

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22478

研究課題名(和文)化学遺伝学的手法による新規認知症治療法の開発

研究課題名(英文)Developing a novel strategy to treat dementia through chemical genetics

研究代表者

園下 将大 (Sonoshita, Masahiro)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：80511857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化社会の進行に伴い、認知症の罹患患者数の増加が続いている。これを解決すべく代表者は、患者で観察される変異型Tauを発現するショウジョウバエを作成し、このバエがタウオパチーの典型的な所見の神経細胞死やそれに伴う生存率の低下を示すことを見出した。次に代表者は、このバエの遺伝学スクリーニングにより、上記形質を抑制するキナーゼ遺伝子変異を同定した。これらのキナーゼはタウオパチーを促進する機能を持つ新規治療標的と考えられる。そこでこれらを阻害する化合物をこのバエに投与したところ、この化合物は上記形質を抑制することが分かった。以上の結果は、認知症の発生機序や新規治療法の開発に道を拓くものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、高齢化社会が一層進行しており、これに伴って認知症に罹患する患者数の増加が続いている。認知症の病態はいまだ不明点が多く、有効な治療標的も不明であるため、新規治療法の開発は難航している。我々は認知症の新規モデルバエの作出に成功するとともに、新規治療標的となるキナーゼを見出し、その阻害剤がこのモデルの症状を緩和できることを見出した。今後一層深刻化することが予想される認知症に対し、これらの成果は重要な研究基盤となると期待される。

研究成果の概要(英文)：There has been a significant increase in the number of dementia patients according to the progress of an aging society. To solve this issue, we developed a novel dementia model in *Drosophila* expressing mutant Tau. These flies displayed lethality due to neuronal death. Through comprehensive genetic screening in these flies, we identified kinases whose mutation suppressed lethality in flies. Inhibitors against these novel therapeutic targets rescued such phenotypes, validating our strategy as a novel path to control dementia.

研究分野：遺伝学、創薬科学

キーワード：認知症 キナーゼ ショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

近年、認知症患者数の大幅な増加が続いている。患者数は今後 30 年間で 2 倍以上になるとも予想されており、極めて大きな社会問題となっている<sup>1</sup>。このため、代表的な認知症のアルツハイマー病のマウスモデルや培養ヒト神経細胞を用いた解析が盛んにおこなわれてきた。しかし、新薬候補の治験成功率は 3%以下に留まり、哺乳類に依存した創薬研究は困難を極めている。このような状況から、認知症研究手法のパラダイムシフトが必要となっていた。

一方申請者は近年、臨床検体や遺伝子改変マウス、培養ヒト細胞をショウジョウバエと融合したがん研究を展開し、がん発生機序の解明や新規治療薬リードの開発を実施してきた<sup>2-15</sup>。ハエは、遺伝学的な解析ツールが個体レベルで充実している(8割以上の遺伝子のノックアウト系統や全遺伝子のノックダウン系統が入手可能)、繁殖が迅速・容易で安価に研究を推進できる(約 10 日間で次世代が生まれ、飼育費用もマウスの約 1/1,000 のみ)など、哺乳類を補完する多数の利点を備えている。かつ哺乳類との間で遺伝子やシグナル伝達経路の保存度が高く、患者の遺伝子型を模倣することにより患者に類似した表現型を呈することから、疾患研究の有用なモデルとして近年注目を集めている<sup>12,15,16</sup>。さらに近年、認知症患者由来の人工多能性幹細胞(iPSCs: induced pluripotent stem cells)の供給体制が整ってきたことから申請者は、ハエと iPSCs を組み合わせることで、迅速・安価かつ多段階で結果の検証が可能な新規の研究基盤を構築できるのではないかと着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、認知症発症の分子機序と新規予防・治療法の開発を実施する。特に、アルツハイマー病を含む種々の認知症発症への関与が強く示唆されているタウオパチーに着目する。認知症研究で世界初となる、タウオパチーのショウジョウバエモデルとタウオパチー患者由来の iPSCs を組み合わせる独自の研究手法により、迅速な認知症発症機序解析と予防・治療法の開発を実施する。

## 3. 研究の方法

### (1) タウオパチーモデルハエの構築

まず、タウオパチー患者で観察される変異型ヒトタウ(*hTau*<sup>R406W</sup>)のcDNAをUASベクターに挿入し、このベクターをハエ胚に顕微注入して、*UAS-hTau*<sup>R406W</sup>ハエを作成した。これを、視神経細胞特異的に転写因子*gal4*を発現する*GMR-gal4*ハエと交配することで、視神経細胞特異的に*hTau*<sup>R406W</sup>を発現するタウオパチーモデルハエ*GMR>hTau*<sup>R406W</sup>を作成した。

### (2) 遺伝学スクリーニング

はじめに、ハエの全キナーゼ253遺伝子について、ヘテロ接合性あるいはホモ接合性変異体、あるいはノックダウンshRNA系統を収集し、ハエキノームライブラリを構築した。次にこれをそれぞれ*GMR>hTau*<sup>R406W</sup>に交配し、各キナーゼのヘテロ接合性変異あるいはshRNAを有する*GMR>hTau*<sup>R406W</sup>ハエを作成して、各系統間で生存率や複眼の形態を比較した。

### (3) タウオパチーモデルハエへの投薬試験

寒天・ビール酵母・酵母抽出物・ショ糖・ブドウ糖を沸騰させ、液温が50℃まで低下した段階で化合物を混入し、冷やし固めた。この餌上で*GMR-gal4*ハエと*UAS-hTau*<sup>R406W</sup>ハエを交配して*GMR>hTau*<sup>R406W</sup>ハエの胚を得た。生まれた幼虫は、餌を食べることで薬を経口摂取することになる。これを25℃で12日間飼育し、前項と同様に表現型を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) タウオパチーモデルハエの構築

ハエ複眼は約 800 個の視神経細胞から成り立っており、細胞死や細胞増殖を容易に観察できる優れたモデル組織として、神経疾患やがん研究に広く用いられている<sup>12,15</sup>。本研究ではまず、転写因子*gal4*の標的配列UASの下流にタウオパチー患者で観察される変異型ヒトタウ(*hTau*<sup>R406W</sup>)を接続した遺伝子組換えハエを作成した。

このハエは、通常の飼育条件下では検出可能な表現型を示さなかった。しかしこのハエを、視神経細胞特異的な活性のある*GMR*遺伝子のエンハンサー配列で転写因子*gal4*を発現する*GMR-gal4*ドライバーハエと交配し、視神経特異的に*hTau*<sup>R406W</sup>を発現する*GMR>hTau*<sup>R406W</sup>を作成したところ、このハエはタウオパチーの典型的な所見である神経細胞の過剰な細胞死を呈し、その結果複眼形成不全とそれに伴う生存率の低下を示した。

これらの結果は、患者で観察される変異遺伝子がハエでも患者と同様の神経細胞死を招来することを示しており、*GMR>hTau*<sup>R406W</sup>ハエがタウオパチーの病態を反映したモデルとして有用である可能性を示している。

### (2) タウオパチーハエモデルを用いた新規治療標的の同定

次に代表者は、タウオパチーの病態に關与するエフェクター群やそれらが参画するシグナル伝達経路を網羅的に同定すべく、*GMR>hTau<sup>R406W</sup>* 八工を使用した遺伝学解析 Dominant modifier screening (DMS) を実施した。DMSは、特定の現象に關与する遺伝子やシグナル経路を網羅的に同定するための、八工遺伝学で gold standard となっている手法である<sup>15</sup>。キナーゼ群に着目するのは、がんをはじめとする疾患でこれらの変異や活性化などの異常が確認されており、活用できる知見や研究資源が豊富で、代表者自身も豊富な研究経験・資源を有するためである<sup>12,15</sup>。

このスクリーニングの結果代表者は、細胞極性の制御に關与するキナーゼをはじめとするおよそ20種類のキナーゼのヘテロ接合性変異が、*GMR>hTau<sup>R406W</sup>* 八工の生存率を著明に改善することを見出した。このことは、これらのキナーゼがタウオパチー形質を促進することを示唆しているため、代表者はこれらのキナーゼを Tauopathy-Promoting Kinases (TPKs) と名付けた。

対照的に、細胞周期の制御に關与するキナーゼをはじめとするおよそ10種類のキナーゼのヘテロ接合性変異が、*GMR>hTau<sup>R406W</sup>* 八工の生存率を著明に低減することも見出した。これらのキナーゼはタウオパチー形質を抑制すると考えられるため、代表者はこれらのキナーゼを Tauopathy-Suppressing Kinases (TSKs) と名付けた。

### (3) タウオパチーの新規治療薬候補の探索

前項で同定したTPKsは、活性を阻害することでタウオパチー形質の抑制を認めた。このことから、TPKsはタウオパチーの新規治療標的と考えられる。そこで代表者は、影響の大きいTPKs上位5種に着目し、これらに対する阻害剤を*GMR>hTau<sup>R406W</sup>* 八工に投与した。その結果代表者は、この八工の生存率を有意に改善する阻害剤を同定した。これらの阻害剤は、前述の神経細胞死も抑制したことから、タウオパチーの新規治療薬候補と考えられる。

このように代表者は、タウオパチー患者で觀察される変異型タウを神経細胞特異的に発現することで、神経細胞死を模倣する新規タウオパチーモデル八工を作出した。そして代表者はこの八工を使用して、タウオパチー形質を促進あるいは抑制するキナーゼを複数同定することに成功し、それらの活性を抑制する阻害剤がタウオパチーの新規治療薬候補となることを初めて個体レベルで解明した。引き続き、*Tau<sup>R406W</sup>* 変異を持つタウオパチー患者から樹立された iPSCs を分化誘導して得た神経細胞 (iPSCs-derived neurons; iPSC-N) を、通常培養条件下およびグルタミン酸による神経細胞死誘導条件下に置き、これらの阻害剤の影響を解析している。この研究を完遂することで、今後一層深刻な福祉問題となることが確実視されている認知症の発症素過程解明と新規治療法候補を創出し、学術と福祉の双方への貢献を図る。

#### < 引用文献 >

1. Dawson et al. *Nat Neurosci* 21:1370 (2018).
2. Takaku, Sonoshita et al. *J Biol Chem* 275:34013 (1999).
3. Sonoshita et al. *Nat Med* 7:1048 (2001).
4. Sonoshita et al. *Cancer Res* 62:6846-6849 (2002).
5. Taketo, Sonoshita, *Biochim Biophys Acta* 1585:72 (2002).
6. Takeda, Sonoshita et al. *Cancer Res* 63: 4872 (2003).
7. Kawada, Sonoshita et al. *Cancer Res* 64: 4010 (2004).
8. Sonoshita et al. *Cancer Cell* 19:125-137 (2011).
9. Sonoshita et al. *Cancer Discov* 5:198 (2015).
9. Itatani, Sonoshita et al. *J Biochem* 159:133 (2016).
10. Kakizaki, Sonoshita et al. *Cancer Sci* 107:1622 (2016).
11. Okada, Sonoshita et al. *Cancer Sci* 108:744 (2017).
12. Sonoshita et al. *Fly models of human diseases* pp287 (2017).
13. Sonoshita et al. *Nat Chem Biol* 14:291 (2018).
14. Ung\*, Sonoshita\* et al. *PLoS Comput Biol* 15:e1006878 (2019). [\*equal contribution]
15. Yamamura et al. *Cancer Sci* 112:505-514 (2021).
16. Bouleau, Tricoirre *J Alzheimers Dis* 45:1015 (2015).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryodai Yamamura, Takako Ooshio, Masahiro Sonoshita	4. 巻 112
2. 論文標題 Tiny Drosophila makes giant strides in cancer research	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 505 ~ 514
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14747	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 抗がん剤をスクリーニングする方法及び膀胱がんの治療のためのキナーゼ阻害剤の組み合わせ	発明者 大塩貴子、園下将大、 関谷翔、平野聡	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/7651	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 がんの治療又は予防剤、及びがんの治療又は予防のためのRF経路阻害剤とMEK阻害剤との組み合わせ	発明者 園下将大、市川聡、 佐藤悠介、藤井清永	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-29585	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 KINASE INHIBITOR COMPOUNDS, COMPOSITIONS, AND METHODS OF TREATING CANCER	発明者 Dar, Cagan, Scopton, Sonoshita	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、US Patent 10519113	取得年 2019年	国内・外国の別 外国

〔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
---------	---------