

令和元年5月9日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14578

研究課題名（和文）遺伝子改変による神経変性疾患モデルザル開発

研究課題名（英文）Generation of neurodegenerative disease model macaques

研究代表者

等 誠司（Hitoshi, Seiji）

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：70300895

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：我々が確立したレンチウイルスを用いた遺伝子導入法を応用し、変異型APP遺伝子を発現するアルツハイマー病モデルザルを作製するとともに、MRIを用いた脳内アミロイド沈着の検出法や、脳高次機能を評価できるタッチパネル式行動解析装置を開発した。家族性ALSの原因遺伝子の1つであるFUS遺伝子についても、テトラサイクリン誘導下に変異型FUSを発現させるレンチウイルスを作製し、カニクイザルES細胞から分化させた神経細胞に感染させ、変異型FUSが本来の局在である核から細胞質に漏出して凝集体を形成することを観察した。このレンチウイルスをカニクイザル受精卵に導入し、胚盤胞期の胚でトランスジーンを発現を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患の動物モデルとして、様々な遺伝子改変マウスが開発されてきたが、脳のサイズや構造的類似性、高度な機能などの面から、霊長類疾患モデルの有用性は高い。本研究は、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症をターゲットに、患者で報告されている遺伝子変異をカニクイザルに導入し、神経細胞における早期の病変の検出を試みた。これらの神経変性疾患モデルザル作製により、疾患病態の理解が深められることに加え、新たな治療薬が考案された場合に、前臨床試験に用いることができ、新規治療薬開発や安全性の確保に大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have established the lentivirus-mediated gene transfer technology and generated Alzheimer's disease model macaques, which express mutated human APP gene. We have also developed several reagents, with which amyloid deposition in the macaque brain is visualized by MRI, and a touch panel-based behavior analysis device. In addition, we have constructed lentivirus expressing mutated FUS gene, one of causative genes of familial amyotrophic lateral sclerosis, under the control of inducible tetracycline system. After the infection of this lentivirus, neurons derived from crab-eating monkey ES cells expressed mutated FUS, which located in the cytoplasm but not in the nucleus and formed aggregates. Using this lentivirus, we observed mutated FUS was introduced to fertilized eggs of crab-eating monkeys.

研究分野：神経科学

キーワード：カニクイザル 神経変性疾患 アルツハイマー病 筋萎縮性側索硬化症

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経難病の多くを占める神経変性疾患は、近年多くの疾患で原因遺伝子の同定や病態の解明が行われているにも関わらず、依然有効な治療法の開発は充分には進んでいない。本研究が対象とするアルツハイマー病(AD)や筋萎縮性側索硬化症(ALS)においても、家族性 AD/ALS 研究で幾つかの原因遺伝子が見出され、それを基に AD/ALS モデルマウスが開発されているが、患者における病理や病態が観察されない場合が多く、新規治療法開発のためのモデル動物としては不十分である。げっ歯類と霊長類とでは、神経細胞・グリア細胞などに代謝速度や細胞周期などの面でさまざまな差異があることが原因として考えられている。そこで、ヒトの病態をげっ歯類モデルよりも正確に再現できる、非ヒト霊長類を用いた神経変性疾患モデルの開発が急務である。

そのような考えに基づき、世界中で遺伝子組換えサルや霊長類の作製が試みられている。最近の遺伝子編集技術の急速な発展により、これまでほぼマウスに限定されていた遺伝子改変動物の作出が、霊長類でも可能になってきたことによるが、論文としては研究開始時点で7報しか報告がない。その中で佐々木らは遺伝子組換えマーマセットの作出に初めて成功し(Sasaki *et al.*, *Nature*, 2009)、世界のトップレベルの技術を有することを証明した。滋賀医大は、国内有数の規模のカニクイザルコロニーを有する利点を活かし、佐々木らが用いたレンチウイルスによる遺伝子導入技術を用いて、カニクイザルでもこの技術が有効であることを確認した。旧世界ザルの1種であるカニクイザルは、新世界ザルのマーマセットよりもヒトに近いと考えられていることから、カニクイザルを用いたアルツハイマー病や ALS モデルの開発には大きな意義がある。我々は、レンチウイルスを用いた技術を応用することで、神経変性疾患モデルサルの開発が可能だと考え、本研究を提案した。

2. 研究の目的

本研究では、レンチウイルスによって家族性 AD/ALS の原因となる変異型 amyloid precursor protein (APP)および fused in sarcoma (FUS)遺伝子を過剰発現させることにより、AD/ALS モデルサルの作出を試みる。アルツハイマー病は、本邦において 450 万人以上いると考えられる認知症患者の約半数の原因であり、近年多くのことが解明されてきているとは言え、根本的な治療法や予防策はなく、依然として社会にとって大きな負担である。若年性 AD は家族性であることが多く、これらの家系の研究から家族性 AD の原因遺伝子として APP や presenilin (PS)1、PS2 が同定された。特に、APP には家族性 AD を引き起こすと考えられている多くの変異が報告されている。APP は、プロテアーゼである β セクレターゼと γ セクレターゼによって順次切断され、AD 患者脳で観察される老人斑の主成分である A β が産生されるが、家族性 AD の変異も A β ペプチドの周辺に集積している。中でも、Swedish 変異 (KM670/671NL) は β 切断を修飾することによって、A β 産生量を増加させる働きがある。

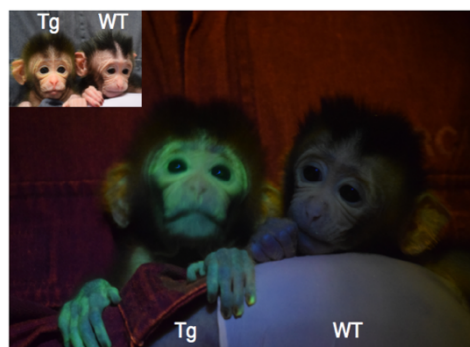
一方、運動ニューロンが選択的に変性し消失していく進行性の神経難病である ALS は、我が国では約 9000 人の患者が存在すると言われる。弧発性 ALS が大部分を占めるが、約 1 割は家族性と考えられている。家族性 ALS では、近年次々に発見された ALS 責任遺伝子 (SOD1, TDP-43, FUS, C9orf72 など) の変異が病態に密接に関係すると考えられており、これら責任遺伝子をターゲットにした ALS 発症原因究明や治療戦略確立が喫緊の課題になっている。FUS は RNA binding protein の機能を持つが、我が国では SOD1 に次いで頻度の高い家族性 ALS 責任遺伝子とされている。FUS 変異に起因する ALS は、他の責任遺伝子に比べて若齢発症のケースが多く進行が速いのが特徴であり、本研究で用いる P525L 変異は、特に若年発症・急速進行型として知られる。

AD および ALS は、どちらも早急な対応が期待される神経変性疾患であり、患者で見られる症状や病理などを忠実に反映した非ヒト霊長類モデルの開発が望まれている。これらモデルサルの産児が得られたならば、発症超早期や発症前の病態解析を行い、病態に基づいた診断法や新規治療法の開発を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

CAG プロモーター下で GFP を発現するレンチウイルスを作製し、カニクイザル受精卵に感染させることで、GFP トランスジェニックサルの作製には既に成功している(図 1)。ただし、GFP の発現量には個体差が見られることや、同一個体内でも組織によって GFP 発現に強弱があることから、CAG プロモーターがサイレンシングを受けていることが予想される。そこで、比較的サイレンシングを受けにくいとされるヒト EF1 α プロモーターや、他のサイレンシング回避に有効と言われている因子をもつレンチウイルスを作製し、順次 GFP トランスジェニックサルを作出して解析中である。平行して、

図 1 GFP 発現カニクイザル(左)
(Seita *et al.*, *Sci Rep*, 2016 より)



神経細胞特異的 Thy-1 プロモーターや、神経幹細胞/アストロサイト特異的 GFAP プロモーターなどの細胞種特異的プロモーターをもつウイルスも試していく。これらのプロモーターは、既に樹立したカニクイザル ES/iPS 細胞や、成体カニクイザルより分離培養した神経幹細胞を用いて、活性測定を行う。実際、例えば GFAP プロモーターは、神経幹細胞から分化させたアストロサイトでの活性を確認している。

CAG もしくはヒト EF1 α プロモーター下に、Swedish 変異 (KM670/671NL) をもつヒト APP (swAPP) 遺伝子を組み込んだレンチウイルスを作製し、上述のカニクイザル細胞を用いて感染性の確認や swAPP タンパク質発現の程度を測定する。swAPP 発現レンチウイルスの感染効率やタンパク質発現効率、細胞毒性などをチェックした上で、このウイルスをカニクイザル受精卵に感染させ、swAPP トランスジェニックサルの作製を試みる。

ALS モデルサルの作製には、P525L 変異 FUS (FUS^{P525L}) を用いる。ただし、変異型 FUS を胎児期から全ての神経細胞で過剰発現させた場合、中枢神経系に発生異常が生じて胎生致死になる可能性が高いため、何らかの誘導型発現システムが必要だと考えられる。そこで本研究では、テトラサイクリン誘導システムをレンチウイルスに組み込み、1つのベクターにおいてテトラサイクリン誘導下で FUS^{P525L} を発現させられるレンチウイルスを開発する。上記同様に、ウイルスの感染効率やタンパク質発現効率、細胞毒性などを評価した上で、ウイルスをカニクイザル受精卵に感染させ、テトラサイクリン誘導下 FUS^{P525L} トランスジェニックサルの作製を行う。

4. 研究成果

生命科学領域で汎用される4つのプロモーター (CMV, CAG, EF1 α , Ubiquitin C) を、カニクイザル ES 細胞やそこから分化させた神経細胞で評価したところ、幹細胞の段階では EF1 α のプロモーター活性が最も強かったものの、神経細胞においては CAG の方が優位であることが判明した。そこで、CAG プロモーターに swAPP 遺伝子をつないだレンチウイルスを作製し、カニクイザル受精卵に感染させて swAPP トランスジェニックサルを作製した。報告時までには4頭の個体を得ることに成功し、また妊娠途中で致死になった胎児個体においてトランスジーン発現を確認した。動物倫理上の制約から、少なくとも生後12ヶ月までは母子関係に影響を与えるような検査はできないが、明らかな発達や行動の異常は観察されていない。

カニクイザルの神経発生・発達過程における FUS 遺伝子および変異 FUS 遺伝子の過剰発現が及ぼす影響を検証するため、野生型および変異 FUS 遺伝子を、テトラサイクリン誘導系を用いて発現をコントロールできるカニクイザル ES 細胞 (Tet-ON:FUS および Tet-ON:FUS^{P525L} ES 細胞) を樹立した。その結果、① Tet-ON:FUS および Tet-ON:FUS^{P525L} 遺伝子導入サル ES 細胞はともに、テトラサイクリン誘導体ドキシサイクリン (Dox) 非存在下においては正常な神経細胞分化能を有することが分かった。さらに、② 遺伝子導入サル ES 細胞および神経細胞分化細胞において、Dox 存在下培養でのみ FUS および FUS^{P525L} タンパク質の発現誘導が確認された (図2右)。

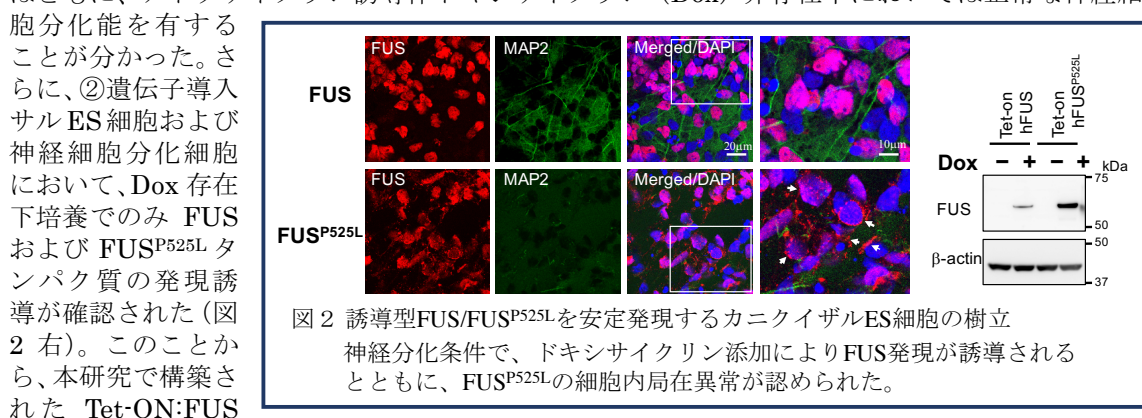


図2 誘導型FUS/FUS^{P525L}を安定発現するカニクイザルES細胞の樹立
神経分化条件で、ドキシサイクリン添加によりFUS発現が誘導されるとともに、FUS^{P525L}の細胞内局在異常が認められた。

および FUS^{P525L} システムによる FUS および FUS^{P525L} タンパク質の発現 ON/OFF は、望んだ発生段階での Dox 投与/非投与によって厳密にコントロールできる可能性が示唆された。加えて、本システムは神経細胞分化細胞においても FUS タンパク質が核局在を示し、一方 FUS^{P525L} タンパク質が細胞質局在を示しており、またその形状は凝集体様であることが確認できた (図2左)。

この結果を踏まえ、テトラサイクリンシステムとヒト FUS^{P525L} 遺伝子とを1つのベクター上にもつ高力価レンチウイルスを作製した。既に確立した技術を用いてレンチウイルスをカニクイザル受精卵に導入したところ、培養下で正常に胚盤胞まで発生することが判明した。レンチウイルスの感染は同時に発現する Kusabira Orange の蛍光でモニターすることができ、また胚盤胞期に Dox を添加することで変異型 FUS が誘導されることも確認できた。報告時までには、ウイルスが導入してきた胚盤胞を仮親子宮に移植し、出産を待っているところである。産児を得られたならば、生後12ヶ月から Dox 投与を開始し、経時的に ALS 症状に関連する表現型を観察する予定である。具体的には、四肢の運動機能 (ケージ上部への掴まりや移送箱への移動行動 3D ビデオ評価観察) の他、手指の運動機能 (実物のオブジェクトを動かす Brinkman board test および Wisconsin General Test Apparatus: WGTA) や認知機能 (タッチパネルによる作業記憶テスト)、神経伝導検査と針筋電図、筋萎縮および脳・脊髄の MRI 画像解析などを行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 7 件）

*は責任著者

1. Seita Y., Hitoshi S., *et al.* (他 11 名, 9 番目) Comprehensive evaluation of ubiquitous promoters suitable for the generation of transgenic cynomolgus monkeys. **Biol Reprod** in press
2. †Hayashi Y., †Jnnou H., *Sawamoto K., *Hitoshi S. Adult neurogenesis and its role in brain injury and psychiatric diseases. **J Neurochem** 147; 584–594, 2018 († equal contribution)
3. Kuroda A., Fuchigami T., Fuke S., Koyama N., Ikenaka K., *Hitoshi S. Minocycline directly enhances the self-renewal of adult neural precursor cells. **Neurochem Res** 43; 219–226, 2018
4. Naruse M., Ishizaki Y., Ikenaka K., Tanaka A., *Hitoshi S. Origin of oligodendrocytes in mammalian forebrains: a revised perspective. **J Physiol Sci** 67; 63-70, 2017
5. Seita Y., Hitoshi S., *et al.* (他 14 名, 10 番目) Generation of transgenic cynomolgus monkeys that express green fluorescent protein throughout the whole body. **Sci Rep** 6; 24868, 2016
6. *Yamaguchi M., Hitoshi S., *et al.* (他 5 名, 7 番目) Neural stem cells and neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain. **J Physiol Sci** 66; 197–206, 2016
7. †Naruse M., †Ishino Y., Kumar A., Ono K., Takebayashi H., Yamaguchi M., Ishizaki Y., Ikenaka K., *Hitoshi S. The dorsoventral boundary of the germinal zone is a specialized niche for the generation of cortical oligodendrocytes during a restricted temporal window. **Cerebral Cortex** 26; 2800–2810, 2016 († equal contribution)

〔学会発表〕（計 5 件）

研究代表者が筆頭著者の招待講演のみ

国際学会

1. Hitoshi S., Kuroda A., Ema M., Fuchigami T. Klf4 and 5 regulate the long-lasting neural stem cell population. The 6th International Conference on Biology and Pathobiology of KLF/Sp Transcription Factors (2018.10.28-31, Kyoto)
2. Hitoshi S. Revealing the potential of postnatal neural stem cells. 2017 ISN-ESN (2017.8.20-24, Paris)
3. Hitoshi S., Kuroda A., Ema M., Fuchigami T. The Role of KLF proteins in self-renewal and differentiation of neural stem cells. Science Research Conferences-Federation of American Society for Experimental Biology (SRC-FASEB) (2016.8.7-11, Snowmass)

国内学会

4. Hitoshi S., Kuroda A., Ema M., Fuchigami T. 成体脳神経幹細胞の Quiescence 獲得のメカニズム. 第 15 回成体脳神経新生懇談会 (2019.2.2, 大阪)
5. Hitoshi S. The role of adult neural stem cell-neurogenesis in the pathogenesis of psychiatric disorders. 第 57 回日本神経学会学術大会 (2016.5.18-21, 神戸)

〔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：

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
滋賀医科大学生理学講座統合臓器生理学部門
<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqphysi1/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※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。