

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640061

研究課題名(和文) 超短命アフリカメダカは神経精神疾患モデルとなり得るか？

研究課題名(英文) Can short-lived African medaka be a model of neuropsychiatric disease ?

研究代表者

松井 秀彰 (Matsui, Hideaki)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：60710853

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)：本研究では超短命の脊椎動物であるアフリカメダカにおいて加齢以外になんら特別な処置なしに、ヒトパーキンソン病に酷似した病変が進んでいくことを見いだしました。すなわちアフリカメダカは加齢依存性に神経変性およびシヌクレイン陽性の凝集体の進展を示しました。これはまさにヒトパーキンソン病病理に瓜二つと言えます。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we found that Africa medaka (short-lived vertebrate) showed Parkinson-like pathology in age-dependent manner. This phenotype was not caused by genetic manipulation or toxin exposure but by aging. This medaka showed neurodegeneration and progression of alpha-synuclein pathology in older stage. This phenotype is very similar to human Parkinson disease phenotype.

研究分野：神経内科学

キーワード：アフリカメダカ

1. 研究開始当初の背景

人は自身の老化を制御したいというその欲望と老化に伴う致命的な疾患を予防したいという願いから、老化およびそれに伴う神経疾患等の疾病の研究は、多額の研究費を用いて様々なモデル生物を用いて行われている。酵母やショウジョウバエといった脊椎動物ではない種からの情報も、老化研究に大きく貢献している。一方で組織レベルの老化や疾患を問題にするのであればマウスのような高等な脊椎動物は大変有望なモデル生物であるが、研究に相当な時間がかかること、費用が高価であること、必要なスペースが広いこと、などいくつか困難な点がある。

従来、メダカやゼブラフィッシュといった小型魚類は主に、発生生物学の実験動物として利用されてきた。申請者はそれらを神経精神疾患のモデルとして利用し、これまで多数の神経精神疾患のモデルを作製することに成功してきた。確かにこれらの小型魚類はモデル動物として多くの利点を有するが、その生殖サイクルは3ヶ月で寿命は2~5年と、いずれもほぼマウスと同様の時を費やすために研究の律速段階となる事が多かった。

アフリカメダカはアフリカに分布する小型魚類で、わかっている範囲で脊椎動物で2番目に短命である。平均9週間で短い一生を終えるサイクルは内因的なものである。つまりこのサイクルは野生のみならず実験室内でも再現される。さらに加齢に伴い、臓器の萎縮、運動能力の低下、癌の発生頻度の上昇など、老化の様々な兆候を示す。小型魚類一般の利点も同様に有しており、老化やそれに伴う疾患の新しいモデルとなると期待される。

2. 研究の目的

ゼブラフィッシュやメダカは小型魚類の動物モデルとして、古くから発生学的研究など

で利用されており、近年では疾患モデル作製にも利用されている。小型で扱いやすい一方で、寿命が2~5年と長く、老化やそれに伴う疾患の研究には不向きな点があり、また生殖サイクルが3ヶ月とマウスと変わらない長さである点は研究の律速段階となる事が多かった。

本研究申請では脊椎動物で2番目に短命なアフリカメダカを用いる。アフリカメダカの生殖サイクルは1ヶ月と速く、実験室でも既に8週齢で老化の兆候を示し、寿命はわずか9週間である。このことを利用し、今までにない老化・神経精神疾患モデルの作製、ならびに研究速度の大幅な効率化を目指す。

3. 研究の方法

超短命アフリカメダカを老化研究や神経精神疾患モデルとして樹立することを目的とし本研究計画では2年の研究期間で以下の2つに取り組む。

A. 中枢神経の解剖図譜の作製、および老化または負荷による神経変性の有無の検討

B. 研究期間を縮小するモデル動物の樹立

これまで申請者がメダカやゼブラフィッシュで行ってきたようにニッスル染色や免疫組織学にて中枢神経の解剖を明らかにし、自然経過でのあるいは環境因子や遺伝因子による負荷下での神経精神疾患の表現型の有無を解析する。また小型魚類を用いた生物研究に要する期間を大幅に短縮できるかどうかチャレンジする。

A. 中枢神経の解剖図譜の作製、および老化または負荷による神経変性の有無の検討

すでにメダカやゼブラフィッシュで明らかにされた解剖図譜を参考に、ニッスル染色や免疫組織染色を用いて、ドパミン神経や小脳のPurkinje細胞など変性疾患の標的となる細胞群の解剖を中心に、その分布および神経

細胞数を明らかにする。ドパミン神経は Tyrosine Hydroxylase に対する抗体 (ドパミン神経とノルアドレナリン神経のマーカー) が広く様々な魚類でも利用可能であり、Abcam 社の抗体である AB152 や MAB318 がアフリカメダカでも使用できる可能性が高い。同様に Purkinje 細胞は zebrin II に対する抗体 (Purkinje 細胞のマーカー) が使用可能である。小型魚類は PFA よりもブアン固定の方が好ましいことが多く、ブアン固定後、パラフィン切片を作製し、標準の免疫組織染色あるいはニッスル染色を行う。抗体染色と並行してドパミントランスポーター (ドパミン神経のマーカー) と Carbonic anhydrase 8 (Purkinje 細胞のマーカー) に対する probe を使用し in situ hybridization を行い免疫組織染色で同定された神経群と比較し、ドパミン神経と Purkinje 細胞を確認する。ニッスル染色は全中枢神経のアトラス作製に利用し、免疫染色とあわせて論文発表や web 上での開示で広く参照可能なものとする。

次いで、4 週齢、8 週齢、12 週齢の各ステージ 10 個体程度で対象細胞のカウントを行い、老化による神経細胞数の変化を確認する。神経細胞数の減少が観察されれば、TUNEL 染色などアポトーシスの標識方法を組み合わせ、神経細胞死を確認する。ゼブラフィッシュやメダカでは 24 ヶ月の範囲で神経細胞数の減少は観察されないことから、この段階で負荷なしでアフリカメダカで神経細胞数の減少が確認されれば、それだけで老化および疾患モデルとして新たなものとなる。

B. 研究期間を縮小するモデル動物の樹立

申請者はこれまで小型魚類が in vivo イメージングに適している点に注目し、ゼブラフィッシュを用いて中枢神経におけるカルシウムイメージング、光遺伝学に利用してきた。現在はシナプス可塑性を同様に可視化する

ことに取り組んでいる。このような研究の際、導入したい遺伝子を受精卵にマイクロインジェクションすることで、遺伝子導入するが、第一世代はモザイクに対象遺伝子がゲノムに挿入されるため、第二世代、第三世代と世代を経ることで安定して対象部位全体に遺伝子を発現するものを選択し、管理維持する必要がある。生殖サイクルは 3 ヶ月であり、マイクロインジェクションから例えば第二・第三世代に至るまで最短でも 3 および 6 ヶ月要することになる。

アフリカメダカは短命であるだけでなく、その性成熟に要する期間は 1 ヶ月と既存の研究用小型魚類の 1/3 である。産卵後一度浸水状態から取り出し乾燥期間をおき、再度浸水する必要があり、その期間は個体により大きく異なる。卵の中から成長の早いものを繰り返し選別する事で、乾燥期間を短縮した系統を樹立する。すでに申請者は乾燥期間 1 ヶ月以内の系統を入手し飼育しているが、さらなる期間短縮を目標とし、マイクロインジェクションから第二・第三世代に至るまでの期間短縮および費用短縮を目指す。結果として研究全体の期間短縮、研究全体の生産性の向上を可能とする脊椎動物モデルとして確立する。

4. 研究成果

本研究では非常に難しいとされるアフリカメダカの経代維持および実験使用に成功した。特に特記すべきことに、アフリカメダカにおいては加齢以外何ら特別な処置なしにヒトパーキンソン病に類似の病変が進行した。すなわちアフリカメダカでは加齢依存性にドパミン・ノルアドレナリン神経の変性および シヌクレイン陽性の凝集体の進展を認めた。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Matsui H. Time course and Progression of Parkinson's Disease in Small Fish. Chronological change in Brain function Symposium, Chiba, Chiba University Inohana Campus, 2016/3/8

〔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:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 秀彰 (Matsui, Hideaki)

宮崎大学医学部・助教

研究者番号: 60710853

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: