

令和元年6月12日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08637

研究課題名(和文) 加齢依存的神経変性におけるアストロサイトとオリゴデンドロサイトでの自然免疫の役割

研究課題名(英文) Roles of glial innate immunity in age-related neurodegeneration

研究代表者

飯島 浩一 (IIJIMA, Koichi)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センターアルツハイマー病研究部・部長

研究者番号：50632535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Toll様受容体が介する自然免疫シグナルの慢性的変化は、アルツハイマー病をはじめとする多くの加齢依存性神経変性疾患の病態に寄与すると考えられている。本研究では、ショウジョウバエを用いて神経変性に対するToll様受容体の作用について解析した。その結果、9種類のToll様受容体のうち、Toll-9が加齢、またはタウタンパク質の蓄積の過程で活性化され、神経変性を増悪化させる作用をもつ可能性が示唆された。さらに、グリア細胞でTl/Toll、18w/Toll-2、Toll-6の発現を抑制すると加齢依存的に神経変性が惹起され、一部のToll様受容体はハエ脳で神経保護的な作用を有することも分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの加齢依存性神経変性疾患において、脳内での炎症反応の慢性的亢進が病態の進行と密接に関連すると考えられ、グリア細胞における免疫シグナルが治療薬標的として注目されている。Toll様受容体は自然免疫において重要な役割を担うが、その変化が神経変性へ及ぼす影響は明らかでない。本研究の結果から、ヒトのToll様受容体と最も相関性が高いToll-9の活性化が、加齢、またはタウにより惹起される神経変性を促進することが示された。一方で、一部のToll様受容体は神経保護的作用を有する可能性も分かり、Toll様受容体がアルツハイマー病等の神経変性疾患の発症機序の理解から治療法の開発につながる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Toll-like receptors (TLRs) are evolutionarily conserved pattern recognition receptors that play central roles in innate immunity. Recent evidence suggests that dysregulation of TLRs are involved in a number of neurodegenerative diseases, including Alzheimer's diseases. We utilized *Drosophila* to investigate roles of TLRs in neurodegeneration. We found that among 9 TLRs, mRNA expression levels of Toll-9 were increased during aging, and overexpression of Toll-9 in adult retina induced age-dependent neurodegeneration. We further demonstrated that Toll-9 expression was increased in fly model of tauopathy, and knockdown of Toll-9 suppressed tau-mediated neurodegeneration. These results suggest that induction of Toll-9 is involved in neurodegeneration in flies. We also found that knockdown of Tl/Toll, 18w/Toll-2, and Toll-6 in glial cells caused age-dependent locomotor defects and neurodegeneration. These results suggest that some of TLRs play neuroprotective roles in flies.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：アルツハイマー病 神経変性疾患 加齢 自然免疫 Toll様受容体 グリア細胞 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

グリア細胞は神経細胞に対する構造的な支持、栄養の供給と放出された神経伝達物質やイオンの除去など、脳内環境の維持に必須な役割を担う。近年、グリア細胞をはじめ神経細胞以外の細胞で起こる慢性的な変化が、アルツハイマー病など多くの加齢依存性神経変性疾患の発症機構に関与していることが明らかとなった。これら疾患の患者脳では、特に炎症反応の亢進と自然免疫シグナルの変化が報告されている。脳内の自然免疫は主にミクログリアが担うことから、自然免疫と神経変性疾患に関するこれまでの先行研究は、ミクログリアに焦点を当てて進められてきた。しかし、自然免疫シグナルはほぼすべての細胞に備わっており、神経変性の過程ではアストロサイトやオリゴデンドロサイトにおいても自然免疫シグナルの活性が上昇していると考えられる。しかし、これらグリア細胞における自然免疫シグナルの慢性的な変化が、加齢依存性な神経変性疾患の発症や病態の進行に果たしている役割は明らかではない。

ヒトとショウジョウバエの間では自然免疫シグナルがよく保存されており、ハエには9種類のToll様受容体が存在する。また、ショウジョウバエ脳組織にも哺乳類脳に対応するような特徴的な性質をもつグリアサブタイプが存在し、それら細胞特異的な遺伝子発現制御を行うためのツールも整っている。アルツハイマー病をはじめとする老年性の神経変性疾患の患者脳においてタウタンパク質の蓄積がしばしば見られることから、タウの異常は多くの神経変性疾患に共通するメカニズムにかかわると考えられている。申請者は、タウ神経毒性モデルショウジョウバエを確立し、ショウジョウバエを遺伝学的モデルとして用いて、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患の分子メカニズムについて新たな知見を数多く報告してきた。

本研究では、アストロサイト、またはオリゴデンドロサイトにおける自然免疫の変化が、1) 加齢依存的に神経変性を惹起するか、2) タウを発現する神経変性疾患モデルショウジョウバエにおいて、タウの異常リン酸化や神経変性等の脳病態を増悪化させるか、について検討を行う。本研究は、未だ明らかではないアストロサイトとオリゴデンドロサイトにおける自然免疫シグナルと加齢依存性神経変性疾患の関係を明らかにすることで、自然免疫の切り口から脳の恒常性維持と破綻におけるグリア細胞と神経細胞のクロストーク研究に新たな局面を展開し、多くの神経変性疾患に共通する治療法の開発に発展する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、Toll様受容体が介する自然免疫シグナルの慢性的な変化と加齢依存性な神経変性の関係を明らかにする。具体的には、ショウジョウバエの遺伝学的モデルとしての利点を活かし、1) 9種類のToll様受容体の発現を抑制、あるいは過剰発現した時に、加齢依存性に神経失調、神経変性、および個体寿命へ生じる影響、2) タウ神経毒性モデルショウジョウバエにおいてToll様受容体の発現を操作した時に、タウの代謝異常、およびタウの神経毒性により惹起される神経変性への影響、という2点について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 研究室で確立した、複眼で特異的に発現するGMR-GAL4ドライバーにてヒトタウを発現させたショウジョウバエ(複眼タウモデル)と神経細胞特異的なelav-GAL4ドライバーにてヒトタウを発現させたショウジョウバエ(神経タウモデル)において、各Toll様受容体の発現変化を定量的RT-PCR(qRT-PCR)を用いて解析した。

次に、複眼タウモデルに各Toll様受容体のRNAiシステムを交配し、Toll様受容体の発現低下がタウの神経毒性に及ぼす影響を調べた。具体的には、各Toll様受容体の発現低下がタウの神経毒性により惹起される神経変性へ及ぼす影響について、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施したハエ脳組織切片における視神経軸索脱落の定量的評価、またタウの総タンパク質量やリン酸化レベルの変化についてウェスタンブロット法による定量的評価を行った。

(2) 各Toll様受容体の発現レベルが、ショウジョウバエ頭部中枢神経で加齢依存性に変化するかを、qRT-PCRを用いて調べ、さらにその変化が神経変性を惹起するかを、ショウジョウバエ複眼神経を用いて調べた。

(3) すべてのグリア細胞で特異的に発現するrepo-GAL4ドライバーを用いて、ショウジョウバエ脳組織のすべてのグリア細胞において各Toll様受容体の発現をRNAi法にて抑制し、加齢依存性に神経機能の低下、神経変性が惹起されるか、また個体寿命への変化が生じるかどうかについて調べた。当初は、アストロサイト、あるいはオリゴデンドロサイトに特異的なGAL4ドライバーを用いて遺伝子発現操作を行う予定であったが、グリア細胞における各Toll様受容体の発現様式が詳細に解析されていないため、すべてのグリア細胞で各Toll様受容体の発現を抑制してその影響を解析することとした。具体的には、クライミングアッセイ法を用いた加齢依存性な運動変化の定量的評価、HE染色を施したハエ脳組織切片における神経突起層の脱落の評価、羽化後の生存日数の解析による寿命への影響の評価を行った。

4. 研究成果

(1) アルツハイマー病をはじめとする多くの神経変性疾患の病態に關与する、タウの神経毒性に影響を及ぼす Toll 様受容体の網羅的な探索を行った。上述(「3. 研究の方法」参照)の神経タウモデル、および複眼タウモデル脳において各 Toll 様受容体の発現レベルを解析したところ、両方のモデルで *Toll-9* の発現が有意に増加していたことから、*Toll-9* はタウによる神経変性の過程で発現が誘導されることが示された。

次に、*Toll-9* の発現誘導がタウによる神経変性を抑制するのか、あるいは増悪化させるのかを調べるため、RNAi 法を用いて *Toll-9* の発現を抑制したところ、タウによって惹起される神経変性の程度が有意に抑制された。このときにタウのタンパク質総量、またリン酸化レベルに変化はなかったことから、*Toll-9* が活性化するとタウの代謝に影響を与えず、神経変性を増悪化する可能性が考えられた。

(2) *Toll-9* の発現が加齢によって変化するかを調べたところ、羽化後 7 日に比べ羽化後 40 日のショウジョウバエ頭部で *Toll-9* の発現が顕著に上昇していた。この結果から、*Toll-9* は加齢に伴う神経変性に關わる可能性が考えられた。そこで、*Toll-9* の過剰発現系統 (UAS 系統) を入手し、*Toll-9* の発現のみで神経変性が惹起されるかを検証した。既報の通り、GMR-GAL4 ドライバーを用いてショウジョウバエ複眼に発生前から *Toll-9* を過剰発現させると、重篤な複眼の形成異常が惹起された。次に、薬剤誘導性遺伝子発現システム (GeneSwitch システム) を用いて、発生・変態後の成虫期に *Toll-9* を複眼神経細胞に過剰発現させたところ、加齢依存的に神経変性が惹起された。これらの結果より、加齢による *Toll-9* の異常活性化は神経変性を惹起する可能性が示唆された。

(3) グリア細胞特異的に 9 種類の Toll 様受容体の発現を抑制し、加齢依存的に神経失調、神経変性、および個体寿命へ生じる影響を調べた。すべてのグリア細胞で発現する repo-GAL4 ドライバーを用いて各 Toll 様受容体の発現を抑制し、クライミングアッセイ法を用いて神経機能への影響を調べたところ、*Tl/Toll*、*18w/Toll-2*、*Toll-6* の 3 遺伝子について、加齢依存的に運動機能が有意に低下することが分かった。また、HE 染色を施した脳組織切片の解析により、中枢神経突起層 (central neuropil) において変性を惹起することが示された。以上の結果より、一部の Toll 様受容体はグリア細胞において神経機能の維持、また神経細胞の生存に關与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

(英文原著論文、査読あり)

1) Y. Sakakibara, M. Sekiya, T. Saito, T.C. Saido, & K.M. Iijima, Amyloid- β plaque formation and reactive gliosis are required for induction of cognitive deficits in *App* knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *BMC Neurosci* **20**:13, 2019. doi: 10.1186/s12868-019-0496-6.

2) A. Satoh, & K.M. Iijima, Roles of tau pathology in the locus coeruleus (LC) in age-associated pathophysiology and Alzheimer's disease pathogenesis. *Brain Res* **1702**: 17-28, 2019. doi: 10.1016/j.brainres.2017.12.027.

3) T. Chiku, M. Hayashishita, T. Saito, M. Oka, K. Shinno, Y. Ohtake, S. Shimizu, A. Asada, S. Hisanaga, K.M. Iijima, & K. Ando, S6K/p70S6K1 protects against tau-mediated neurodegeneration by decreasing the level of tau phosphorylated at Ser262 in a *Drosophila* model of tauopathy. *Neurobiol Aging* **71**: 255-264, 2018. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.07.021.

4) Y. Sakakibara, M. Sekiya, T. Saito, T.C. Saido, & K.M. Iijima, Cognitive and emotional alterations in *App* knock-in mouse models of A β amyloidosis. *BMC Neurosci* **19**: 46, 2018. doi: 10.1186/s12868-018-0446-8.

5) M. Sekiya, M. Wang, N. Fujisaki, Y. Sakakibara, X. Quan, M.E. Ehrlich, P.L. De Jager, D.A. Bennett, E.E. Schadt, S. Gandy, K. Ando, B. Zhang, & K.M. Iijima, Integrated biology approach reveals molecular and pathological interactions among Alzheimer's A β 42, Tau, TREM2, and TYROBP in *Drosophila* models. *Genome Med* **10**: 26, 2018. doi: 10.1186/s13073-018-0530-9.

6) Y. Sakakibara, M. Sekiya, N. Fujisaki, X. Quan, & K.M. Iijima, Knockdown of *wfs1*, a fly homolog of Wolfram syndrome 1, in the nervous system increases susceptibility to age- and stress-induced neuronal dysfunction and degeneration in *Drosophila*. *PLOS Genet* **14**(1): e1007196, 2018. doi: 10.1371/journal.pgen.1007196.

7) M. Sekiya, A. Maruko-Otake, S. Hearn, N. Fujisaki, Y. Sakakibara, E. Suzuki, K. Ando, & K.M. Iijima, EDEM function in ERAD protects against chronic ER proteinopathy and age-related physiological decline in *Drosophila*. *Dev Cell* **41**(6): 652-664, 2017. doi: 10.1016/j.devcel.2017.05.019.

8) M. Oka, N. Fujisaki, A. Maruko-Otake, Y. Ohtake, S. Shimizu, T. Saito, S. Hisanaga, K.M. Iijima, & K. Ando, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II promotes neurodegeneration caused by tau phosphorylated at Ser262/356 in a transgenic *Drosophila* model of tauopathy. *J Biochem* **62**(5): 335-342, 2017. doi: 10.1093/jb/mvx038.

9) K. Ando, M. Oka, M. Ohtake, M. Hayashishita, S. Shimizu, S. Hisanaga, & K.M. Iijima, Tau phosphorylation at Alzheimer's disease-related Ser356 contributes to tau stabilization when PAR-1/MARK activity is elevated. *Biochem Biophys Res Commun* **478**(2): 929-934, 2016. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.053.

(和文総説、査読あり)

10) 飯島浩一、関谷倫子 . アルツハイマー病の発症機序研究～TREM2/TYROBP から見えてきたアルツハイマー病発症機序～ . *Animus* **96**: 13-17, 2018

11) 岡未来子、飯島浩一、安藤香奈絵 . 神経細胞内のミトコンドリア局在異常と認知症 . 実験医学増刊「認知症: 発症前治療のために解明すべき分子病態は何か?」 **35**(12): 182-185, 2017

12) 関谷倫子、飯島浩一 . 統合生物学的手法によるアルツハイマー型神経細胞死の機序解明とその抑止法 . *Dementia Japan* **30**(2): 246-256, 2016

[学会発表](計23件)

(国際学会発表)

1) K.M. Iijima, X. Quan, Y. Sakakibara, M. Sekiya. Studying mechanisms underlying hippocampal sclerosis of aging in *Drosophila*. The 14th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (AD/PD), 2019

2) M. Sekiya, & K.M. Iijima. Roles of EDEM family proteins in APP metabolism. The 14th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (AD/PD), 2019

3) K.M. Iijima. Deciphering Alzheimer's Disease Pathogenesis from Gene Co-expression Network. The 13th International Symposium on Geriatrics and Gerontology "Cutting Edge of Aging Research", 2018

4) K. Ando, M. Oka, A. Maruko-Otake, Y. Ohtake, M. Sekiya, S. Hisanaga, & K.M. Iijima. CaMKII enhances tau-mediated neurodegeneration downstream of tau phosphorylation in transgenic *Drosophila* models of tauopathy. The 4th Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference, 2017

5) M. Sekiya, M. Wang, N. Fujisaki, Y. Sakakibara, M.E. Ehrlich, E.E. Schadt, S. Gandy, K. Ando, B. Zhang, & K.M. Iijima. Ectopic expression of human TREM2/TYROBP in *Drosophila* glial cells negatively affects transcriptional programs induced by Aβ42 and worsens tau-mediated neurodegeneration. The 13th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (AD/PD), 2017

6) M. Sekiya, & K.M. Iijima. Enhanced ER protein quality control selectively targets APP subjected to η-site processing pathways and reduces amyloid-η and amyloid-β. The 13th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (AD/PD), 2017

7) K. Ando, A. Maruko-Otake, M. Hayashishita, M. Oka, Y. Ohtake, M. Sekiya, T. Saito, S.I. Hisanaga, & K.M. Iijima. Sustained activation of CaMKII caused by depletion of mitochondria from the axons enhances tau toxicity. *Neuroscience* 2016, 2016

8) M. Oka, E. Suzuki, S.I. Hisanaga, K.M. Iijima, & K. Ando. Reduction in ATP levels in the axon during aging and the role of mitochondrial distribution. *Neuroscience* 2106, 2016

(国内学会発表)

9) 権秀明、榊原泰史、飯島浩一、関谷倫子 加齢性海馬硬化症発症機序の解明 第11回 NAGOYA

グローバルリトリート、2019

- 10) 飯島浩一 . 早期診断から先制治療に向けたアルツハイマー病に対する新たな研究アプローチ . 第 41 回日本分子生物学会年会 (セッションチェア、オーガナイザー)、2018
- 11) 飯島浩一、権秀明、榊原泰史、関谷倫子 . 加齢性海馬硬化症モデルショウジョウバエの解析 . 第 37 回日本認知症学会学術集会、2018
- 12) 飯島浩一 . 生物学的手法を用いてアルツハイマー病発症機序を読み解く . 第 91 回日本生化学会大会 シンポジウム 「S10m」 多様性に富むアルツハイマー病発症リスク:最適化先制医療への最前線」、2018
- 13) 榊原泰史、関谷倫子、斎藤貴志、西道隆臣、飯島浩一 . Aβ アミロイドーシスモデルである App ノックインマウスにおける情動および認知機能に関する行動解析 . 第 41 回日本神経科学大会、2018
- 14) 権秀明、関谷倫子、榊原泰史、飯島浩一 . 加齢性海馬硬化症発症機序の解明 . 第 41 回日本神経科学大会、2018
- 15) 榊原泰史、関谷倫子、飯島浩一 . Neuroprotective roles of Toll-like receptors in glial cells during aging in *Drosophila* . 第 40 回日本分子生物学会年会、2017
- 16) 権秀明、藤崎尚規、榊原泰史、関谷倫子、飯島浩一 . Protective roles of SUR, a fly homologue of Sulfonylurea receptors, ABCC8/SUR1 and ABCC9/SUR2, against age-associated neurodegeneration in *Drosophila* . 第 40 回日本分子生物学会年会、2017
- 17) 関谷倫子、M. Wang、藤崎尚規、榊原泰史、B. Zhang、飯島浩一 . システム生物学による Aβ , tau , TREM2/TYROBP の遺伝子相互作用解析 . 第 36 回日本認知症学会学術集会、2017
- 18) 藤崎尚規、榊原泰史、関谷倫子、飯島浩一 . 転写因子 NPAS3/trh の欠損が AD 型神経変性を増悪化させるメカニズムの解析 . 第 36 回日本認知症学会学術集会、2017
- 19) 安藤香奈絵、林下幹輝、知久朋樹、斎藤太郎、浅田明子、久永眞市、飯島浩一 . S6 kinase and insulin/IGF signaling regulates accumulation and toxicity of tau through Ser262 phosphorylation in a *Drosophila* model of tauopathy. 第 60 回日本神経化学大会、2017
- 20) 藤崎尚規、榊原泰史、関谷倫子、飯島浩一 . The mechanism underlying neurodegeneration in a *Drosophila* model of Wolfram syndrome . 第 39 回日本分子生物学会年会、2016
- 21) 岡未来子、鈴木えみ子、久永眞市、飯島浩一、安藤香奈絵 . 軸索での加齢依存的な ATP 量減少とミトコンドリア分布の関係 . 第 59 回日本神経化学大会、2016 年
- 22) 林下幹輝、斎藤太郎、久永眞市、飯島浩一、安藤香奈絵 . Ribosomal protein S6 kinase はアルツハイマー病関連 Ser262 サイトのリン酸化を介してタウタンパク質を安定化し毒性を悪化させる . 第 59 回日本神経化学大会、2016
- 23) 榊原泰史、藤崎尚規、関谷倫子、飯島浩一 . The mechanism underlying neurodegeneration in a *Drosophila* model of Wolfram syndrome . 第 39 回日本神経科学大会、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.ncgg.go.jp/camd/department/alz/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。