

実績報告書（総括）

研究課題番号 29-5

ポリグルタミン病モデルマーモセット系統を用いた 病態理解と治療法開発

主任研究者：関 和彦

（1）3年間の研究目標

NCNP では、これまでの所内共同研究によって、発症し進行形の症状を呈する世界初の病態モデルマーモセットの作出及び系統化に成功していた。本研究の目的はこのマーモセット系統の維持・発展を行うと同時に、研究所—病院連携研究によって同モデルを用いた治療法開発やバイオマーカー検索の研究基盤を確立する事であった。このマーモセット系統を作出・解析できる点で NCNP には他にはない戦略的な優位性があるが、この優位性を活かして研究成果を生むためには、基礎（研究所）と臨床（病院）の連携研究を支える研究基盤の整備が必要であった。この研究基盤を用いた継続的な研究によって、難治性疾患であるポリグルタミン病の新たな診断・治療方法が提案できる可能性があった。

（2）3年間を通じての最終的な研究成果

ポリグルタミン病モデルマーモセットの系統化（関）

本研究開発項目では、ポリグルタミン病モデルマーモセットラインを用いた運動失調症の病態解明に必要な次世代個体の作出を行った。具体的には第一世代および第二世代の産生によって、本研究に十分な質・量の動物および研究環境の整備を行った。その結果、第二世代5頭、第三世代3頭、合計8頭の次世代個体が作出された。令和2年6月の時点で、第二世代2頭、第三世代2頭が未発症であり、様々なバイオマーカーを用いた発症評価が進行している。

ポリグルタミン病モデルマーモセットの解析（関）

ゲノム解析の結果、第三世代の2頭において、それぞれ1コピーと2コピーまで純化された。今後、1コピーまで絞られ発症すれば、発症時期・進行症状が安定したモデルマーモセットの完成となる。また、早期発症と晩期発症の個体から脳神経系各部位の導入遺伝子の発現量を比較した結果、小脳、側頭葉、線条体などで導入遺伝子発現量の相違がみられた。またポリグルタミン病モデルマーモセット系統は親子で似た発症機序を示し、発症機序の違いは導入遺伝子がゲノムのどの位置に挿入されたかに起因する可能性が高いことが分かってきた。以上の成果から発症に必要な導入遺伝子が絞られ、発症機序が均一なポリグルタミン病モデルマーモセットが完成する見通しがついた。

新規生化学バイオマーカーの開発（和田・永井）

ポリグルタミン病 (PolyQ 病) に対する疾患バイオマーカーの開発を目的として実験を行った。F1 世代の PolyQ 病マーモセットおよび野生型マーモセットから経時的に検体採取（採血と血清分離）を行い、血清中の細胞外小胞エクソソームについて網羅的プロテオーム解析を行った。その結果、マーモセット血液エクソソームに含まれるタンパク質を 2000 以上同定した。野生型との比較から、PolyQ 病モデルで共通して増加または減少しているタンパク質を同定した。また、PolyQ 病モデルマーモセットの発症前後の血清エクソソームの比較から、発症時に増加するタンパク質を 5 種同定した。前者は疾患マーカーとして、後者は病態を反映して変容するサロゲートマーカー候補としての応用が期待される。また、本研究で明らかとなったマーモセットの血液中エクソソームのプロテオーム情報は、これまでに世界中で報告がなく、初めての網羅的データと

して高い科学的価値を有する。

イメージングバイオマーカーの開発 (花川)

健常個体群では8ヶ月齢まで灰白質が増加したが、TG個体群は発症・未発症を問わず増加率が低かった。白質は、健常個体群では12ヶ月齢で増加がプラトーに達するが、TG個体群は発症・未発症問わず増加率が低かった。小脳は、健常個体では3から12ヶ月齢でやや増加し、発症TG個体群もやや増加傾向であった。線条体は、健常個体では増加傾向だが、TG個体群は発症・未発症問わず増加率が低かった。MRIからは未発症TGについても脳の潜在的な異常がある可能性が高く、発症前バイオマーカーとしてMRIを用いることのできる可能性が示唆された。

マーモセット行動バイオマーカーの開発 (関)

本項目では、ヒト患者を対象に行われるPolyQ患者への行動評価を参考に、PolyQマーモセットの発症と病態の進行を反映する行動バイオマーカーを確立することであった。その結果、運動性を反映する日内活動量、歩行機能を反映するはしご上り能力、平衡機能を反映する棒上歩行課題、また定性的指標としてはマーモセット用主観的運動失調チェックリスト(自作)が発症及び病態の進行を反映することが明らかになった。以上の結果、行動バイオマーカーと発症程度の関連性が確立され、行動バイオマーカーが確立した。

ヒト行動バイオマーカーの開発 (高橋)

運動失調症の患者レジストリJ-CAT(Japan Consortium of Ataxia)を積極的に進めた。海外のコホートと比較して、発症年齢、登録時年齢、登録時SARA総スコアなどの代表的統計量は類似しており、J-CATのMJD/SCA3コホートの信頼性の高さが裏付けられた。従来Historical recordに準拠した臨床指標としてはBarthel score(BI)が使われているが、BIは天井効果のため軽症例の評価には不向きである。J-CAT登録情報を活用して、MJD/SCA3患者の早期例11例において、診察所見に立脚した臨床指標であるSARA scoreと、Historical recordに準拠した臨床指標であるUMSARS score Part Iとの相関関係を検討した。有意差は認めなかったものの、SARAとUMSARS score Part Iの相関関係を示唆する結果が得られた($r=0.31$)。今後J-CATの症例を蓄積していくことによりRobustな相関関係が得られる可能性がある。Historical recordによる臨床指標はより多数の患者における評価に適しており、今後の行動バイオマーカー開発に活用できると考えられた。

ヒトマーモセット共通生化学バイオマーカーの開発 (高橋・関)

Neurofilament Light Chain(NfL)タンパク質は神経変性のバイオマーカーとして知られており、数々のヒト神経変性疾患で患者の血液や脳脊髄液中のNfL濃度が上昇するという報告がある。そこで、モデルマーモセット及び対照群のNfL濃度の計測を行った。予備的解析より、病理解析により神経変性が認められた発症個体3個体の血液中NfL濃度は野生型個体に比べ有意に高い値であり、さらにヒト患者と同程度の値であった。そこでUniversity Collage Londonのハンチントン病研究所との共同研究において、すべての発症個体及び対照群サンプル、及びNCNP病院やバイオバンクで蓄積したサンプルをすべて解析している。現在、年度末に先方にサンプルを送付したが、Covid19によるUCL閉鎖の影響を受けて、解析が停滞している。先方の解析を待って、NfLのバイオマーカーとしての適合性が評価できる。また、上記、エクソソーム解析結果からヒトマーモセット 共通バイオマーカーの探索も継続して進めている。

ポリグルタミン病モデルマーモセットの病理解析 (齊藤)

主として、第二世代個体を対象とした解析を進めた。2017年に論文にした個体とほぼ同様の部位、すなわち、脊髄前角、脳幹運動神経核、末梢神経、筋肉の病変が強く、小脳では個体差が目立った。やはり同胞の病理は他と比して同様の病理を呈していた。封入体の超微形態は、ヒトポリグルタミン病のそれと矛盾しないものと考えられた。遺伝子発現量と病理については、封入体の量では相関は見られなかったが、microgliaやastrogliaの活性化などでは発現量との相関が見られた。

Tet-on システム導入マーモセットのライン化（富岡）

Tet-on システムを搭載したポリグルタミン病原因遺伝子を受精卵に導入することで、7 頭（TET1～TET7）の産仔獲得に成功した。この 7 頭のマーモセット（TET1～TET7）について爪より抽出した DNA を解析した結果、4 頭がトランスジェニック個体であった。さらに、ドキシサイクリンを投与することで遺伝子発現量が増加したことから、個体レベルで Tet-on システムが正常に機能していた。次に、最も遺伝子発現量の高かった TET3 から、自然交配により第二世代を作出した。その結果、計 6 頭の個体（TET3-1～6）の獲得に成功し、DNA 解析した結果、TET3-3 のみトランスジェニック個体であった。TET3-3 より採取した耳線維芽細胞にドキシサイクリンを添加することで遺伝子発現量が増加したことから、Tet-on システムが正常に機能していた。以上より、Tet-on システムを導入したポリグルタミン病モデルマーモセットの系統作出に成功した。

（3）今後の研究の進め方について

まず、本研究成果の論文化を行う。ヒトと同様発症後に進行性の運動失調を示し、発症時期や症状の進行を反映する複数のバイオマーカーが確立している霊長類モデル動物は世界でも稀有である。論文化の後は、積極的に世界にアピールし、当該疾患臨床前研究の有用なモデル動物として利用されることを願う。

（4）倫理面における配慮の状況（生命倫理・安全対策等の遵守）

本研究での実験動物の取扱に当たっては、厚生労働省が定める「動物実験等の実施に関する基本指針」および国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所の霊長類研究施設倫理指針を遵守し、動物が受ける苦痛を最小限に停める努力がなされた。本研究は国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所により承認された機関承認実験である。

29-5 「ポリグルタミン病モデルマーモセット システムを用いた病態理解と治療法開発」 ポリグルタミン病モデルマーモセットの生化学 バイオマーカー開発

和田 圭司
国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 所長
永井 義隆
大阪大学大学院医学系研究科
神経難病認知症探索治療学寄附講座 教授

【緒言】

加齢に伴って発症する神経変性疾患の克服は、高齢化が進行するわが国における重要な課題である。神経変性疾患の病態解明と治療法開発へ向け、ヒト病態をより正確に反映し、前臨床研究に適した疾患モデルを確立するために、脳の構造・機能や代謝経路がヒトに近い霊長類を用いたモデルの開発が急務である。

ポリグルタミン (polyQ) 病は、原因蛋白質内のpolyQ鎖の異常伸長により発症する神経変性疾患の総称であり、異常蛋白質の構造異常と凝集を通じて、多くの神経変性疾患と共通の分子機構により発症すると考えられている。

私たちはこれまでに、ヒトpolyQ病病態を反映する世界初の遺伝子改変マーモセットを樹立した¹⁾。F0世代のうち早期発症個体の画像解析では第4脳室の開大を認め、病理解析では小脳・脊髄などでの神経変性と、脳幹・脊髄などでの抗polyQ抗体陽性の封入体とミクログリアの活性化を認めた。このpolyQ病マーモセットの疾患モデルとしての妥当性を検証し、疾患バイオマーカーを開発することを目的として、以下の研究を行った。

【方法と結果】

これまでの研究から、異常蛋白質の再折りたたみを行う分子シャペロンがエクソソームと呼ばれる膜小胞によって細胞外に分泌され、polyQ病病態に関わることを明らかにしている²⁾。そこでバイオマーカー候補分子としてエクソソーム内蛋白質に着目し、上記のpolyQ病モデルマーモセット(脊髄小脳失調症3型)の血液エクソソームのプロテオーム解析を行い、候補分子を網羅的に検索する。得られた候補分子については、患者検体にて検証する。

F0世代の発症個体から変異遺伝子の伝達を確認されたF1世代のpolyQ病マーモセットに対し、運動症状の発症年齢を考慮し、3ヶ月齢・

5ヶ月齢・12ヶ月齢での生化学的バイオマーカー評価を行うこととした。PolyQ病モデルマーモセット5頭、ならびに対照群として野生型マーモセット4頭から血液検体を採取した。それぞれの血液検体からエクソソームを含む細胞外小胞画分を精製し、LC-MS/MS測定により画分内に存在するタンパク質を網羅的かつ定量的に解析した。その結果、いずれの検体においても2,000種を超えるタンパク質を定量的に同定することに成功した。そのうち、polyQ病マーモセット群で増加または減少するタンパク質を4種、さらに発症と相関して増加するタンパク質を4種同定した。

現在、これら計8種の変動タンパク質について、polyQ病患者においても変動が見られるかの検証を行っている。NCNPバイオバンクから提供されたpolyQ病患者血液検体21例、および対照群として非変性疾患患者検体25例について、すでにエクソソーム画分の精製が終了し、上記8種のタンパク質についてウェスタンブロットによる定量評価を行っている。今後、定量評価結果について、polyQ病型、罹病期間、polyQリピートや重症度などとの相関を解析することにより、polyQ病生化学マーカーとしての信頼性を評価するとともに、病態を反映して変容する分子の探索を進めていく。

【考察】

本年度は、polyQ病に対する疾患バイオマーカー開発に向け、polyQ病モデルマーモセット由来血液エクソソームのLC-MS/MS測定結果について、詳細なプロテオーム解析を行い、polyQ病モデルでの変容分子を8種同定した。さらにこれら8種について、患者検体を用いた検証実験を開始した。今後、患者検体における定量評価結果と臨床症状との相関解析を進めることにより、病態を反映しかつ発症前から検出可能な鋭敏な疾患バイオマーカーの開発を目指す。

【成果発表】

【学会】

- 1) 永井義隆. 認知症・神経変性疾患バイオマーカーとしての血液中エクソソームの可能性. 第38回日本認知症学会学術集会(R1.11.7-9、東京)
- 2) 中谷輝実、他. 国立精神・神経医療研究センターにおけるトランスジェニックマーモセット研究の現状. 第9回日本マーモセット研究会(R2.2.14-15、神戸)

29-5「ポリグルタミン病モデルマーマセツト系統を用いた病態理解と治療法開発」

(分担課題名) SCA3 の種間画像マーカーの開発

分担研究者 花川 隆

国立精神・神経医療研究センター 脳病態統合イメージングセンター 先進脳画像研究部

緒言

神経変性疾患には治療法が確立されていない難病が多い。治療法の確立に寄与するモデル確立を目指して、ヒトの疾患遺伝子を導入したトランスジェニックマーマセツトの開発が進められているが、種差のためにモデル動物の遺伝系・表現形だけではモデルとしての妥当性を言うことは難しいことが予想される。本研究では、磁気共鳴撮像 (MRI: Magnetic Resonance Imaging) を用いることで、トランスジェニック (TG) マーマセツトの脳構造、機能異常を非侵襲的かつ縦断的に評価しつつ、ほぼ同じ方法で取得できるヒト患者での MRI 研究と組み合わせることで、TG マーマセツト疾患モデルの妥当性の評価を可能にする非侵襲全脳網羅的イメージング法の基盤技術を開発することを目指した。さらに、蓄積を進めてきた健常・SCA3 モデルマーマセツトの MRI データを用いて、MRI 解析技術の最適化を図り、次いでヒト患者 MRI 研究により種間の相同・特異性を同定していくことを目指した。

方法

ヒトSCD患者とマーマセツトモデルの画像バイオマーカー樹立プロジェクトを並行して推進した。

マーマセツトプロジェクトでは、健常、発

症TG、未発症TG個体の脳体積を経時的に計測した。健常・TGマーマセツトで縦断的MRI撮像を行い、正常と遺伝子異常に伴う脳構造・脳機能の経時的変化のデータポイントを増やした。マーマセツト健常群から得られたMRIより当施設における年齢別マーマセツト標準発達データを作成し、健常モデルと疾患モデル群間での脳灰白質容積の違い比較した。特に小脳および第四脳室付近や基底核に絞った健常群、SCA3モデル群間の脳体積の変化についても検討した。

ヒトプロジェクトでは、SCD総計31名 (SCA3, SCA 6, SCA 31, CCAを含む)、健常コントロール29名のデータを収集した。うちSCD総計23名、健常コントロール21名のデータについて、群間比較およびプリズム適応課題 (Hashimoto et al. 2015) の成績と脳灰白質容積の相関解析を行い報告した (Bando et al. 2019)。また新しい失調症状評価法の提案を行った (Honda et al. 2020)。

結果

マーマセツト研究において、健常個体群では8ヶ月齢まで灰白質が増加したが、TG個体群は発症・未発症を問わず増加率が低かった。白質は、健常個体群では12ヶ月齢で増加がプラトーに達するが、TG個体群は発症・未発症問わず増加率が低かった。小脳は、健常個体では3から12ヶ月齢でやや増加し、発症TG個体群もやや増加傾向であった。線条体は、健常個体では増加傾向だが、TG個体群は発症・未発症問わず増加率が低かった。MRIからは未発症TGについても脳の潜在的な異常がある可能性が高いと考えている。

ヒト研究において、SCD群では、健常コントロールとの比較で、小脳を中心とした萎縮

を確認し、その一部（左下半月小葉と第VI小葉）はSCDにおけるプリズム学習の低下の程度と相関していること発見し報告した（Bando et al. 2019）。SCAのタイプ別の差については現段階では明らかでないが、引き続き症例の蓄積を進める。

考察

運動失調は小脳の機能障害のみならず、体性感覚や視覚の異常でも生じうる。今回対象としたSCA3のTGマーモセットには、中枢神経系以外にも筋肉など末梢の異常があり、運動障害の表現系だけでは、SCAのモデルとして妥当か否かの判断は難しい。今回の一連の研究は、MRIによりモデルマーモセットとヒト症例の共通バイオマーカーを探索できる可能性を示した。一方でマーモセットを撮像したMRI装置の限界からヒトのようなボクセルレベルでの解析は困難であった。

結論

TGマーモセットとヒト患者の両方においてMRIで測定できる小脳の灰白質容積がSCAのバイオマーカーとなる可能性を示した。

参考文献

Hashimoto Y, Honda T, Matsumura K, Nakao M, Soga K, Katano K, Yokota T, Mizusawa H, Nagao S, Ishikawa K. Quantitative evaluation of human cerebellum-dependent motor learning through prism adaptation of hand-reaching movement. PLoS One. 2015 Mar 18;10(3): e0119376. doi: 10.1371/journal.pone.0119376.

研究発表

Bando K, Honda T, Takahashi Y, Ishikawa K, Mizusawa H, Hanakawa T: Impaired adaptive motor learning is correlated with cerebellar gray matter atrophy in spinocerebellar ataxia patients: A voxel-based morphometry study. Front Neurol 10: 1183, 2019.11.

Honda T, Mitoma H, Yoshida H, Bando K, Terashi H, Taguchi T, Miyata Y, S, Hanakawa T, Aizawa H, Kondo T, Mizusawa H, Manto M, Kakei S: Assessment and rating of motor cerebellar ataxias with Kinect v2 depth sensor: Extending our appraisal. Front Neurol 11:179, 2020.3

知的所有権の出願・取得状況

なし

**29-5「ポリグルタミン病モデルマーマセット系統を用いた病態理解と治療法開発」
(分担課題名)ポリグルタミン病モデルマーマセットの作出と行動バイオマーカー開発**

分担研究者 関 和彦
国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 モデル動物開発研究部

緒 言

当プロジェクトではこれまで、神経変性疾患であるポリグルタミン病に焦点を合わせ、遺伝子改変技術を用いたモデル霊長類の作出を進めてきた。その結果、PolyQ 遺伝子が導入された世界初のマーマセットが合計5頭誕生し、そのうち3頭で発症が認められた。さらに発症個体1頭の第二世代5頭の獲得に成功し、そのうち3頭で発症が確認され、その発症個体1頭から、第三世代が3頭獲得された。この第二第三世代を対象に行動バイオマーカー確立のための研究を行った。

方法・結果・考察

1)モデルマーマセットの系統化

本研究に十分な質・量の動物および研究環境の整備を行った。第二世代5頭、第三世代3頭、合計8頭の次世代個体が作出された。現在、第二世代2頭、第三世代3頭の発症を待っているが、早期発症型ラインであるため今年度末までに数頭、次年度中にはすべての個体に発症を見込んでいる。ゲノム解析の結果、第一世代では、ゲノムに4コピー以上のトランスジーンの挿入が見られたが、第三世代の2頭において、それぞれ1コピーと2コピーまで純化された。今後、1コピーまで絞られ発症すれば、発症時期・進行症状が安定したモデルマーマセットの完成となる。また、第二・第三世代のポリグルタミン病モデルマーマセットについて、早期発症と晚期発症の個体から脳神経系を採取

し、各部位の導入遺伝子の発現量を比較した。その結果、早期発症個体は晚期発症個体に比べ、小脳、側頭葉、線条体、胸髄、腰髄での導入遺伝子の発現が高かった。このポリグルタミン病モデルマーマセット系統は親子で似た発症機序を示し、発症機序の違いは導入遺伝子がゲノムのどの位置に挿入されたかに起因する可能性が高いことが分かってきた。すなわち、導入遺伝子のゲノムへの挿入部位の違いで脳の各部位における導入遺伝子の発現量が変化し、発症機序の違いが出てきたものと推察された。以上の成果から発症に必要な導入遺伝子が絞られたため、今後は発症機序が均一なポリグルタミン病モデルマーマセットが完成する見通しがついた。

2) 行動バイオマーカー

a. 平衡機能評価

ポリエチレン製の棒をモータで時計回り/逆周りに一定スピードで回転させ、その上を落下せずに歩行し出口に到達した段階で報酬を与える行動課題を行わせた。充分な落下防止措置を施した。PolyQ 個体では体軸方向が健常個体と優位に異なり、予測的運動機能や運動学習機能に障害がある可能性が示された。

b. 日内活動量

日内活動量のコントロール個体を対象とした標準値作成と疾患モデルとの比較:野生型(n=10)及びTG 個体(n=10)を収容しているシングルケージに24時間体制で活動を監視できる受動的赤外線運動検出センサーを設置した。センサーは各個体のケージ内での運動を検出し、2秒ごとにロガーに記録し、一年を通してほぼ継続的な計測した。F1, F2 個体ともに、身体活動量は症状の進行を反映するマーカーであることが確認された。

c. 鉛直移動能力の評価: 自発的はしご登り運動についての評価方法を確立した。コントロール個体と発症前、発症後の移動能力を計測し、病状進行の指標になるか確認する目的であった。セッションは、高さ120cmの2cm間隔のステップを設けた梯子を使い5分間行い、この間正面よりビデオ撮影することによって、四肢の運動パターンを計測した。発症個体では、ホームケージ活動量で変化が始まった時期に移動速度の低下も始まり、滞在時間の解析では、それに先んじて床にとどまる割合が増加していた。樹上生活動物であるマーモセットは、本課題をあまり訓練しなくても遂行することができることがわかり、ヒト患者の歩行機能検査の代用として、ヒトマーモセット 共通行動バイオマーカーとして用いられる可能性を示していた。

今後の展望

未発症の個体について継続的に計測し、その後論文化を行う予定である。本方法は疾患モデルマーモセットに広く用いることが可能な行動バイオマーカーであるので、共同研究などによって積極的に活用する予定である。

成果発表

- 1) 小杉亮人, 小泉昌司, 小島潮子, 川野邊哲代, 関和彦: 自由行動課題を用いたマーモセット下肢筋力評価, 第9回日本マーモセット研究会大会, 2020/2/14, シーサイドホテル舞子ビラ神戸
- 2) 中谷輝実, 小杉亮人, 小泉昌司, 小島潮子, 川野邊哲代, 野上尚武, 尾張健介, 沼澤秀美, 皆川栄子, 武内敏秀, 富岡郁夫, 齊藤祐子, 花川隆, 永井義隆, 和田圭司, 関和彦: 国立精神・神経医療研究センターにおけるトランスジェニックマーモセット研究の現状, 第9回日本マーモセット研究会大会, 2020/2/14, シーサイドホテル舞子ビラ神戸
- 3) 小泉昌司, 野上尚武, 中谷輝実, 川野邊哲代, 佐賀洋介, 関和彦: 長期間にわたるホームケージでの

マーモセット運動量の計測. 第41回日本神経科学大会. 神戸国際展示場, 2018/7/28

4) 小泉昌司, 野上尚武, 佐賀洋介, 川野邊哲代, 小島潮子, 中谷輝実, 尾張健介, 関和彦: 遺伝子改変ポリグルタミン病モデルマーモセットの疾患進行による行動変化の探索. 第8回日本マーモセット研究会大会. 日本橋ライフサイエンスハブ, 2019/2/6 - 2/7

5) 野上尚武, 小泉昌司, 佐賀洋介, 小島潮子, 尾張健介, 中谷輝実, 川野邊哲代, 富岡郁夫, 関和彦: ポリグルタミン病モデルマーモセットにおける簡易レーティング法の開発. 第8回日本マーモセット研究会大会. 日本橋ライフサイエンスハブ, 2019/2/6 - 2/7

6) 川野邊哲代, 佐賀洋介, 小泉昌司, 野上尚武, 関和彦: マーモセット運動失調モデルのバランス歩行解析. 第8回日本マーモセット研究会大会. 日本橋ライフサイエンスハブ, 2019/2/6 - 2/7

7) 関和彦: 遺伝子改変技術を用いた精神・神経疾患モデル霊長類の作出と評価. 第58回日本神経病理学会総会 会長シンポジウム. 学術総合センター (一橋講堂): 2017/6/2

8) 関和彦: 霊長類モデルを用いた運動系機能評価と神経疾患研究. 第54回薬剤学懇談会研究討論会. 熱海温泉新かどや: 2017/6/9

9) 関和彦: 遺伝子改変技術を用いた神経疾患モデルマーモセットの作出と利用. 第37回ヒューマンサイエンス基礎研究講習会. NCPN 教育研修棟ユニバーサルホール: 2017/9/12

10) 野上尚武, 尾張健介, 中谷輝美, 小泉昌司, 佐賀洋介, 川野邊哲代, 永井義隆, 富岡郁夫, 関和彦: ポリグルタミン病モデルマーモセットのライン化及び表現型解析. 第40回日本神経科学大会. 幕張メッセ: 2017/7/22

11) 野上尚武, 尾張健介, 中谷輝美, 小泉昌司, 佐賀洋介, 川野邊哲代, 齊藤祐子, 富岡郁夫, 関和彦: ポリグルタミン病モデルマーモセットの作出と病態解析. 日本畜産学会第123回大会. 信州大学農学部: 2017/9/4 - 9/8

12) 野上尚武, 尾張健介, 中谷輝美, 小泉昌司, 佐賀洋介, 川野邊哲代, 齊藤祐子, 富岡郁夫, 関和彦: ポリグルタミン病マーモセットの病態解析. 第7回日本マーモセット研究会大会. 京都大学芝蘭会館: 2018/1/17

29-5 「ポリグルタミン病モデルマーモセット系 統を用いた病態理解と治療法開発」 (分担課題名)

分担研究者 高橋 祐二
(所属) 国立精神・神経医療研究センター・
病院・脳神経内科

緒言

本研究の目的は、MJD/SCA3 に関して、ヒトとマーモセット両方の病態を反映する共通のバイオマーカーを確立することである。共通バイオマーカーを用いて発症早期の変化を検出することにより、早期診断が可能となり、病態抑制治療の早期導入に繋がる。マーモセットを用いた治療研究における鋭敏かつ信頼性の高いマーカーの確立は、マーカーを活用した自然歴の確立、治療効果の判定に有用であり、治験を行うための基盤が整備される。

方法

MJD/SCA3 患者における行動バイオマーカーの開発に関して、NCNP 内での研究倫理申請を行う。NCNP 受診患者において研究同意を取得する。患者リクルートには運動失調症の患者レジストリ J-CAT も活用する。行動バイオマーカーのデータを経時的に追跡する。

SARA 等の臨床症状評価バッテリーを同時に取得し、データの相関を検討して妥当性を検証する。罹病期間が異なり、発症年齢、そして CAG リピート数の比較的類似した患者群において、罹病期間による行動バイオマーカーの差異を評価し、同一患者の経時的データの外挿と合わせて、臨床指標としての有用性を検証する。

結果

本年度は、センター内での MJD/SCA3 患者の血清

/髄液検体の収集を推進し、血漿/血清 7 例、髄液 5 例の検体を収集した。さらに、University of College London との共同研究で Neurofilament L の測定を開始した。一方、J-CAT を用いた患者レジストリを積極的に進め、年度内に 1460 例の運動失調症患者の登録が得られ、そのうち 809 例の遺伝子検査が終了した。MJD/SCA3 と診断されたのは 74 例(10%)であった。また、J-CAT を活用して血漿を収集する体制を整備し、さらなる検体収集の体制を整えた。

考察

本研究においては MJD/SCA のバイオマーカーを探索するために血清・髄液等のリソース収集が必要である。本年度は順調に検体収集が進捗した。今後も継続的にリソースを蓄積していく。レジストリは順調に進捗し、比較的早期からの患者登録を達成している。MJD/SCA3 に関しては、米国の 138 例のコホート(1)、欧州の 139 例のコホート(2)などがあるが、それらと比肩するコホートが構築されつつある。また今年度よりゲノム DNA のみならず血漿の収集体制も整え、より統合的な研究体制が構築された。今後はさらに J-CAT を発展させ、MJD/SCA3 のバイオマーカー探索にも活用する。

結論

期間を通じて順調に研究は進捗した。今後は蓄積したリソースを活用してヒト・マーモセット共通のバイオマーカーの探索を行う。

参考文献

1. Ashizawa T, Figueroa KP, Perlman SL, Gomez CM, Wilmot GR, Schmahnmann JD, et al. Clinical characteristics of patients with spinocerebellar ataxias 1, 2, 3 and 6 in the

US; a prospective observational study. Orphanet journal of rare diseases. 2013;8:177.

2. Diallo A, Jacobi H, Cook A, Labrum R, Durr A, Brice A, et al. Survival in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 (EUROSCA): a longitudinal cohort study. Lancet neurology. 2018;17(4):327-34.

研究発表

1. Shinji Oda, Yuji Saitoh, Yuji Takahashi, Hidehiro Mizusawa, Japan Consortium of Ataxias. Exploration of Evaluation Tool for ADL by Historical Review in Hereditary SCD Patients. 第 60 回日本神経学会学術大会 大阪 (2019)

2. Yuka Hama, Hidetoshi Date, Yuji Takahashi, Hidehiro Mizusawa, and J-CAT (Japan Consortium of Ataxias). Epidemiological analysis of the hereditary spinocerebellar ataxias: J-CAT study 第 60 回日本神経学会学術大会 大阪 (2019)

知的所有権の出願・取得状況

なし。

29-5「ポリグルタミン病モデルマーマーモセット系統を用いた病態理解と治療法開発」

(分担課題名)

ポリグルタミン病モデルマーマーモセットの病理解析

分担研究者 齊藤祐子

(所属) 国立精神・神経医療研究センター病院 臨床検査部

緒言

これまで、当センターで開発されたポリグルタミン病 (SCA3) モデルマーマーモセットの病理解析に取り組んできた (参考文献1)。昨年度はMRI画像との対比が取るための方法論の確立を行った。今年度はこれまでに病理解析した個体の病理につき、臨床像との比較、導入遺伝子発現の部位差と病理の相違の有無、ヒト SCA3 との比較をさらにすすめた。

方法

これまでに実験殺された発症個体合計6個体を主に対象とした。実験殺後、大脳・小脳・脳幹は半分に切り、半分を病理検索用に4%PFAに固定した。生化学・遺伝子解析用の反対側は必要量を採取した残りの部位を電顕観察用に4%グルタルアルデヒドにて固定した。末梢神経は半切し、GAIにてそれぞれ固定した。脊髄は脊椎を含んだ形で4%PFAに固定した。筋の一部を4%PFA固定した。一般臓器はすべて4%PFA固定した。大脳・小脳・脳幹は一晚MRI撮像後、パラフィン包埋し、6ミクロン厚切片を作成した。脊髄は2日間固定後、脊髄を細切、パラフィン包埋およびGA固定後、エポン包埋した。他の4%PFA固定組織はすべてパラフィン包埋し、GA固定組織はエポン包埋を行った。パラフィン包埋切片は、通常染色と、抗ポリグルタミン、抗GFAP、抗Iba 1、抗ubiquitin抗体等にて免疫染色を施行した。エポン包埋ブロックは、電顕観察を行った。今年度は主に光顕所見と導入遺伝子の部位差との比較を行った。

そして、次の個体の解析までにこれまでの結果の論文化を進めた。

結果

導入遺伝子の発現については、late onsetのPQD11では、脳幹、前頭葉、後頭葉において発現量が高いというデータが得られている。一方early onsetのPQD 13, PQD 14では側頭葉、線条体、胸髄、腰髄の発現量が高く、小脳ではやや高く、海馬および頸髄では後者のみがやや高いという結果であった。

病理学的には、封入体の数、ミクログリアの活性化の状態、GFAPによる変性の度合い等により、部位別に評価を行ったが、半定量化による評価によっても脳幹では明らかな相関がみられた。他の部位では上記の方法では、明らかな相関を見ることは困難であった。

ヒトとの比較のために封入体の超微構造の観察を行ったところ、限界膜をもたない、ランダムな線維が密に配列している封入体を観察することに成功した。

考察

本モデルでは、脳幹の所見が特徴的で、個体差、あるいは同胞例での類似像が特徴的であった。今回導入遺伝子との相関がその部位で明らかであったことはそれを裏付ける結果であったと考える。封入体の超微形態については、ヒトの封入体で観察に成功した報告がなく、引き続き自験例で観察を試みたい。

結論

本モデルは生検可能な部位の障害が強く、治療効果を縦断的に判定できると考えた。

参考文献

Tomioka I, Ishibashi H, Minakawa EN, Motohashi HH, Takayama O, Saito Y, Popiel HA, Puentes S, Owari K, Nakatani T, Nogami N, Yamamoto K, Noguchi S, Yonekawa T, Tanaka Y, Fujita N, Suzuki H, Kikuchi H, Aizawa S, Nagano S, Yamada D, Nishino I, Ichinohe N, Wada K, Kohsaka S, Nagai Y, Seki K. Transgenic Monkey Model of the Polyglutamine Diseases Recapitulating Progressive Neurological Symptoms. eNeuro. 2017 Mar 28;4(2).

研究発表

なし

知的所有権の出願・取得状況

なし

29-5「ポリグルタミン病モデルマーマーモセット系統を用いた病態理解と治療法開発」

(分担課題名) ポリグルタミン病モデルマーマーモセットのライン化

分担研究者 富岡 郁夫
(所属) 信州大学農学部

緒言

ポリグルタミン病は、ハンチントン病や様々な脊髄小脳失調症など9疾患の総称であり、原因遺伝子内のグルタミンをコードする不安定なCAGリピート配列の異常伸長が原因である。我々はこれまでに、CMVプロモーター下でポリグルタミン病原因遺伝子が発現するポリグルタミン病モデルマーマーモセットの作出に成功した。このモデルは正常に発育したのち発症し、緩徐進行性の症状を示した一方で、胎生期の高い流産率や若齢期の発症により系統維持が困難であった。この原因として、強力なユビキタスプロモーターであるCMVを用いたことが挙げられる。この結果を受けて、導入遺伝子的人為的発現制御を可能にするため、Tet-onシステムを導入したポリグルタミン病マーマーモセットを作出し、産仔獲得に成功した。そこで本研究は、このポリグルタミン病モデルマーマーモセットを系統(ライン)化することを目的とした。

方法

凍結保存していたトランスジェニックマーマーモセット精子を、卵細胞質内精子注入(ICSI)法を用いて第二・第三世代を作出した。また、成熟したトランスジェニックマーマーモセットは自然交配させ、産子を獲得した。産子について、遺伝子解析によりトランスジーン挿入部位を特定し、遺伝子発現量解析によりトランスジーン発現量を定量した。

結果

CMVプロモーターで病原遺伝子が発現するポリグルタミン病モデルマーマーモセットを増産し、解析した。第二・第三世代のモデルマーマーモセットも安定して発症が認められた。ゲノム解析の結果、第一世代では、ゲノムに4コピー以上のトランスジーン挿入が見られたが、第三世代の2頭において、それぞれ1コピーと2コピーまで純化された。今後、1コピーまで絞られ発症すれば、発症時期・進行症状が安定したモデル

マーマーモセットの完成となる。また、第二・第三世代のポリグルタミン病モデルマーマーモセットについて、早期発症と晩期発症の個体から脳神経系を採取し、各部位の導入遺伝子の発現量を比較した。その結果、早期発症個体は晩期発症個体に比べ、小脳、側頭葉、線条体、胸髄、腰髄での導入遺伝子の発現が高かった。このポリグルタミン病モデルマーマーモセット系統は親子で似た発症機序を示し、発症機序の違いは導入遺伝子がゲノムのどの位置に挿入されたかに起因する可能性が高い。以上の成果から発症に必要な導入遺伝子が絞られたため、今後は発症機序が均一なポリグルタミン病モデルマーマーモセットが完成する見通しがついた。

TETシステム導入ポリグルタミン病マーマーモセットを作出し、4頭のトランスジェニックマーマーモセットの獲得に成功した。ドキシサイクリンを投与することで遺伝子発現量が増加したことから、個体レベルでTet-onシステムが正常に機能していた。次に、最も遺伝子発現量の高かったTET3から、自然交配により第二世代を作出した。その結果、1頭のトランスジェニック個体の獲得に成功し、Tet-onシステムが正常に機能していた。以上より、Tet-onシステムを導入したポリグルタミン病モデルマーマーモセットの系統作出に成功した。

考察

子孫にも安定して症状が受け継がれる、ポリグルタミン病モデルマーマーモセットのライン化に成功した。次世代以降でトランスジーンが1か所になることで、単一遺伝子に起因するモデル系統が完成する予定である。また、人為的に遺伝子発現誘導可能なTet-Onシステム導入ポリグルタミン病モデルマーマーモセットのライン化にも成功した。得られたマーマーモセットで発症が確認できれば、世界初の人為的に発症を制御できる疾患モデル霊長類となる。この動物は発症を任意でコントロールできことが最大の利点であり、いったん発症させた動物の遺伝子発現を抑制することで、霊長類において『神経変性の進行程度と可逆性の関係』を証明できることや、異なる成長段階で発症させることで『成長段階と症状の関係』を探索できる。また、病原遺伝子を止めた状態は治療後の回復時期の状態を模倣できるため、治療バイオマーカーの開発にも繋がる可能性を持つ。

結論

子孫にも安定して症状が受け継がれる、ポリグルタミン病モデルマーマセットのライン化に成功した。

研究発表

1. Tomioka I, Nagai Y, Seki K. Developing biomarkers for neurodegenerative diseases using genetically-modified common marmoset models. *Neural Regeneration Research*. 13(7): 1189-1190, 2018.
2. Tomioka I, Nogami N, Nakatani T, Owari K, Fujita N, Motohashi H, Takayama O, Takae K, Nagai Y, Seki K. Generation of transgenic marmosets using a tetracyclin-inducible transgene expression system as a neurodegenerative disease model. *Biology of Reproduction*, 97(5), 772-780, 2017. 5YIF=3.445 (JCR2017), Rank 5 / 29 in Reproductive Biology.
3. Tomioka I, Ishibashi H, Minakawa EN, Motohashi H, Takayama O, Saito Y, Popiel HA, Sandra P, Owari K, Nakatani T, Nogami N, Yamamoto K, Noguchi S, Yonekawa T, Tanaka Y, Fujita N, Suzuki H, Kikuchi H, Aizawa S, Nagano S, Yamada D, Nishino I, Ichinohe N, Wada K, Kohsaka S, Nagai Y, Seki K. Transgenic monkey model of the polyglutamine diseases recapitulating progressive neurological symptoms. *eNeuro*, 4(2), 0250-16, 2017.

知的所有権の出願・取得状況

Intramural Research Grant (29-5) for
Neurological and Psychiatric Disorders of NCNP
Understanding of pathology and development of new therapy of
Polyglutamine disease using transgenic marmoset lines.
Principle investigator: Kazuhiko SEKI (NCNP)

We generated SCA3 model marmosets (n=7) and established the disease model line by generating F1 (n=5) and F2 (n=3) animals. In this three years, we performed an extensive phenotyping from different aspects, e.g. behavior measurement, biochemical analysis, non-invasive brain imaging, pathological analysis. According to these analysis, we proposed the biomarker that reflect the onset and progression of the symptom, and some of them were confirmed to be shared in human patients.

【 Behavior 】 We routinely performed the measurement of daily activity, ladder-climbing task, and beam-walking task on both TG and control animals to detect the onset and progression of symptom. As a result, we established a reliable test battery. These test could evaluate the ability of locomotion, equilibrium, and general motor function separately. **【 Brain Imaging 】** While the brain volumes gradually increase from 3 months to 9 months of age in the wild type, it is less dominant in the TG group. This observation suggest TG marmosets may exhibit developmental disorder of the brain structure before the onset of symptom, suggest that the MRI could be used to as a biomarker predicting the onset of symptom. **【 Biochemistry 】** By means of exosome analysis, we found the potential biomarker that could be shared between human patient and TG marmoset. On the other hand, we found a preliminary finding indicating that the Neuro Filament Light chain (NfL) could also be functioning as the shared biomarker between human and marmoset (temporarily paused due to Covid-19 pandemic). **【 Pathology 】** In the case of littermates twins, we confirmed the tendency that pathological images are similar. These

image is comparable between F0 and F1 animals in general. However, we could not find the difference between the early and late onset line.

【Human MJD】 We have established a system to conduct clinical research with ethics approval. We also confirmed 12 MJD/SCA patients and measured using test battery like SARA scores and others. We accumulated the patient registry composed by 1460 patients, and genotyping of them are in progress (finished 809/1460) 【New animal model】 In order to enable artificial expression control of the transgene, we have been developed and evaluated polyglutamine disease marmosets that introduced by the Tet-on system.