

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07501

研究課題名(和文)異常蛋白の発現調整が可能な多系統萎縮症動物モデルの開発と抗ミクログリア点鼻薬治療

研究課題名(英文)A novel mice model of MSA by overexpression of mutant alpha-synuclein in oligodendroglia in a temporarily restrictive manner using Tet-off system

研究代表者

松瀬 大(Matsuse, Dai)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：70596395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：多系統萎縮症の病態を解明するため、任意の時期にオリゴデンドログリアにシヌクレインを発現、抑制できる動物モデルを作成し、マウスの臨床症状、運動機能、病理学的所見などについて評価した。モデル動物は、病初期からミクログリアの活性化が認められた。病初期にシヌクレインの発現を抑制すると改善した。CSF-1R阻害剤というミクログリア除去剤を使用し、治療的介入についての検証も行った。ヒト多系統萎縮症患者末梢血の解析では、向炎症性のIntermediate単球が病初期に減少する傾向を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

任意の時期にシヌクレインをオリゴデンドロサイトに発現できる、多系統萎縮症の新規モデルを作成した。髄鞘形成後の時期からシヌクレインを発現させることができ、従来のモデルよりMSAの病態に近く、また短期間での評価が可能なため、病態の解明や治療薬の開発に有用である。多系統萎縮症患者の末梢血解析では、単球系の細胞分画の特徴を新たに見出すことができ、本疾患のバイオマーカーとして有用のみならず、本疾患のさらなる病態の解明にもつなげられると思われる。

研究成果の概要(英文)：We generated a transgenic mice model which express mutant human A53T-synuclein in oligodendroglia as a new animal model of multiple system atrophy (MSA). This will be a useful mice model because it develops clinical symptoms and pathological changes within a few months. Behavioral analysis and pathological evaluation were performed. Marked activation of microglia was seen especially in early stage. Therapeutic approaches were also analyzed. We also analyzed about the biomarkers of MSA from peripheral blood of patients. Early decrease of peripheral blood intermediate monocytes may be characteristic of MSA.

研究分野：神経内科学

キーワード：多系統萎縮症 グリア炎症 ミクログリア バイオマーカー intermediate monocytes シヌクレイン

1. 研究開始当初の背景

多系統萎縮症 (MSA) は α シヌクレイノパチーに分類され、オリゴデンドログリアへの不溶化した α シヌクレインの蓄積が MSA の発症、進展に重要な役割を演じている。私たちは、MSA 患者髄液では GM-CSF、IL-6、IL-7、IL-12 などの炎症性サイトカインが非炎症性神経疾患患者と比較し有意に上昇していること、MSA 患者において髄液中 MCP-1 値と罹病期間が負に相関し、かつ髄液中 IL-6 値と橋底部径が負に相関することを初めて見出し報告した (Yamasaki, et al. *J Neuroinflammation* 2017)。これらは MSA 初期病態への炎症の関りを強く示唆する。加えて MSA 患者の病理で、病初期からミクログリアの活性化が高度にみられることもこれを支持する (Ishizawa, et al. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004)。オリゴデンドログリアに α Syn が蓄積すると、続いてミクログリアが活性化され、種々のサイトカインを産生すると考えられる。また、病勢の進行とともにオリゴデンドログリアに蓄積する α Syn は拡散し、それと共にミクログリアの活性化も拡大し、神経細胞障害も増悪する可能性が考えられる。

これらをふまえ、今後 MSA の治療法を考える上で、オリゴデンドログリアへの α シヌクレインの蓄積を軽減させるか、炎症を軽減させるかいずれに重点を置くかが重要な問題と考えるに至った。それを解明するためには、任意の時期にオリゴデンドログリアに α シヌクレインを発現、抑制できる動物モデルを作成し、 α シヌクレインの蓄積と炎症の関係を明らかにすることが必要と考えた。それまでに国内外で作成された MSA モデルマウスは、オリゴデンドログリア特異的にヒト正常 α シヌクレインを恒常的に発現させた通常のトランスジェニックマウスしかなかった。それらのモデル動物では髄鞘の形成過程の段階ですでに α シヌクレインが発現しているため、髄鞘の形成異常をきたしている可能性は除外できないなど、成人発症である MSA の病態を正確に反映しているモデルとはいいがたく、よりヒト MSA の病態に近い動物モデルが望まれていた。

また同時に、MSA 患者髄液の炎症性サイトカインレベルが病初期に上昇している事実 (Yamasaki, et al. *J Neuroinflammation* 2017) は、MSA の重要なバイオマーカーとなり得る点でも重要な発見であった。しかしながら髄液採取は日常診療で行っているものではなく、簡便なマーカーとはなり難い。髄液サイトカインの上昇に伴って、末梢血にも変化が及んでいれば、より有用なバイオマーカーとなり、また MSA の病態を考察するうえでも重要な情報となり得る。上昇している髄液サイトカインの性質から、末梢血の単球が関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

MSA の病態を解明するため、任意の時期にオリゴデンドログリアに α シヌクレインを発現、抑制できる動物モデルを作成し、 α シヌクレインの蓄積と炎症の関係を明らかにすることを目指した。そのため Tet-off システムを用いた新規 MSA モデルマウスの開発を行った。そのモデルマウスを使用し、髄鞘形成後に α シヌクレインを発現させ、モデルマウスの臨床症状、運動機能、病理学的所見などについて評価し、MSA の病態のより深い解明を行う。また、治療的介入も行い、本疾患の新規治療開発を目指した。

さらに、ヒト MSA 患者末梢血を採取し、単球系の解析を行い、その変化について検証。MSA の末梢血バイオマーカーの探索を行うと同時に、MSA の病態解明を患者サンプルの方向からも検索し、動物モデルでの結果と合わせて検証した。

3. 研究の方法

Tet0- α SynA53T Tg/+ マウスと PLP-tTA Tg/+ マウスをさらに交配させ Tet0- α SynA53T Tg/+; PLP-tTA Tg/+ マウスを得る。交配中および、髄鞘形成が完成する生後 8 週までは Doxycycline (DOX) 添加の餌を与え α Syn A53T の発現を抑制する。生後 8 週齢より通常餌を与え α Syn A53T をオリゴデンドログリア特異的に持続的に発現させる。その後、行動学的解析 (ロタロッドテスト)、組織学的解析、生化学的解析を行い、ミクログリア、アストログリアがどの時期に脳脊髄のどの部位で活性化するかを明らかにする。またそれらの細胞を、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、マイクロアレイなどを用いて、種々のマーカーの発現を評価し、どのような性質の細胞が病態悪化、保護に関与しているか明らかにする。

治療的なアプローチとしては、上記のモデル動物の α シヌクレインの発現を発症直後の 23 週齢、あるいは発症後 1 か月ほど経過した 27 週齢の時点で、再度 DOX 添加の餌を与え、 α シヌクレインの発現を停止させ、症状や病理学的所見の変化を解析する。また薬物治療として、当初イグラチモドを想定していたが、CSF-1R 阻害剤のほうが適切との判断に至り、モデルマウス発症直後、直前時期それぞれで治療的投与を 1 週間ごとに経口投与にて行い、2-4 週間で評価を行い、治療効果について判定した。

さらに、髄鞘形成完了前である 3 週齢から通常餌を与えて α シヌクレインを発現させた場合の表現型についても解析し、MSA、 α シヌクレイノパチーの病態についての解明を行う。

その病初期に活性化するミクログリアが疾患進行に関連している可能性があり、ミクログリアを対象とした治療を検討した。17-24 週齢の発症前後のモデルマウスに対し、ミクログリア除去剤である CSF-1R 阻害剤を 2-4 週間投与し、行動、組織学的評価を行った

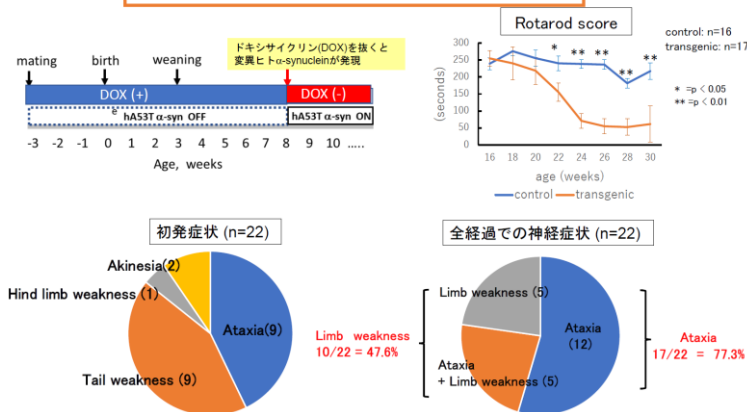
ヒト末梢血解析に関しては、当科で MSA-C、MSA-P あるいは遺伝性脊髄小脳変性症 (hSCD) と診断された患者の末梢血より単球を分離し、それらの表面マーカーを、フローサイトメトリー法で解析した。得られた単球を CD14、CD16 の発現により、Classical (CD14++ CD16-)、Intermediate (CD14++CD16+)、Non-classical (CD14+CD16++) の 3 群に分け、それぞれについて CX3CR1、CCR2、CD62L、CD64 の発現を調べた。さらに、患者の臨床データ (発症年齢、採血時年齢、罹病期間) と、フローサイトメーターで得られた患者末梢血単球の解析結果との関連性を検討した。健常コントロール (HC) 24 例、hSCD 20 例、MSA-C 29 例、MSA-P 5 例を対象に計測を実施した。また、罹病期間や MRI 計測データ、UMSARS スコアと末梢血解析データとの関連についても検証した。

4. 研究成果

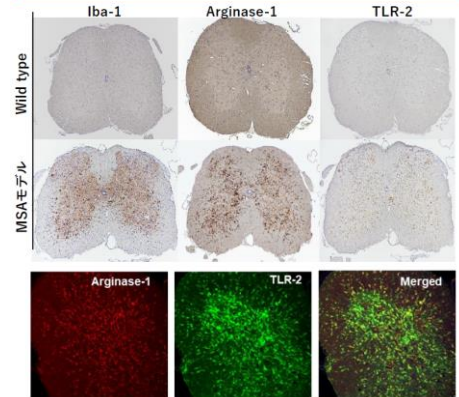
TetO- α SynA53T Tg/+ マウスと PLP-tTA Tg/+マウスを交配させ TetO- α SynA53T Tg/+; PLP-tTA Tg/+ マウスを得た。まず、成年マウスとなった生後 8 週以降に α Syn 発現させることで、多系統萎縮症のモデルマウスを作成した。マウスは平均 22.1 週齢で発症したが、その表現型は失調歩行のほか、尾や後肢の麻痺、寡動など多岐にわたった。症状は発症後徐々に進行し、体重減少や rotarod score の悪化がみられた (図 1)。病理学的所見では α シヌクレインの沈着や脱髄所見が脳、小脳、脳幹、脊髄にみられ、それに伴い arginase-1 陽性ミクログリアの顕著な浸潤やアストロサイトのコネキシン 43/30 の広汎な脱落を認めた (図 2)。マイクロアレイにて遺伝子発現を解析したところ、炎症や免疫に関する遺伝子群の発現が上昇していた。

治療的介入として、まず α シヌクレインの発現抑制実験を行った。発症直後の 23 週齢で α Syn の発現を抑制すると、マウスの症状は改善傾向を認め、体重や rotarod score、病理学的所見もコントロール群と同等に回復した。しかしながら、発症約 5 週後の 27 週齢で α シヌクレインの発現を抑制した場合は、症状の悪化は停止するものの、回復は部分的にとどまった (図 3)。この結果から、少なくとも α シヌクレインの発現を抑制すれば発症後でも症状を改善させることが可能で、しかしそれには一定の therapeutic window が存在し、本マウスでの治療介入時期は発症直後の時期までが適切と判断した。

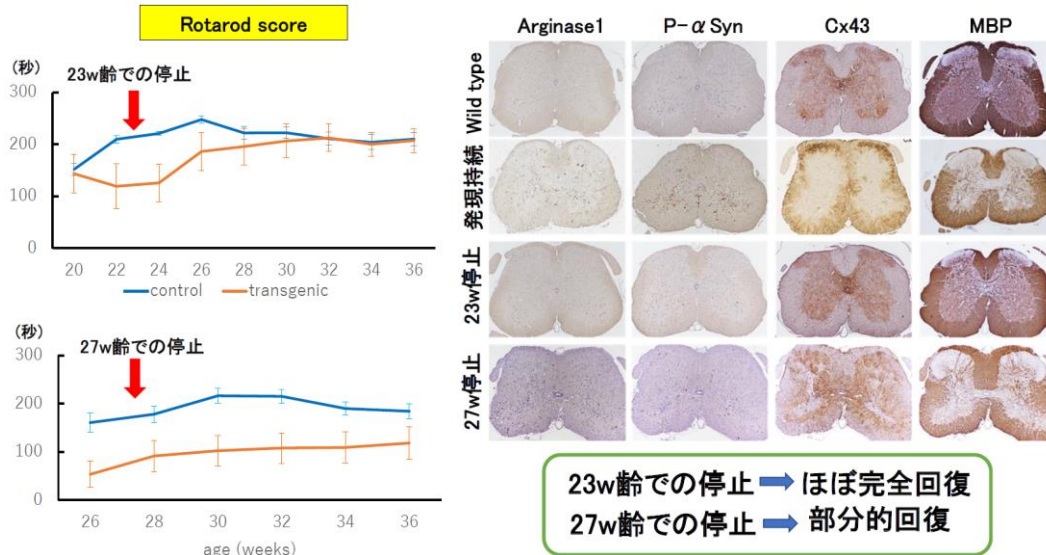
(図1) MSAモデルマウスの行動解析と主な神経症状



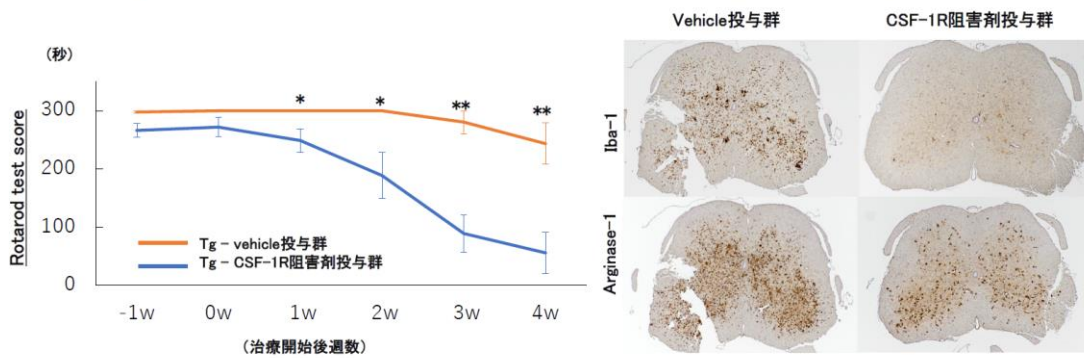
(図2) MSAモデルマウス24w齢 (発症後) の病理所見と、CNSミクログリア/マクロファージのFCM解析



(図3) MSAモデルマウスの α Syn発現停止による病態改善



(図4) MSAモデルマウス発症直前期のCSF-1R阻害剤投与実験



治療群はむしろ症状増悪し、Arginase-1陽性ミクログリアが残存する傾向

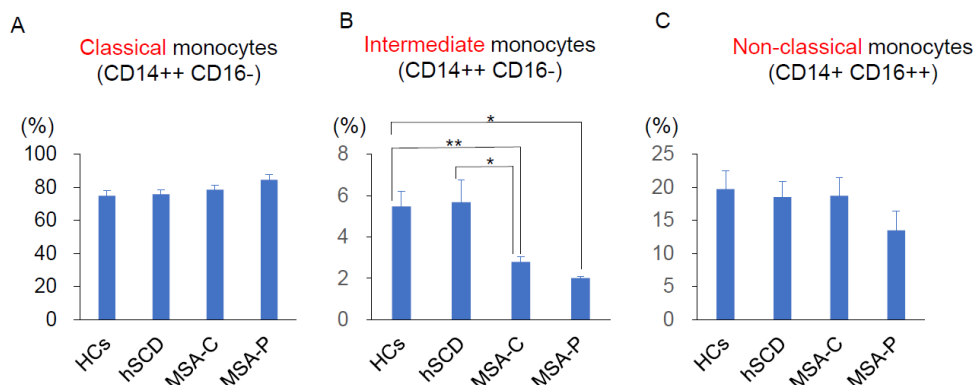
これらの研究から、適切な治療介入時期は発症直後が望ましいことが示唆されたが、方法として、 α シヌクレインの沈着から抑制する必要がある可能性と、それに続いて二次的に起こるグリア炎症をコントロールすることが治療につながる可能性が考えられた。後者の可能性を検証するため、活性化ミクログリアを標的とした治療法開発を試みることにした。19-25週齢の発症前後のマウスにCSF1R阻害薬を2-4週間連日経口投与させ、病理学的評価、行動評価を行った。Iba-1陽性ミクログリアは減少したもののarginase-1陽性活性化ミクログリアは比較的残存し、運動機能はむしろ増悪の傾向を認めた(図4)。保護的なミクログリアの除去が悪化に関連したと考え、今後ミクログリアのサブpopulation解析が重要になると思われた。

一方、髄鞘形成期(3週齢)から α Synを発現させると、運動麻痺が約70%と高い頻度でみられ、病理学的に大脳や脳幹で卵円形や線形など局所的なp- α Syn沈着、arginase-1陽性ミクログリア、Cx43/Cx30脱落を認め、その一部に局所的な脱髄斑が観察された。これらより、髄鞘形成後に発現させたモデルとの違いが示唆され、 α シヌクレインの沈着が一部で報告されている一次進行型多発性硬化症との関連性についても示唆された。

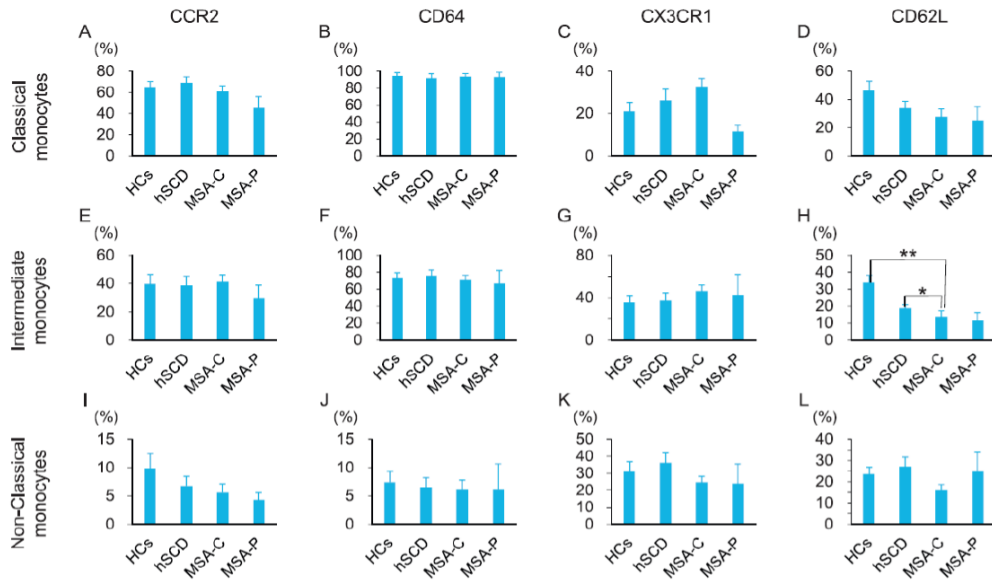
ヒトMSA末梢血解析に関しては、Intermediate (CD14++CD16+)単球の割合は、HC、hSCD、MSA-C、MSA-Pでそれぞれ $5.5 \pm 0.7\%$ 、 $5.7 \pm 1.1\%$ 、 $2.8 \pm 0.2\%$ 、 $2.0 \pm 0.1\%$ であり、MSA-C群はHC群、hSCD群に対して($p < 0.01$ 、 $p < 0.05$)、MSA-P群はHC群に対し($p < 0.05$)それぞれ有意に低値であった(図5)。CD62L+/Intermediate (CD14++CD16+)単球の割合においても、HC、hSCD、MSA-C、MSA-Pでそれぞれ $33.9 \pm 4.3\%$ 、 $18.9 \pm 1.9\%$ 、 $13.9 \pm 3.5\%$ 、 $11.5 \pm 4.8\%$ となり、MSA-C群で健常者群群に対し有意に低値であった($p < 0.01$) (図6)。さらに、MSA-C群において、Intermediate (CD14++CD16+)単球の割合が罹病期間と正の相関を認めた($p < 0.05$)。また、MSA-C群のIntermediate (CD14++CD16+)単球の割合は、UMSARS part Iスコア、Part IIスコア、罹病期間と正相関($p < 0.01$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$)、延髄前後径と逆相関($p < 0.05$)の関係にあり、病初期にIntermediate (CD14++CD16+)単球の割合減少が目立つ傾向が明らかになった(図7) (Matsuse et al, J Neuroimmunol 2020)。

これらよりMSAは病初期に中枢のグリア炎症が目立ち、Arginase-1陽性ミクログリアなどの活性化を来し、また髄液の炎症性サイトカインの上昇や末梢血の向炎症性単球の減少を伴い、病状の進行に関わっていると考えられた。病初期の α シヌクレイン沈着のコントロール、あるいはグリア炎症の制御が治療的アプローチに繋がると考えられる。

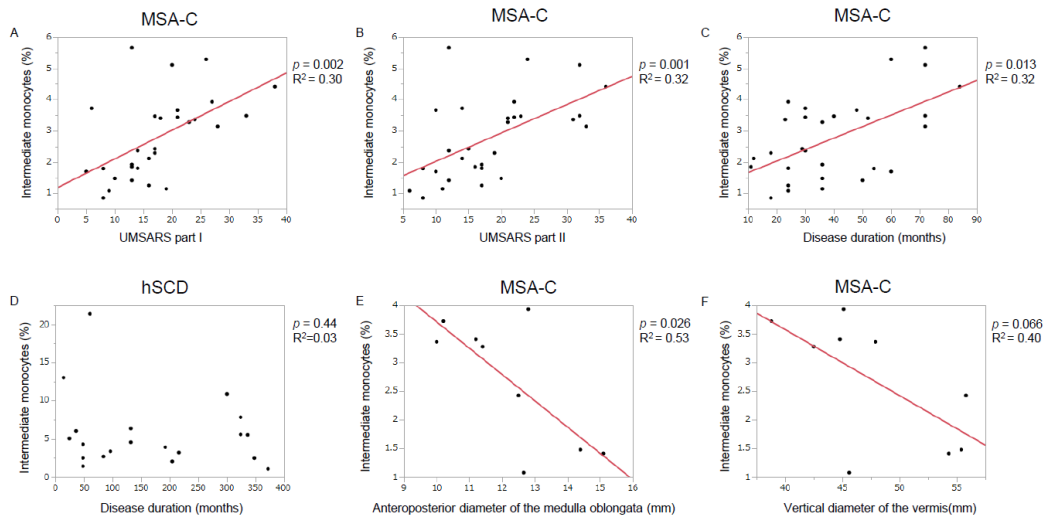
(図5) 向炎症性のIntermediate monocyteがMSA-C末梢血で有意に減少



(図6) MSA-Cでは接着分子CD62Lを発現する
向炎症性・貪食性単球が末梢血で低下



(図7) 末梢血の向炎症性intermediate monocyteは
MSA-C病初期に低下



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Dai Matsuse, Ryo Yamasaki, Guzailiayi Maimaitijiang, Hiroo Yamaguchi, Katsuhisa Masaki, Noriko Isobe, Takuya Matsushita, Jun-ichi Kira	4. 巻 349
2. 論文標題 Early decrease in intermediate monocytes in peripheral blood is characteristic of multiple system atrophy-cerebellar type	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 577395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jneuroim.2020.577395.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Toru Saiga, Hiroo Yamaguchi, Dai Matsuse, Katsuhisa Masaki, Yiwen Cui, Ryo Yamasaki, Kenji Tanaka, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 A novel model of primary progressive multiple sclerosis by oligodendroglial mutant alpha-synuclein
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Dai Matsuse, Hiroo Yamaguchi, Toru Saiga, Katsuhisa Masaki, Yiwen Cui, Ryo Yamasaki, Kenji Tanaka, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 A novel mice model of PPMS/MSA by oligodendroglial overexpression of mutant alpha-synuclein
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会 / 第62回日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsuhisa Masaki, Dai Matsuse, Hiroo Yamaguchi, Toru Saiga, Yuji Nishimura, Tatsunori Tanaka, Mitsuru Watanabe, Ryo Yamasaki, Kenji Tanaka, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 A novel model of multiple system atrophy-cerebellar type and primary progressive multiple sclerosis
3. 学会等名 The 24th Annual Meeting of the Japan Glia
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真崎勝久、松瀬大、山口浩雄、雑賀徹、西村由宇慈、田中辰典、渡邊充、田中謙二、山崎亮、吉良潤一
2. 発表標題 オリゴデンドロサイト特異的 シヌクレイン蓄積による小脳型多系統萎縮症・一次進行型多発性硬化症モデル
3. 学会等名 第31回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroo Yamaguchi, Dai Matsuse, Katsushisa Masaki, Toru Saiga, Yuji Nishimura, Mitsuru Watanabe, Ryo Yamasaki, Kenji Tanaka, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 Expression of mutant α -synuclein in oligodendrocytes induces remarkable glial inflammation and demyelination in the spinal cord and brainstem/cerebellar white matter: A novel model of multiple system atrophy-cerebellar type and primary progressive multiple sclerosis
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru Saiga, Hiroo Yamaguchi, Dai Matsuse, Katsuhisa Masaki, Yiwen Cui, Ryo Yamasaki, Kenji Tanaka, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 A novel model of primary progressive multiple sclerosis by oligodendroglial mutant alpha-synuclein
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Dai Matsuse, Hiroo Yamaguchi, Toru Saiga, Katsuhisa Masaki, Yiwen Cui, Ryo Yamasaki, Kenji Tanaka, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 A novel mice model of PPMS/MSA by oligodendroglial overexpression of mutant alpha-synuclein
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会 / 第62回日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Dai Matsuse, Ryo Yamasaki, Guzailiayi Maimaitijiang, Hiroo Yamaguchi, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 Early decrease of peripheral blood intermediate monocytes in multiple system atrophy cerebellar-type
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsunori Tanaka, Yuji Nishimura, Katsuhisa Masaki, Dai Matsuse, Hiroo Yamaguchi, Toru Saiga, Mitsuru Watanabe, Ryo Yamasaki, Kenji Tanaka, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 Therapeutic drug search using model mice for multiple system atrophy and primary progressive multiple sclerosis
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroo Yamaguchi, Tatsunori Tanaka, Dai Matsuse, Yuji Nishimura, Katsuhisa Masaki, Toru Saiga, Mitsuru Watanabe, Ryo Yamasaki, Kenji Tanaka, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 Gene expression profile of multiple system atrophy/primary progressive multiple sclerosis mice model
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村由宇慈, 眞崎勝久, 松瀬大, 山口浩雄, 雑賀徹, 田中辰典, 田中謙二, 山崎亮, 岩城徹, 吉良潤一
2. 発表標題 新規小脳型多系統萎縮症モデルによる脱髄・神経細胞障害機序とグリア制御による新規治療法開発の試み
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松瀬大, 山口浩雄, 眞崎勝久, 西村由宇慈, 田中辰典, 雑賀徹, 田中謙二, 山崎亮, 吉良潤一
2. 発表標題 オリゴデンドロサイト特異的 シヌクレイン蓄積による小脳型多系統萎縮症モデルの樹立
3. 学会等名 第14回日本パーキンソン病・運動障害疾患学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dai Matsuse, Ryo Yamasaki, Guzailiyi Maimaitijiang, Hiroo Yamaguchi, Toru Saiga, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 Decrease of peripheral blood intermediate monocytes in multiple system atrophy cerebellar-type
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松瀬大, 山口 浩雄, Maimaitijiang Guzailiyi, 樋渡 昭雄, 松下 拓也, 山崎 亮, 吉良 潤一
2. 発表標題 多系統萎縮症の病態形成における自然免疫の関与とバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Nishimura, Katsuhisa Masaki, Dai Matsuse, Hiroo Yamaguchi, Toru Saiga, Tatsunori Tanaka, Mitsuru Watanabe, Shoko Sadashima, Ryo Yamasaki, Kenji Tanaka, Toru Iwaki, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 Eliminaion of CSF1R-positive microglia exacerbates a novel mouse model of multiple system atrophy
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Katsuhisa Masaki, Yuji Nishimura, Dai Matsuse, Hiroo Yamaguchi, Toru Saiga, Tatsunori Tanaka, Mitsuru Watanabe, Shoko Sadashima, Ryo Yamasaki, Kenji Tanaka, Toru Iwaki, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 Early dysregulation of connexins in astroglia and oligodendroglia in multiple system atrophy
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dai Matsuse, Ryo Yamasaki, Guzailiayi Maimaitijiang, Hiroo Yamaguchi, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 Early decrease of peripheral blood intermediate monocytes in multiple system atrophy cerebellar-type
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松瀬大、山口浩雄、眞崎勝久、西村由宇慈、田中辰典、雑賀徹、田中謙二、山崎亮、吉良潤一、磯部紀子
2. 発表標題 新規小脳型多系統萎縮症モデルのCSF-1R阻害剤治療
3. 学会等名 第15回日本パーキンソン病・運動障害疾患学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	山口 浩雄 (Yamaguchi Hiroo) (00701830)	九州大学・大学病院・特任講師 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	雑賀 徹 (Saiga Toru) (00744880)	九州大学・医学研究院・学術研究員 (17102)	
研究分担者	山崎 亮 (Yamasaki Ryo) (10467946)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関