

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06485

研究課題名(和文) 老化するとなぜ神経組織の堅牢性は低下するのか

研究課題名(英文) Understanding of the aging process and neuronal tissue robustness

研究代表者

佐貫 理佳子 (SANUKI, Rikako)

京都工芸繊維大学・応用生物学系・助教

研究者番号：50607471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：なぜ神経変性疾患は多くが遅発性なのであろうか。本研究では老化の実験モデルとして、哺乳動物と比べて寿命が短いショウジョウバエを利用し、また神経組織の堅牢性を評価できる新しい神経変性モデルとして外傷性脳損傷(Traumatic brain injury, TBI)開発し、老化による堅牢性低下の分子機構を明らかにすることを目的とした。ショウジョウバエにTBI処置を行うと、若齢個体に比べて老化個体では自然免疫が異常に活性化されることが明らかになった。また、神経変性を抑制する効果を持つミノサイクリンは、老化個体には効果を示さないことが分かり、その原因としても自然免疫の過剰活性化が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷性脳損傷モデルは神経保護薬のスクリーニングに利用されてきた。しかし、これまでの神経保護薬は臨床試験において主要評価項目を未達のまま開発が中止されており、30年以上の間、効果のある薬が見つかっていない。基礎研究で使われる動物モデルに問題があると予想されているが、本研究によって神経保護薬の探索に利用してきた動物モデルが若すぎるのが一因ではないかと示唆された。神経保護薬を必要とする患者の多くは高齢者である。したがって、若い動物で有効性を示す化合物であっても、高齢者を対象とした試験ではその効果が無効化されるのではないかと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Why are so many neurodegenerative diseases late onset? In this study, we used *Drosophila* as an experimental model of aging, which has a shorter lifespan than mammals. The purpose of this study was to develop a new model of neurodegeneration to evaluate the robustness of traumatic brain injury (TBI) and to clarify the molecular mechanism of aging-induced robustness loss. The results showed that TBI treatment of *Drosophila* caused an abnormal activation of innate immunity in aged individuals compared to young ones. In addition, minocycline, which has an inhibitory effect on neurodegeneration, was found to be ineffective in aged flies, suggesting that the excessive activation of innate immunity is also the underlying factor.

研究分野：神経科学

キーワード：老化 堅牢性 外傷性脳損傷 神経組織 自然免疫

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病や緑内障といった晩年に発症する神経変性疾患の多くは、老年期に神経細胞が異常死して症状が現れる。興味深いことに、**80**歳以上のヒトの脳では、ほとんど例外なく神経変性疾患の要因とされる沈着物が溜まっているが、一部の人は病的な異常を示さない (**Nature, 2016, 539:180-186**)。なぜ神経変性疾患は多くが遅発性なのであろうか。またなぜ、神経変性を引き起こさない人がいるのであろうか。このような遅発性疾患における症状の顕在化の謎についてはほとんど明らかにされていない。申請者は神経組織には破綻しないための「堅牢性」が備わっていると考えている。遅発性神経変性疾患では、その原因と考えられる遺伝的・環境的因子に加え、老化による堅牢性の低下が鍵となり、疾患の発症を促すのではないかと仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

老化研究において、げっ歯類などの哺乳動物では、研究に使用する老化個体を得るために、年単位の膨大な時間を要する。そのため、寿命が短いショウジョウバエが神経変性疾患のモデルとして利用されてきた。例えばアルツハイマー病において、アミロイド斑に蓄積されるペプチドのAβ42の過剰発現系では、ショウジョウバエの神経系でAβ42による明確な神経毒性が現れる。しかし、このモデルでは早期から神経毒性を示し、短命であるため、Aβ42が病態原因の一つであることは分かるが、老化が与えた変化については評価ができない。マウスをはじめ、多くの遅発性神経変性疾患モデルで同様の課題があり (J. Alzheimer's Dis., 2008, (4):523-40)、堅牢性を理解するためには新たなモデルが必要である。そのため申請者は老化の実験モデルとして、哺乳動物と比べて寿命が短いショウジョウバエを利用し、また神経組織の堅牢性を評価できる新しい神経変性モデルとして外傷性脳損傷 (**Traumatic brain injury, TBI**) 開発し、さらにはショウジョウバエを用いた系によって老化による堅牢性低下の分子機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 外傷性脳損傷 (**TBI**) は外部からの物理的な力により脳が損傷することであり、**TBI** による脳損傷は外部からの衝撃によって直接引き起こされる一次性脳損傷と、経時変化に伴い出現する二次性脳損傷による変性に大別される。二次性脳損傷は神経変性疾患における中枢神経系の変性とメカニズムが似ていることが知られている。私たちはショウジョウバエを用いて新しい**TBI** モデルを作製した (図1AとB)。35Gの注射針を用い、直接知ショウジョウバエの右眼より脳を傷つけて、穿通性脳損傷モデルとした。これを成虫となって1週間の若いハエと1カ月の老化したハエを対象に行い、生存率や脳組織の細胞死について解析した。

(2) **NCBI** の **GEO** より老化ショウジョウバエの頭部や全身打撲を負ったショウジョウバエの遺伝子発現プロファイルを再開解析し、自然免疫関連の遺伝子に着目して、リアルタイム **qPCR** による発現量解析を行った。

(3) **TBI** による神経変性について哺乳動物でその効果が知られているミノサイクリンを用い、**TBI** 後のショウジョウバエに投与して生存曲線を解析し、若齢と老齢のハエにおける効果について比較した。

### 4. 研究成果

(1) 若いショウジョウバエと正常老化させたショウジョウバエに **TBI** を与え、死亡率を調べた (図1C)。その結果、損傷後1日後と7日後の両方において老化したショウジョウバエで死亡率が高くなった。さらに、**TBI** の1日後でショウジョウバエの脳をアポトーシスマーカーである活性型 **Caspase3** に対する抗体で染色して調べた (図1DとE)。老化したショウジョウバエでは若齢よりもアポトーシスを引き起こす細胞が多く存在した。**TBI** と老化との間では相互作用が認められ、老化したショウジョウバエに **TBI** 処置を行うこと

により多くの細胞死を招くことが示された。以上の結果から老化したショウジョウバエもヒトの場合と同様に **TBI** による二次性脳損傷の影響は老化により悪くなることが明らかとなった。

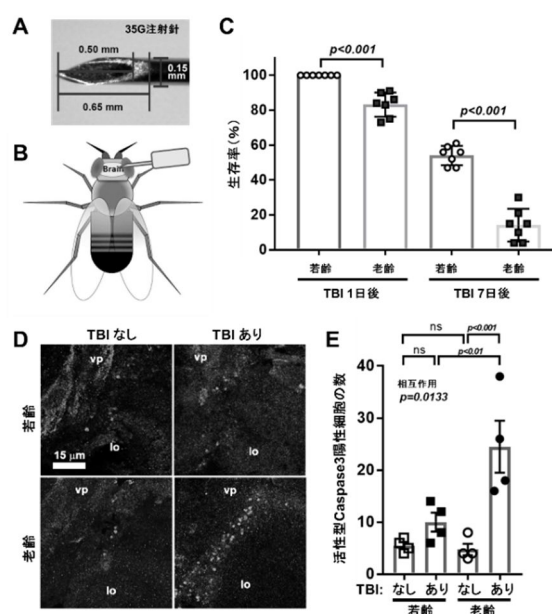


図1. **TBI** 処置は若齢にくらべて老化ショウジョウバエの死亡率を上昇させ、より多くの脳細胞死を誘導する。

(2) ショウジョウバエの自然免疫系は哺乳動物と同じく、下流に位置するNF-κBに相当する転写因子の核内移行により制御されており、IMD経路とToll経路の二つが大きな役割を持つことが知られている。哺乳動物との共通性はIMD経路と

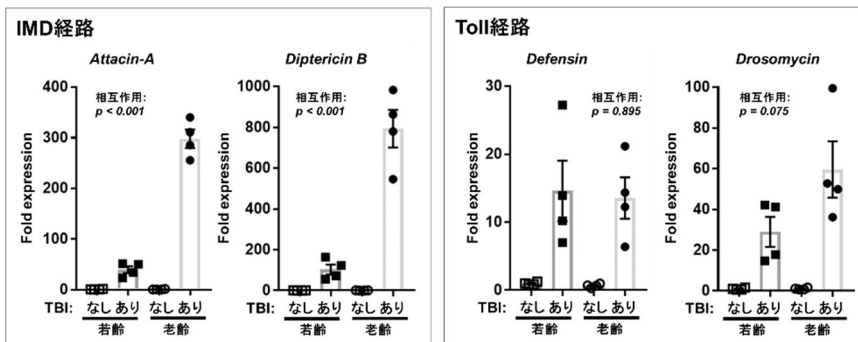


図2. TBIは老化ショウジョウバエのIMD経路を異常活性化させる。

TNF経路、Toll経路とTLR経路の間にある。また、哺乳動物の自然免疫系では主にサイトカインの転写が活性化されるが、ショウジョウバエでは抗菌ペプチド遺伝子の転写が活性化される。私たちはIMD経路由来の抗菌ペプチドであるAttacin-AとDiptericin BおよびToll経路由来の抗菌ペプチドであるDefensinとDrosomycinについて、若齢と老化時におけるTBIによる転写活性化への影響を調べた。定量的PCRを行ったところ、IMD経路のAttacin-Aが若齢のTBIでは平均で約40倍の増加だったのに比べ、老化のTBIでは300倍に、Diptericin Bが若齢のTBIでは平均で約100倍の増加だったのに比べ、老化のTBIでは800倍に転写が増大されており、老化とTBIとの間に強い相互作用が認められた。またこの相互作用は頭部のみならず、全身を対象として調べた場合でも認められた。しかし、Toll経路由来の抗菌ペプチド遺伝子ではTBIによる発現上昇は認められるものの、老化によるさらなる発現の増加はなかった。これより、老化ショウジョウバエにTBIを実施すると、IMD経路の自然免疫系が異常に増大することが示された。

(3) ミノサイクリンはテトラサイクリン系の抗生物質の一種であるが、哺乳動物のTBIモデルにおいて、神経保護効果をもたらすことが知られている。哺乳動物においてはミノサイクリンがNF-κBの核内移行阻害し、損傷部におけるミクログリアの活性化を抑え、抗炎症作用をもたらすことで神経保護効果に結び付くと考えられている。そこで私たちは、ショウジョウバエのTBIモデルでミノサイクリンが有効かを調べた。TBIの後に、

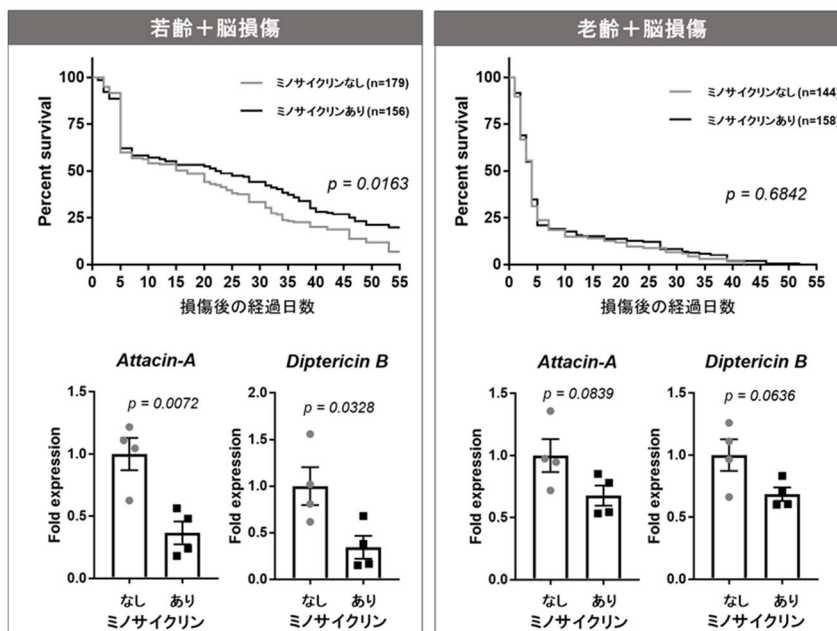


図3. TBI後の老化ハエにミノサイクリンを投与しても効果が打ち消される

ショウジョウバエを0.05 mMのミノサイクリンを含む餌で飼育した。 Kaplan-Meier法による生存曲線の解析を行い、ミノサイクリンの効果を調べた。その結果、若いショウジョウバエにTBIを与え、ミノサイクリンを経口投与すると、投与されていないものに比べて寿命が長くなった。ミノサイクリンはTBIに対して有効であることが分かる。しかし、老化したショウジョウバエにTBIを与えたものに対しては、寿命の延長効果が認められなかった。なぜミノサイクリンの効果が表れなかったのか、それを明らかにするために抗菌ペプチド遺伝子の発現を調べた。すると、若いショウジョウバエにTBIを与えたものではミノサイクリン投与群で、Attacin-AやDiptericin Bの発現量が60-70%有意に減少したが、老化したショウジョウバエでは3割程度の減少傾向にとどまった。先に述べた私たちの研究で、老化ショウジョウバエではTBIによる抗菌ペプチド遺伝子の上昇が若齢に比べて著しく、自然免疫を過剰に活性化させることが分かっている。したがって老化個体では、TBI状況下におけるミノサイクリンによる自然免疫への影響が弱く、このことが薬効の違いとなって現れたと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki Fumiko, Okuno Mariko, Tanaka Tomoya, Sanuki Rikako	4. 巻 25
2. 論文標題 Overexpression of neural miRNAs miR 9/9* and miR 124 suppresses differentiation to Muller glia and promotes differentiation to neurons in mouse retina in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 741 ~ 752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12809	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sanuki Rikako	4. 巻 25
2. 論文標題 Drosophila models of traumatic brain injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioscience	6. 最初と最後の頁 168 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2741/4801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sanuki Rikako, Tanaka Tomoya, Suzuki Fumiko, Ibaraki Kimihide, Takano Toshiyuki	4. 巻 80
2. 論文標題 Normal aging hyperactivates innate immunity and reduces the medical efficacy of minocycline in brain injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, and Immunity	6. 最初と最後の頁 427 ~ 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbi.2019.04.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山村友紀、佐貴理佳子
2. 発表標題 遺伝的背景を統一したショウジョウバエの自然免疫経路の制御による個体寿命の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 マウス網膜における神経マイクロRNA miR-9/9*とmiR-124のin vivo過剰発現はミユラーグリア細胞への分化抑制と神経細胞への分化促進を行う
2. 発表標題 マウス網膜における神経マイクロRNA miR-9/9*とmiR-124のin vivo過剰発現はミユラーグリア細胞への分化抑制と神経細胞への分化促進を行う
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 富美子、田中智也、佐貫理佳子
2. 発表標題 神経マイクロRNAの in vivo強制発現による細胞分化への影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中智也、佐貫理佳子
2. 発表標題 種間で保存性の高いマイクロRNAの機能の比較
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoya Tanaka, Kimihide Ibaraki, and Rikako Sanuki
2. 発表標題 Traumatic brain injury in aged Drosophila induces hyperactivation of innate immunity
3. 学会等名 第61回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐貴 理佳子, 田中 智也, 茨木 公英, 高野 敏行
2. 発表標題 神経変性の進行と神経保護薬の効果は加齢に伴い変化する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中智也、佐貴理佳子
2. 発表標題 エレクトロポレーション法によるショウジョウバエ胚及び3齢幼虫の脳への遺伝子導入法の確立
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Sanuki Lab <a href="https://sites.google.com/view/sanuki-lab">https://sites.google.com/view/sanuki-lab</a>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------