

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月18日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22650074

研究課題名（和文）線虫モデルを用いたタウオパチー治療薬の戦略的スクリーニング

研究課題名（英文）Development of anti-tauopathy drugs using *C. elegans*.

研究代表者

宮坂 知宏 (MIYASAKA TOMOHIRO)

同志社大学・生命医科学部・助教

研究者番号：90342857

研究成果の概要（和文）：

微小管結合タンパク質・タウの蓄積を伴う神経変性疾患を総称してタウオパチーと呼んでいる。タウオパチーの本質は異常タウによる神経機能障害であるが、その機構は不明である。したがって、治療法確立を目的とした *in vitro* 解析系の構築は困難であり、神経機能を評価出来る *in vivo* スクリーニング系が必須といえる。本研究では既存のタウオパチーモデル線虫を基にした個体運動追跡システムによる行動評価系の構築、およびこれらモデル動物を用いた抗タウオパチー化合物の選出を行った。

研究成果の概要（英文）：

Tauopathy is a category of neurodegenerative disease, which develops tau accumulation in the affected neurons. Because the mechanisms of neurodegeneration of tauopathy remain obscure, screening of anti-tauopathy compounds must be processed using *in vivo* model, which can assess the neuronal dysfunction affected by abnormal tau. Purposes of this study are 1, to develop the *in vivo* drug screening system that combines *C. elegans* model of tauopathy and fluorescence based motion tracking (FMT) system, and 2, to perform direct screening of the anti-tauopathy compounds possibly ameliorate tau-induced neuronal dysfunction using the *C. elegans* models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,900,000	0	1,900,000
23年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	330,000	3,330,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経病理学

キーワード：タウ・タウオパチー・アルツハイマー病・神経細胞死・線虫

1. 研究開始当初の背景

(1) タウオパチーの背景について

①平均寿命の平均寿命の伸長のみではない理由で認知症の有病率が増加し続けている。

高齢者における認知症は根本的な治療法が無く、患者家族の負担や介護等にかかる社会経済的コストの増大が問題となっていた。

②アルツハイマー病をはじめとする認知症

の多くは共通の病理変化として変性神経細胞内における微小管結合タンパクの一種であるタウの蓄積がおこること（このような疾患は総称してタウオパチーと呼ばれている）。

(2) 抗タウオパチー薬開発の背景について

① タウオパチーの本質的な神経変性メカニズムは不明である。

② タウオパチー治療の試みは異常リン酸化、凝集など、患者剖検脳の生化学的解析から得られた情報をもとにすすめられていた。しかし、近年ではこのようなタウの生化学的異常と神経変性が解離するとの認識が優勢であり、既存の知見を基に発案された創薬は本質的な治療に結びつかない可能性が高いこと。

③ そのため、タウオパチー治療薬のスクリーニングは、①信頼しうる *in vivo* のモデルであること、②既存の仮説にとらわれず、網羅的に進める必要があること。

2. 研究の目的

(1) 申請者らが構築したタウオパチーモデル線虫と新たに作成した蛍光タンパクの頭部局所発現モデルを組み合わせ、蛍光自動追跡／運動量解析ソフトを用いた、効率の良い *in vivo* の薬物スクリーニング系、**fluorescence based motion tracking (FMT) system** を構築すること。

(2) タウオパチーモデル線虫を用いた化合物のスクリーニングを行い、新たなタウオパチー治療薬、治療法を提示すること。

3. 研究の方法

(1) タウオパチーモデル線虫を用いた *in vivo* の薬物スクリーニング系の構築

① 用いた線虫について

野生型、遺伝子改変型線虫として N2 (野生型), tmIs388 (punc-119::mock), tmIs390 (punc-119::WT4R-tau), tmIs226 (punc-119::R406W-tau) を用いた。

② punc-119::DsRed 遺伝子導入線虫の作成について

PCR により DsRed cDNA を増幅し、線虫神経細胞発現用ベクター pFXneo-punc-119 の NotI / BglII サイトに組み込んだ。得られたプラスミドについては DNA sequencer により配列を確認した。

作製した DsRed 発現ベクター (pmyo-2::DsRed) は pBluescript vector で適宜希釈し、recipient 線虫 (N2) の生殖巣にマイクロインジェクションした。咽頭筋の赤色蛍光を指標として遺伝子導入個体を選別し、extrachromosomal line を得た。この個体を用い UV 照射法により安定発現株 (integrant line) を作製した (tmIs900, tmIs901)。それぞれの株は N2 と 2 回戻し交配してから解析に用いた。安定発現株に行動異常、発達異常などが無いことを確認した後、

タウ遺伝子導入線虫株と交配した。

pmyo-2::DsRed 遺伝子については咽頭筋の赤色蛍光を、タウ遺伝子については共に導入した ges-1::EGFP に由来する腸管の緑色蛍光により伝達を確認し、pmyo-2::DsRed +/+, punc-119::tau +/+ の交配体を作製した。

(2) DsRed/tau-Tg 線虫の行動解析

線虫は Nematode Growth Medium (NGM) 培地上で大腸菌 OP50 株を餌として飼育維持した。成虫を一定時間 6cm NGM plate 上に放置し、同期させた受精卵を得た。20°C で一定期間飼育後、各行動実験に供した。Unc assay では線虫の軌跡の幅、速さを指標とし、軌跡の幅が広く移動速度が速いものを healthy、軌跡の幅は狭いが移動速度は速い、もしくは軌跡の幅は広いが移動速度が遅いものを unc、軌跡の幅が狭く移動速度が遅いものを severe unc とした (Fig. 2a)。各分類の出現率を求め、データは実験間の平均±標準誤差 (n=3) で表した。

FMT system は蛍光顕微鏡、高感度 CCD カメラ、動作解析ソフトで構成される。成虫まで飼育した後、一部を新しい NGM 培地に移し、蛍光実体顕微鏡 (SZX16;

Olympus) で観察した。咽頭筋赤色蛍光の動きは SZX16 に取り付けられた高速 CCD カメラ (QICAM; 日本ローパー) にて一定時間撮影し、動画ファイルとして保存した。また、一部の個体は 8 連 PCR tube 用 flat cap (No. 137-431C; Watson) に分注した 0.2% ゼラチン入り M9 緩衝液中に移動させ、緩衝液中における thrashing 運動について計測した。同様に咽頭筋赤色蛍光の動きを SZX16 に取り付けられた高速 CCD カメラ (QICAM; 日本ローパー) にて一定時間撮影し、動画ファイル (撮像速度、時間は 20 fps, 15 秒) として保存した。得られた動画ファイルは AVI ファイルに変換した後、動作解析ソフト (Move-tr/2D; 株ライブラリー) によって輝点追跡および運動量計測を行った。50ms 毎の輝点の移動距離から速度を求め、さらに同取得時間内の各個体の平均移動速度を求めた。各実験群における平均移動速度の平均値±標準誤差 (n = 20~40) を求め、比較した。

(3) 化合物のスクリーニング

はじめに **SPECTRO LINKERTM** を用いて OP50 株を塗布した 3.5 cm NGM 寒天培地に 2500 J/m² の UV を照射し、大腸菌を死滅させた。その後、それぞれ 0 μM、30 μM、となるように、3.5 cm NGM 寒天培地に添加し、2 時間乾燥させた。乾燥後、3-5 日齢の線虫をそれぞれのプレートに乗せ、50~100 個の卵が確認出来るまで 20°C で培養した。十分な数の卵が確認できたら成虫を取り除き、20°C 2 日間培養した。2 日後、初日と同様に薬物を添加した 3.5 cm NGM 寒天培

地を準備し、全ての線虫を新しいプレートに移動させて、さらに 20 °C 2 日間培養した。得られた 4 日目の線虫を用いて実体顕微鏡下で Unc assay を行った。

4. 研究成果

はじめに pFXneo-pmyo-2::DsRed を導入した安定発現株 (tmIs900, tmIs901) の基礎的解析を行った。これらのラインでは頭部にある咽頭筋に DsRed を発現することにより蛍光顕微鏡下で赤色の蛍光として観察出来る。発生障害、成長障害、および基本的な神経機能障害に起因する行動異常 (Unc, Mec, など) は認められなかった。これより、作成した DsRed 発現株は、行動解析への応用が可能と判断した (data not shown)。

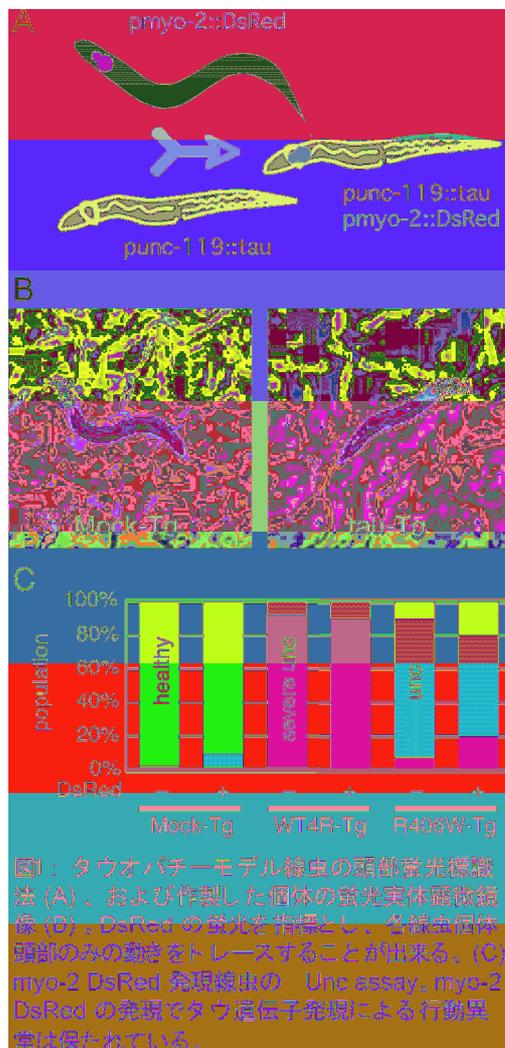


図1: タウオパチーモデル線虫の頭部蛍光標識法 (A)、および作製した個体の蛍光実体顕微鏡像 (B)。DsRed の蛍光を指標とし、各線虫個体頭部のみを移動をトレースすることが出来る。(C) myo-2 DsRed 発現線虫の Unc assay。myo-2 DsRed の発現でタウ遺伝子発現による行動異常は保たれている。

次に既存のタウ遺伝子導入線虫との交配を行った (図 1 A)。線虫は 5 本の常染色体と 1 本の性染色体を有する。したがって導入した遺伝子が同一染色体上に組み込まれている場合は、完全な交配は不可能となる。実際、本研究においても tmIs390 x tmIs901 は交

配が成立しなかった。これは導入した tau 遺伝子と DsRed 遺伝子が同一染色体上にされたためと考えている。一方 tmIs900 については目的とする tau-Tg ライン (tmIs388, tmIs389, tmIs390, tmIs226) すべてと交配が成立した。これより以下の実験には tmIs900 と交配したラインを用いた。

次に交配したラインの行動異常について検討した。Mock-Tg, WT4Rtau-Tg, R406Wtau-Tg 線虫を比較すると Mock-Tg ではスムーズな曲線を描きながら動くのに対し、タウを発現させた線虫では動きが緩慢になると同時に軌跡の波高が低くなる特徴が現れた。この Unc の程度を半定量した結果、いずれのラインにおいても myo-2::DsRed 株との掛け合わせに拘らず、同等な表現系を維持していた (図 1)。

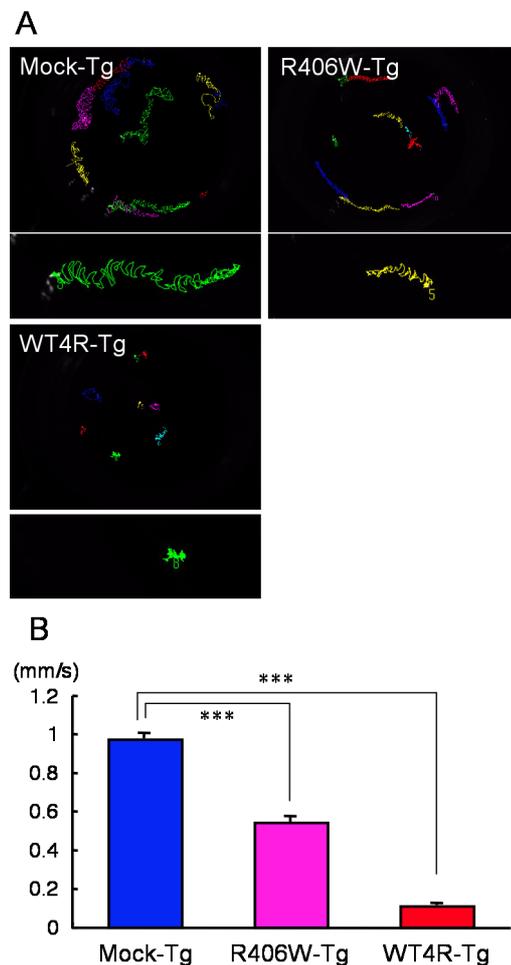


図2: (A) Liquid thrashing における自動追跡の一例。(B) 各輝点の移動速度を平均化した (means ± SE)。多点同時計測が可能であり、15 秒間で行動異常を定量的に検出することが出来る。R406W tau-Tg, WT4RTau-Tg では有為に水中での thrashing が低下している。(Bonferroni/Dunn *** P < 0.001)

続いて、作成した tau-Tg 株を用いて蛍光

標識トラッキングによる行動解析、FMT assay を行った。Myo2::DsRed で標識した Mock-Tg, R406Wtau-Tg, WT4R-Tg 線虫を 0.2% ゼラチンを添加した M9 buffer 中に移し、20 秒間の輝点の運動を計測した。20fps で撮影した動画 (AVI) をもとに Move-Tr2D ソフトで軌跡のトラッキング、運動量の定量化を行った。その結果、R406W 株、WT4R 株ともに有意な輝点移動速度の減少が認められた (図 2)。運動量低下の程度は既存の unc assay と同様の傾向であり、FMT assay により、より短時間で定量的な解析が可能となった。

線虫は現在一般的に用いられているモデル生物の中で最も生活環が短く、且つ多数個体の飼育が可能である。したがって、線虫は様々な化合物スクリーニングに耐える唯一の in vivo モデルであると言える。本課題で構築した FMT system は線虫を用いた化合物スクリーニング、特に創薬分野への応用が期待出来る。はじめに、線虫に運動障害を引き起こす化合物の効果について検討した。Levamisole は強力なニコチン性アセチルコリン受容体の作動薬であり、線虫に運動麻痺を引き起こすことが知られている。Mock-Tg 株の成虫を 50 μ M Levamisole, vehicle をそれぞれ塗布した NGM 培地上に移動し、3 時間飼育した。その後、0.2% ゼラチンを含む M9 buffer に移し、輝点のトラッキングを行った。その結果、本解析系において levamisole 処理による行動障害を明確に検出した (図 3)。これより、本解析系は線虫の行動に影響を及ぼす化合物の解析に有用であると考えた。

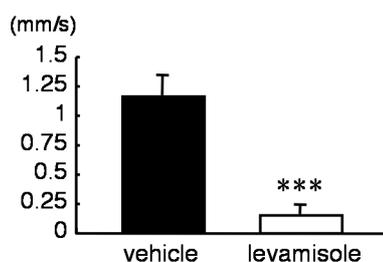


図3: 線虫 liquid thrashing に対する levamisole の効果。各輝点の移動速度平均化した。50 μ M levamisole 処理による運動麻痺により有意に水中での thrashing が低下している。(Student's t-test *** $P < 0.001$)

本課題で用いた Tau-Tg 線虫は Tau オパチーのモデル生物として作成したものである。したがって、tau-Tg 線虫の行動障害を改善する化合物は抗 Tau オパチー薬のリード化合物となる可能性が高い。これまでに天然物由来の化合物を対象に、tau-Tg 線虫の行動異常 (unc) を指標としたスクリーニングを行った。これまでの解析から、既に tau-Tg 線虫の行動障害を軽減する化合物と

して X を同定しており、同化合物の効果について本法による定量的な解析を行った。その結果、化合物 X は有意に tau 発現による神経機能障害を軽減した (図 4)。

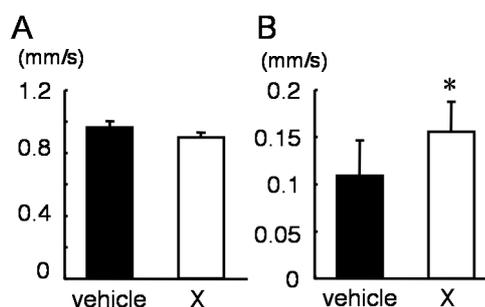


図4: 線虫 liquid thrashing に対する化合物 X の効果。各輝点の移動速度を平均化した。30 μ M X 処理は Mock-Tg の運動機能に影響を与えない (A)。一方、tau の発現による運動障害は有意に改善される (B)。(Student's t-test * $P < 0.05$)

本課題は申請者がこれまでに作成、解析してきた Tau オパチーモデル線虫の行動障害をより客観的、定量的に解析することを目的としている。本課題による成果は当初の計画、目標を十分に満たすものであり、今後広く活用されることが予想される。

線虫はその神経ネットワークが詳細に同定されており、神経の機能障害、神経形態学的異常などが解析出来る最も単純な動物モデルである。さらに遺伝学的手法、薬理学的手法による網羅的な解析を取り入れることが可能な実験動物であり、とくに神経疾患モデルとしての利用が期待される。現在、アルツハイマー病、Tau オパチーにおける Tau だけでなく、synuclein、TDP-43、FUS、Huntingtin など神経変性疾患に関連する遺伝子、タンパク質が多数同定されており、その一部では線虫を用いたモデルが報告されている。これらタンパク質による神経機能障害のメカニズムはいずれも不明であるものの、治療法、治療薬の開発が急務となっている。明確な創薬ターゲットが不明である疾患に対し、神経機能を広く改善する化合物の検索するためには in vivo のスクリーニング系が必須であり、本研究と同様に線虫モデルの構築、化合物スクリーニングの応用は第一選択となるであろう。そのようなケースでは本課題で確立した自動計測システムが客観性、ハイスループット化をとおしてスクリーニング精度の向上に大きく貢献出来ると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

・Miyasaka T, Sato S, Tatebayashi Y, Takashima A. Microtubule destruction induces tau liberation and its subsequent phosphorylation. FEBS Letters (2010) 584, 3227-3232 (査読有)

〔学会発表〕 (計 2 件)

① Miyasaka T, Shinzaki Y, Yoshimura S, Yoshina S, Kage-Nakadai E, Mitani S, Ihara Y. Imbalanced expression of tau and tubulin may be a determinant of the tauopathy cascade. 40th Annual meeting, Society for Neuroscience (2010, 11, 15), SanDiego

② Miyasaka T, Yoshimura S, Saka A, Shinzaki Y, Yoshina S, Kage-Nakadai E, Mitani S, and Ihara Y. Curcumin improves tau-mediated neuronal dysfunction in nematode. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD) 2010 (2010, 7, 14), Hawaii

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮坂 知宏 (MIYASAKA TOMOHIRO)

同志社大学・生命医科学部・助教

研究者番号：90342857