

## 別紙様式 3

## 4 大学連携研究（公募型）支援費に係る研究成果（ホームページ用）

事 項	(所 属)	(職 名)	(氏 名)
共同研究 代表者	京都府立医科大学大学院 医学研究科神経内科学	教授	水野 敏樹
研究組織 の体制	京都府立医科大学 京都工芸繊維大学 京都工芸繊維大学 京都工芸繊維大学 京都薬科大学	教授 教授 教授 准教授 教授	徳田隆彦 山口政光 森 肇 井上喜博 中田徹男
研究の名称	脳神経系疾患の発症メカニズム解析と神経再生の新技術開発を統合した新規ヘルスサイエンス共同研究		
研究のキーワード（注1）	神経疾患モデル、ショウジョウバエ、筋萎縮性側索硬化症、		
研究の概要 （注2）	<p>京都3大学（工繊大、府医大、薬科大学）間で共同研究チームを構築して、昆虫モデル・ラットモデルを用いてヒト神経疾患の発症機構を解明する学際的共同研究を行った。筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子<i>Fig4</i>遺伝子を複眼原基特異的にノックダウンした神経疾患モデルを作成し複眼形態異常を誘導すること、神経特異的にノックダウンしたモデルで運動能力の低下と寿命の短縮、さらに神経筋接合部のシナプス長の短縮を認め、そのシグナル伝達経路の探索を進めている。酸化ストレスを体内に蓄積するショウジョウバエシステムを作製し、加齢にともない行動量が低下し、寿命が短縮、アポトーシスの誘導によって脳内のドーパミン神経数が早期に減少していることを明らかにした。また昆虫工学手法を用いて神経細胞増殖因子NGF多角体の開発をおこなった。高血圧モデルラットにおける脳血管障害の発症とTGF-<math>\beta</math>発現推移を検討し、TGF-<math>\beta</math>シグナルの異常を明らかにした。今後病態解明と共に損傷した神経系の再生技術の開発ならびに神経疾患の治療薬の探索を視野に入れた共同研究をこのチームで発展させる予定である。</p>		
研究の背景	<p>これまでに京都3大学間で共同研究チームを構築して、昆虫モデル・ラットモデルを用いてヒト神経疾患の発症機構を遺伝子レベルで理解するという、各大学の特色を活かした効果的な学際的共同研究を展開してきた。その実績をもとに、本研究ではさらに新たな神経疾患遺伝子を操作したモデル生物を用いて解析して、それらの遺伝子が発症原因とされる神経疾患の発症機構の解明を行った。さらに工繊大の研究開発成果のひとつである「タンパク質を昆虫ウイルス多角体に固定化する昆虫工学技術」を損傷した神経系の再生に応用する新規の技術開発を進めた。</p>		

<p>研究手法</p>	<p>1. 新たな筋萎縮性側索硬化症(ALS)ショウジョウバエモデルとなるヒト遺伝子導入ショウジョウバエの作製およびそれらを用いた発症メカニズムの解析 (山口、水野、徳田)</p> <p>ヒトALSの原因遺伝子として新たに発見された<i>Fig4</i>遺伝子のショウジョウバエホモログのノックダウン系統を解析し、<i>Fig4</i>遺伝子の生体内機能を明らかにする。ヒトの脳小血管病の原因遺伝子とされるNotch3遺伝子を遺伝子導入した昆虫モデルを作製し、脳神経系にどのような異常が生じるか、免疫染色法等により検討した。</p> <p>2. ヒト脳小血管病モデルにおけるTGF-βの解析 (中田、水野)</p> <p>脳小血管病モデルとして、DOCA食塩負荷高血圧モデルラットにおける脳血管障害の発症とTGF-β発現推移を経時的に検討し、脳腎連関とTGF-β発現の関連について検討した。</p> <p>2. 神経系の再生をめざした神経細胞の培養新技術の開発 (森)</p> <p>神経前駆細胞の増殖、分化に必要な細胞増殖因子NGFをカイコサイポウイルスBmCPVが作る多角体に固定化したNGF多角体を作製する。これをPC12細胞に与えて神経細胞への分化が誘導されるか、作製した多角体が機能的なNGFを効率よく徐放できることを確かめる。</p> <p>3. 酸化ストレスによる老化が早い昆虫モデルを用いた脳神経系の変化に関する解析 (井上、徳田、山口)</p> <p>老化の原因と考えられている酸化ストレスが体内に蓄積するショウジョウバエを遺伝子操作法により作製した。ドーパミン神経の細胞数が減少の有無、神経細胞のアポトーシスの有無を検討する。さらにその誘導に関わる遺伝子群を同定する。ドーパミン神経以外に、脳内にあるどのような種類の神経細胞が老化に伴って減少しやすいか明らかにする。</p>
<p>研究の進捗状況と成果</p>	<p>1. ヒトALSの原因遺伝子として新たに発見された<i>Fig4</i>遺伝子を複眼原基特異的にノックダウンすると複眼形態異常を誘導することを見出した。また神経特異的にノックダウンすると運動能力の低下と寿命の短縮、さらに神経筋接合部のシナプス長の短縮を観察した。これらの表現型は他のALS原因遺伝子である<i>FUS</i>遺伝子のショウジョウバエホモログ<i>Caz</i>ノックダウン系統が示す表現型と一致しており、両遺伝子と共通に関連する遺伝子とシグナル伝達経路の探索を現在進めている。(山口・徳田・水野担当)</p> <p>2. DOCA食塩負荷2週目より血圧上昇と尿蛋白の増加を認め、3~4週目にかけて高率に脳室穿破を伴う穿通枝領域の脳出血を発症した。組織別のTGF-βの発現を検討したところ、腎臓や脳微小血管といったstrain vessel構造をもつ臓器でより早期にTGF-βが増加し、続いて、胸部大動脈、頸動脈、脳大血管で増加することが示された。</p> <p>3. 神経細胞増殖因子NGFをカイコサイポウイルスBmCPVが作る多角体に固定化したNGF多角体を作製した。得られた2種類のNGF多角体はいずれもPC12細胞の分化を誘導した。またこのNGF多角体を培養容器の1カ所に貼り付け後、PC12細胞を播種するとNGF多角体から一定の間隔を保って、細胞が一行に並ぶ現象が見られ、神経細胞によるネットワーク形成へ繋がることが示唆された。(森)</p>

	<p>担当)</p> <p>4. 老化や疾患との関連が想定される酸化ストレスを体内に蓄積するショウジョウバエモデルを構築した。この成虫は脳内のドーパミン神経数が早期に減少する。これはアポトーシスの誘導によるとの結果を得た。酸化ストレスがセロトニン、オクトパミン産生神経に及ぼす影響についても調査中である。(井上)</p>
地域への研究成果の還元状況	市民、医療関係者等への講演活動を通じた脳血管疾患の予防の啓蒙
研究成果が4大学連携にもたらす意義	<p>神経内科学と昆虫科学という異分野の学問分野を融合させた共同研究により、発症機構の解明から、神経再生、治療薬探索まで視野に入れたユニークな共同研究を実施することが本研究計画の目的である。3大学の教員・学生が一つの研究プロジェクトに真摯に取り組むことが大学連携の強化、さらなる教育研究の発展につながり、「ヘルスサイエンス教育プロジェクト」を推進するための体制基盤になりうる。また各大学の特徴を活かした神経難病疾患の新規治療法開発のためのモデル研究となり、産学協同による治療法開発のシーズとなる。</p>
研究発表 (注3)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 Kuriyama N, <u>Mizuno T</u>, (12人中2番目) et al. TGF-beta1 is associated with the progression of intracranial deep white matter lesions: a pilot study with 5 years of magnetic resonance imaging follow-up. Neurological Research Vol; 36, 47-52, 2014.</li> <li>2 Y Azuma, T Tokuda, M Shimamura, A Kyotani, H Sasayama, T Yoshida, I Mizuta, <u>T Mizuno</u>, M Nakagawa, N Fujikake, M Ueyama, Y Nagai, M Yamaguchi. Identification of ter94, Drosophila VCP, as a strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of Caz, Drosophila FUS. Human Molecular Genetics ; 23(13):3467-80, 2014</li> <li>3 M Shimamura, A Kyotania, Y Azuma, H Yoshidaa, T. B. Nguyena, I Mizuta, T Yoshida, T Mizuno, M Nakagawa, T Tokuda, M Yamaguchi. Genetic link between Cabeza, a Drosophila homologue of Fused in Sarcoma (FUS), and the EGFR signaling pathway. EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 326: 36-45, 2014</li> <li>4 Oka, S., Hirai, J., Yasukawa, T., Nakahara, Y. and Inoue, Y. H.: A correlation of reactive oxygen species accumulation by depletion of superoxide dismutases with age-dependent impairment in the nervous system and muscles of Drosophila adults. Biogerontol. (2015) Mar 24. 10.1007/s10522-015-9570-3</li> <li>5 Yasukawa, T., Nakahara Y., Hirai, J., and Inoue, Y. H.: Drosophila Ogg1 ortholog is required for suppression of 8-oxo-guanine accumulation by oxidative stress. Gene Genet System. (2015) in press.</li> <li>6 中田徹男. 神戸新聞夕刊(2015.4.6)「高血圧と生活習慣病」</li> </ol>