであるタウ発現マウスにTMD-2Bを投与したところ、治療効果らしきデータが得られた(nが少なく未統計処理)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病など多くの神経変性疾患は発症に寿命に関わり、現在のように超高齢化社会である日本では早急に治療法の確立が必要である。これらの疾患では、異常タンパク質が神経細胞内・外に蓄積し、細胞にダメージが蓄積してゆき、やがて神経細胞の脱落が生じて発症してゆく。それに対し細胞としては、タンパク質の蓄積を抑制する重要な機能の一つにオートファジーと呼ばれる細胞機能が有る。オートファジーとは、リソソームを利用し自己構成成分を分解するマシナリーである。本研究では、オートファジーを活性化することによりアルツハイマー病の発症を抑制する可能性を示した重要な研究である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed that

1) On the other hand, brain-specific Aag4 KO mice were constructed and analyzed, and it became clear that movement disorders occurred. 2) in cultured cells deficient in Atg5 (Neuro2A Atg5 KO), it was revealed that the addition of TMD-2B to the medium induces Atg5 independent autophagy. 3) in the Neuro2A Atg5 KO cells, the degradation of tau protein was not suppressed, and was suppressed when the autophagy was stopped with drugs, indicating that tau protein was degraded by Atg5 independent autophagy. 4) in a mouse model of Alzheimer's disease, TMD-2B has therapeutic effect.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：神経変性疾患 オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの神経変性疾患では、それぞれ異なる原因タンパク質が神経細胞内に凝集・蓄積し神経変性を引き起こす。そのため、オートファジーを介したタンパク質分解経路を活性化し、凝集タンパク質を除去することが神経変性疾患の治療に必須だと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、

- (1) 従来の Atg5 依存型オートファジーとは異なる Atg5 非依存型 Atg5 非依存的オートファジー経路が神経系で機能を有するか検討する。
- (2) 神経変性疾患に対するオートファジー活性化の治療効果を検討する。

3. 研究の方法

- (1) 我々の研究室で同定した alternative autophagy related gene 4 (AAG4) を、脳特異的ノックアウトしたマウスを樹立し解析を行う。解析方法は、体重測定、claspings、ローターロッド、歩幅測定を行い、異常が見つかったら対応する脳の部位を解析する。
- (2) 培養細胞を用いて、神経変性疾患の原因タンパク質の分解を誘導する薬剤を探し、神経変性疾患マウスモデルを用いて薬剤の *in vivo* での抑制効果を検討する。

4. 研究成果

(1) 従来の Atg5 依存型オートファジーとは異なる Atg5 非依存型 Atg5 非依存的オートファジー経路が神経系で機能を有するか検討する。

Aag4 脳特異的 KO マウスは体重減少を示す。

我々は Atg5 非依存型 Atg5 非依存的オートファジー関連遺伝子としてすでに複数の遺伝子を同定している (alternative autophagy related genes Aag1-5, Rab9)。本研究では、それらのうち機能の全く不明である Aag4 について、脳特異的ノックアウト (KO) マウスを樹立し解析を行った (Fig.1)。その結果、生後 10 週齢では優位な差は認めないが (AAG4^{flox/flox}: 22.64 ± 1.14g、AAG4^{flox/flox}; nestin-Cre: 19.5 ± 3.29g) 生後 20 週齢では優位に体重の低下を示した (AAG4^{flox/flox}: 28.28 ± 1.40g、AAG4^{flox/flox}; nestin-Cre: 22.8 ± 4.30g、*p* < 0.05, Bonferroni's multiple comparisons test)。

Aag4 脳特異的 KO マウスは運動機能障害を示す。

次に、Aag4 脳特異的 KO マウスの尻尾を持ち上げた結果、後ろ足に力を入れて体の方に近づける表現型を示した。これは claspings と呼ばれる表現型で、神経機能障害が生じる結果このような表現型を示す。

そこで次に、rotarod 解析を行った。マウスを回転する回転棒の上に乗せ、回転棒の回転する速さを加速してゆき、回転棒の上を歩けなくなるまでの時間を測定した。その結果、生後 10 週齢から優位に時間が短くなることを明らかにした (AAG4^{flox/flox}: 124 ± 49.16 seconds、AAG4^{flox/flox}; nestin-Cre: 86 ± 8.49 seconds、*p* < 0.05, Bonferroni's multiple comparisons test)。Rotarod の測定結果は、運動神経が異常になると回転棒に乗ることが困難となり優位に回転棒の上を歩いている時間の低下が生じる。さらに運動障害が生じているか確認するために、マウスの歩幅測定を行った。生後 10 週齢のマウスは体の大きさに優位な差は認めない (AAG4^{flox/flox}: 20.35 ± 0.73g、AAG4^{flox/flox}; nestin-Cre: 19.13 ± 0.21g、*p* > 0.05, Student's *t*-test)。このマウスに前足跡を赤、後足跡を青に染めて、紙の上を 15 cm 歩かせた結果、野生型のマウスに比べて、Aag4 脳特異的 KO マウスでは優位に足幅が短くなっていった (Fig.2、AAG4^{flox/flox}: 5.50 ± 0.12 cm、AAG4^{flox/flox}; nestin-Cre: 3.19 ± 0.49 cm、*p* < 0.01, Student's *t*-test)。以上の結果より、Aag4 脳特異的 KO マウスは運動障害を生じることが明らかとなった。

Aag4 脳特異的 KO マウスは小脳変性を引き起こす。

Aag4 脳特異的 KO マウスは運動障害を生じることから、小脳について解析を行った。10 週齢のマウスから小脳を取り出し、小脳における神経細胞のうちプルキンエ細胞(神経細胞の一

Fig.1 生後 20 週齢のマウス

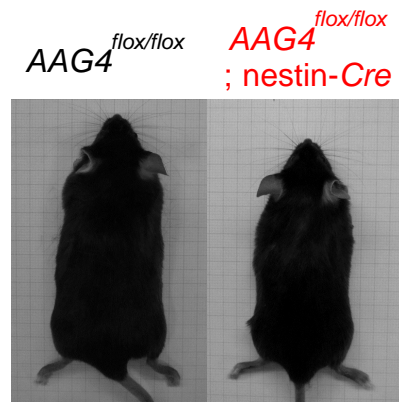
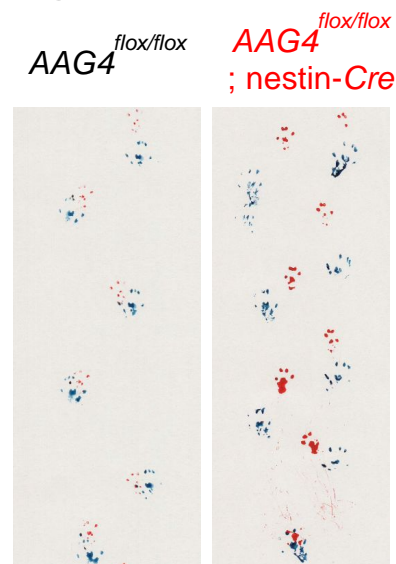


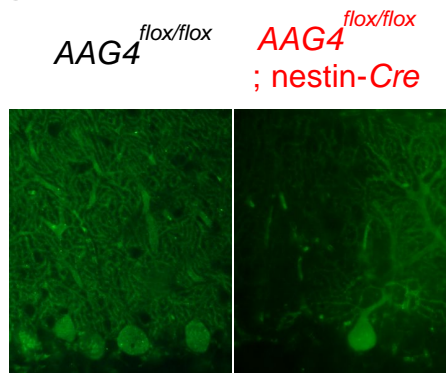
Fig.2 足跡解析



種)を染めてみた結果、Aag4 脳特異的 KO マウスではプルキンエ細胞が減少していた (Fig.3)。プルキンエ細胞が減少しているか確認するため、小脳の切片に対してヘマトキシリン・エオジン染色をして、プルキンエ細胞の数を数えてみたところ、

Aag4 脳特異的 KO マウスでは優位に細胞が脱落していることが確認できた ($AAG4^{flox/flox}$: 164.78 ± 8.95 cm、 $AAG4^{flox/flox}; nestin-Cre$: 49.85 ± 17.01 cm、 $p < 0.01$, Student's *t*-test)。次に、海馬の切片について NeuN 抗体を用いて神経細胞の核を染めてみたところ優位な差はなかった。以上のことから、小脳変性が生じていることが明らかとなった。さらに神経変性疾患原因タンパク質が蓄積していないか検討したが、優位な差はみられなかった。

Fig.3 小脳のプルキンエ細胞染色

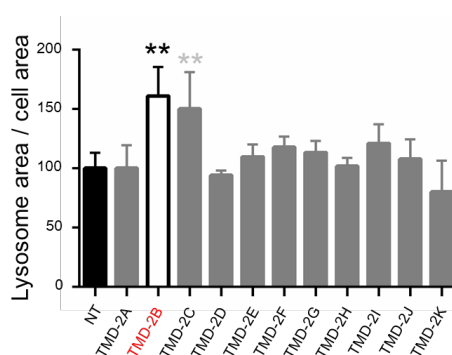


(2) 神経変性疾患に対するオートファジー活性化の治療効果を検討する。

オートファジー誘導化合物の同定

我々は、これまでに大規模化合物ライブラリーを用いたスクリーニングから、オートファジー誘導化合物をすでに複数同定している。今回の研究では、それらのうちから神経変性疾患の薬剤を同定することを目標としている。そのためには、まず血液脳関門をすり抜けることが重要であるため、オートファジー誘導化合物から既存薬であり、なおかつ脳の薬剤に既に使われているものを 11 化合物抽出した。次に、神経細胞において Atg5 非依存的オートファジーを誘導することが重要かと考えて、Neuro2a 細胞に CRISPR/Cas9 を用いて Atg5 を欠損させた細胞 (Neuro2a ATG5 KO) を用いて、薬剤を培地に加えた後にリソソームの大きさを Lamp2 で免疫染色することによって測定した。

Fig.4 新規オートファジ 誘導活性

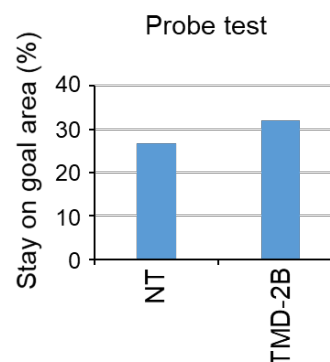


その結果、TMD-2B および 2C では、Lamp2 の肥大化が更新していることが明らかとなり (Fig.4) このことから、ライソソームの肥大化が起きているため、Atg5 非依存的オートファジが誘導されていると考えられる。このうち、TMD-2B は抗うつ薬として使用されており、アメリカでは FDA 認可がおりているため、TMD-2B について更なる研究を行った。TMD-2B が Neuro2A 細胞で Atg5 依存的なオートファジーも誘導するか検討した結果、細胞の培地に TMD-2B を加えると LC3 の II 型が徐々に増えたことから、Atg5 依存的なオートファジーも誘導することが明らかとなった。

アルツハイマー病マウスモデルの症状を抑制する。

次に、神経変性疾患のモデルで TMD-2B の薬剤の可能性を調べた。Neuro2A 細胞でいろいろな病気の原因タンパク質を発現させて、培地に TMD-2B を加え、western blot でタンパク質の分解が促進されているかどうか調べた。その結果、アルツハイマー病の原因タンパク質であるタウの分解が促進されることが明らかとなった。

Fig.5 Morris's water maze



そこで、TMD-2B がアルツハイマー病の治療薬となるかどうかを調べるため、異常タウを発現し発症する rTg4510 マウスに投与を行った。投与方法は、TMD-2B が飲み薬としてすでに使われているため、注射などではなく、ゾンデを用いて経口投与を行った。2ヶ月からマウスにゾンデで TMD-2B を投与し、6ヶ月齢まで毎週 2 回の投与を続け、6ヶ月齢で Novel object recognition task 及び Morris's water maze テストを行った。その結果、どちらも個体数が少ないため統計学的な解析はこれからだが、得られているデータは改善していた (Fig.5)。

(3) 考察

(1) で述べた通り、脳特異的 Atg5 非依存的オートファジ欠損マウスでは、小脳特異的に細胞が脱落していたため、Atg5 非依存的オートファジは小脳特異的に働くことが考えられる。これは、小脳ではなく海馬が脱落するアルツハイマー病モデルマウスでは、TMD-2B は Atg5 非依存的オートファジではなく Atg5 依存的なオートファジーを誘導するため治療効果が得られると考えられるかもしれない。しかし、a. Aag4 遺伝子はどの細胞でも発現していること、b. アルツハイマー病モデルマウスでは異常タウを発現していることから、Atg5 非依存的オートファジ

は小脳以外の細胞では、異常タウの蓄積などの異常な状態な細胞で働き、正常な状態に戻す働きをしていると考えられる。いずれにしても、Atg5 非依存的オートファジの研究が今後進むことで、明らかになるであろう。また、TMD-2B はアルツハイマー病に対する治療薬として、今後研究が進むことを切に願うものである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Fujikake N, Shin M, Shimizu S., Association Between Autophagy and Neurodegenerative Diseases., Front Neurosci. 2018 May 22;12:255. 査読有 doi: 10.3389/fnins.2018.00255. eCollection 2018.
2. Ishiguro T, Sato N, Ueyama M, Fujikake N, Sellier C, Kanegami A, Tokuda E, Zamiri B, Gall-Duncan T, Mirceta M, Furukawa Y, Yokota T, Wada K, Taylor JP, Pearson CE, Charlet-Berguerand N, Mizusawa H, Nagai Y, Ishikawa K., Regulatory Role of RNA Chaperone TDP-43 for RNA Misfolding and Repeat-Associated Translation in SCA31. Neuron. 2017 Apr 5;94(1):108-124.e7. 査読有 doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.046. Epub 2017 Mar 23.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 藤掛伸宏、清水貴美子、清水重臣、オートファジー活性化剤のタウオパチーに対する影響、第 41 回日本神経科学大会、2018
2. 藤掛伸宏、従来型 / 新規型オートファジーの活性化による神経変性疾患の治療法開発、難治疾患研究所研究発表会、2017
3. 藤掛伸宏、山口啓史、荒川聡子、清水重臣、脳における Atg5 非依存的オートファジーの役割、第 39 回日本分子生物学会年会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/index.html>

6 . 研究組織

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。