

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16924

研究課題名（和文）ショウジョウバエ神経疾患モデルによるミトコンドリア軸索輸送障害の解明と治療開発

研究課題名（英文）Pathophysiology and therapeutic development of mitochondrial axonal transport disorders using Drosophila model of neurological diseases

研究代表者

森井 芙貴子 (Kitani-Morii, Fukiko)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：60806842

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はミトコンドリア軸索輸送に関わる分子の同定、機能解析、治療法の開発を目的とした。MFN2のホモログであるMarfの神経特異的ノックダウン（KD）系統はキネシンの一種であるKlp68D-KD系統との交配により運動機能が改善した。筋萎縮性側索硬化症モデルでも同様に運動機能が改善した。神経特異的ヒトTDP43遺伝子トランスジェニックショウジョウバエにおいてもKlp68D-KD系統の交配により生存期間が延長した。また網羅的遺伝子発現解析によってHsp70の有意な発現低下を確認し、Hsp70阻害薬の経口摂取によって成虫の運動機能に改善傾向が見られたが、統計学的有意差には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患においてミトコンドリアの軸索輸送は長い神経の末端までエネルギーを供給するシステムとして重要であるが、その運搬に関与する具体的な分子は不明点が多かった。本研究でショウジョウバエKlp68D（ヒトKif3Bホモログ）は複数の運動神経変性疾患の原因遺伝子と遺伝的相互作用を示し、発現抑制によって予後の改善が得られた。さらにHsp70の関与が示された。複数の異なる遺伝子で共通に変化する分子の同定に至ったことにより幅広い神経変性疾患への応用が可能な治療標的となり得る

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to identify molecules involved in mitochondrial axonal transport, analyze their functions, and develop therapeutic strategies. Similarly, motor function was improved in an amyotrophic lateral sclerosis model. In Drosophila, a neural-specific human TDP43 transgenic strain, mating with the Klp68D-KD strain also prolonged survival. Comprehensive gene expression analysis showed a significant down-regulation of Hsp70, and oral administration of an Hsp70 inhibitor tended to improve locomotor function in adults, but the difference did not reach statistical significance.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：疾患モデル 神経変性疾患 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞活動のエネルギー源である ATP の産生を担う重要な細胞小器官である。細胞体で翻訳されたミトコンドリアが神経細胞の長い軸索の末端部まで輸送される現象(ミトコンドリア軸索輸送)は、軸索に ATP を供給し、軸索の恒常性を保つために必須の機構である。そのプロセスは複数のミトコンドリア膜蛋白によって巧妙に調整されているが、創薬につながる詳細な分子的機序は未解明の点が多い。神経細胞はこのようなミトコンドリア動態によるエネルギー産生に強く依存していると考えられ、中でも、ミトコンドリア外膜蛋白であるミトフシン 2 (MFN2) 遺伝子変異によって遺伝性の末梢神経障害を生じる Charcot-Marie-Tooth 病タイプ 2A (CMT2A) は、ミトコンドリア障害と神経疾患を関連づけるモデル疾患として注目されている。

申請者は過去に MFN2 変異を有する細胞モデルにおいてミトコンドリアの軸索輸送速度の低下や軸索での ATP 産生量の低下が再現されることを示し、ミトコンドリア軸索輸送障害が神経軸索変性の要因であると考えた。しかし、ミトコンドリア軸索輸送については、ミトコンドリアを運搬するモータータンパク質を始め、どのような分子が関与する現象であるのかについての詳細は不明点が多い。

2. 研究の目的

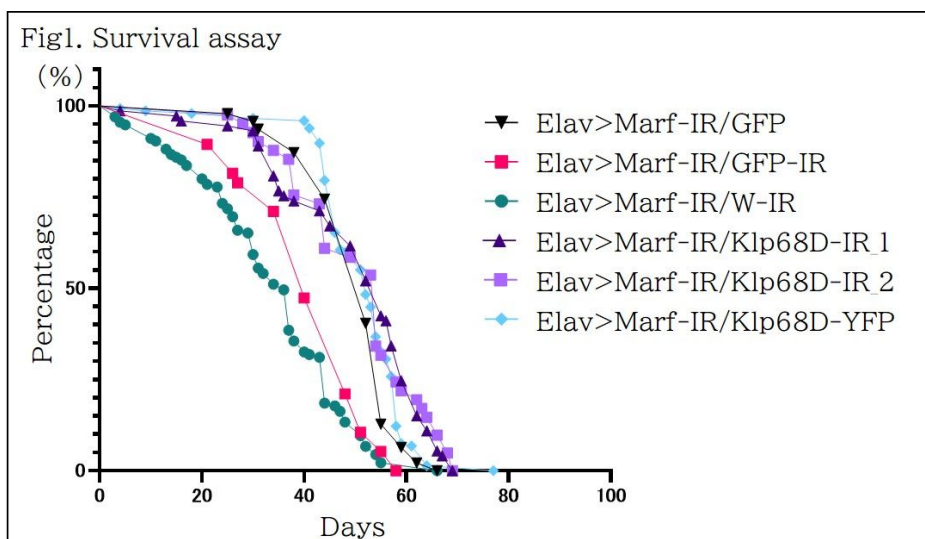
本研究では変異 MFN2 によるミトコンドリア軸索輸送障害の機序解明と新規治療標的の開発を目的とする。

3. 研究の方法

ショウジョウバエは遺伝子工学的手法を用いることで、任意の遺伝子を任意の組織で特異的にノックダウンした系統を作製することができる。ショウジョウバエの神経特異的ドライバー遺伝子保有系統と MFN2 ノックダウン系統の交配により、神経特異的 MFN2 ノックダウン系統の樹立を行い、ヒト患者で見られる表現型(運動機能の低下、ミトコンドリア軸索輸送速度の低下、軸索での ATP 産生量の低下など)についての再現性を確認する。さらに作製した神経特異的 MFN2 ノックダウン系統とモータータンパク質ノックダウン系統を交配し、子世代(二重ノックダウン系統)の神経特異的表現型の有意な増強あるいは抑圧について網羅的に観察する。さらに神経特異的 MFN2 ノックダウン系統ならびにヒト細胞モデルを用いて、新たに同定したモータータンパク質を治療標的とする薬物のスクリーニングを行い、将来の臨床応用可能な候補薬物を同定する。

4. 研究成果

CMT2A の原因遺伝子である MFN2 のショウジョウバエホモログ Marf の神経特異的ノックダウン(KD)系統と細胞内輸送を担うモータータンパク質の一種であるキネシンスーパーファミリー(KIFs)の KD 系統を網羅的に交配し、ヒト Kif3B に相当する Klp68D-KD 系が CMT2A モデルの複眼形成不全と運動機能を改善することを見出した。その他の運動神経障害モデルとして筋萎縮性側索硬化症(ALS)原因遺伝子 TDP43(ハエホモログは TBPH)、FUS(同 caz)の神経特異的 KD 系と Klp68D-KD 系を交配すると Marf 同様に運動機能の改善が見られた(Fig1)。



Klp68D の強制発現系との交配ではこれらの改善効果は見られず、TBPH ではむしろ生存期間の短縮が見られた。このことから運動神経変性において Klp68D-KD が横断的に保護的な働きを示すことがわかった。ヒト TDP43 遺伝子 (Q331K 変異) を神経特異的に発現するトランスジェニックショウジョウバエを作成して Klp68D-KD 系と交配したところ、有意に生存期間が延長することを確認した。Klp68D 強制発現系による有意な変化は見られなかった。治療標的分子の同定のため Marf、TBPH、caz と Klp68D の二重 KD 個体から網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、全ての二重 KD 系統で Hsp70 の有意な発現低下が見られた。Hsp70 阻害薬である Apoptozole を神経特異的 Marf-KD 系統に経口摂取させたところ成虫の運動機能に改善傾向が見られたが統計学的有意差には至らなかった。今後サンプル数を増やして再現性を確認する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kitani-Morii Fukiko, Friedland Robert P., Yoshida Hideki, Mizuno Toshiki	4. 巻 84
2. 論文標題 Drosophila as a Model for Microbiota Studies of Neurodegeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 479 ~ 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-215031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kitani-Morii Fukiko, Noto Yu-ichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Recent Advances in Drosophila Models of Charcot-Marie-Tooth Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7419 ~ 7419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21197419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Fukiko Kitani-Morii
2. 発表標題 Investigating Kinesins as potential therapeutic targets of axonal degeneration using Drosophila models
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fukiko Kitani-Morii
2. 発表標題 Investigating Kinesins as potential therapeutic targets of axonal degeneration using Drosophila models
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fukiko Kitani-Morii
2. 発表標題 Investigating Kinesins as potential therapeutic targets of CMT and ALS using Drosophila model
3. 学会等名 Peripheral Nerve Society 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------