

平成 28 年 4 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670442

研究課題名(和文)多重遺伝子改変メダカによる神経変性疾患の病態解明

研究課題名(英文) Analyzing the pathogenesis of neurodegenerative diseases using medaka with multigene mutations.

研究代表者

高橋 良輔 (Takahashi, Ryosuke)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90216771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)は、病理学的に中脳黒質ドパミン神経細胞の脱落と神経細胞内シヌクレイン(α -syn)凝集体形成を特徴とする。最近、GBAの変異がPDの強いリスクとなることが報告されており、本研究ではGBA欠失メダカを作製・解析した。同変異体は、他GBA欠失生物種と異なり、月単位で生存し病態の観察が可能であった。同変異体の脳に α -synの蓄積を認め、原因としてオートファジー・ライソソームの異常を考えた。さらに、 α -syn欠失メダカを作製と交配・解析、またヒト α -synトランスジェニックメダカを作製と交配・解析を行ったが、病態に変化を認めず、 α -syn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)：Parkinson's disease (PD) is pathologically characterized by dopaminergic neuron loss and intraneuronal α -synuclein (α -syn) aggregates. Recent genetic studies have revealed that GBA mutations confer a strong risk for PD. In the present study, we generated and analyzed GBA nonsense mutant (GBA -/-) medaka. In contrast to the perinatal death in other species lacking GBA, GBA -/- medaka survived for months, enabling analysis of the pathological progression. Pathological findings represented α -syn accumulation in their brains, which was caused by the impairment of autophagy-lysosome pathway. Furthermore, we generated α -syn deletion mutant medaka and human α -syn transgenic medaka. We crossed them with GBA mutant medaka respectively, but these double mutant medaka did not display any pathological changes. From these results, this study could not elucidate the pathological role of α -syn in GBA -/- medaka.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 メダカ シヌクレイン GBA

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は運動機能障害を主徴とする神経変性疾患であり、病理学的には神経細胞内 α -シヌクレイン (α -syn) 凝集体 (レビー小体) の形成を伴う黒質緻密部ドパミン神経細胞の脱落を特徴とする。ドパミン補充療法で一時的な運動症状の改善が見られるが、根治的治療法は無く、進行を抑制する治療法も未だに無い。我が国の患者数は 15 万人以上であり、今後、超高齢化社会を迎えるに当たって更なる患者数の増加が予想され、病態解明と治療法開発には大きな社会的ニーズがある。

PD 研究における大きな障害は、病態をよく再現するモデルが無いことである。げっ歯類、霊長類を含めて、汎用されているモデルは無い。これまで我々は、小型魚類のメダカを用いて PD 研究を進めてきた。直近では、TILLING 法にて家族性 PD の原因遺伝子 *PINK1* と *Parkin* ナンセンスメダカを作製し、二重変異体において、ミトコンドリアの機能低下と進行性のドパミン神経細胞の進行性脱落が見られることを報告した (Matsui H., et al. *Hum Mol Genet.* 2013)。また、同じく家族性 PD の原因遺伝子 *ATP13A2* スプライシング変異メダカを作製し、リソソーム機能障害と進行性のドパミン神経細胞脱落が見られることを報告した (Matsui H., et al. *FEBS Lett.* 2013)。メダカは PD 研究において大きな可能性を秘めているモデル動物であると言える。

最近、疫学研究からゴーシェ病の原因遺伝子 *GBA* (*Glucocerebrosidase*) の変異が PD の強いリスクとなることが報告された。我々は TILLING 法にて *GBA* ナンセンスメダカを作製し、解析を行った。*GBA* 欠失 (*GBA*^{-/-}) メダカは脳内に α -syn が蓄積することを見出した。また、透過型電顕による解析で、リソソーム内に異常構造物が蓄積し、軸索にオートファゴソームが蓄積していることを見出した。

2. 研究の目的

1 で述べたように、*GBA* 欠失メダカは PD の特徴である α -syn の蓄積を示し、PD の病態解明に有用なモデルとなる可能性を秘めている。同変異体をベースに、必要に応じて更なる遺伝子改変メダカを作製し、*GBA* 変異が PD 発症に繋がる機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

メダカは頻用されるモデル動物では無く、使用可能な遺伝子改変体や抗体が少ないなど、解析に不利な点もある。必要に応じてオートファゴソームやリソソーム等に蛍光タンパクを発現するトランスジェニック (Tg) メダカを作製し、*GBA* 欠失体の解析を進める。また、同モデルですで見出されている α -syn の蓄積が病態にどのように関わっているか

解析するため、 α -syn 欠失メダカを作製し、*GBA* 変異メダカと交配することにより、表現型がどのように変化するかを解析する。さらに、ヒト α -syn Tg メダカを作製し、これらメダカそのものの解析に加えて、*GBA* 変異体と交配することにより、表現型がどのように変化するかを解析した。

4. 研究成果

まず、TILLING 法にて作出した *GBA* 欠失メダカの表現型解析を行った。*GBA* 欠失マウスは出生間もなく致死的となり解析が困難であるのに対し、*GBA* 欠失メダカは月単位で生存し、病態の観察が可能であった。*GBA* 欠失メダカは 2 ヶ月齢で行動異常を示し、5 ヶ月齢までに死亡した。メダカを用いた研究では、利用可能な抗体が乏しいことが問題となるが、メダカ α -syn に対する抗体を作製し、免疫染色にて脳内に α -syn が蓄積することを見出した (図 1)。また、オートファゴソームとリソソームを検出可能な抗体を発見し、これらの異常を免疫組織学的・生化学的に観察した (図 1)。これらは、透過型電顕による解析で、リソソーム内に異常構造物が蓄積し、軸索にオートファゴソームが蓄積している所見と矛盾しなかった (図 2)。また、メダカ α -syn 抗体を用いた免疫電顕を行ったところ、オートファゴソームが蓄積した軸索に一致して α -syn が蓄積していることが確認できた (図 2)。この所見に関しても、LC3 抗体とメダカ α -syn 抗体を用いた蛍光二重染色にて、オートファゴソームと α -syn の蓄積部位が一致することが確認できた (図 3)。さらに、免疫組織染色と *in situ* ハイブリダイゼーションにて非選択的な神経細胞死とミクログリアの増生を見出した。

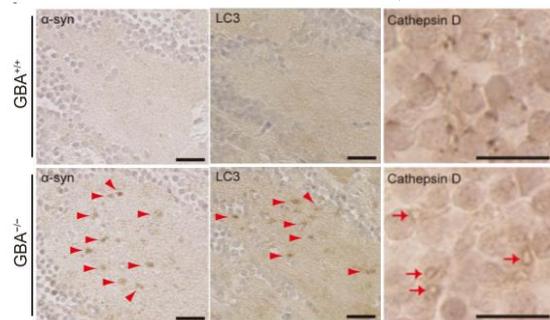


図 1. *GBA*^{-/-}メダカ脳免疫染色像。

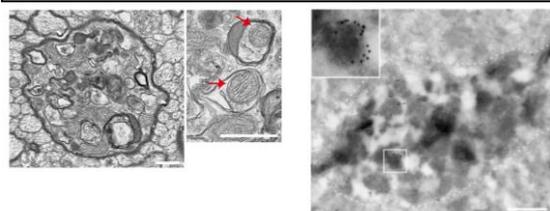


図 2. (左) *GBA*^{-/-}メダカ脳電顕像。軸索の腫脹と内部にオートファゴソームの蓄積を認める。オートファゴソーム内部に時にミトコンドリアを認める。(右) *GBA*^{-/-}メダカ α -syn 免疫電顕像。軸索腫脹部に一致してメダカ α -syn の蓄積を認める。

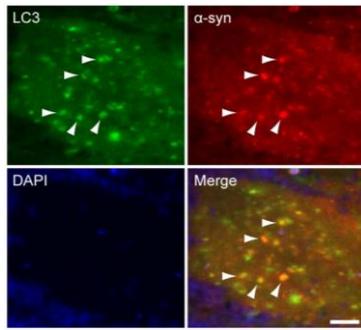


図3. (左) *GBA*^{-/-}メダカ脳二重免疫蛍光染色像。

次に、 α -syn 欠失 (α -syn^{-/-})メダカを TALENs にて作製した。同変異メダカは翻訳開始部位の直後に 11 塩基欠失を持ち、フレームシフト変異によって α -syn を欠失している (図4)。この変異メダカを *GBA* 変異メダカと交配し、*GBA*/ α -syn 二重欠失メダカを解析したが、生存期間、神経細胞脱落の程度は変化せず、本モデルにおける α -syn 蓄積の病態への関与は確認できなかった (図5)。一因として、*GBA* 欠失メダカにおいてはゴーシェ病としての表現型が強く、 α -syn 蓄積毒性が確認しにくくなっている可能性を考えた。*GBA* 欠失メダカと *GBA*/ α -syn 二重欠失メダカを解析した成果は論文として発表した (Uemura N, et al. PLoS Genetics 2015)。

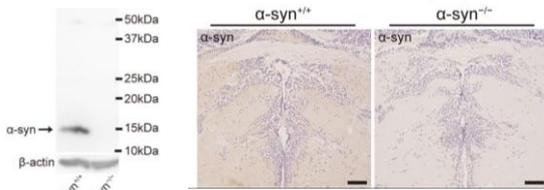


図4. (左) メダカ α -syn ウェスタンブロッティング。(右) メダカ α -syn 免疫組織染色像。

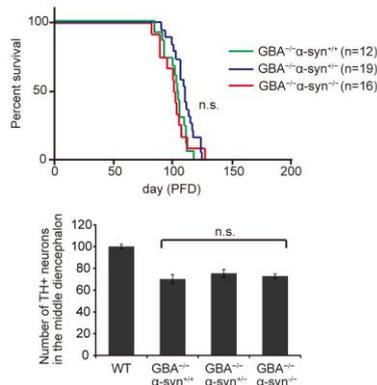


図5. (上) 生存曲線。(下) 3カ月齢における間脳ドパミン神経細胞数。

さらに、神経細胞特異的なメダカ GAP43 プロモーター下にヒト α -syn (WT, A30P, A53T) を発現するトランスジェニックメダカを作製した。それぞれ複数ラインを作製し、 α -syn の発現量が多いラインを選別し、そのラインそのものの解析に加えて、*GBA* 欠失メダカと交配・解析を行った (図6)。しか

し、9カ月齢まで観察したが、いずれのラインにおいても寿命、ドパミン神経細胞脱落は変化せず、さらにヒト α -syn 凝集体形成も認めなかった (図7)。以上から、*GBA* 欠失メダカにおける α -syn の病態への関与は明らかではなかった。

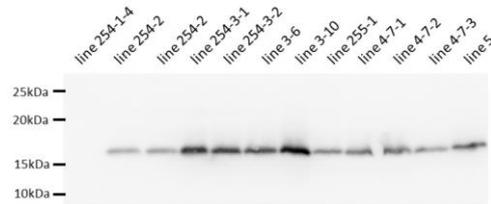


図6. (左) ヒト α -syn ウェスタンブロッティング。

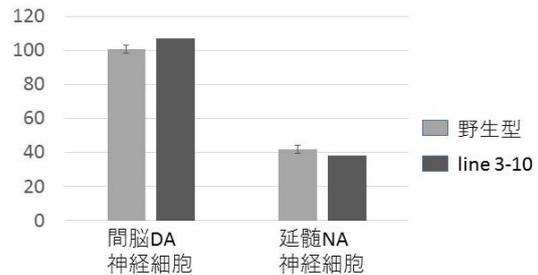


図7. 3カ月齢におけるドパミン(DA)、ノルアドレナリン(NA)神経細胞数。

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)

1. 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. 11(4): e1005065, 2015
2. Imai Y, Kobayashi Y, Inoshita T, Meng H, Arano T, Uemura K, Asano T, Yoshimi K, Zhang CL, Matsumoto G, Ohtsuka T, Kageyama R, Kiyonari H, Shioi G, Nukina N, Hattori N, Takahashi R. The Parkinson's Disease-Associated Protein Kinase LRRK2 Modulates Notch Signaling through the Endosomal Pathway. PLoS Genet. 2015 Sep 10;11(9):e1005503. doi: 10.1371/journal.pgen.1005503. eCollection 2015 Sep.
3. Sawamura M, Uemura N, Takahashi R. Innate immunity regulates α -synuclein clearance. Movement Disorders. Epub ahead of print

doi:10.1002/mds.26571

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

5. 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

[学会発表] (計 12 件)

1. 上村紀仁、石川智子、木下政人、小池正人、松井秀彰、山門穂高、植村健吾、内山安男、藤堂剛、武田俊一、高橋良輔、GBA 変異メダカは脳に alpha-synuclein 凝集体を形成する、第 55 回日本神経学会学術大会、2014 年 5 月 24 日

2. 上村紀仁、石川智子、木下政人、小池正人、松井秀彰、山門穂高、内山安男、藤堂剛、武田俊一、高橋良輔、GBA 変異メダカは軸索内に alpha-synuclein 凝集体を形成する、第 23 回日本 Cell death 学会、2014 年 7 月 18 日

3. Yosuke Taruno, Hideaki Matsui, Norihito Uemura, Hodaka Yamakado, Ryosuke Takahashi
Pathological role of GBA2 in GBA1-deficient neuronopathic Gaucher's disease model of medaka
第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 30 日、神戸

4. Norihito Uemura, Tomoko Fujiwara-Ishikawa, Masato Kinoshita, Masato Koike, Hideaki Matsui, Hodaka Yamakado, Yasuo Uchiyama, Takeshi Todo, Shun-ichi Takeda, Ryosuke Takahashi,
Alpha-synuclein accumulation in Gaucher disease model of medaka does not contribute to neurodegeneration, 第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 12 日、神戸

5. Ryosuke Takahashi
Current Perspectives and Future Directions, ASEAN Neuroscience 2015、2015 年 7 月 31 日、シンガポール、

6. 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

7. 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 9 月 12 日、神戸

8. Norihito Uemura, Ryosuke Takahashi,
Medaka fish model of Parkinson's disease、

10th GEO-PD、2015 年 10 月 2 日、東京

9. 生野真嗣、浅野剛史、山門穂高、高橋良輔、孤発性パーキンソン病の遺伝的リスク因子を利用した新しいパーキンソン病モデルマウス作製の試み

第 9 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres、2015 年 10 月 16 日、東京

10. 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

11. Masanori Sawamura, Norihito Uemura, Ryosuke Takahashi
Does endogenous 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

12. 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

[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

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

高橋 良輔 (TAKAHASHI Ryosuke)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90216771

(2)研究分担者：なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者

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