2-8　脳神経疾患研究に資する霊長類モデル動物の作出と評価に関する基盤的研究

主任研究員　国立精神・神経医療研究センター
関　和彦

総括研究報告

1　研究目的

アルツハイマー型（AD)認知症の患者数は国内300万、また世界では1800万人と推測されている。また、広く認知症を含めると全国で500万人とも言われている。本研究では世界で初めてサルを用いた同疾患のモデル動物系統を確立し、発症と病態進行を反映するバイオマーカーを確立する目的である。3 つの変異を持つ APP 遺伝子と 2 つの変異を持つ PS1 遺伝子とを併せ持つ早期発症型遺伝子改変 AD モデルマーモセットを作出し、生化学バイオマーカー（CSF、血中Aβ）及びアミロイドイメージング（PET)などによって遺伝子改変個体の表現型を発症前から評価し、ヒトーサル共通のバイオマーカーを確立して将来的な治療研究に有効なモデル動物ラインを確立する。次に、AD 以外の認知症や、その他高次脳機能障害モデルサル研究を複数同時に規模の小さい NCNP で行う研究環境を実現するため、ウィルスベクター静注を用いた新たな疾患モデル動物作出方法を開発する。最後に、前年度から継続しているポリグルタミン病モデルマーモセットを対象としたヒトーサル間共通バイオマーカーの確立を目的とした研究を完結させる。

2　研究組織

主任研究者
関　和彦　国立精神・神経医療研究センター
分担研究者
加藤孝一　国立精神・神経医療研究センター
髙橋祐二　国立精神・神経医療研究センター
齊藤祐子　国立精神・神経医療研究センター
皆川栄子　国立精神・神経医療研究センター
高田昌彦　京都大学・霊長類研究所
永井義隆　大阪大学・大学院医学系

研究協力者
大屋知徹　国立精神・神経医療研究センター
小杉亮人　国立精神・神経医療研究センター
Roland Philipp　国立精神・神経医療研究センター
窪田慎治　国立精神・神経医療研究センター
小泉昌司　国立精神・神経医療研究センター
中谷輝実　国立精神・神経医療研究センター
川野邊哲代　国立精神・神経医療研究センター
種田久美子　国立精神・神経医療研究センター
工藤もゑこ　国立精神・神経医療研究センター
YARON Amit　国立精神・神経医療研究センター
内田直輝　国立精神・神経医療研究センター
大谷暢子　国立精神・神経医療研究センター
熊本卓哉　広島大学大学院薬学研究科
古本祥三　東北大学大学院サイクロトロンラジオアイソトープセンター
齊藤勇二　国立精神・神経医療研究センター
佐野輝典　国立精神・神経医療研究センター
盆子原紘子　国立精神・神経医療研究センター
宮崎将行　国立精神・神経医療研究センター
武内敏秀　大阪大学・大学院医学系
張　暁曼　大阪大学・大学院医学系

3　研究成果

本年度は１）全体統括・新規疾患モデル動物作出技術開発、２）認知症モデルサルの PET による表現型解析、３）運動失調モデルサルの生化学バイオマーカー開発、４）認知症モデルサルの神経病理解析、５）認知症モデルサルの生化学バイオマーカー開発、６）疾患モデルサル作出用新規ウィルスベクター開発、７）運動失調モデルサルの生化学バイオマーカー開発、の項目別に研究を進めているので、各項目における研究成果についてその概略を説明する。

【全体統括】

Covid19 の影響、また動物棟改修工事の影響があったが、全体としては、各プロジェクトは予定通り順調に進行していると判断した。

【認知症モデルサルの PET による表現型解析】

SMBT-1 は東北大学で開発された最新のトレーサーであり、MTA を締結後、サンプルの提供および種々の情報の開示を受けた。開示された合成法を NCNP の装置環境に合わせて変更し、標識合成を行った。その結果、PET 撮像に十分な量の放射能と、60GBq/μmol のモル放射能で目的の ^{18}F 標識 SMBT1 を得ることが出来た。

FC-119S は論文が報告されているため、研究協力者に前駆体および標品の合成を依頼した。得られた前駆体を用い、論文記載の合成方法を NCNP の装置環境に合わせて変更し、標識合成を行った。その結果、分取の過程で目的の ^{18}F 標識 FC-119S の直前に非標識の不純物ピークが現れることが判明した。目的物との分離はでき、^{18}F 標識 FC-119S は得られたものの、今後、PET の撮像を目的として継続的に合成するのであれば、コンタミのリスクを避けるためにも不純物ピークの問題は改善した方が良いと考えられる。

【運動失調モデルサルの生化学バイオマーカー開発】

「神経変性疾患における臨床指標・バイオマーカーの開発」（倫理承認番号 A2017-131）において研究倫理承認を得て実施体制を整えた。当院には MJD/SCA3 の患者が多数入院しており、研究体制は整っている。今後はヒトに応用可能な評価指標を確立し、研究を推進していく必要がある。

【認知症モデルサルの神経病理解析】

発症時からの経時的な変化を in situ で追跡することを念頭に、PET リガンドとの関係でモデルマウスの解析の援助を行った。ひとつはアミロイドベータの染色方法の至適な方法を確立した。また、炎症のマーカーについては、現在検討中である。認知症のモデルマウスとして確立されている検体とバイオマーカーとの検討を行う検討を進めることが出来ている。一方で、ヒト認知症のバイオマーカー（髄液、PET）と病理との関係について他の研究で行っているプロジェクトがある。それについて、本研究と紐づけるべく、次年度以降、検討を進めてゆく。

【認知症モデルサルの生化学バイオマーカー開発】

AD モデルマウスでは野生型マウスと比べて CSF 中の $A\beta_{40}$ および $A\beta_{42}$ 濃度が上昇していた。また認知機能低下および Aβ 陽性プラークが顕在化している 12 ヶ月齢の AD モデルマウスでは、2 ヶ月齢の AD モデルマウスと比較して CSF 中の可溶性 $A\beta_{42}$ および $A\beta_{42/40}$ 比が低下していた。すなわち 12 ヶ月齢マウスではヒト AD 患者同様に CSF 中の $A\beta_{42}$ および $A\beta_{42/40}$ 低下が再現されていることを見出した。本研究では、過去にわれわれが作出した、発症し進行性の症状を呈する世界初の神経変性疾患モデルマー

モセット[1]における独自の表現型解析の経験にもとづき、本班で作出する早期発症型 AD モデルマーモセットの表現型解析法の開発を早期から戦略的に進め、AD 病態進行を反映する生化学バイオマーカーを確立することをめざしている。本年度の成果をふまえ、次年度は引き続き CSF の経時的採取と可溶性 Aβ 測定を進め、AD モデルマウス CSF において可溶性 $A\beta_{42}$ および $A\beta_{42/40}$ 比の低下が出現する最も早い月齢を同定することをめざす。さらに本研究で得られた結果を班内で実施される PET イメージングや病理解析における Aβ 蓄積状況と比較することにより、遺伝子改変 AD モデルマーモセットにおいて CSF 中 Aβ 低下が出現しうる時期を推測することをめざす。

【疾患モデルサル作出用新規ウィルスベクター開発】

マーモセット新生児に AAV9.2 を静脈内投与したところ、脳全体にわたって高い効率でニューロンへの遺伝子導入が可能であることがわかった。また、CMV プロモータを synapsin プロモータに変換することによって、脳以外の臓器にほとんど感染せず、ニューロン選択的な遺伝子導入を可能にするベクターを作製した。特に 2020 年度は、AAV9.2 に更なる改良を加え、遺伝子導入効率の向上に成功するとともに、小脳プルキンエ細胞に特異的なプロモータ（L7）を搭載した AAV9.2 を作製し、マーモセットの新生児においてプルキンエ細胞選択的に外来遺伝子導入できることを予備的に確認した。

【運動失調モデルサルの生化学バイオマーカー開発】

F0 世代の発症個体から変異遺伝子の伝達が確認された 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、それぞれの検体でおよそ 2,000 種のエクソソーム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 病モデル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。

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た。NCNP バイオバンクから提供された PolyQ 病患者血液検体 16 例（脊髄小脳失調症 3 型および 6 型）、および対照群として非変性疾患患者検体 25 例について、エクソソーム画分を精製し、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た。その結果、一部のタンパク質において、PolyQ 病患者で変動が認められた。また、罹病期間もしくは PolyQ リピート長との相関が認められた。現在、PolyQ 病患者検体を追加して検証を進めているところである。

2-8「脳神経疾患研究に資する霊長類モデル動物の作出と評価に関する基盤的研究」
（分担課題名）全体統括・新規疾患モデル動物作出技術開発

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】

本研究班では主に全体統括を行なう。研究は３本柱で行っている。①ポリグルタミン TG サルの表現型解析：NCNP で保有する当該疾患 TG サル（未発症）６頭について、発症前から発症後までの表現型解析を継続し、論文化を行う。②AD サル開発と表現型評価：げっ歯類で早期発症の実績がある 5ｘFAD タイプの TG マーモセットを作出し、作出されたマーモセットの表現型を解析する。③新規技術を用いた神経変性疾患モデルサルの作出:サル(マーモセット・マカクサル)脳に最適化するため改良された新規のアデノ随伴ウィルスベクターを用い、疾患遺伝子を脳部位特異的に発現させる実験技術を開発し、作出個体を解析する。

【目的】

①世界初の進行性症状を呈する神経変性疾患モデルマーモセットの表現型解析が完結し、ヒト・サル間バイオマーカーを開発する。②世界初の認知症モデルマーモセットを作出し、このモデルサルを有する NCNP や我が国が AD 病態研究の戦略的優位性を確保する。AD はもっとも患者数の多い神経疾患の一つであり、メジャーな認知症であることから、社会的な波及効果も大きい。③ウィルスベクターを用いた疾患モデルサル（SCA3)が作出され､TG マーモセットと同等以上にヒトに近似した表現型を確認する。それによって、NCNP のような小さなサルコロニーでも様々な脳神経疾患サルモデルを対象とした研究が可能になる。NCNP で研究対象としている多くの疾患に対して霊長類モデル動物が確立できれば、NCNP のミッションに大きく貢献する。

【方法と結果】

項目 1 では、高橋、永井グループと連関し、現在の発症して症状が進行中の個体の解析を進めると同時に、前年度までのデータ解析を進めて、論文化を促進する計画である。実験を収束させるため、作成した個体のサンプリングを順次進めている。２０２１年６月には全ての個体サンプリングが終了し、論文作成を進めることができる。項目 2 では、マーモセット用の遺伝子コンストラクトの作成や機能確認を行うとともに、対象個体の性周期管理を行なって発生工学的な個体作出を開始する予定であった。発生工学的な実験は予定通り開始され、複数個体での妊娠が維持されている。また加藤・皆川グループと連関してマウスモデルを対象にイオマーカーの確立のための基盤技術を開発する予定であった。予定通り、5ｘFAD マウスを用いたいイメージングと生化学バイオマーカー研究が進行している。また斎藤グループと連関して､5xFAD の病理解析技術の開発を継続している。項目 3 では高田グループと連関して、ベクターの開発を行い、開発されたベクターの個体投与方法について検討を加える予定であった。再現性の高い投与方法、また１ヶ月間の人工哺乳技術を確立した。

今後の展望

Covid19 の影響下にあっても、各プロジェクトは予定通り順調に進行している。次年度も引き続き、予定された研究計画を遂行してゆく。

成果発表

（論文）

1. Koizumi M, Nogami N, Owari K, Kawanobe A, Nakatani T, Seki K (2021): Motility profile of captive-bred marmosets revealed by a long-term in-cage monitoring system. Front. Syst. Neurosci. https://doi.org/10.3389/fnsys.2021.645308, 15 April 2021.

（学会・シンポジウム等における発表）

1. Are primates just big frogs? Forelimb force direction and amplitude are independently controlled by spinal motor modules. Yaron A, Kowalski D, Yaguchi H, Takei T, Seki K：Neuromatch meeting, 10.26-10.30, 2020. 国外、口頭.

3. 自由行動下における皮質脳波から筋活動情報を解読する ―野生型及び脳梗塞モデルサルにおける検討例―. 関和彦:第22回日本ヒト脳機能マッピング学会 シンポジウム「ニューロイメージング研究の基礎から臨床への展開」, 8.29, 2020. 国内、口頭.

5. 長期間のホームケージ活動量計測によるマーモセット運動性の齢による変化の検討 Age dependent motility profile of marmosets revealed by long term in-cage activity measurement. 小泉 昌司、小杉 亮人、川野邊 哲代、中谷 輝実、関 和彦:第10回日本マーモセット研究会大会 1.27.2021. 国内、ポスター

6. 自由行動課題を用いた神経筋疾患モデルマーモセットの進行性運動機能障害評価 Characterization of the progressive motor impairment in freely behaving common marmoset. 小杉 亮人、小泉 昌司、小島 潮子、川野邊 哲代、中谷 輝実、関 和彦:第10回日本マーモセット研究会大会 1.27.2021. 国内、ポスター

2-8「脳神経疾患研究に資する霊長類モデル動物の作出と評価に関する基盤的研究」

（分担課題名）認知症モデルサルの PET による表現型解析

分担研究者　加藤孝一
（所属）国立精神・神経医療研究センター　神経研究所　疾病研究第七部

緒　言

遺伝子改変モデルを作成する上で、動物の生体内に生じている分子変化の表現型を解析し、疾患の発症の予測や評価を行うことは重要である。本課題では、AD モデル動物の脳内に生じている変化を PET により画像化し、動物の病態を評価することを目的とする。標的には、アミロイドβが脳内に蓄積することにより生じるアミロイドプラーク、およびプラークの周りで誘導される反応性アストロサイト挙げる。反応性アストロサイトにおいては、細胞内で検出される分子変化を撮像する。

方法

本研究では PET により AD モデルマーモセットの作出を評価するのが目的であるが、前段階として、AD モデルマウスに対する PET を撮像して病態の評価を行い、モデルマーモセット研究の参考にすることとした。アミロイドプラークの異常βシート構造を捉える PET トレーサーとして Chi らにより開発された FC-119S を選択した。また、反応性アストロサイトにおいて高発現する分子として MAO-B を取り上げ、MAO-B トレーサーとして東北大学で最近開発された SMBT-1 を用いることにした。

結果

SMBT-1 は東北大学で開発された最新のトレーサーであり、MTA を締結後、サンプルの提供および種々の情報の開示を受けた。開示された合成法を NCNP の装置環境に合わせて変更し、標識合成を行った。その結果、PET 撮像に十分な量の放射能と、60GBq/μmol のモル放射能で目的の ^{18}F 標識 SMBT1 を得ることが出来た。

FC-119S は論文が報告されているため[1]、研究協力者に前駆体および標品の合成を依頼した。得られた前駆体を用い、論文記載の合成方法を NCNP の装置環境に合わせて変更し、標識合成を行った。その結果、分取の過程で目的の ^{18}F 標識 FC-119S の直前に非標識の不純物ピークが現れることが判明した。目的物との分離はでき、^{18}F 標識 FC-119S は得られたものの、今後、PET の撮像を目的として継続的に合成するのであれば、コンタミのリスクを避けるためにも不純物ピークの問題は改善した方が良いと考えられる。

考察

^{18}F 標識は ^{11}C と比較すると環境から安定同位体が混入する可能性は少なく、一部の特殊な状況を除いてはより高いモル放射能の標識化合物が得られる。今回 SMBT1 は、期待通りのモル放射能で標識体が得られ、今後の PET の撮像に向けて準備が整ったと言える。FC-119S は PET の撮像には問題の無い品質の標識体が得られているものの、合成中に不純物ピークが出現する問題は解決した方が良いと考えている。反応条件等を考慮した関連実験から不純物の予想がついたため、現在、その同定および不純物が目的物の直前に出てくることを回避する対処法を検討している。

結論

FC-119S　の標識合成に改善の余地はあるものの、SMBT1、FC-119S ともに ^{18}F 標識化合物は得られたた。令和 3 年度はいずれのトレーサーともに AD モデルマウスに対する PET の撮像が可能となったと言える。

参考文献

1. Lee B. S. et. al. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 2043-52.

マーモセット・ヒト共通バイオマーカーの探索

分担研究者：高橋　祐二
国立精神・神経医療研究センター
病院・脳神経内科

緒言

脊髄小脳変性症の臨床評価指標は神経学的所見に立脚した SARA であり、動物モデルに適用可能な臨床指標は開発されていない。本研究では、MJD/SCA3 モデルマーモセットを活用して、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。MJD/SCA3 のヒト・マーモセット共通のバイオマーカー確立することは、マーモセットを用いた治療研究に必須である。発症早期の変化を検出することにより、早期診断に鋭敏なマーカーが同定され、病態抑制治療の早期導入に繋がる。本研究の期待される成果として、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が確立する。マーカーを活用した自然歴の確立、治療効果の判定が可能になる。治験を行うための基盤が整備される。

方法

①MJD/SCA3 マーモセットにおける行動バイオマーカーの探索
リーチング課題を中心とした行動指標の評価により、マーモセットにおける行動バイオマーカーを探索する。罹病期間に応じたバイオマーカーの変化を追跡する。早期変化にも着目する。
②MJD/SCA3 患者における行動バイオマーカーの妥当性検証
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 J-CAT のレジストリも活用する。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。
③ヒト・マーモセットの共通行動バイオマーカーの確立
①②を統合し、ヒト・マーモセットの共通行動バイオマーカーを確立する。得られたデータを分析し、より精度の高い方法への改良も同時に行う。

結果

「神経変性疾患における臨床指標・バイオマーカーの開発」（倫理承認番号 A2017-131）において研究倫理承認を得て実施体制を整えた。

考察

当院には MJD/SCA3 の患者が多数入院しており、研究体制は整っている。今後はヒトに応用可能な評価指標を確立し、研究を推進していく必要がある。

結論

本年度は倫理承認を得て研究実施体制を確立した。

参考文献

なし。

研究発表

1. Iwata R, Inagawa T, Noda T, **Takahashi Y**, Kito S. Spinocerebellar ataxia type 6 presenting with hallucination. Psychogeriatrics. 2021 Online ahead of print.
2. Sugiyama A, Sato N, Kimura Y, Fujii H, Shigemoto Y, Suzuki F, Tanei ZI, Saito Y, Sasaki M, **Takahashi Y**, Matsuda H, Kuwabara S. The cerebellar white matter lesions in dentatorubral-pallidoluysian atrophy. Journal of the neurological sciences. 2020;416:117040.
3. Odo T, Okamoto T, Sato N, **Takahashi Y**. Blended phenotype of adult-onset Alexander disease and spinocerebellar ataxia type 6. Neurology Genetics. 2020;6(6):e522.
4. Kondo Y, Bando K, Ariake Y, Katsuta W, Todoroki K, Nishida D, Mizuno K, **Takahashi Y**. Test-retest reliability and minimal detectable change of the Balance Evaluation Systems Test and its two abbreviated versions in persons with mild to moderate spinocerebellar ataxia: A pilot study. NeuroRehabilitation. 2020.

知的所有権の出願・取得状況

なし。

2-8「脳神経疾患研究に資する霊長類モデル動物の作出と評価に関する基盤的研究」
（分担課題名）認知症モデルサルの神経病理解析

分担研究者　齊藤祐子
（所属）　　都健康長寿医療センター　神経病理
国立精神神経医療研究センター　モデル動物開発研究部　協力研究員

緒　言

従来のモデルマウス解析や、知覚過敏のマーモセット解析、ポリグルタミン病の脊髄小脳変性症のモデルマーモセットの解析のノウハウを駆使して、新たに作成される認知症のモデルサルの病理的解析を行い、ヒトのアルツハイマー病との比較を比較する。

方法

作成されたモデル動物を従来の方法により病理組織標本とし、通常の凍結標本、パラフィン包埋標本、電顕標本を作製する。作成した標本については、ヒト脳解析で得た方法に準じて、一般染色、特殊染色、免疫染色を施し、評価を行う。そのうえで画像所見やバイオマーカーと比較するとともにヒトの脳との比較を行う。

マーモセットによるモデルサルの解析に先立ち、モデルマウスの解析を行い、認知症の動物モデル解析の手法を確立する。

結果

発症時からの経時的な変化を in situ で追跡することを念頭に、PET リガンドとの関係でモデルマウスの解析の援助を行った。ひとつはアミロイドベータの染色方法の至適な方法を確立した。また、炎症のマーカーについては、現在検討中である。

考察

認知症のモデルマウスとして確立されている検体とバイオマーカーとの検討を行う検討を進めることが出来ている。一方で、ヒト認知症のバイオマーカー（髄液、PET）と病理との関係について他の研究で行っているプロジェクトがある。それについて、本研究と紐づけるべく、次年度以降、検討を進めたい。

結論

モデルサルの病理検討に先立ち、他のライフスパンの短いモデル動物の検討、および最終目標とするヒト脳のバイオマーカー探索、治療との研究を深め、本研究の病理解析の結果がより効率的、効果的に進められるよう、備えている。

参考文献

ありません。

研究発表

Minakawa EN, Popiel HA, Tada M, Takahashi T, Yamane H, Saitoh Y, Takahashi Y, Ozawa D, Takeda A, Takeuchi T, Okamoto Y, Yamamoto K, Suzuki M, Fujita H, Ito C, Yagihara H, Saito Y, Watase K, Adachi H, Katsuno M, Mochizuki H, Shiraki K, Sobue G, Toda T, Wada K, Onodera O, Nagai Y. Arginine is a disease modifier for polyQ disease models that stabilizes polyQ protein conformation. Brain. 2020 Jun 1;143(6):1811-1825.doi: 10.1093/brain/awaa115. PMID: 32436573.

知的所有権の出願・取得状況

ありません。

2-8「脳神経疾患研究に資する霊長類モデル動物の作出と評価に関する基盤的研究」
認知症モデルサルの生化学バイオマーカー開発

皆川栄子
国立精神・神経医療研究センター
神経研究所　疾病研究第四部

【緒言】

アルツハイマー病（AD）をはじめとする神経変性疾患においては、臨床症状の顕在化以前から脳内に様々な変化が起こり、その一部は生前から検出可能である。AD 患者において認知機能低下の顕在化以前に検出しうる生化学的変化としては脳脊髄液（CSF）中の可溶性アミロイドβ（Aβ）タンパク質レベルの低下があり、AD 患者における生化学バイオマーカーとして確立している。そこで本研究では遺伝子改変 AD モデルマーモセットの CSF の Aβ 測定を行い、将来認知機能低下を発症する可能性がある遺伝子改変マーモセット個体を同定することを試みる。2021 年度前半までは遺伝子改変個体が産出できる可能性は低いので、野生型マーモセットならびに AD モデルマウスを用いて開発を行う。以上により、本研究班で作出される遺伝子改変 AD モデルマーモセットにおいて CSF 中 Aβ 低下が出現しうる時期を推測することをめざす。

【方法】

2020 年度は遺伝子改変 AD モデルマーモセットがまだ産出されていないため、野生型マウスならびに遺伝子改変 AD モデルマウスを用いて以下の解析を行なった。AD モデルマウス（オス・メス）および対照群として使用予定の野生型マウス（オス・メス）を用いて、深麻酔下でガラスキャピラリーを用いて大後頭槽から CSF を採取した。CSF 採取は、既報告において当該の AD モデルマウス脳に認知機能低下と Aβ 病理が出現する前後の複数の時点（2・3・4・5 ヶ月齢）、および、陽性対照として認知機能低下ならびに Aβ 陽性プラークが顕在化する 12 ヶ月齢において実施した。このうち 2 ヶ月齢および 12 ヶ月齢の野生型および AD モデルマウスマウスから採取した CSF を用いて、ELISA 法により可溶性 $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ を測定するための条件の最適化を行い、$A\beta_{40}$、$A\beta_{42}$、$A\beta_{42/40}$ を測定した。

【結果】

AD モデルマウスでは野生型マウスと比べて CSF 中の $A\beta_{40}$ および $A\beta_{42}$ 濃度が上昇していた。また認知機能低下および Aβ 陽性プラークが顕在化している 12 ヶ月齢の AD モデルマウスでは、2 ヶ月齢の AD モデルマウスと比較して CSF 中の可溶性 $A\beta_{42}$ および $A\beta_{42/40}$ 比が低下していた。すなわち 12 ヶ月齢マウスではヒト AD 患者同様に CSF 中の $A\beta_{42}$ および $A\beta_{42/40}$ 低下が再現されていることを見出した。

【考察】

本研究では、過去にわれわれが作出した、発症し進行性の症状を呈する世界初の神経変性疾患モデルマーモセット [1]における独自の表現型解析の経験にもとづき、本班で作出する早期発症型 AD モデルマーモセットの表現型解析法の開発を早期から戦略的に進め、AD 病態進行を反映する生化学バイオマーカーを確立することをめざしている。

本年度の成果をふまえ、次年度は引き続き CSF の経時的採取と可溶性 Aβ 測定を進め、AD モデルマウス CSF において可溶性 $A\beta_{42}$ および $A\beta_{42/40}$ 比の低下が出現する最も早い月齢を同定することをめざす。さらに本研究で得られた結果を班内で実施される PET イメージングや病理解析における Aβ 蓄積状況と比較することにより、遺伝子改変 AD モデルマーモセットにおいて CSF 中 Aβ 低下が出現しうる時期を推測することをめざす。本研究を通じて得られる成果は AD の新規診断法や新規治療法の開発につながるのみならず、国内外で樹立されると見込まれる種々の遺伝子改変 AD モデルマーモセットの病態解析にも資することが期待される。

【参考文献】

1) Tomioka I., *et al.* Transgenic Monkey Model of the Polyglutamine Diseases Recapitulating Progressive Neurological Symptoms. ***eNeuro*** 4(2): e0250-16.2017 (2017).

2-8「脳神経疾患研究に資する霊長類モデル動物の作出と評価に関する基盤的研究」
（分担課題名）疾患モデルサル作出用新規ウィルスベクター開発

分担研究者　高田昌彦
（所属）　（京都大学霊長類研究所）

緒　言

最近、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター９型やその改変型が血液脳関門（BBB）を越えて脳に目的遺伝子を導入できることが示され、マウスでは血管内投与で全脳的なニューロンへの遺伝子導入が可能であることが報告された。しかしながら、これらのベクターはサルをはじめ霊長類の脳では機能せず、未だ全脳的なニューロンへの遺伝子導入には至っていない。我々は最近、AAV９型と高いニューロン特異性を示すことが知られている AAV2 型とのモザイクキャプシドを用いた改変 AAV ベクター（AAV9.2）の開発に成功した。本研究では、マーモセットおよびマカクザルを対象にして、AAV9.2 を用いた非侵襲的かつ全脳的なニューロンへの遺伝子導入を実現する新規技術を確立し、脊髄小脳変性症、レビー小体型認知症などの遺伝子改変疾患モデルの作出を目指す。

方法

BBB が開放しているマーモセットおよびマカクザルの新生児に AAV9.2 を静脈内投与し、全脳レベルでのニューロンへの遺伝子導入を行う。また、特異的プロモータを用いて特定のニューロン種に選択的な全脳的遺伝子導入を行う。

結果

まずマーモセット新生児に AAV9.2 を静脈内投与したところ、脳全体にわたって高い効率でニューロンへの遺伝子導入が可能であることがわかった。また、CMV プロモータを synapsin プロモータに変換することによって、脳以外の臓器にほとんど感染せず、ニューロン選択的な遺伝子導入を可能にするベクターを作製した。特に 2020 年度は、AAV9.2 に更なる改良を加え、遺伝子導入効率の向上に成功するとともに、小脳プルキンエ細胞に特異的なプロモータ（L7）を搭載した AAV9.2 を作製し、マーモセットの新生児においてプルキンエ細胞選択的に外来遺伝子導入できることを予備的に確認した。

考察

今後は、L7 プロモータ制御下で ATAXIN3 遺伝子を搭載した AAV9.2 をマーモセット新生児の小脳に導入し、脊髄小脳変性症の霊長類モデルを作出するとともに、alpha-synuclein 遺伝子を搭載した AAV9.2 を大脳に導入し、レビー小体型認知症の霊長類モデルの作出を目指す。本研究の成果は、精神・神経疾患の病態解明と新規治療法開発に大きく寄与すると考える。

結論

本研究は、霊長類において全脳的なニューロンへの遺伝子導入を実現する改変 AAV ベクターを利用し、発生工学とは全く異なる斬新な発想に基づいて遺伝子改変疾患モデルを作出するという点で極めて独創的かつ新規性が高い。

参考文献

特になし。

研究発表

Nagai Y, Miyakawa N, Takuwa H, Hori Y, Oyama K, Ji B, Takahashi M, Huang X-P, Slocum ST, DiBerto JF, Xiong Y, Urushihata T, Hirabayashi T, Fujimoto A, Mimura K, English JG, Liu J, Inoue K, Kumata K, Seki C, Ono M, Shimojo M, Zhang M-R, Tomita Y, Suhara T, Takada M, Higuchi M, Jin J, Roth BL, Minamimoto T. (2020) Deschloroclozapine: a potent and selective chemogenetic actuator enables rapid neuronal and behavioral modulations in mice and monkeys. Nature Neuroscience 23:1157-1167.

Amita H, Kim H, Inoue K, Takada M, Hikosaka O (2020) Optogenetic manipulation of a value-coding pathway from the primate caudate tail facilitates saccadic gaze shift. Nature Communications. 11:1876.

Kubota S, Sidikejiang W, Kudo M, Inoue K, Umeda T, Takada M, Seki K (2019) Optogenetic recruitment of spinal reflex pathways from large-diameter primary afferents in non-transgenic rats transduced with AAV9/Channelrhodopsin 2. Journal of Physiology. 597:5025-5040.

知的所有権の出願・取得状況

なし。

2-8「脳神経疾患研究に資する霊長類モデル動物の作出と評価に関する基盤的研究」
運動失調モデルサルの生化学バイオマーカー開発

永井　義隆
近畿大学医学部
脳神経内科　教授

【緒言】

高齢化社会を迎え、加齢に伴って発症する神経変性疾患に対する早急な治療薬開発が望まれている。近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン（PolyQ）病などの神経変性疾患の病態解明・治療法開発へ向けて、これまで様々な疾病モデルマウスが開発されてきたが、げっ歯類とヒトでは脳の構造・機能や代謝経路が大きく異なるという問題点がある。一方、私たちはこれまでに、ヒトPolyQ病病態を反映する世界初のPolyQ病トランスジェニックマーモセットモデルの樹立に成功した。そこで本研究では、既存のげっ歯類モデルの問題点を克服すべく、PolyQ病トランスジェニックマーモセットモデルを用いて、より正確にヒト病態を反映する疾患バイオマーカーの開発を目指す。具体的には、PolyQ病モデルマーモセットの血液、尿、脳脊髄液などを用いた網羅的な解析により疾患バイオマーカーを開発し、発症前からの鋭敏な診断や薬効評価法を開発する。

【方法と結果】

これまでの研究から、異常タンパク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。そこでバイオマーカー候補分子としてエクソソーム内タンパク質に着目し、上記のPolyQ病モデルマーモセット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が確認された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、それぞれの検体でおよそ2,000種のエクソソーム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病モデル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。

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た。NCNPバイオバンクから提供されたPolyQ病患者血液検体16例（脊髄小脳失調症3型および6型）、および対照群として非変性疾患患者検体25例について、エクソソーム画分を精製し、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た。その結果、一部のタンパク質において、PolyQ病患者で変動が認められた。また、罹病期間もしくはPolyQリピート長との相関が認められた。現在、PolyQ病患者検体を追加して検証を進めているところである。今後、追加検体の定量評価結果について、PolyQ病型、罹病期間、PolyQリピート長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を目的として、PolyQ病モデルマーモセット由来血液エクソソームのプロテオーム解析で得られた変動タンパク質8種について、患者検体を用いた検証実験を行い、一部のタンパク質がPolyQ病患者でも変動している可能性を示唆する結果を得た。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) Tomioka I., Nagai Y., Seki K. Generation of common marmoset model lines of spinocerebellar ataxia type 3. ***Front. Neurosci.*** 14:548002 (2020)

【学会】

1) 永井義隆. 認知症バイオマーカーとしての血液中エクソソームの可能性. 南大阪認知症講演会（R3.3.25、大阪）

Intramural Research Grant (2-8) for Neurological and Psychiatric Disordersof NCNP

Basic research on the creation and evaluation of primate models for the study of neurological diseases

Principle investigator: Kazuhiko SEKI (NCNP)

In this fiscal year, we are conducting research in the following areas: 1) overall supervision and development of new animal models for diseases, 2) phenotypic analysis of dementia model monkeys using PET, 3) development of biochemical biomarkers for ataxia model monkeys, 4) neuropathological analysis of dementia model monkeys, 5) development of biochemical biomarkers for dementia model monkeys, and 6) development of new viral vectors for disease model monkeys. The following is a summary of the results of our research in each of the following areas.

【Overall Management】

Despite the impact of Covid19 and the renovation of the animal building, overall, each project was judged to be progressing smoothly as planned.

【Phenotyping of a monkey model of dementia using PET】.

SMBT-1 is the latest tracer developed at Tohoku University. After signing the MTA, we were provided with samples and various information. After signing the MTA, we received samples and various information. As a result, we were able to obtain the desired 18F-labeled SMBT1 with sufficient radioactivity for PET imaging and a molar activity of 60 GBq/μmol. Since FC-119S has been reported in the literature, we asked our research collaborator to synthesize the precursor and the preparation. Using the precursor obtained, we modified the synthesis method described in the paper to suit the equipment environment of NCNP and performed labeling synthesis. As a result, it was found that an unlabeled impurity peak appeared just before the target 18F-labeled FC-119S in the preparative process. Although we were able to separate the 18F-labeled FC-119S from the target product and obtained 18F-labeled FC-119S, if we are to continue synthesizing it for PET imaging in the future, it would be better to improve the problem of the impurity peak to avoid the risk of contamination.

【Development of biochemical biomarkers in a monkey model of ataxia】

We have obtained research ethics approval for "Development of Clinical Indicators and Biomarkers in Neurodegenerative Diseases" (Ethics Approval No. A2017-131) and have set up a system for implementation. A large number of patients with MJD/SCA3 are hospitalized at our hospital, and the

research system is in place. In the future, it is necessary to establish an evaluation index that can be applied to humans and promote the research.

【Neuropathological analysis of a monkey model of dementia】.

We assisted in the analysis of model mice in relation to PET ligands, with the aim of tracking changes over time from the onset of the disease in situ. For one, we established the optimal method of staining for amyloid-beta. In addition, markers of inflammation are currently under investigation. We are able to proceed with the study to examine biomarkers and specimens that have been established as model mice for dementia. On the other hand, there is a project being conducted by another researcher on the relationship between biomarkers (spinal fluid, PET) and pathology in human dementia. We will continue to study the relationship between the biomarkers and the pathology of human dementia in the next fiscal year.

【Development of biochemical biomarkers in a monkey model of dementia】.

Aβ40 and Aβ42 levels in CSF were elevated in AD model mice compared to wild-type mice. In addition, soluble Aβ42 and Aβ42/40 ratio in CSF were decreased in 12-month-old AD model mice, in which cognitive decline and Aβ-positive plaques were apparent, compared with 2-month-old AD model mice. In other words, we found that 12-month-old mice reproduced the same decrease in Aβ42 and Aβ42/40 in CSF as human AD patients. In this study, based on our previous experience of phenotyping the world's first neurodegenerative disease model marmoset with onset and progressive symptoms, we will strategically develop a phenotyping method for the early-onset AD model marmoset to be generated in this group from an early stage, and establish biochemical biomarkers that reflect the pathological progression of AD. We aim to establish biochemical biomarkers that reflect the progression of AD. Based on the results of this year's study, we will continue to collect CSF and measure soluble Aβ over time in the next year, and aim to identify the earliest age at which soluble Aβ42 and Aβ42/40 ratio decrease in CSF of AD model mice. Furthermore, by comparing the results obtained in this study with the Aβ accumulation in PET imaging and pathological analysis performed in the group, we aim to estimate the time when the decrease of Aβ in CSF may appear in the genetically modified AD model marmosets.

【Development of novel viral vectors for the generation of disease model monkeys】

When AAV9.2 was intravenously administered to marmoset neonates, it was found that gene transfer to neurons was possible with high efficiency throughout the brain. In addition, by converting the CMV promoter to the synapsin promoter, we have created a vector that enables neuron selective gene transfer with little infection of organs other than the brain. In particular, in FY2020, we made further improvements to AAV9.2 to improve the efficiency of gene transfer, and also created AAV9.2 with a promoter (L7) specific for cerebellar Purkinje cells, and preliminarily confirmed that Purkinje cell-selective foreign gene transfer

is possible in marmoset neonates. The results showed that AAV9.2 was able to selectively transduce Purkinje cells in marmoset neonates.

【Development of biochemical biomarkers for ataxia model monkeys】

Blood samples were collected from five PolyQ disease model marmosets and four wild-type marmosets as a control group. Blood samples were collected from five PolyQ disease model marmosets and from four wild-type marmosets as a control group. Extracellular vesicle fractions containing exosomes were purified from each blood sample, and the proteins present in the fractions were comprehensively and quantitatively analyzed by LC-MS/MS. As a result, we succeeded in quantitatively identifying approximately 2,000 exosomal proteins in each sample. Of these, we identified four proteins that increased or decreased in the PolyQ disease model marmoset group, and four proteins that increased in correlation with the onset of the disease.We purified exosome fractions from 16 blood samples of PolyQ disease patients (spinocerebellar ataxia types 3 and 6) donated by NCNP Biobank and 25 samples of non-degenerative disease patients as a control group. We purified the exosome fractions of 16 blood samples from patients with PolyQ disease (types 3 and 6) and 25 samples from patients with non-degenerative diseases as a control group, and performed quantitative evaluation of the above eight proteins by Western blot. The results showed that some of the proteins showed variation in PolyQ disease patients. In addition, there was a correlation with disease duration or PolyQ repeat length.