

パーキンソンモデルショウジョウバエの 進歩と応用ーゴーシェ病との関わり

公益財団法人 国際科学振興財団 時間生物学研究所

川崎 陽久、鈴木 孝洋、高原 翼、伊藤 薫平、石田 直理雄

パーキンソン病は、もっとも良く知られている神経変性疾患のひとつである。いわゆる認知症を引き起こす疾患の中ではアルツハイマー病に次いで多い。脳の黒質にあるドーパミン作動性ニューロンが減少すると共に、 α シヌクレインで構成された繊維状神経細胞内封入体であるレビー小体が形成され、錐体外路運動障害が生じる。 α シヌクレインのアミノ酸変異は家族性パーキンソン病の原因となり、 α シヌクレインがレビー小体および異常神経突起 (Lewy neurites) に蓄積する。

Feanyらは、野生型および変異型のヒト由来 α シヌクレイン遺伝子をショウジョウバエで発

現させることで、パーキンソンモデルショウジョウバエを作成した。このモデルショウジョウバエは、成人発症性の特徴であるドーパミン作動性ニューロンの減少を引き起こし、 α シヌクレインで構成されるレビー小体の発生や、運動機能の障害など、ヒトにおけるパーキンソン病の主要な病変を再現する事ができた¹⁾。

実験動物には数多くの種類があるが、医学研究に用いられる。実験動物として最もポピュラーな存在は、言うまでも無くマウスである。しかしながら、我々の研究室では、専らショウジョウバエを使用している。実は、ショウジョウバエには、マウス

に比べて、経済性や迅速性、飼育に手間がかからない等の様々な利点がある。通常のマウス・ラットを用いた動物実験は、実験結果が出るまでに多大な時間が費やされるばかりか、近年は動物愛護や管理の観点から、これまでのような実験が行いにくくなってきている。実験でやむなくマウスを殺傷する場合は、数多くの書類を作成する必要があるのだが、これが、大変な手間だ。また、多数のマウスを飼育する場合、多くの飼育スペースや餌が必要となる。例えば特定の疾患に有効な薬剤をスクリーニングする場合、膨大な労力と設備、予算が必要となる。

このように、マウスを用いた

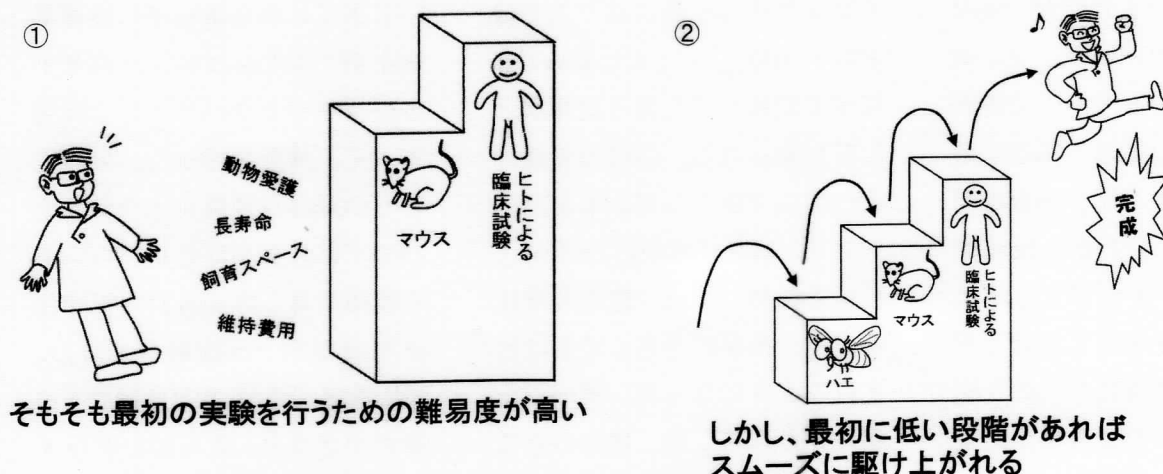


図1：マウス実験の前段階として、ショウジョウバエ実験を組み入れる。

実験には、大きなハードルが立ちふさがっている。この手前に、低いハードルとして設置されるのが、ショウジョウバエなのだ(図1)。ショウジョウバエは10日程で成虫になるため世代交代が早い。また、寿命は約2カ月しか無いため、寿命測定にも適している。体長は3ミリ前後と非常に小さいため、直径3センチほどの容器に数十匹のショウジョウバエを餌と一緒にに入れて飼育し、半月ごとに餌を交換するだけの手間も非常にかからない実験動物なのである。したがって、薬剤の一次スクリーニングのためにショウジョウバエを使用し、続く2次スクリーニングでマウスを使用する方が、犠牲となるマウスの数も大幅に削減することができ、合理的である。

我々の研究室では、ヒト α シヌクレインA30PをUAS-GAL4システムを用いて強制発現したパーキンソン病モデルショウジョウバエを用いて、薬剤のスクリーニングなどの研究を行っている。例えば、パーキンソン病発症に先駆けて睡眠障害が起きる事が知られているのだが、我々の研究室でこのパーキンソン病モデルショウジョウバエで睡眠解析を行ったところ、同様の睡眠異常がパーキンソン病発症前に確認された(伊藤ら投稿準備中)。このショウジョウバエに様々な薬剤を与えて飼育したところ、睡眠改善に効果的な物をスクリーニングする事が出来た。さらに、この薬剤は、パーキンソン病に特徴的な運動機能

の不調をも改善させる事が、確認できた。このように、ショウジョウバエを用いた病理モデルは、医学研究に対して非常に有効だと言える(投稿準備中)。

ところで、わが国では患者数が少ないためあまり知られていないが、ゴーシェ病(Gaucher's disease)という名の遺伝病がある。これは非常に稀な常染色体劣勢遺伝性疾患で、*Glucocerebrosidase* (GBA) 遺伝子が発変する事により、その産物であるグルコセレブロシダーゼ酵素の活性が低下あるいは欠損する疾患である。その結果、生体膜の構成成分であるスフィンゴ脂質の分解過程で、基質であるグルコセレブロシドが体中のマクロファージに蓄積すると考えられている^{2,3)}。病状としては、神経症状、骨症状、肝脾腫などが挙げられ、非神経型(1型)、急性神経型(2型)、亜急性神経型(3型)の3タイプに分類され、特に2型の患者は2歳まで生きる事が出来ず、深刻な疾患である。日本では4~6万人に1人という非常に僅かな確立で発症するが、アッシュケナーズ系ユダヤ人では900~1000人に1人と極めて高確率で発病してしまう民族病としても知られる。GBAの変異体をヘテロで保有しているとパーキンソン病発症率が約28倍に上昇するため、最近、認知症発症の強力な増悪因子としても注目されるようになった。ゴーシェ病のメカニズムは、現在のところ不明で、治療や予防方法がほとんど存在しない。高齢化社会の

到来に伴い、これら疾患の治療や予防等の対策を確立させることが急務となっている。

ゴーシェ病のモデル動物作成の試みは古くからあったが、モデルマウスは約40年間、実現しなかった。非常にシビアな病気であるため、GBA ホモログをノックダウンさせると約3週間で死に至る。

当研究室では、ゴーシェ病のヒト原因遺伝子を導入した組み換えショウジョウバエを作成し、ゴーシェ病モデルショウジョウバエを確立した。この系統では、小胞体ストレスの亢進や、複眼の形態異常が確認された。また、ヒトゴーシェ病に有効とされる化合物・アンブロキソールが小胞体ストレスを軽減する事でゴーシェ病モデルショウジョウバエの神経変性疾患症状を緩和する事も確認された⁴⁾。

最近、ショウジョウバエのCG31414およびCG31148という遺伝子が、GBA遺伝子のショウジョウバエホモログ(相同遺伝子)ではないかという報告が、相次いでいる。当研究室では、いち早くこれら遺伝子の変異系統を第2世代のゴーシェ病モデルショウジョウバエとして利用すべく、検証を行った。少なくともCG13414変異ショウジョウバエでは、グルコセレブロシドの蓄積が見られ(図2)、平均生存期間が約25%短縮し(図3)、睡眠障害(図4)などを確認する事ができた⁵⁾。さらに、クライミングアビリティ測定を行ったところ、有意に運動機能の低

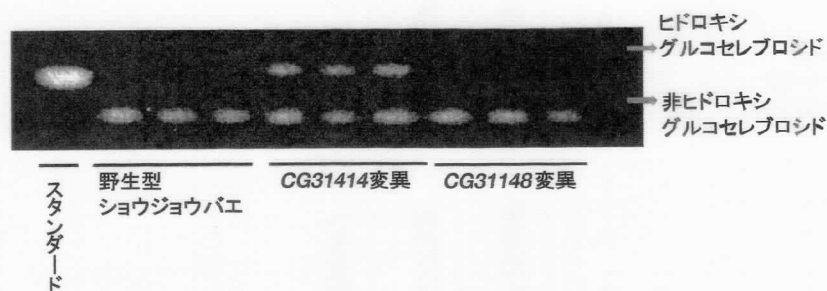


図2：ショウジョウバエ GBA ホモログ変異体では、グルコセレブロシダーゼ酵素の活性が低下したため、グルコセレブロシドの蓄積が起きる。

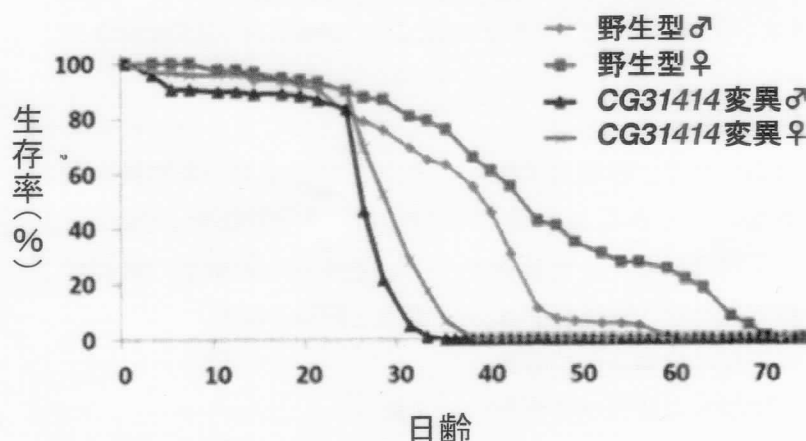


図3：ショウジョウバエ GBA ホモログ変異体では、生存期間が著しく減少する。

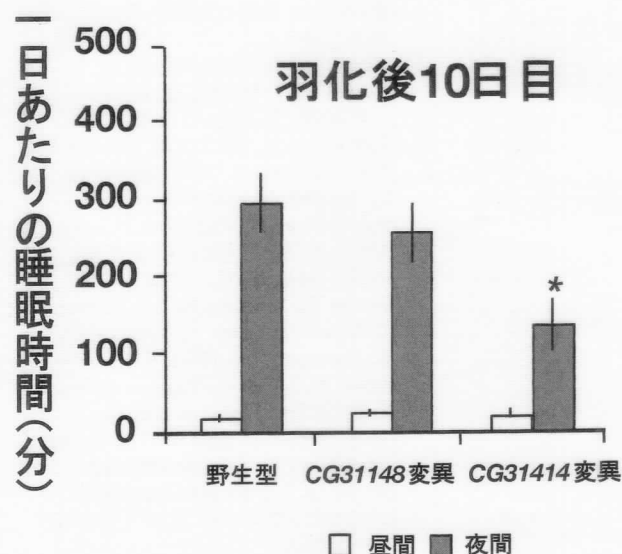


図4：ゴーシェ病の特徴である睡眠の減少が、ショウジョウバエ GBA ホモログ変異体でも再現される。

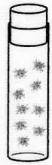
下も確認された(図5)。しかしながら、CG31148変異ショウジョウバエでのこれらに関しては、野生型とほとんど違いは見られ

なかった。変異系統の他にRNAiを行って、これら遺伝子を不活化させても、同様の結果が見られた。これらの結果がCG31414

遺伝子がヒトのゴーシェ病原因遺伝子と同様の機能を持つオルソログだと考えている。ちなみに、パーキンソン病で発現異常を起こす遺伝子群について、それぞれの発現を測定してみた(図6)ところ、*p62*および*tok*、さらに*26-29-p* (*cathepsin k*) の発現が増加していたことから、オートファジーや細胞免疫系が活性化している可能性が示唆された。*Pink1* の発現が増加したため、ミトコンドリア機能不全も示唆された。また、*CG14715* (*FKBP10*) の発現が増加しているため、プロテオソームによる分解促進やコラーゲン異常の可能性も示唆された。しかしながら、*s-xbp1* の発現は低いため、小胞体ストレスはこの変異系統には起きない可能性も考えられた。*CG31148* 遺伝子と *CG31414* 遺伝子は近傍にあり、ヒトにおいても *GBA1* 近傍に偽遺伝子が存在していることから、*CG31148* は偽遺伝子である可能性も考えられる。よって、我々は *CG31414* 変異系統を新たにゴーシェ病モデルショウジョウバエとして採用する事にした。

さらに、我々の研究室では、ゴーシェ病モデルショウジョウバエに飢餓ストレスを与える事で、約3日間という短期間で生存率を測定する新しい系(ASアッセイ: Accelerated Starvation assay)を開発した。ゴーシェ病に対する新規治療薬を得るため、このアッセイ系に *CG31414* 変異系統を用いて、約300種類の薬剤を餌に混ぜて摂食させるとい

①空のバイアルに、決まった数のショウジョウバエを入れる



②机上で数回軽く叩き、ハエを完全に下に落とす



③そのまま静置しておき、決まった時間(通常は10秒)で決まった距離(例えば10センチ)に到達したハエをカウントし、全個体数の何パーセントになるかでクライミング活性を算出する。

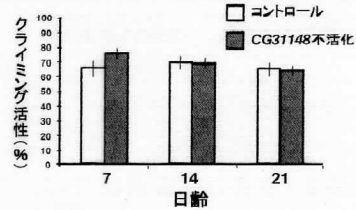
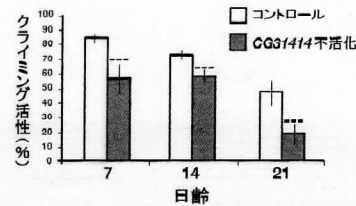


図5: 運動機能の低下は、クライミングアッセイで測定する事ができる。UAS-GAL4 およびRNAiによって、ショウジョウバエの神経系でGBA ホモログの発現を低下させクライミングアッセイを行ったところ、加齢に伴う運動機能低下が、CG31413の不活化でより顕著に見られた。

うスクリーニングを行った。その結果、候補物質を7種類に絞り込む事が出来、これらの薬剤で生存期間の延長が確認された。この作業には、修士課程の学生が一人で、1年間という短期間で成し遂げる事ができた。このように、非常に効率的なアッセイが可能となった。とは云うものの、飢餓条件下ということやヒトとショウジョウバエでは脊椎動物と無脊椎動物という違いや、

ヒトの血液とショウジョウバエの体液の違いなど、相違点は数多く存在する。しかしながら、薬の治療薬開発における経済性という点で見れば、ショウジョウバエは非常に安価でかつ容易に開発に繋がる可能性があると言える。よって、ショウジョウバエでの薬剤スクリーニングを1次スクリーニングのツールとして用い、そこで効果が見られた場合、これらの候補物質を用い

てマウスやラットなどの哺乳類やヒト患者由来の細胞株を用いて2次、高次評価をしていくことで、効率的な治療薬の開発ができると期待される。

文献

- 1) Feany, M.B. and Bender, W.W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404(6776), 394-398. doi: 10.1038/35006074.
- 2) 衛藤義勝, 井田博幸. (2016). ゴーシェ病 Up Date. 診断と治療社. ISBN978-4-7878-2246-8
- 3) Mitsui, J., Mizuta, I., Toyoda, A., Ashida, R., Takahashi, Y., Goto, J., Fukuda, Y., Date, H., Iwata, A., Yamamoto, M., Hattori, N., Murata, M., Toda, T., Tsuji, S. (2009). Mutations for Gaucher Disease Confer High Susceptibility to Parkinson Disease. *ARCH. NEUROL* 66(5), 571-576. doi: 10.1001/archneurol.2009.72.
- 4) Suzuki, T., Shimoda, M., Ito, K., Hanai, S., Aizawa, H., Kato, T., Kawasaki, K., Yamaguchi, H., Ryoo, H. D., Goto-Inoue, N., Setou, M., Tsuji, S., Ishida, N. (2013). Expression of human Gaucher disease gene *GBA* generates neurodevelopmental defects and ER Stress in *Drosophila eye*. *PLOS ONE*. 8(8):e69147. doi: 10.1371/journal.pone.0069147.
- 5) Kawasaki, H., Suzuki, T., Ito, K., Takahara, T., Goto-Inoue, N., Setou, M., Sakata, K., Ishida, N. (2017). Minos-insertion mutant of the *Drosophila* GBA gene homologue showed abnormal phenotypes of climbing ability, sleep and life span with accumulation of hydroxy-glucocerebroside. *Gene*. 30 (614), 49-55. doi: 10.1016/j.gene.2017.03.004.

各遺伝子の発現量

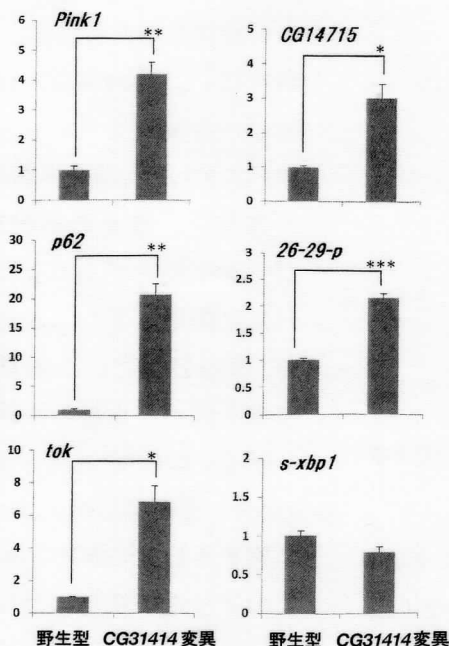


図6: qRT-PCRにより、パーキンソン病で発現異常を起こす遺伝子群のショウジョウバエホモログの遺伝子発現を測定した。