

神経系の機能低下は、老年期において我々の生活の質を低下させる要因の一つである。神経機能を低下させる要因として神経細胞の細胞死があり、アルツハイマー病・パーキンソン病・筋萎縮性側索硬化症等の神経変性疾患においてよく研究がなされている。正常老化においては、近年脳の特定の領域における加齢に伴う神経細胞の細胞死を記述する研究が行われているものの、不明な点が多い。

学位申請者の所属研究室ではショウジョウバエを用い、細胞死の実行因子であるカスパーゼが正常老化に伴いどのような活性化パターンを持つか調べられている。その結果、嗅覚受容神経の一種である Or42b 神経においてカスパーゼ活性化が観察された。嗅覚受容神経は約 50 のサブタイプが存在するが、加齢に伴うカスパーゼの活性化は Or42b 神経のみにおいて高頻度に観察された。また、Or42b 神経におけるカスパーゼ活性化は細胞死を誘導し、さらに Or42b 神経を介した個体の誘因行動の異常を引き起こすことを明らかにした。これらのことから Or42b 神経のカスパーゼ活性化は、正常老化に伴う細胞レベルでの変化と個体の行動の変化を結びつける上で非常に有用なモデルである。学位申請者は本学修士課程において、Or42b 神経の細胞死と自然免疫応答の亢進に相関があることを見出した。本論文は自然免疫応答の亢進に着目し、Or42b 神経の正常老化に伴う細胞死メカニズムの詳細な解析を行った研究成果を述べたものである。

Or42b 神経の細胞死と自然免疫応答の関係を調べるために *J4* ヘテロ接合変異体を用いた研究を行っている。*J4* アレルはショウジョウバエ自然免疫応答経路の一つである Toll 経路の転写因子、*DIF* と *Dorsal* の双方を欠失した変異体であり、寿命は野生型と差がないことを確認している。一般にショウジョウバエにおける自然免疫応答は Toll 経路下流の *Drosomycin*, IMD 経路下流の *Diptericin B* をはじめとした AMP (Antimicrobial peptide) 遺伝子の発現強度に反映される。触角における AMP 遺伝子の発現を調べた結果、野生型で観察される加齢依存的な AMP 遺伝子発現の上昇が *J4* ヘテロ接合変異体では抑制される事が明らかとなった。この結果は感染実験によって調べられてきた研究結果と異なる点が二点ある。一点目は Toll 経路関わる変異体が IMD 経路にも影響を及ぼすことである。このような現象が見られた理由として、IMD 経路の転写因子である *Relish* が *DIF* とヘテロ二量体を作製し Toll、IMD 双方の経路の転写を制御する報告があることから、加齢に伴う触角における自然免疫応答の亢進では転写因子間での Toll、IMD 経路間の相互作用が存在する可能性が考えられる。二点目は老齢個体の触角においては Toll 経路下流の AMP の発現が完全に抑制されているが、感染実験においては *J4* ヘテロ接合変異体では完全には抑制されないことである。これらのことから、触角における加齢に伴う自然免疫応答の亢進は *DIF* と *Dorsal* を介するものの、感染によって誘導される自然免疫応答の亢進の調節機構と異なる可能性が考えられる。

J4 ヘテロ接合変異体での Or42b 神経における加齢依存的なカスパーゼ活性化を調べたところ、野生型で見られるカスパーゼ活性化が *J4* ヘテロ接合変異体では抑制される事が明らかになった。また Or42b 神経の数は、野生型では加齢依存的な細胞体数の減少が見られるのに対し、*J4* ヘテロ接合変異体では加齢依存的な変化が見られなかった。この結果から自然免疫応答の Toll 経路活性化を抑制する事により、Or42b 神経の細胞死を抑制できる事が明らかになっている。

自然免疫経路を亢進した場合の Or42b 神経のカスパーゼ活性化と細胞死を調べるために、自然免疫系路の一つである Toll 経路のリガンドである *Spaetzle* の活性化型 (*Spz^{act}*) を Or42b 神経で過剰発現し、Or42b の細胞死に対する影響を調べている。その結果 30 日齢の時点において野生型

では観察されないカスパーゼ活性化及び細胞死が、活性化型 Spatzle の発現により誘導されることを明らかにした。一方で活性化型 Toll 受容体 (*Toll^{10B}*) を Or42b 神経で発現した場合には 30 日齢においてカスパーゼ活性化は観察されず、細胞体の減少も活性化型 Spatzle と比較して軽度であった。活性化型 Spatzle は分泌型の因子であり Or42b 神経とその周囲の細胞において Toll 経路を活性化するが、活性化型 Toll 受容体は Or42b 神経のみにおいて Toll 経路を活性化する。これらのことから Or42b 神経におけるカスパーゼの活性化と細胞死は Or42b 神経自身の自然免疫経路の活性化の結果ではなく、その周囲の細胞における自然免疫経路の活性化の結果であることが示唆された。上記の結果を更に検証するために、Or42b 神経において自然免疫経路に関わる *Toll*, *MyD88*, *Imd* のノックダウンを行い、加齢依存的な Or42b 神経の細胞死を調べている。その結果、Or42b 神経において自然免疫経路の因子のノックダウンを行っても Or42b 神経の細胞死は抑制されない事が明らかになった。これらの結果は、Or42b 神経の加齢に伴う細胞死は Or42b 神経における自然免疫経路の活性化の結果ではないことを支持する。

自然免疫応答の亢進により AMP の発現が上昇することから AMP が Or42b 神経の細胞死に関わるか調べた。加齢に伴い触角で発現が上昇することを明らかにした AMP である *Drosocin* を Or42b 神経において発現させ、Or42b 神経におけるカスパーゼ活性化及び細胞体数の変化を調べた。その結果、野生型ではカスパーゼ活性化と細胞死を示さない 30 日齢の個体において、*Drosocin* の強制発現により Or42b 神経におけるカスパーゼ活性化と細胞死を誘導する事が明らかになった。従って、*Drosocin* は Or42b 神経の加齢依存的なカスパーゼ活性化に関わる可能性が示唆された。ショウジョウバエ脳で様々な AMP を強制発現することにより神経変性を誘導する報告があることから、*Drosocin* のみならず他の AMP の強制発現によっても Or42b 神経における細胞死を誘導することが出来ると考えている。

Or42b 神経が刺激されることによってショウジョウバエは誘引行動を示すことが知られている。また加齢に伴う Or42b 神経の細胞死によって、Or42b 神経を介した誘引行動が低下することを先行研究で明らかにしている。本学修士課程における研究で、食事制限により加齢に伴う触角における自然免疫応答の亢進が抑制されること、そして Or42b 神経の細胞死が抑制されることを明らかにしている。そこで今回、食餌制限下で老化した個体の Or42b 神経を介した誘引行動を調べている。その結果、食餌制限によって Or42b 神経を介した誘引行動の低下が抑制されることが明らかとなった。この結果は自然免疫応答の亢進の抑制による Or42b 神経細胞死の抑制によって、個体の誘引行動の低下を抑制することが出来る可能性を示唆するものである。

本研究により、ショウジョウバエ嗅覚受容神経 Or42b において観察される正常老化に伴うカスパーゼ活性化と細胞死が、自然免疫経路の活性化によって誘導される事を明らかにしている。また活性化型 Spatzle と活性化型 Toll を用いた実験等から、Or42b 神経以外の細胞における自然免疫応答の亢進が細胞死を誘導することが示された。これらの成果により、正常老化に伴って生じる自然免疫応答の亢進と神経細胞死を結びつけることが出来た。また食餌制限による自然免疫応答の抑制により、老化現象を抑制する事が示唆された。

近年老化に伴う慢性炎症が正常な老化のプロセスや様々な疾患に関与すること、嗅覚系の異常が老化や神経変性疾患の初期段階において生じることが明らかとなっている。このことから本研究の成果は正常老化における脳機能の低下のみならず神経変性疾患の生じるメカニズムの解明にも寄与することが期待される。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。