

令和元年6月13日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09850

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いた新規前頭側頭葉変性症モデルマウスの開発

研究課題名(英文) Development of novel frontotemporal lobar degeneration model mice using genome editing.

研究代表者

細川 雅人 (HOSOKAWA, Masato)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・主席研究員

研究者番号：00435116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：前頭側頭葉変性症(FTLD)は、前頭・側頭葉の神経細胞脱落により人格変化や失語症状を呈する。初老期認知症の中ではアルツハイマー型認知症に次いで頻度が高い疾患である。ほとんどのFTLD例では、神経細胞やグリア細胞内に特定の蛋白質が封入体を形成する。その主要構成蛋白として近年明らかとなったTDP-43およびC9orf72のノックイン(KI)マウスをゲノム編集技術により作製し、FTLDのモデル動物を構築することを目的とした。助成期間内にC9orf72-KIマウスは得られなかったが、TDP-43-KIマウスの作出に成功した。今後FTLD患者脳と同様の病変を再現できるか検討をおこなう予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で作出されたTDP-43-KIマウスは、これまでのTDP-43過剰発現トランスジェニックマウスとは異なり、生理的なTDP-43発現レベルを維持している世界初のマウスである。このマウスを用いてTDP-43蓄積の病理機構を解析することが可能であると考えられる。また、このマウスを用いた前頭側頭葉変性症モデルへ、TDP-43の異常凝集を抑制する候補化合物を投与することにより、疾患に適用できる新たな薬剤開発をおこなうことができると期待される。

研究成果の概要(英文)：Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) patients present personality changes and aphasia due to loss of neurons in the frontal and temporal lobes. Among presenile dementias, FTLD is the second most frequent disease. In most FTLD cases, specific proteins form inclusion bodies in neurons and glial cells. TDP-43 and C9orf72 knock-in (KI) mice, which have been clarified in recent years as their main component proteins, were produced by genome editing technology, and the purpose was to develop model mice of FTLD. Although C9orf72-KI mice were not obtained within this research grant period, TDP-43-KI mice were successfully produced. Next, we will investigate whether it is possible to reproduce the same pathology as that of FTLD patient's brain.

研究分野：実験病理学

キーワード：TDP-43 C9orf72 ゲノム編集 CRISPR-Cas9 病態モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前頭側頭葉変性症(frontotemporal lobar degeneration: FTLD)は、前頭・側頭葉の神経細胞脱落により人格変化や失語症状を呈する疾患群の総称であり、初老期認知症の中ではアルツハイマー型認知症に次いで頻度が高く、時に筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)を合併する。臨床的には前頭側頭型認知症、意味性認知症、進行性非流暢性失語の3つの類型に分類される。病理学的には、ほとんどのFTLD例では、神経細胞あるいはグリア細胞内に特定の蛋白質が凝集し、封入体を形成する。その主要構成蛋白として、これまでにタウ、TAR DNA-binding protein of 43 kD (遺伝子: *TARDBP*, 蛋白: TDP-43)、fused in sarcoma(FUS)が同定され、FTLD-tau、FTLD-TDP、FTLD-FUSという3つの主要な病理グループを形成している。

近年、封入体の構成蛋白質の同定とともに、タウ(*MAPT*)、granulin (*GRN*)、chromosome 9 open reading frame 72 (*C9ORF72*)などの家族性FTLDの原因遺伝子が次々と同定されたことで、FTLDの疾患理解は大きく進んだ。

最近発見された*C9ORF72*遺伝子変異では、*C9ORF72*のエクソン1aと1b間にあるイントロンにGGGGCCというヘキサヌクレオチドの繰り返し配列の異常伸長が発見された。健常人でのGGGGCCリピート数は2-23であるのに対し、患者では700以上と推測されている。変異例の基本的な病理像は、FTLD-TDPとALSのコンビネーションであり、TDP-43陽性核内封入体(NCI)が、大脳皮質、海馬、基底核、黒質、脳幹および脊髄の運動ニューロンなどに広汎に分布する。

FTLDについては、原因蛋白としてのTDP-43とFUS、および原因遺伝子としての*GRN*と*C9ORF72*の発見によりその研究は近年飛躍的に進歩し、細胞モデルおよび動物モデルの作製も進んでいる。しかし、細胞モデルではヒトの病理と良く似た像が再現されているが、未だにヒトの病理像を十分に反映した動物モデルは作製できていない。これまでにTDP-43トランスジェニックマウスに関する報告は複数あるが、発生初期から神経系の異常が観察される系統はあるものの、疾患と同様の病変が再現されたものはない。また、*GRN*ノックアウトマウスの解析をおこなったがTDP-43の異常蓄積は観察されなかった。これらの結果より、特にTDP-43に関しては従来の強制発現系もしくは*GRN*遺伝子のノックアウトではヒトの病態を再現できないということが示唆された。*C9ORF72*に関してはショウジョウバエのレベルにとどまっておらず、哺乳類モデルは存在していなかった。良い動物モデルが構築できていないため、FTLDの治療薬開発が進んでいないのが現状であった。

本研究は、過剰発現系(トランスジェニック)ではなく、ゲノム編集技術と遺伝子ノックインの手法を用いて、人工的な表現型をできるだけ排除した新規モデルマウスを作製し、FTLD患者脳と同様の病変を再現できる次世代型神経変性疾患モデルを構築するという世界で初の試みである。

2. 研究の目的

前頭側頭葉変性症の新規モデルマウスを、ゲノム編集技術を用いて作製し、疾患と同様の病変を再現する。作出したマウスを用いて異常タンパク質蓄積の病理機構を生化学的・組織化学的に明らかにするとともに、認知機能や情動に関する行動解析をおこなう。さらに応用研究として、タンパク質の異常凝集を抑制する候補化合物をマウスに投与し、前頭側頭葉変性症に適用できる新たな薬剤開発へつなげる。

3. 研究の方法

ゲノム編集技術による新規前頭側頭葉変性症モデルマウスの作製

(1) *C9ORF72* ノックインマウスの作製

マウスにおいて、ヒト *C9ORF72* 遺伝子に相当する部位はすでに解明されており [Suzuki N. et al. Nature Neurosci. 16(12): 1725-1727 (2013)], マウス 4 番染色体上に存在する。相同遺伝子名は *3110043O21Rik* であるが便宜上マウス *C9ORF72* と呼ぶ。マウス *C9ORF72* のエクソン 1 の上流に GGGGCC リピート部分に相当する場所があり、この部位へゲノム編集技術を利用し、GGGGCC が 145 回繰り返された (GGGGCC)₁₄₅ の挿入をおこなう。*C9ORF72* を標的とした single-guide RNA (sgRNA)、二本鎖 DNA 切断酵素である Cas9 の mRNA、相同組換えに用いる (GGGGCC)₁₄₅ 配列を含んだドナー DNA の 3 つをマウス受精卵の雄性前核に注入後、偽妊娠マウスの子宮内へ受精卵を戻す。産まれた個体の中から、相同組換えによって (GGGGCC)₁₄₅ が挿入されたマウスを選択し、繁殖後実験に用いる。

(2) TDP-43 ノックインマウスの作製

ヒトとマウスでアミノ酸配列が大きく異なる TDP-43 遺伝子のエクソン 5, 6 部分を、ゲノム編集によりヒト型に置換した TDP-43 ノックインマウスの作製をおこなう。マウス TDP-43 のエクソン 5, 6 をそれぞれ切断するための sgRNA、二本鎖 DNA 切断酵素 Cas9 の mRNA、相同組換え用ヒト TDP-43 のエクソン 5, 6 を含んだドナー DNA を上記と同様にマウス受精卵に導入する。産まれた個体の中から、相同組換えによってヒト型 TDP-43 が挿入されたマウスを選択し、繁殖後実験に用いる。また、cDNA をドナー DNA としたものをを用いて個体作製もおこなった。

4. 研究成果

(1) *C9orf72* ノックインマウスの作製

C9orf72 ノックインマウスに関してはヒト *C9ORF72* 遺伝子と相同なマウス *3110043O21Rik* 遺伝子に (GGGGCC)_n のヘキサヌクレオチドリピートを挿入し、*C9orf72* 遺伝子変異モデルマウスの作製をおこなった。*C9orf72* を標的とした crRNA, tracrRNA、二本鎖 DNA 切断酵素 Cas9 の mRNA またはタンパク、相同組換えに用いる (GGGGCC)_{x145} 配列を含んだドナー DNA をマウス受精卵の雄性前核に注入後、偽妊娠マウスの子宮内へ受精卵を戻した。1 回目 93 匹、2 回目 102 匹、3 回目 90 匹、合計 285 匹の出生個体が得られたが、目的遺伝子がノックインされたマウスは 0 匹であった。

(2) TDP-43 ノックインマウスの作製

ヒトとマウスでアミノ酸配列が大きく異なる TDP-43 遺伝子のエクソン 5, 6 部分を、ゲノム編集によりヒト型に置換した TDP-43 ノックインマウスの作製をおこなった。マウス TDP-43 のイントロン 5 を切断するための single-guide RNA (sgRNA)、二本鎖 DNA 切断酵素 Cas9 の mRNA、相同組換え用ヒト TDP-43 のエクソン 5, 6 を含んだドナー DNA をマウス受精卵に導入した。産まれた 73 個体の中から、相同組換えによってヒト型 TDP-43 が挿入されたマウス 3 系統を樹立した。繁殖後ヒト型 TDP-43 の発現を確認したが、陰性であった。

次にヒト TDP-43 のエクソン 5-6 間にあるイントロン 5 の配列をヒトからマウスに変更したドナーDNA を用いて、同様にマウス受精卵に導入した。50 個体産まれたが、ノックインマウスは得られなかった。

ゲノムのノックインではうまく行かなかったので、ドナーDNA を cDNA に置き換えて、再作製をおこなった。TDP-43 はエクソン 2 に開始コドンがあり、その ATG に合わせてヒト TDP-43 cDNA をノックインできるように、ドナーDNA を改良した。25 匹のマウスが産出され、その中から 2 系統のノックインマウスが得られたが、ヒト TDP-43 タンパクの発現は確認できなかった。

次に 3'非翻訳領域であるエクソン 1 部分にヒト TDP-43 cDNA をノックインできるように、ドナーDNA を改良した。この方法では 20 匹のマウスが生まれ、1 系統のノックインマウスが得られたが、エクソン 2-4 が欠失した、不完全ノックインマウスであった。ヒト型 TDP-43 タンパクの発現も確認できなかった。

これまでは CRISPR-Cas9 によるゲノム切断箇所が 1 箇所であったので、最新の論文を元に、2 種類の crRNA を使い、2 箇所に切断点を入れた上でのノックインをおこなった。この方法では 69 匹中 8 匹でノックインが成功していることがわかった。この 8 匹のマウスの尾からタンパク質を抽出し、イムノプロットをおこなったところ、8 匹すべてにおいて、ヒト型 TDP-43 タンパクの発現が確認された。ヒト型 TDP-43 ノックインマウスの作製に成功した。現在交配し、これらの TDP-43 ノックインマウスを増産している所である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. プログラニユリン 細川雅人 非定型パーキンソンニズム-基礎と臨床- 209-215, 2019 査読無
2. Clinical features of behavioral variant of frontotemporal dementia useful for predicting underlying pathological subtypes of frontotemporal lobar degeneration. Kobayashi Z, Arai T, Kawakami I, Yokota O, Hosokawa M, Oshima K, Niizato K, Shiraishi A, Akiyama H, Mizusawa H. *Psychogeriatrics* 18(4): 307-312, 2018 査読有 doi: 10.1111/psyg.12334.
3. C9ORF72 dipeptide repeat poly-GA inclusions promote: intracellular aggregation of phosphorylated TDP-43. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Hosokawa M, Shimozaawa A, Hirai S, Okado H, Hasegawa M. *Human Molecular Genetics* 27(15): 2658-2670, 2018 査読有 doi: 10.1093/hmg/ddy174.
4. Progranulin haploinsufficiency reduces amyloid beta deposition in Alzheimer's disease model mice. Hosokawa M, Tanaka Y, Arai T, Kondo H, Akiyama H, Hasegawa M. *Experimental Animals* 67(1):63-70, 2018 査読有 doi: 10.1538/expanim.17-0060.
5. 認知症 発症前治療のために改名すべき分子病態は何か? 第 1 章 脳神経病理変化 4. 脳内炎症の病理像と意義 細川雅人、秋山治彦 実験医学(増刊)第 35 巻第 12 号 1962-1966, 2017 査読無
6. iPSC-based drug repositioning identifies Src/c-Abl as a therapeutic target for ALS motor neurons. Imamura K, Izumi Y, Watanabe A, Tsukita K, Woltjen K, Yamamoto T, Hotta A, Kondo T, Kitaoka S, Ohta A, Tanaka A, Watanabe D, Morita M, Kaji R, Takuma H, Tamaoka A, Kunath T, Wray S, Furuya H, Era T, Fujisawa T, Nishotoh H, Kengo H, Ichijo H, Julien J-P, Obata N, Hosokawa M, Akiyama H, Ayaki T, Ito H, Takahashi R, Yamanaka S, Inoue H. *Science Translational Medicine* 9:391, 2017 査読有 doi: 10.1126/scitranslmed.aaf3962
7. Accumulation of multiple neurodegenerative disease-related proteins in familial frontotemporal lobar degeneration associated with granulin mutation. Hosokawa M, Kondo H, Serrano GE, Beach TG, Robinson AC, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M, Arai T. *Scientific Reports* 7(1):1513, 2017 査読有 doi: 10.1038/s41598-017-01587-6.
8. Progranulin regulates lysosomal function and biogenesis through acidification of lysosomes. Tanaka Y, Suzuki G, Matsuwaki T, Hosokawa M, Serrano G, Beach TG, Yamanouchi K, Hasegawa M, Nishihara M. *Human Molecular Genetics* 26(5):969-988, 2017 査読有 doi: 10.1093/hmg/ddx011.
9. プリオンモデル 細川雅人、長谷川成人 最新医学 第 71 巻/3 月増刊号 529-537, 2016 査読無

10. Enhancement and regulation effect of myrcene on antibody response in immunization with ovalbumin and Ag85B in mice. Uyeda S, Sharmin T, Satho T, Irie K, Watanabe M, Hosokawa M, Hiramatsu Y, Koga T, Nakashima Y, Kashige N, Toda A, Mishima K, Miake F. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology 34(4):314-323, 2016 査読有 doi: 10.12932/AP0734.
11. Quantitative and combinatory determination of in situ phosphorylation of tau and its FTDP-17 mutants. Kimura T, Hosokawa T, Taoka M, Tsutsumi K, Ando K, Ishiguro K, Hosokawa M, Prof. Hasegawa M, Hisanaga S. Scientific Reports 6:33479, 2016 査読有 doi: 10.1038/srep33479.
12. Chorea as a clinical feature of the basophilic inclusion body disease subtype of fused-in-sarcoma-associated frontotemporal lobar degeneration. Kawakami I, Kobayashi Z, Arai T, Yokota O, Nonaka T, Aoki N, Niizato K, Oshima K, Higashi S, Katsuse O, Hosokawa M, Hasegawa M, Akiyama H. Acta Neuropathologica Communication 4(1):36, 2016 査読有 doi: 10.1186/s40478-016-0304-9.
13. The Abundance of Nonphosphorylated Tau in Mouse and Human Tauopathy Brains Revealed by the Use of Phos-Tag Method. Kimura T, Hatsuta H, Masuda-Suzukake M, Hosokawa M, Ishiguro K, Akiyama H, Murayama S, Hasegawa M, Hisanaga S. American Journal of Pathology Vol. 186, No. 2, 398-409, 2016 査読有 doi: 10.1016/j.ajpath.2015.10.009.
14. An autopsied case of corticobasal degeneration showing severe cerebral atrophy over a protracted disease course of 16 years. Kondo D, Hino H, Shibuya K, Fujisawa K, Kosaka K, Hirayasu Y, Yamamoto R, Kasanuki K, Minegishi M, Sato K, Hosokawa M, Arai T, Arai H, Iseki E. Neuropathology Vol. 35, No. 3, 280-288, 2015 査読有 doi: 10.1111/neup.12188.

〔学会発表〕(計 27 件)

1. Progranulin haploinsufficiency reduces amyloid beta deposition in Alzheimer's disease mouse model. Hosokawa M, Tanaka Y, Arai T, Kondo H, Akiyama H, Hasegawa M. ADPD2019 The 14th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases, 2019
2. タウ伝播モデルマウスの作製 細川雅人、下沢明希、鈴掛雅美、長谷川成人 第 92 回日本薬理学会, 2019
3. マウス及びウサギ心筋梗塞モデルにおけるプログラニュリンの心筋保護作用 佐々木貴寛、金森寛充、山田好久、久世祥己、鈴木元治郎、増田智美、中村信介、嶋澤雅光、細川雅人、湊口信也、原 英彰 第 26 回日本血管生物医学学会学術集会, 2018
4. Progranulin haploinsufficiency reduces amyloid beta deposition in Alzheimer's disease mouse model. Hosokawa M, Tanaka Y, Arai T, Kondo H, Akiyama H, Hasegawa M. 11th International Conference on Frontotemporal Dementias, 2018
5. 加齢性機能障害における発達期要因の解明 田中智子、細川雅人、斉藤貴志、西道隆臣、長谷川成人、岡戸晴生 第 37 回日本認知症学会, 2018
6. タウの伝播モデル動物 細川雅人、長谷川成人 第 37 回日本認知症学会, 2018
7. 髄液検査の有用性 細川雅人 第 59 回日本神経学会学術大会, 2018
8. タウのプリオン様伝播モデル 細川雅人 日本薬学会第 138 年会, 2018
9. GRN 変異脳における神経変性疾患関連タンパクの重複蓄積とミクログリア 細川雅人、新井哲明、近藤ひろみ、秋山治彦、長谷川成人 第 3 回 プログラニュリン研究会, 2018
10. TDP-43 proteinopathy モデルマウスの作製 細川雅人、新井哲明、野中隆、亀谷富由樹、近藤ひろみ、秋山治彦、長谷川成人 2017 年度 生命科学系学会合同年会 (ConBio2017), 2017
11. プログラニュリンのハプロ不全は AD モデルマウスにおける Aβ の蓄積を減少する 細川雅人、田中良法、新井哲明、近藤ひろみ、秋山治彦、長谷川成人 第 36 回 日本認知症学会, 2017
12. TDP-43 proteinopathy モデルマウスの作製 細川雅人、新井哲明、野中隆、亀谷富由樹、近藤ひろみ、秋山治彦、長谷川成人 第 47 回日本神経精神薬理学会, 2017
13. タウのプリオン様伝播モデルマウスの作製 細川雅人、下沢明希、鈴掛雅美、新井哲明、設楽浩志、長谷川成人 第 1 回伝播性タンパク研究会, 2017
14. TDP-43 proteinopathy モデルマウスの作製 細川雅人、新井哲明、野中隆、亀谷富由樹、近藤ひろみ、秋山治彦、長谷川成人 第 137 回 日本薬学会, 2017
15. グラニュリン変異脳における神経変性疾患関連タンパクの重複蓄積 細川雅人、長谷川成人、小久保康昌 日本医療研究開発機構研究費(難治性疾患実用化研究事業)紀伊 ALS/PDC 診療ガイドラインの作製と臨床研究の推進班 平成 28 年度班会議, 2017
16. TDP-43 proteinopathy モデルマウスの作製 細川雅人、新井哲明、野中隆、亀谷富由樹、近藤ひろみ、秋山治彦、長谷川成人 第 35 回 日本認知症学会, 2016

17. Clinical and pathological study of FTL D-FUS presenting chorea. Kawakami I, Arai T, Kobayashi Z, Yokota O, Nonaka T, Niizato K, Oshima K, Higashi S, Hosokawa M, Hasegawa M, Akiyama H. 10th International Conference on Frontotemporal Dementias, 2016
18. Multiple accumulation of neurodegenerative disease-related proteins in familial granulin mutation brains. Hosokawa M, Arai T, Kondo H, Serrano GE, Beach TG, Hasegawa M, Akiyama H. 10th International Conference on Frontotemporal Dementias, 2016
19. Progranulin overexpression decrease levels of the matured form of cathepsin D due to enhancement of lysosomal acidification. Tanaka Y, Nonaka T, Suzuki G, Hosokawa M, Kametani F, and Hasegawa M. 第 39 回日本神経科学会 Neuro2016, 2016
20. Phosphorylated tau and α -synuclein accumulation in familial granulin mutation cases. Hosokawa M, Arai T, Kondo H, Serrano GE, Beach TG, Hasegawa M, Akiyama H. Alzheimer's Association International Conference 2016, 2016
21. Multiple accumulation of neurodegenerative disease-related proteins in familial granulin mutation brains. Hosokawa M, Arai T, Kondo H, Serrano GE, Beach TG, Hasegawa M, Akiyama H. 30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, 2016
22. グラニューリン変異脳における神経変性疾患関連タンパクの重複蓄積 細川雅人、新井哲明、近藤ひろみ、長谷川成人、秋山治彦 第 46 回 日本神経精神薬理学会, 2016
23. グラニューリン変異脳における神経変性疾患関連タンパクの重複蓄積 細川雅人 第 1 回 プログラニューリン研究会, 2016
24. グラニューリン変異例における神経変性疾患関連タンパクの重複蓄積 細川雅人、新井哲明、近藤ひろみ、長谷川成人、秋山治彦 厚生労働科学研究委託業務 障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野) 異常タンパク伝播仮説に基づく神経疾患の画期的治療法の開発 平成 27 年度 成果報告会, 2015
25. プログラニューリン変異脳における神経変性疾患関連タンパク質の重複蓄積 細川雅人、新井哲明、近藤ひろみ、長谷川成人、秋山治彦 第 34 回 日本認知症学会, 2015
26. The abundance of nonphosphorylated tau among heterogeneously phosphorylated tau species in vivo in mice and human brains. 木村妙子、初田裕幸、鈴掛 - 増田雅美、細川雅人、石黒幸一、秋山治彦、村山繁雄、長谷川成人、久永眞市 第 58 回 日本神経化学会大会, 2015
27. 非定型タウオパチーの二剖検例 河上緒、新井哲明、池田研二、大島健一、新里和弘、細川雅人、長谷川成人、秋山治彦 第 56 回 日本神経病理学会, 2015

〔図書〕(計 3 件)

1. Progranulin and Frontotemporal Lobar Degeneration. Hosokawa M and Arai T Progranulin and Central Nervous System Disorders, Springer Nature 35-69, 2019
2. PGRN and Neurodegenerative Diseases Other Than FTL D. Hosokawa M Progranulin and Central Nervous System Disorders, Springer Nature 71-84, 2019
3. Progranulin and Inflammation/Neuroinflammation. Hosokawa M Progranulin and Central Nervous System Disorders, Springer Nature 117-126, 2019

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/project/detail/dementia.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：新井 哲明

ローマ字氏名：ARAI, tetsuaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。