

令和元年6月21日現在

機関番号：83903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07418

研究課題名(和文)新規アルツハイマー病モデルマウスにおけるシナプス機能低下の分子メカニズム解析

研究課題名(英文)Molecular mechanism analysis of synaptic dysfunction in a novel Alzheimer's disease model mouse

研究代表者

南 竜之介(MINAMI, Ryunosuke)

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・研究員

研究者番号：90806895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究室で開発されていた新規アルツハイマー病(AD)マウスモデルは、内耳有毛細胞でAD発症の一因であるアミロイド(A β)を発現させることにより、4ヶ月齢で高音刺激特異的な聴力低下を示す(Omata et al., Aging, 2016)。

本研究課題において、聴力低下の原因を解析した結果、新規ADマウスモデルの内耳有毛細胞では、細胞変性やシナプス数の減少が観察されないことから、聴力低下は内耳有毛細胞におけるシナプス機能の低下に起因する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、多くのADマウスモデルが開発され、発症機序の解明から創薬研究まで広範にわたり用いられてきたが、「疾患修飾薬」の開発には至っていない。本研究課題を通して、創薬研究から眺めた既存ADマウスモデルの限界点を克服したこの新規モデルを用いた発症機序の解析からは、前シナプスにおけるシナプス小胞リサイクリングの重要性を示唆する結果が得られた。新規ADマウスモデルは、ADにおけるシナプス機能低下のメカニズムを分子レベルで解析するのに優れた系であることに留まらず、ADにおけるシナプス機能低下を聴力低下として定量化できることから薬剤開発に大いに貢献することも期待される。

研究成果の概要(英文)：Our group produced a novel mouse AD model, in which amyloid-beta (A β) with familial AD mutation was expressed at mouse auditory hair cells. Electrophysiological assessment indicated that those mice showed hearing impairment specifically against high-frequency sounds stimulation (>32 kHz) at 4-months-old (Omata et al., Aging, 2016).

To reach the molecular mechanism of hearing defects in this AD mouse model, we observed cochlear with immunohistochemical approaches. The result showed that there are no degeneration of cochlear hair cells and no decline in synaptic ribbon numbers at 5-months-old. We propose that synaptic disorders might be involved in the hearing defects in the novel mouse AD model.

研究分野：分子生物学・細胞生物学

キーワード：アルツハイマー病マウスモデル シナプス機能 内耳有毛細胞 聴力

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

1. 研究開始当初の背景

AD の発症原因因子として $A\beta$ 産生の前駆体 (APP) が見だされてから、変異型ヒト APP を脳神経細胞で発現する多くの “APP マウス” が確立され、AD 疾患メカニズムの解明から創薬研究まで広範にわたり用いられてきた。しかし、発症に 1 年近く要し、定量的解析が困難な記憶・学習障害を観察する行動試験が判定指標とされているなど、治療薬検定系としての問題点もあり、「疾患修飾薬」の開発には至っていない。これを受けて本研究室では、 $A\beta$ の毒性効果を短時間で、定量的に判定できる新規マウス解析系が開発されている。新規マウス (Tg[Math1E-A β 42^{E22G}]) 解析系の特徴は、内耳有毛細胞と脳神経細胞の共通点に着目し、家族性 AD 変異を導入した $A\beta$ 42 ($A\beta$ 42^{E22G}) を内耳有毛細胞で発現している点である。このマウスでは、生後 4 ヶ月で高音域 (> 32kHz) 特異的聴力低下を示す (図 1)。高音刺激応答の低下は加齢性難聴でも観察されていることから、加齢が最大のリスクファクターである AD との相関が予想されている。このように、 $A\beta$ 42 の発現による神経機能の低下を聴性脳幹反応 (ABR) を測定することで電気生理学的に直接観察することができる点で、従来の方法とは異なる画期的手法として注目されているが、発症メカニズムについては明らかになっていない。

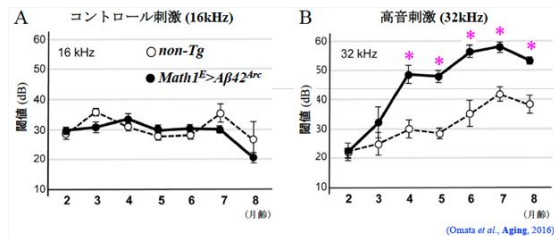


図1. 新規 AD マウスモデルにおける聴性脳幹反応 (ABR) 閾値の経時変化
コントロール刺激(16kHz)に対する ABR 閾値の経時変化は non Tg と $Math1E>A\beta42Arc$ との間で差が認められない (A)。一方で、加齢に脆弱性を示す高音刺激(32kHz)に対する ABR 閾値はわずか4ヶ月齢で上昇し、高音刺激特異的な聴力の低下を示す (B)。(Omata et al., Aging, 2016)

2. 研究の目的

本研究課題では、新規 AD マウスモデルの創薬モデルとしての有用性を考える上で重要なステップとして、A 発現による聴力低下の分子機構を解明することを目指す。A による有毛細胞の機能低下の要因としては、AD 発症原因から類推し、シナプス機能低下が生じている可能性を予想した。本研究課題を遂行することにより、根治的效果をもたらす治療薬開発に繋がる AD 発症の分子機構の解明に迫ると同時に、新規 AD モデルマウスとしての有用性を検証した。

3. 研究の方法

新規 AD マウスモデルでは、高音域 (> 32kHz) に対する聴力低下が観察されている。高音域の刺激応答の異常にはシナプス小胞のリサイクリング等のシナプス機能低下が関わっている可能性が予想されていることから、新規 AD モデルマウスにおけるシナプス小胞のリサイクリングに注目した解析を行う。具体的には、以下の方法で解析を行った。

(1) 組織化学的アプローチによる細胞変性およびシナプス形態変化に関する解析

これまでに報告されている AD の発症メカニズムから類推すると、新規 AD マウスモデルにおける $A\beta$ 発現による聴力低下の要因として、1)有毛細胞の変性、2)シナプスの減少、3)シナプス機能低下、という3つの可能性が予想される。そこで、まず、有毛細胞変性の有無を検証するため、蝸牛を単離して形態を観察した。さらに、有毛細胞のリボンシナプスマーカー (CtBP2) および聴神経細胞のシナプスマーカー (GluR2A) で 2 重染色を行い、シナプス形成を観察した。

(2) 遺伝学的アプローチによる PI(4,5)P₂ 代謝の重要性に関する解析

遺伝学的アプローチにより、PI(4,5)P₂ の発現調節に重要な Synj1 との遺伝学的な相互作用を観察することで、 $A\beta$ による聴覚低下の分子メカニズムにおけるイノシトールリン脂質代謝調節の重要性を検証した。方法としては、[$Math1E-A\beta42^{E22G}$] に Synj1 変異を交配によりヘテロで導入し、生後 4 ヶ月から生じる聴力低下が抑制されるか否かを調べた。

4. 研究成果

(1) 新規 AD マウスモデルの聴力低下はシナプス機能の低下に起因する

組織化学的アプローチにより、生後 5 ヶ月齢と 8 ヶ月齢マウスにおいて、高音刺激を受容する細胞領域に注目して、細胞変性およびシナプス形態変化を解析した結果、有毛細胞の欠損およびシナプス形成能に顕著な異常は認められなかった (図 2. A-F^{''})。一方で、シナプス形態に差が観察されることから、シナプス小胞リサイクリングをはじめとするシナプス機能の調節機構が聴力低下に関与する可能性が示唆された。

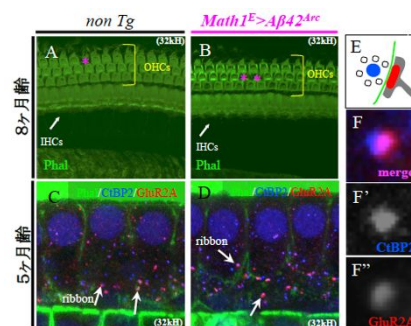


図2. 新規 AD マウスモデルの内耳有毛細胞における細胞変性とシナプス形成 non Tg (A) と $Math1E>A\beta42Arc$ (B) の有毛細胞でそれぞれ顕著な細胞変性は観察されない (8ヶ月齢)。IHCs: 内耳有毛細胞, OHCs: 外耳有毛細胞。*: 脱落した細胞 (A, B)。non Tg (C) と $Math1E>A\beta42Arc$ (D) の内耳有毛細胞において、シナプス数の減少は観察されない (5ヶ月齢)。緑: Phalloidin, 青: リボンシナプスマーカー (CtBP2), 赤: AMPA 受容体マーカー (GluR2A), 矢印: リボンシナプスと AMPA 受容体のマーカーが隣接して発現している正常なシナプス形成。 (E) 正常なシナプス形成の模式図 (F) merge, (F') リボンシナプスマーカー (CtBP2), (F'') AMPA 受容体マーカー (GluR2A)。

(2) 新規聴力測定システムの導入と改善

本研究室では、外有毛細胞の自律運動が生み出す歪成分耳音響放射 (DPOAE) を測定する装置が導入され、聴神経の電位の漏れを検出する ABR 測定システムを含めた聴力測定システムの改善に取り組んだ。元々、ABR による聴力測定には1頭当たり30分しか要しないが、DPOAE による聴力測定を導入することで、わずか5分程度の計測時間で複数の周波数刺激に対する応答を計測可能になり、スクリーニング系としてさらなる質の向上が図れた。また、注目すべき点として、DPOAE による聴力測定においても新規 AD マウスモデルの特徴である高音域特異的な聴力低下が認められた (図3)。これにより、蝸牛神経の電位の漏れを検出するシステムである ABR のみでは明確に示すことができなかった、“Aβ 発現による聴力低下の主な原因が後シナプスではなく有毛細胞における機能低下であること”が示唆された。

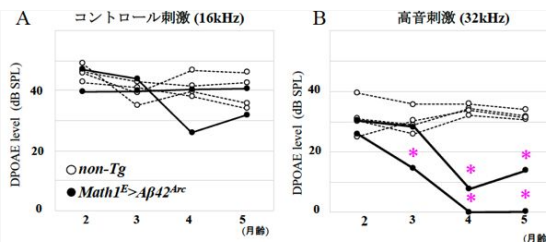


図3. 新規 AD マウスモデルにおける歪成分耳音響放射 (DPOAE) の経時変化
コントロール刺激(16kHz)に対する DPOAE level の経時変化は non Tg と *Math1^{E>Aβ42Arc}* との間で顕著な差はない (A)。ABR と同様に、高音刺激(32kHz)に対する DPOAE level は 3-4ヶ月齢で低下(*)を示し、高音刺激特異的な聴力低下が観察される (B)。

(3) A の神経毒性による聴力低下は有毛細胞 (前シナプス) における PI(4,5)P₂ の代謝調節が関与している可能性が示唆された

遺伝学的アプローチにより、[*Math1^{E>Aβ42^{E22G}}*] に *Synj1* 変異を交配によりヘテロで導入し、生後4ヶ月から生じる聴力低下が抑制されるか否かを調べた。ABR による聴力の経時変化を測定した結果、新規 AD モデルマウスにおいて、高音域の聴力低下の抑制は認められなかった (図4)。

近年、他グループによる報告では、神経細胞特異的に発現する *Synj1* およびユビキタスに発現するパラログ遺伝子 *Synj2* はそれぞれ PI(4,5)P₂ の代謝を制御することや、蝸牛においては内耳有毛細胞に *Synj2*、ラセン神経節細胞に *Synj1* の転写活性があることが示されている。

これらの報告と本研究課題の結果には一貫性があり、本解析系におけるシナプス機能低下の分子メカニズムに関して、後シナプスではなく前シナプス(有毛細胞)におけるイノシトールリン脂質代謝調節が重要であることが予想される。そこで現在、*Synj2* 変異の導入による遺伝学的な相互作用を用いて PI(4,5)P₂ の代謝の重要性を検証している。今後の展開のひとつとして、聴力が回復した場合に、組織化学的・生化学的解析により、Aβ の神経毒性による聴力低下の分子メカニズムを理解したい。

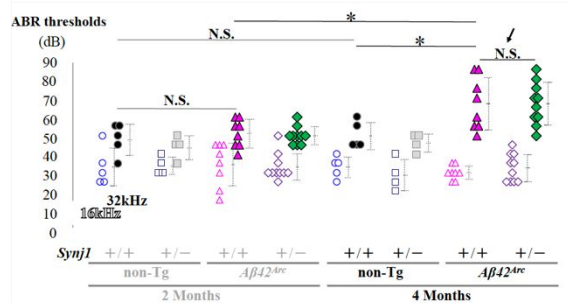


図4. 新規 AD マウスモデルの聴力低下に対する *Synj1* ハプロ不全の効果
新規 AD マウスモデルにおける、生後4ヶ月から生じる高音刺激特異的な聴力低下に対して、*Synj1* 変異ヘテロの導入効果は認められなかった(矢印)。*: $P < 0.05$ 。

<引用文献>

Omata Y, Tharasegaran S, Lim YM, Yamasaki Y, Ishigaki Y, Tatsuno T, Maruyama M, Tsuda L. Expression of amyloid-β in mouse cochlear hair cells causes an early-onset auditory defect in high-frequency sound perception. *Aging* (Albany NY). 2016 Mar;8(3):427-39.

Manji SS, Williams LH, Miller KA, Ooms LM, Bahlo M, Mitchell CA, Dahl HH. A mutation in synaptojanin 2 causes progressive hearing loss in the ENU-mutagenised mouse strain Mozart. *PLoS One*. 2011 Mar 15;6(3):e17607.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

南竜之介, 林永美, 津田玲生.

「ケミカルバイオロジーによるアルツハイマー病(AD) 治療薬の開発」

『第36回本認知症学会』金沢, 2017年11月

南竜之介, 林永美, 津田玲生.

「新規アルツハイマー病 (AD) モデルマウスにおける神経機能低下の分子メカニズム解析」

『第37回本認知症学会』札幌, 2018年10月

南竜之介, 林永美, 津田玲生.

「加齢性神経変性疾患の研究における内耳有毛細胞と神経細胞との分子的共通性」

「Molecular commonalities between auditory hair cells and neurons in the study of age-related neuronal disorder」『第41回日本分子生物学会年会 (MBSJ)』, 横浜, 2018年12月

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：津田 玲生

ローマ字氏名：(TSUDA, Leo)

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。