

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26890005

研究課題名(和文) 脊髄小脳変性症モデルとなるコモンマーモセットの作出および薬物治療の評価

研究課題名(英文) Generation of inherited spinocerebellar ataxia model marmoset and assessment of drug treatment

研究代表者

松崎 泰教 (Matsuzaki, Yasunori)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50738200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：指定難病である遺伝性脊髄小脳失調症(SCA)のマーモセットモデルを作出し薬物治療実験を行った。まず、SCAの主な障害組織である小脳へ原因遺伝子を導入させるため、ウイルスベクターを安定的にインジェクション装置と条件をマーモセットで開発し定めた。次に小脳は運動制御中枢であり、SCAによって障害を受けると小脳性の運動失調が現れる。しかしマーモセットで小脳失調を計測する装置が無かったため、それを検出する2種類の行動実験方法を開発した。最後に行動実験で有意に値が悪くなったマーモセットに対して薬物治療実験を行った。薬物治療実験による改善は認められなかったため、実験系を変更して現在継続中である。

研究成果の概要(英文)：The inherited spinocerebellar ataxia (SCA) model marmosets were generated and treated with a oral drug in this study. (1) I developed the method that SCA symptoms were stably emerged in marmosets using the adeno-associated virus (AAV) vector to inject the SCA causing gene into the marmoset cerebellum which is common degenerated tissue in SCA patients. (2) Because the cerebellum regulated motor behavior and motor learning, SCA patients have several movement disorders called cerebellar ataxia. I developed two behavior experiments to detect cerebellar ataxia of SCA model marmosets. (3) The SCA model marmoset was treated with a oral drug, but results of behavior experiments were not improved. Therefore the experimental design was changed and the experiment is continuing.

研究分野：分子生物学

キーワード：脳神経科学 マーモセット アデノ随伴ウイルスベクター AAV 脊髄小脳失調症 非ヒト霊長類 ATXN Ataxin

1. 研究開始当初の背景

(1) 指定難病の一つに脊髄小脳変性症がある。これは主に運動制御中枢である小脳の神経細胞が障害を受け、運動失調を呈する疾患の総称である。特に常染色体優性遺伝性のもは脊髄小脳失調症(SCA)と呼ばれ、臨床症状や原因遺伝子により 30 を越える型に分類されている。

(2) これまでに多くの SCA モデルとなる齧歯類、特にマウスモデルが作出され、障害のメカニズムや治療研究に用いられてきた。これまでに遺伝子治療、幹細胞治療、RNA 干渉法などの有効な治療方法が SCA モデルマウスを用いた研究で報告されている。しかし、ヒトに対して有効な治療方法は確立できていない。この原因の一つとして、マウスとヒトとの間の生理学的の違いをはじめ、種差が大きいことがあげられる。つまり、マウスで有効である治療法がヒトでの有効性や危険性が未知であるため、臨床研究までたどり着けずにいるということが要因の一つと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、マウスでの動物実験の結果をヒトの臨床試験へ繋ぐため、マウスよりもヒトに近い非ヒト霊長類であるマーモセットを用いて SCA1 モデルマーモセットを作出し、治療研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) まずマーモセット小脳へ SCA を発症させるための原因遺伝子をマーモセット小脳へ導入する必要があった。これにはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた。AAV ベクターはビリオンが小さく、組織に広く拡散し、発現も強いことが分かっている。また、宿主ゲノム DNA に挿入されないよう改良されているため、変異原性も無いなど利点が多い。さらに、脳への AAV ベクターをインジェクションするにあたり、頭部固定装置が必要であったが、小脳へ安定してインジェクション可能な装置が無かったため、新たに開発した。

(2) マーモセットにおける SCA モデル用の行動実験機器がなかったため、2 種類のシステムを開発した。一つは全身運動用であり、小脳失調によってバランス感覚障害や協調運動障害を検出するためのものである。もう一つは小脳失調による手指の巧緻運動障害を検出するためのものである。

(3) 治療実験には SCA モデルマウスへの経口投与で治療効果が認められた薬物治療を行った。この薬物はすでに別の疾患を対象としてヒトにも投与されている治療薬であり、経口投与可能で副作用も少ないと予想されたことからこの治療法を選択した。

4. 研究成果

(1) マーモセット小脳へ AAV ベクターをイン

ジェクションするため、マーモセットを底面に対して真下方向を向かせた状態で頭部を固定する必要があった。このような器具は販売されておらず、当初はイヤーパーと特注の顔面全体を覆うプラスチック製麻酔用マスクを用いていたが、マスクでは頭部が十分に固定できず、前後方向に簡単に動いてしまうためインジェクション位置がずれて安定しないという問題があった。そこで図 1 にあるような器具を開発した。これによって上顎骨を前後方向から押さえ込むことが出来るようになり、イヤーパーと合わせて頭部を完全に固定することが可能となった。

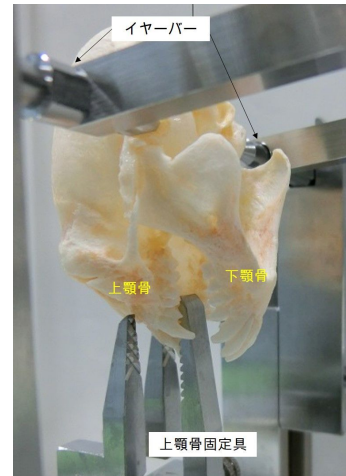


図 1. 頭部固定器具

また、新規の固定装置に合わせ、インジェクション条件を変更した。マーモセット頭骨の矢状縫合とラムダ縫合の交点を基準点とし、そこから三次元マイクロ

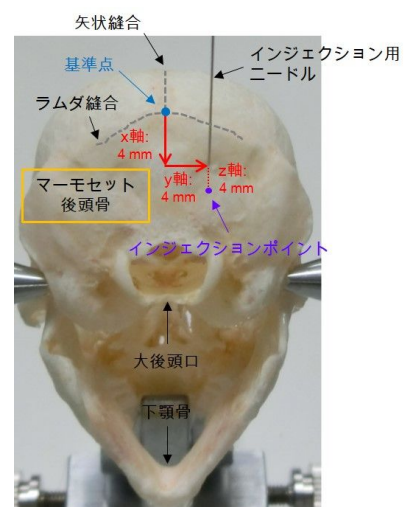


図 2. インジェクション位置

ーターを用いて x 軸方向に 4mm、y 軸方向に 4mm に平衡移動後、後頭骨の表面から z 軸(深さ)方向に 4mm 動かすことで確実に小脳半球にインジェクション可能とした(図 2)。虫部の場合、x 軸方向 3mm、y 軸方向 0mm で z 軸方向が 6mm でインジェクション可能であった。これらの装置や条件検討の結果、マーモセット小脳へ安定したインジェクションが可能となった。

(2) マーモセットの全身運動を計測する装置として、高さ 240cm のタワーを作製した。タワーの内部にはマーモセットが移動可能である平衡バーを 5cm 間隔で自由に取り外し可能な設計とした。SCA による小脳失調の症状の一つとしてバランス障害が現れるため、

タワーを用いてバランス障害を検出可能な実験系を構築した。マーモセットを複数設置した平衡バーの一番上に置き、餌(マシュマロやバームクーヘン)をモチベーションとして下段のバーに自発的に降りていくように教育した。1日1回、5日連続で実験を行い、その様子を動画で撮影して解析した。バーとバーの間隔が離れており、解析にはバーからバーへ降りている時間のみを抽出した(図3)。

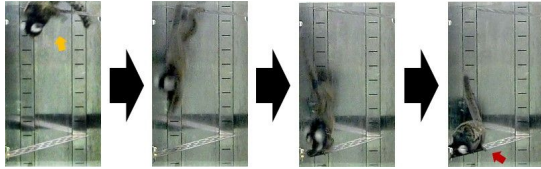


図3. 平衡バーを下降する様子

下降にはバランス感覚が要求されるため、SCAの症状が現れるとスムーズに降りることが出来なくなると予想された。実際、SCAの原因遺伝子を載せたAAVベクターをインジェクションしたマーモセットを経時的に実験していくと、4週目で降りる時間が有意に遅くなり、それ以降もインジェクション前の水準に戻ることは無いという結果となった(図4)。Preではジャンプして降りていたが4週

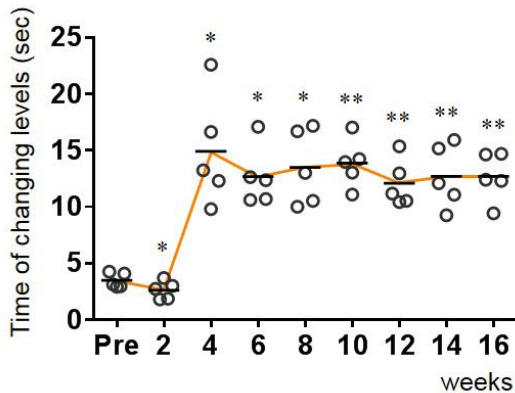


図4. SCAモデルマーモセットにおけるタワーテストの経時変化

目以降は壁伝いにしか降りられなくなったので、バランス障害によりスムーズに降りられなくなったと考えられた。この結果、タワーテストはSCAの小脳失調を計測する行動実験法の一つとして有用であると考えられた。

SCAによる小脳失調ではバランス障害とは別に手指の巧緻運動障害や測定障害が現れる。これらを計測するため、飼育ケージの外に台を設置しそこに餌を置いて手を伸ばして目標を掴ませるリーチングテストを構築した。飼育ケージの外側に10cm四方のプラスチック台を取り付け、5~7cmほどケージから離れたところに餌であるミルワームもしくはマシュマロを置いて、ケージから手を出した瞬間から餌を掴むまでの時間を、ハイスピードカメラを用いて120 frames per second (fps)で撮影し、動画を解析した(図5)。SCAの原因遺伝子をインジェクションしたマ

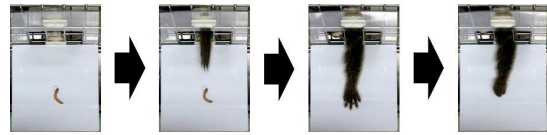


図5. リーチングテストの様子

ーモセットを用いて、1日10回、5日連続で行ったデータを一週間分としてまとめ、スコア化して経時変化を追った。その結果、この実験でも4週目で有意に悪化していることが分かった(図6)。その後、症状に慣れたた

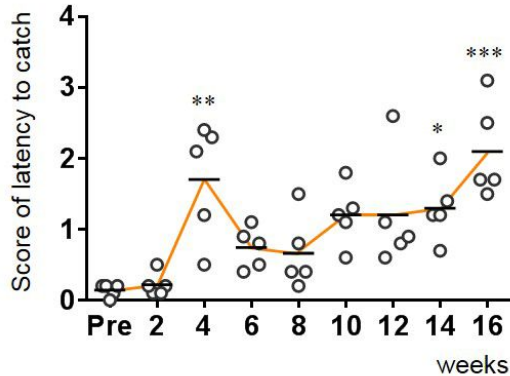


図6. SCAモデルマーモセットにおけるリーチングテストの経時変化

めか一時的に回復するが、また徐々に悪化していく様子も観察できた。これらのことからリーチングテストはSCAによるマーモセットの小脳失調を検出する行動実験の一つとして有用であると考えられた。これらの結果、SCAモデルマーモセットの全身運動および手指による巧緻運動の機能を計測する2種類の行動試験法が開発できたと考えられる。

(3)SCAモデルマーモセット1頭を対象として経口薬物試験の予備実験を行った。治療薬物としてバクロフェンを用いた。バクロフェンはGABA受容体のアゴニストであり、すでにヒトに対して投与されている薬物である。そのため、動物実験で効果が認められればヒトへの臨床試験へ比較的スムーズに進める可能性がある。SCAモデルマウスを用いた行動試験において、投与前と比較して投与24時間後に運動機能が有意に回復していることが分かっている(未発表データ)。その実験系をマーモセットに応用した。すでに症状が出てから1年以上経過したSCAモデルマーモセットに対し、タワーテストを用いて実験を行った。その結果、副作用は確認できなかったが、行動の改善も確認できなかった。効果が認められなかった一番の要因は、導入遺伝子の発現を司るプロモーターにあると考えられた。バクロフェンの効果があったモデルマウスは2種類でいずれも小脳プルキンエ細胞が障害されるタイプであった。マーモセット小脳でのSCAの原因遺伝子発現も、マウスではプルキンエ細胞で発現するSynapsin1 (Syn1)プロモーターを用いたのだ

が、マーモセットでは種の違いからか Syn1 プロモーターはプルキンエ細胞ではほとんど発現せず障害を受けないことが後になって分かった。それ以外にも、投与量や行動実験のタイミングなども様々な要因が考えられる。バクロフェンによる効果がマーモセットでも認められるか検討するため、プルキンエ細胞で発現するプロモーターを用いた実験系を構築し、現在も実験を継続中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Yasunori Matsuzaki, Ayumu, Konno, Ryo Mukai, Fumiaki Honda, Masafumi Hirato, Yuhei Yoshimoto, Hirokazu Hirai, Transduction Profile of the Marmoset Central Nervous System Using Adeno-Associated Virus Serotype 9 Vectors., *Molecular Neurobiology*, 査読有、2016 Feb 16 [Epub ahead of print], <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12035-016-9777-6>

Akira Iizuka, Yasunori Matsuzaki, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, Plasticity of the developmentally arrested staggerer cerebellum in response to exogenous RORα., *Brain Structure and Function*, 査読有、2015 Jun 30 [Epub ahead of print], <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00429-015-1077-9>

Shinya Kusakari, Fumihito Saitow, Yukio Ago, Koji Shibasaki, Miho Sato-Hashimoto, Yasunori Mastuzaki, Takenori Kotani, Yoji Murata, Hirokazu Hirai, Toshio Matsuda, Hidenori Suzuki, Takashi Matozaki, Hiroshi, Ohnishi, Shp2 in Forebrain Neurons Regulates Synaptic Plasticity, Locomotion, and Memory Formation in Mice, *Molecular and Cellular Biology*, 査読有、35 巻 9 号、2015、1557-72 DOI: 10.1128/MCB.01339-14.

Hanae Saida, Yasunori Matsuzaki, Kiyohiko Takayama, Akira Iizuka, Ayumu Konno, Shigeru Yanagi, Hirokazu Hirai, One-year follow-up of transgene expression by integrase-defective lentiviral vectors and their therapeutic potential in spinocerebellar ataxia model mice., *Gene Therapy*, 査読有、21 巻、2014、820-827 DOI: 10.1038/gt.2014.60

Fathul Huda, Ayumu Konno, Yasunori Matsuzaki, Hanna Goenawan, Koichi

Miyake, Takashi Shimada, Hirokazu Hirai, Distinct transduction profiles in the CNS via three injection routes of AAV9 and the application to generation of a neurodegenerative mouse model., 査読有、Article number: 14032, 2014 DOI: 10.1038/mtm.2014.32

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 泰教 (MATSUZAKI, Yasunori)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50738200

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：