

ゼブラフィッシュを用いたパーキンソン病の in vivo薬剤スクリーニング

新潟大学超域学術院 テニュアトラック准教授 松井 秀彰



パーキンソン病はドパミン神経や他の部位の神経の変性を来す神経変性疾患であり治療は未だ症状を緩和する“対症療法”や不足する物質を補う“補充療法”にとどまります。そういった難病に対してよりよい治療方法を見つける場合、少なくとも3つの方法が考えられます。第一は原因をしっかりと解明しその原因に対してアプローチする方法であり、パーキンソン病の場合であればなぜ神経細胞が死んでいくかという点の根本原因が分かれば、治療法の開発に向け大きなステップアップとなります。ただし残念ながら疾患の最初の記載から100年が経つ現在でも、細胞死の原因は不明のままです。第二は最近特に日本では注目を集めている再生医療で、iPSやES細胞を用いて失われた細胞を補う方法です。これは広い意味での補充療法であり、予算の面からも国民からもとても大きな期待がかけられていますが、移植した神経細胞もパーキンソン病を発症することが既にわかっています。また再生医療は他の治療との併用も期待され、やはりパーキンソン病そのものの治療を見つけることは変わらず必要とされています。第三はなんらかの疾患の指標を利用して、疾患改善の可能性のある薬剤を網羅的に検索する方法です。効くか効かないかわからない物質を患者さんにむやみに投与することは、これは倫理的に大問題ですし、また仮にマウス等を使ってやるにしてもそういった比較的大型の動物ではせいぜい数種類の薬剤を検討するのが精一杯です。またパーキンソン病の場合はよいモデル動物を作製するという面でも困難が立ちまわります。

私達は今から10年前にメダカやゼブラフィッシュといった小型魚類の新規疾患モデルとしての可能性にいち早く着目し、これまでパーキンソン病や脊髄小脳変性症の疾患モデル魚類の作製を行ってきました。特に最近では稚魚の段階で顕著な神経変性を来すパーキンソン病モデルと脊髄小脳変性症モデルの作製に成功しています。これらはもちろん当該疾患の病態解明にも役立つものです。しかしさらに小型魚類の有用な点は、治療薬の検索、特に小型魚類の特性を生かして網羅的に多数の化合物・薬剤の効果を探索する事ができる点です。この強みを最大限に活用し、私達は難病医学研究財団の平成26年度医学研究奨励助成金助成金を受け、小型魚類を用いた治療薬検索のシステム確立のため以下の項目に取り組みました。

1：疾患モデル小型魚類の作製と比較

既に私達は複数のパーキンソン病モデルを作製済みですが、近年のTALEN、CRISPRといった遺伝子工学技術の登場により、より自在に遺伝子改変を行うことができるようになりました。そのTALENやCRISPRを用いて家族性パーキンソン病の原因遺伝子であるPINK1、ATP13A2、GBA等の家族性パーキンソン病の原因遺伝子を破壊したゼブラフィッシュを作製いたしました(図1)。

それらのモデルはいずれもドパミン神経およびノルアドレナリン神経の変性を来すことを確認しました。

PINK1 KO (CRISPR)	
CCGGCCGGTACCGCTTCTTCAGGTTGTCTGTACGCGGGCT	Wild type
CCGGCCGGTACCGCTTC [TTC] AGGTTGTCTGTACGCGGGCT	Δ3
CCGGCCGGTACCGCT [TTC→G] TCAGGTTGTCTGTACGCGGGCT	Δ2
CCGGCCGGTAC [CGCTTCTTC] AGGTTGTCTGTACGCGGGCT	Δ9
ATP13A2 KO (CRISPR)	
CATCCTCTCCCTGACACTGAA CCCTCATAAAGGATCCAAGACC	Wild type
CATCCTCTCCCTGACACTGAACCCC [TCA] TAAAGGATCCAAGACC	Δ3
CATCCTCTCCCTGACACTGAACCCCCT [AT] AAAGGATCCAAGACC	Δ2
CATCCTCTCCCTGACACTGAACCCCCT [CAT→GAACTAAGGATCC] AAAGGATCCAAGACC	Δ10
GBA KO (TALEN)	
TGCTGCCAGATGCTGGTCA GTCTTATCATATGTCAGCAATAAAGCTGGCAGCA	Wild type
TGCTGCCAGATGCTGGTCAAG [TTCTTATCATATGTCAG] CAATAAAGCTGGCAGCA	Δ17
TGCTGCCAGATGCTGGTCAAGTTCTT [ATCATATGTC→GCT] AGCAATAAAGCTGGCAGCA	Δ7
TGCTGCCAGATGCTGGTCAAGTTCT [TATCAT] ATGTCAGCAATAAAGCTGGCAGCA	Δ6

図1：CRISPRおよびTALENにて作製したパーキンソンモデルの例
赤字はTALENないしはCRISPRによる切断部位を示す。
青字はTALENの認識site。

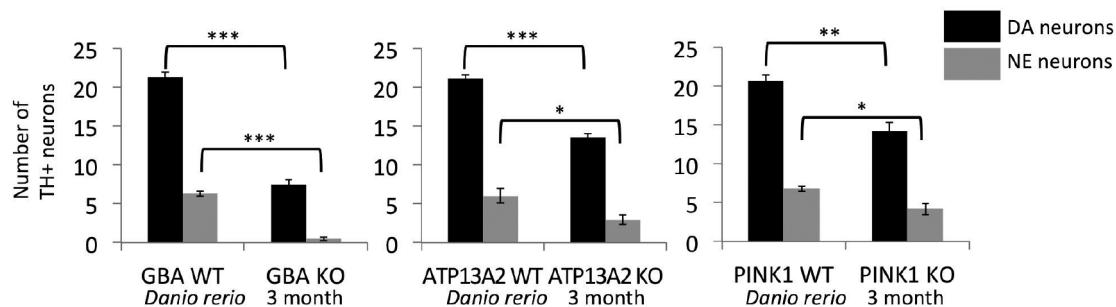


図2：パーキンソンモデルの神経変性

いずれのモデルも3ヶ月でドパミン神経およびノルアドレナリン神経の有意な減少を認める。

今後はこれらのモデルと申請者自身の保持する従来のモデルと比較を行い、稚魚の段階で、パーキンソン病の表現型をより明白に呈するものを選択していきます。またいくつかのモデルを交配することにより、より明白な表現が得られる可能性もあり、そちらも並行して取り組んでいます。

2：疾患評価指標の開発

疾患の状態を評価する指標は神経細胞の蛍光画像取得を用います。既にドパミン神経や小脳Purkinje細胞の細胞数計測等は申請者が確立しています。しかしドパミン神経の評価は現在では抗体染色やin situ hybridizationによらなければなりません。その実験作業は簡便とは言えず、網羅的な解析には適していません。私達はDopamine transporterというドパミン神経に特異的に発現を示すものの遺伝子にCRISPRを用いてRFPタグをノックインかつ付加する事で、ドパミン神経細胞数の評価を確立することに取り組みました。しかし多数の方法を試しましたが、結局ドパミン神経をきれいに標識できる個体の樹立には至りませんでした。

そのため現在はターゲットの遺伝子をDopamine transporterではなくVMAT2に変更し、そちらによるドパミン神経およびノルアドレナリン神経の標識に取り組んでいます。

今後の課題

今後も引き続き明白な表現型を呈するパーキンソン病モデルを選択すること、ならびにドパミン神経の最適な標識方法を検索することに取り組みます。それらにより小型魚類パーキンソン病モデルの稚魚を薬剤スクリーニングに用い治療薬の探索を行うためのセットアップに取り組みます。さらに同様の方法でいずれも難病である筋萎縮性硬化症や脊髄小脳変性症、アルツハイマー病等の他の神経変性疾患や、より複雑な神経難病・精神疾患への適応拡大を目指していきます。

最後に、本研究の概略を示すとともに（図3）、本研究をご支援いただいた難病医学研究財団ならびに関係者の皆様に深く感謝いたします。

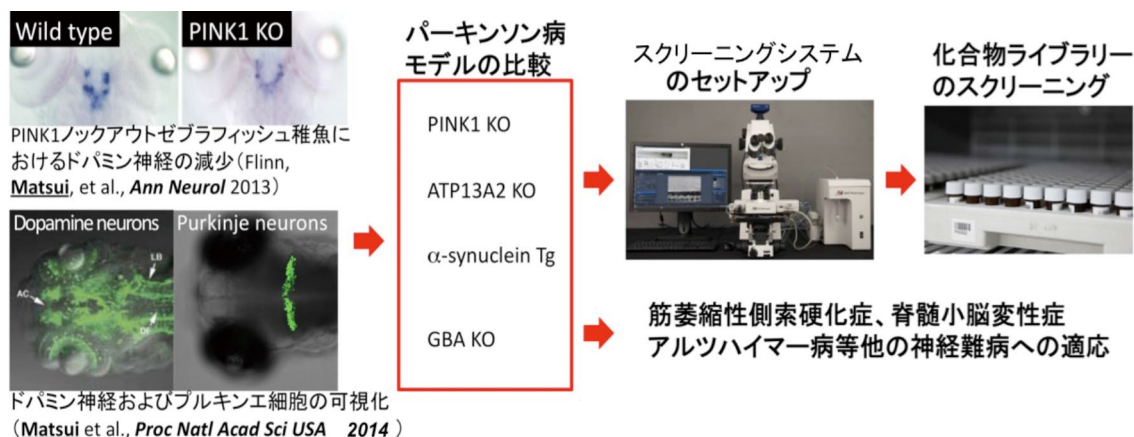


図3：本研究の概略