

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11618

研究課題名（和文）アルツハイマー病と加齢性難聴に共通す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 common to Alzheimer's Disease and Age-related Hearing Loss

研究代表者

南 竜之介（Minami, Ryunosuke）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：90806895

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）：当該研究グループでは、アルツハイマー病（AD）の原因因子である amyloid- $A\beta$ （ $A\beta$ ）を内耳有毛細胞で発現する Tg マウス（Math1E- $A\beta$ 42Arc）を作製し、 $A\beta$  の神経毒性を聴力の低下としてモニターできるシステムを開発している。このマウスは生後4ヶ月で高音刺激特異的な聴力低下を示す。本研究により、当該モデルマウスにおける  $A\beta$  の神経毒性は、シナプス小胞リサイクリングに重要なイノシトールリン脂質 PI(4,5)P<sub>2</sub> の代謝を介して誘導されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AD に対する根治的な効果を狙って進行を抑制する「疾患修飾薬」の開発は難航している。それを受け、本研究グループにて、 $A\beta$  の毒性効果を短時間で定量的に判定できる ADモデルマウス解析系が開発された。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因子である AD との相関が予想される。本研究課題の遂行により、言わば“老化を先取り”した表現型を示す当該モデルにおいて、加齢により引き起こされる難聴の発症機序と共通したシナプス機能調節メカニズムを明らかにすることは、神経変性が生じる前段階に焦点を当てた AD 病態の本質に迫ることに繋がると考えている。

研究成果の概要（英文）：We had already generated Tg mice (Math1E- $A\beta$ 42Arc) that express amyloid- $A\beta$  ( $A\beta$ ), a causative factor of Alzheimer's disease (AD), in auditory hair cells, and developed a system to monitor  $A\beta$  neurotoxicity as hearing impairment. These mice show high-frequency hearing loss at 4 months of age. In this research project, our findings suggest that the neurotoxicity of  $A\beta$  in this mouse model is induced via the metabolic regulation of the inositol phospholipid PI(4,5)P<sub>2</sub>, which is important for synaptic vesicle recycling.

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 加齢性難聴 シナプス機能

1. 研究開始当初の背景

AD に対する症状改善薬の開発が進む中、根治的な効果を狙って進行を抑制する「疾患修飾薬」の開発は、創薬開発に資するマウス解析系の不足により難航している。それを受け、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 AD モデルマウス解析系が開発されている<sup>1</sup>。この AD モデルマウス ( $Tg[Math1^E-A\beta 42^{Arc}]$ ) 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  $A\beta 42$  ( $A\beta 42^{Arc}$ ) 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、わずか生後4ヶ月で高音域 (>32kHz) 特異的な聴力低下を示す。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因子である AD との相関が予想される。AD 病態から当該 AD モデルマウスにおける発症メカニズムを類推すると、 $A\beta$  発現による聴力低下の要因として、以下の3つ、(1)有毛細胞の変性、(2)シナプスの減少、(3)シナプス機能低下が予想された。これまでに、当該 AD モデルマウスにおける免疫組織化学的な解析を行い内耳有毛細胞の変性及びシナプス数の減少が生じないことを示した。一方で、シナプス形態に差が観察されることから、 $A\beta$  発現による聴力低下の要因として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発症に関与する可能性を見出した。

これまでに、AD におけるシナプス小胞リサイクリング異常の一因として、イノシトールリン脂質の代謝異常が知られている。中でも、ホスファチジルイノシール-4,5-ビスリン酸：PI(4,5)P<sub>2</sub> に関しては、発現が低下する APP マウスの記憶・学習障害は、PI(4,5)P<sub>2</sub> の分解に作用する Synptojanin1 (Synj1) の変異をヘテロで導入することで回復する<sup>2</sup>。一方、聴覚制御においては、PI(4,5)P<sub>2</sub> の産生に必須である PIP5K  $\gamma$  の発現低下により高音刺激特異的な応答が低下する<sup>3</sup>。さらに、ヒトの SNP 解析から、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) 7 が加齢性難聴に寄与する因子として同定されている<sup>4</sup>。

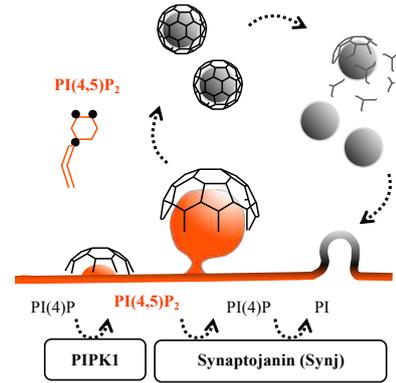


図1. シナプス小胞リサイクリング

2. 研究の目的

当該 AD モデルマウスの高音域刺激応答異常にはシナプス小胞リサイクリングを介したシナプス機能低下の関与を想定している。本研究課題では、AD と加齢性難聴に共通するシナプス機能低下のメカニズムに注目して、発症機序を分子レベルで明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

これまでの AD と加齢性難聴に関する知見から、 $A\beta$  が mGluR7 を介してホスホリパーゼ C (PLC) を活性化することで PI(4,5)P<sub>2</sub> の発現量を低下させ、シナプス小胞のリサイクリング異常による聴力低下を引き起こすモデルを想定した (図2)。そこで、作業仮説に基づき、遺伝学的な相互作用を用いて PI(4,5)P<sub>2</sub> の重要性を検証する。また、当該 AD モデルマウス内耳における PI(4,5)P<sub>2</sub> の量と聴力低下との関係を明らかにする。同時に、シナプスの形態およびシナプス小胞の動態変化に注目して組織化学的解析を行う。具体的には、 $Math1^E-A\beta 42^{Arc}$  に Synj 変異もしくは mGluR7 変異をヘテロで導入することで PI(4,5)P<sub>2</sub> 発現を増加させ、聴力低下が抑制されるか否かを検討する。

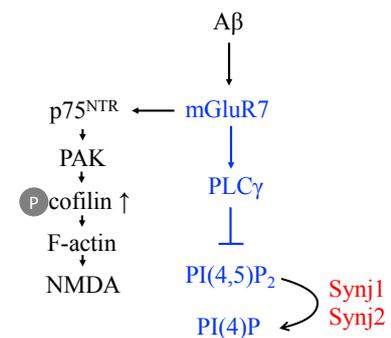


図2.  $A\beta$  作用機序モデル

(1) 免疫組織化学的アプローチによるシナプス形態変化と感覚毛微細構造の解析

$Math1^E-A\beta 42^{Arc}$  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) で二重染色を行い、シナプス形成を観察する。さらに走査型電子顕微鏡を用いて、動毛および不動毛の微細構造を解析する。

(2) 遺伝学的アプローチによる  $A\beta$  の神経毒性に対する PI(4,5)P<sub>2</sub> 代謝の重要性に関する解析

聴神経および蝸牛内耳有毛細胞において、Synj1 のパラログ遺伝子である Synj2 がユビキタスに発現しており PI(4,5)P<sub>2</sub> の代謝を制御している<sup>5</sup>。そこで、 $Math1^E-A\beta 42^{Arc}$  と Synj2 変異もしくは mGluR7 変異マウスを交配し、変異をヘテロで導入し、聴神経の電位の漏れを電気生理学的に検出する聴性脳幹反応 (ABR) および外有毛細胞の自律運動が生み出す歪成分耳音響放射 (DPOAE) の測定による聴力評価を経時的に行う。

## 4. 研究成果

### (1) 免疫組織化学的アプローチによるシナプス形態変化と感覚毛微細構造の解析

組織化学的アプローチにより、生後5ヶ月齢と6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。共焦点顕微鏡を用いた解析から、*Math1<sup>E</sup>-Aβ42<sup>Arc</sup>* の内耳有毛細胞において変性による細胞の欠落は認められなかった。シナプス形成に関しては、シナプス数の増加やシナプス形態の縮小が観察されていることから、シナプス機能調節に変化が生じている可能性も否定できない (図3上段)。今後の課題として、即時放出可能プール・再循環プール・静止プールに分類されるシナプス小胞の状態にも注目していく必要がある。また、脂質二重膜を可逆的に染める蛍光色素である FM4-64 を用いて、エンドサイトーシス動態を解析することも重要と考えられる。

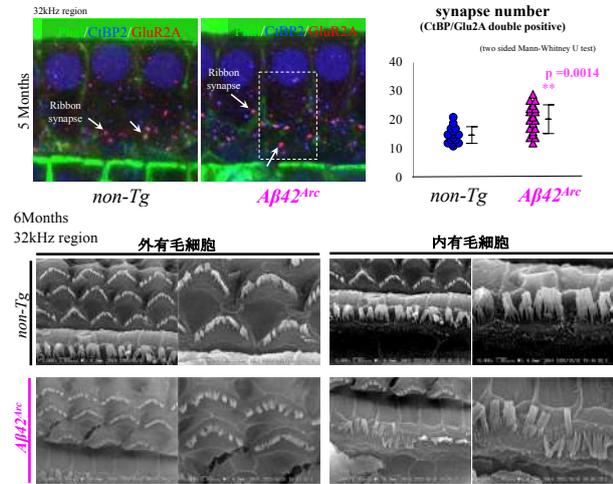


図3. シナプス形態と感覚毛微細構造

一方で、 $\beta$ -actin 染色では、有毛細胞感覚毛の微細構造まで明確に観察することができなかった (図3下段)。そこで、走査型電子顕微鏡を用いて感覚毛の微細構造を解析したところ、*Math1<sup>E</sup>-Aβ42<sup>Arc</sup>* の動毛および不動毛における顕著な微細構造の異常は観察されなかった。

### (2) 遺伝学的アプローチによる Aβ の神経毒性に対する PI(4,5)P<sub>2</sub> 代謝の重要性に関する解析

PI(4,5)P<sub>2</sub> の発現調節に重要な *Synj2* との遺伝学的な相互作用を観察することで、Aβ 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。

生後2ヶ月齢から6ヶ月齢まで、ABR を測定したところ、*Math1<sup>E</sup>-Aβ42<sup>Arc</sup>* では、生後6ヶ月齢において高音域特異的な聴力低下が観察された。一方で、Aβ の神経毒性に対する *Synj2* ハプロ不全による PI(4,5)P<sub>2</sub> 発現抑制効果を検証した結果、*Math1<sup>E</sup>-Aβ42<sup>Arc</sup>* で認められた聴覚低下が有意に改善された。同時に、DPOAE を測定したところ、*Math1<sup>E</sup>-Aβ42<sup>Arc</sup>* の4ヶ月齢において聴力の低下が生じるよりも早期に、*Synj2* ハプロ不全により Aβ の神経毒性が増悪化し、聴力低下が生じる結果も得られている (図4)。

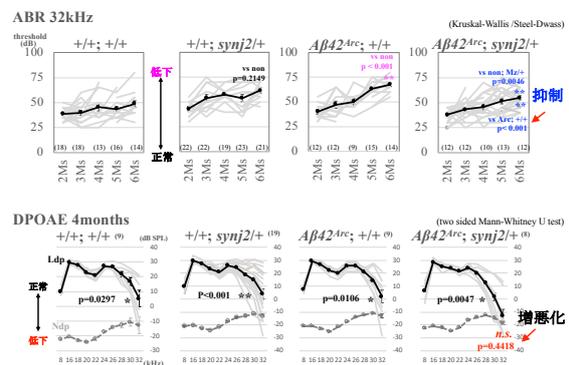


図4. Aβ の神経毒性に対する *Synj2* ハプロ不全による PI(4,5)P<sub>2</sub> 発現抑制効果

求心性神経はラセン神経節の中枢側で蝸牛神経を形成し、脳幹のラセン神経核へと投射する。ひとつの内毛細胞は 10-30 本の有髄の求心性神経 (Type-I) とシナプス結合するのに対し、外毛細胞では 1 本の無髄の求心性神経 (Type-II) が分岐して 10-20 個の外毛細胞に投射する。よって、聴覚刺激の伝達には内毛細胞が重要である。一方で、外毛細胞は主に、脳幹上オリブ核からの遠心性神経投射を受け、自律運動による基底膜振動の増幅に関わる。今回認められた Aβ の神経毒性に対する PI(4,5)P<sub>2</sub> 発現抑制効果の違いに関しては、ABR 測定が聴神経の電位の漏れを電気生理学的に検出するのに対して、DPOAE 測定では外毛細胞の自律運動によって生じる歪成分耳音響放射を検出するといった、機能が反映される細胞種の違いに起因する可能性も考えられる。今後の課題として、PLC 阻害剤を摂取させる薬理的な手法を用いて PI(4,5)P<sub>2</sub> 発現調節の効果を再現すること、PI(4,5)P<sub>2</sub> 発現量変化に関してはタンパク質の定量的な解析を行うことが必要である。

一方、Aβ の作用点としては、代謝型グルタミン酸受容体である mGluR7 を想定していた。そこで、当該研究室では、mGluR7 をコードする *Grm7* 遺伝子欠損 (*Grm7*<sup>-/-</sup>) マウスをゲノム編集により独自に作製した。*Grm7* 遺伝子欠損マウスは homo 個体の多くが致死であったため、*Grm7* 遺伝子欠損 hetero (*Grm7*<sup>+/-</sup>) バックグラウンドで *Math1<sup>E</sup>-Aβ42<sup>Arc</sup>* の聴力機能を経時的に解析した。mGluR7/PI(4,5)P<sub>2</sub> 経路の重要性を検証するために、生後2ヶ月齢から5ヶ月齢まで、ABR および DPOAE を測定した。しかし、コントロールである non-Tg 群のバックグラウンドが高く、*Math1<sup>E</sup>-Aβ42<sup>Arc</sup>* において認められる高音刺激特異的な聴力低下を検出することができなかった。また、バックグラウンドの影響で Aβ の神経毒性の効果が弱く、さらに ABR の測定期間が短いこともあり、聴力低下を検出できなかった可能性も考えられた。そこで、ABR より早期に聴力低下を検出することができる DPOAE の測定結果に注目し、mGluR7 を介した Aβ の神経毒性について検証した結果、Aβ 発現に起因する聴力低下に対して、*Grm7* ハプロ不全による顕著な聴力の回復は認められなかった。よって、Aβ の神経毒性は mGluR7 を介さない PI(4,5)P<sub>2</sub> 代謝調節により誘発されることが予想される。

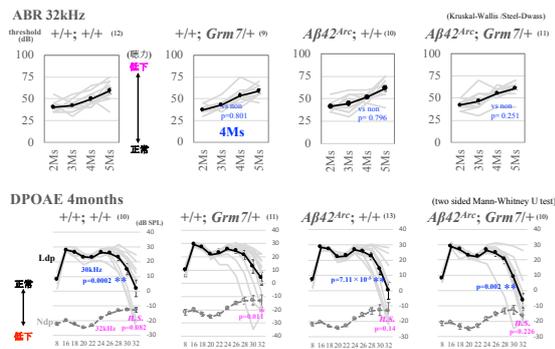


図5. Aβ の神経毒性に対する *Grm7* ハプロ不全の効果

#### <引用文献>

1. Yasuhiro Omata, Suganya Tharasegaran, Young-Mi Lim, Yasutoyo Yamasaki, Yasuhito Ishigaki, Takanori Tatsuno, Mitsuo Maruyama, Leo Tsuda. (2016). Expression of amyloid-β in mouse cochlear hair cells causes an early-onset auditory defect in high-frequency sound perception. *Aging*. 8(3):427-39.
2. Laura Beth J McIntire, Diego E Berman, Jennifer Myaeng, Agnieszka Staniszevski, Ottavio Arancio, Gilbert Di Paolo, Tae-Wan Kim J. (2012). Reduction of synaptojanin 1 ameliorates synaptic and behavioral impairments in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci*. 32(44):15271-6.
3. Guillermina M Goñi, Carolina Epifano, Jasminka Boskovic, Marta Camacho-Artacho, Jing Zhou, Agnieszka Bronowska, M Teresa Martín, Michael J Ec, Leonor Kremer, Frauke Gräte, Francesco Luigi Gervasio, Mirna Perez-Moreno, Daniel Lietha. (2014). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate triggers activation of focal adhesion kinase by inducing clustering and conformational changes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(31):E3177-86.
4. Rick A Friedman, Lut Van Laer, Matthew J Huentelman, Sonal S Sheth, Els Van Eyken, Jason J Corneveaux, Waibhav D Tembe, Rebecca F Halperin, Ashley Q Thorburn, Sofie Thys, Sarah Bonneux, Erik Fransen, Jeroen Huyghe, Ilmari Pyykkö, Cor W R J Cremers, Hannie Kremer, Ingeborg Dhooge, Dafydd Stephens, Eva Orzan, Markus Pfister, Michael Bille, Agnete Parving, Martti Sorri, Paul H Van de Heyning, Linna Makmura, Jeffrey D Ohmen, Frederick H Linthicum Jr, Jose N Fayad, John V Pearson, David W Craig, Dietrich A Stephan, Guy Van Camp. (2009). GRM7 variants confer susceptibility to age-related hearing impairment. *Hum Mol Genet*. 18(4):785-96.
5. Shehnaaz S M Manji, Louise H Williams, Kerry A Miller, Lisa M Ooms, Melanie Bahlo, Christina A Mitchell, Hans-Henrik M Dahl. (2011). A mutation in synaptojanin 2 causes progressive hearing loss in the ENU-mutagenised mouse strain Mozart. *PLoS One*. 6(3):e17607.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 南竜之介, 林永美, 津田玲生
2. 発表標題 アミロイド によるシナプス機能低下の誘導メカニズム解析
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南竜之介, 林永美, 津田玲生
2. 発表標題 アミロイド が引き起こすシナプス機能障害の分子メカニズム
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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
研究分担者	林 永美  (Lim Young-Mi)  (60421898)	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   (83903)	
研究分担者	津田 玲生  (Tsuda Leo)  (30333355)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・研究所 認知症先進医療開発センター・研究生   (83903)	

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