

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02785

研究課題名(和文)アレキサンダー病新規モデルマウスを用いて明らかにするアストロサイトの役割

研究課題名(英文) Pathophysiological analyses of astrocytes using a novel murine model of Alexander disease

研究代表者

近藤 洋一 (Kondo, Yoichi)

大阪医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：40284062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：アストロサイトの骨格タンパクGFAPの遺伝子変異によって起こる致死的な白質ジストロフィー、アレキサンダー病(AxD)には現在、忠実な動物モデルが存在しない。ヒトアストロサイトを用いることが重要と考えた本研究では、AxD患者由来iPS細胞を利用してヒトグリア細胞キメラマウスを作製し、AxDモデルマウスとすることを旨とした。結果、大脳にヒトアストロサイトが分布するキメラマウスが作製できたものの、AxDの病理学的特徴であるアストロサイト内のローゼンタール線維(RF)を認めるには至らなかった。AxD病態機序解明の一助とするためには、このマウスでRF生成を誘導するためのさらなる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレキサンダー病は白質傷害を伴って主に小児を冒す神経難病である。現在、存在しない適切な動物モデルをマウスで作製することにより、病態の理解を進め、さらには治療法開発の端緒とする意味がある。またアストロサイトの疾患でありながら、オリゴデンドロサイト/髄鞘に傷害を及ぼすアレキサンダー病を足がかりとして、アストロサイト自身の機能および、アストロサイト-オリゴデンドロサイト相互連関を明らかにするという科学的意義も強調したい。

研究成果の概要(英文)：Alexander disease (AxD) is a fatal leukodystrophy caused by mutations in the gene for glial fibrillary acidic protein (GFAP), which is an intermediate filament of astrocytes. Currently, no faithful animal models are available for AxD. Therefore we considered it important to use human astrocytes in this study, and aimed to generate human glial chimeric mice using AxD patient-derived iPS cells to serve as a murine model of AxD model. We were able to create mice whose brain contained mature human astrocytes both in gray and white matter. However, such engrafted astrocytes did not demonstrate Rosenthal fibers, which is the pathological hallmark of AxD. Further studies will be needed to induce RF generation in these mice to help elucidate the pathophysiology of AxD.

研究分野：神経科学

キーワード：アレキサンダー病 アストロサイト 疾患特異的iPS細胞 グリア前駆細胞 ヒトグリア細胞キメラマウス

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児の神経難病であるアレキサンダー病 (AxD)には現在、治療法はなく、乳幼児期に発症すれば、患者はけいれん、大頭症、水頭症、精神運動発達遅滞などを伴って十数年以内に死亡する。病理学的にはアストロサイトの細胞内にローゼンタール線維とよばれる凝集物が蓄積することが古くから知られていた。2001年になってアストロサイトの骨格蛋白であるグリア線維性酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)の遺伝子変異が AxD の原因であることが報告され疾患の理解が進んだ。しかし、アストロサイトに病因があるのに、なぜ白質の髄鞘が傷害されるのか、言い換えれば、アストロサイトは、髄鞘を形成するグリアであるオリゴデンドロサイトとどのように関わり、ローゼンタール線維の凝集はなぜその連関を障害するのか等については不明のままである。本研究課題はこの疑問に答えるためのものである。

2. 研究の目的

AxD に不明な点が多い原因のひとつとして、AxD の病理学的変化や神経症状を適切に再現する AxD の動物モデルがないことがあげられる。本研究では AxD 患者由来の iPS 細胞から誘導したアストロサイトを脳内に持つヒトグリア細胞キメラマウスを作製し、これを AxD モデルマウスとして解析する。ローゼンタール線維が白質に病変をもたらす機序を明らかにすることで、AxD の病態生理が理解され、治療法開発のための基礎資料を得ることができる。そして、アストロサイトがオリゴデンドロサイトおよび他の中枢神経系細胞とどのようなコミュニケーションをとっているのかという神経科学的にも興味深い知見を AxD という疾患の窓を通して得ることが期待できた。そこで以下の3つの項目を達成することを目的とした。

(1) AxD 特異的 iPS 細胞から誘導したグリア前駆細胞を免疫不全マウスの脳に移植し、ヒトグリア細胞キメラマウスを作製する。これを AxD モデルマウスとして、アストロサイトや髄鞘に生じる病理学的変化を明らかにする。

(2) AxD モデルマウスから分離したヒトアストロサイトを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、AxD の白質傷害の直接原因となっている分子を突き止める。

(3) ローゼンタール線維の蓄積を減ずる可能性のある薬剤を AxD モデルマウスに投与して、AxD 治療候補薬剤の効果を in vivo で評価する。

3. 研究の方法

AxD 患者由来の iPS 細胞3株および健常者由来 iPS 細胞1株の提供を熊本大学発生医学研究所から受け、グリア前駆細胞を誘導した。モルフォゲンを使い分けて、前脳の背側・腹側、脊髄のグリア前駆細胞を培養した。このグリア前駆細胞を免疫不全マウス (NSG マウス、または Rag-2 knockout マウス) の新生仔脳内へ移植した。一部は髄鞘形成不全マウス (ミエリン塩基性タンパクを欠損; shiverer マウス) と免疫不全マウスを交配したもの (Rag2KO-shi) もホスト動物として用いた。

AxD モデルマウスの評価は免疫組織化学染色により行った。モデルマウスを細胞移植後8週から1年に至るまで様々なタイミングで灌流固定し、組織学的評価に供した。ヒトアストロサイトの同定にはヒト特異的抗 GFAP 抗体を用いた。AxD の病理学的特徴であるローゼンタールファイバーのマーカーとしては GFAP の他、 α -B クリスタリンおよびヒートショックタンパク-27 に対する抗体を用いた。Rag2KO-shi マウスではホストに髄鞘が存在しないため、ヒトグリア前駆細胞から分化したオリゴデンドロサイトが形成する髄鞘が観察できる。髄鞘は抗ミエリン塩基性タンパク抗体を用いて可視化し、AxD モデルにおける髄鞘傷害の有無を評価した。

4. 研究成果

(1) AxD 患者由来 iPS 細胞からのグリア前駆細胞およびアストロサイトの分化誘導

レチノイン酸添加の有無、またソニック・ヘッジホッグの濃度調節等により、脊髄、前脳背側、前脳腹側と異なる領域でグリア前駆細胞、続いてアストロサイトを誘導した。グリア前駆細胞は PDGF-receptor α をマーカーとした。アストロサイトは GFAP や S100b の免疫染色により分化を確認したほか、アクアポリン4の発現を以て成熟段階にあると判断した。しかし、最長では500日を超えて培養したものの明らかにローゼンタール線維と考えられる GFAP の凝集体は確認できなかった。正常対照細胞には AxD 患者由来 iPS 細胞の遺伝子変異配列を遺伝子編集技術を用いて修復し遺伝的バックグラウンドを同一にしたものも用いた。しかしやはり AxD アストロサイトの形態的異常は認めなかった。AxD の病理学的変化は遺伝子変異単独で起こるものではなく、培養環境に何らかの負荷をかける必要があるのかもしれない。

(2) 免疫不全マウスに移植されたヒトアストロサイトはその特徴的な大きな細胞体をたたえて大脳白質に生着したものの、異常な形態は示さず、AxD に特徴的にみられるローゼンタール線維も観察できなかった (図1)。またアストロサイト近傍のオリゴデンドロサイト/髄鞘を傷害することもなかった。

GFAPの遺伝子に変異があればローゼンタール線維は生じるというのではなく、ローゼンタール線維を生じせしめる付加的な因子が存在するものと考えられた。その因子を見つけることは、AxDの発症予防や治療法開発を目指すにあたり重要な課題である。そのために今後、次の3点に着目して研究を継続していく計画である。

AxD患者由来培養アストロサイトを用いたローゼンタール線維凝集を促進する因子の探索:AxD患者由来iPS細胞から誘導した培養アストロサイトに対し、低酸素、種々の液性因子等の負荷をかけて、アストロサイト内にローゼンタール線維が発生する条件をin vitroで探索する。

ローゼンタール線維凝集促進因子の負荷によるAxDモデルマウスの確立:上記で候補となった因子をAxD患者由来グリア細胞キメラマウスに負荷して、in vivoでローゼンタール線維が生じるか、また白質に傷害を生じるかを明らかにする。

脳部位特異的アストロサイトを用いたAxDキメラマウスの改良:本研究にて脊髄、前脳など部位特異的なアストロサイトを誘導できるようになった。これらを脳内移植することで、ローゼンタール線維凝集や白質病変を示すAxDキメラマウスの作製をめざす。最近になって、ラットにヒトと相同のGFAP遺伝子変異を導入することで、脳内ローゼンタール線維集積や白質傷害といった病理学的所見、および神経学的症状を備えた動物モデルが報告された(引用文献)。本課題の拠り所とする、ヒトのアストロサイトでなければAxDを再現できないという仮説が否定されるかとも考えられたが、一方でこのラットモデルでは異常に高いGFAPタンパクの発現、集積がみられており、必ずしもGFAPの遺伝子変異そのものに起因したモデルではない可能性がある。我々のヒトアストロサイトによるAxD再現ははまだ価値ある試みであると考えている。

<引用文献>

Hagemann TL, Powers B, Lin NH, et al. Antisense therapy in a rat model of Alexander disease reverses GFAP pathology, white matter deficits, and motor impairment. Science Translational Medicine. 2021;13(620):eabg4711.

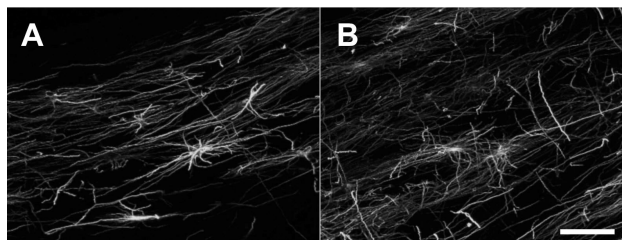


図1 AxDキメラマウス大脳白質のアストロサイト(ヒト特異的GFAP免疫染色)。細胞移植後1年を経ても、正常対照(A)と比較してAxD由来のアストロサイト(B)に形態異常やローゼンタール線維の凝集はみられなかった(未発表データ, bar = 50 μm)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 近藤洋一	4. 巻 78
2. 論文標題 アレキサンダー病の病態機序解明に向けて	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 大阪医科大学雑誌	6. 最初と最後の頁 104 ~ 107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoichi Kondo
2. 発表標題 Histopathological studies on myelin disorders using human glial chimeric mice
3. 学会等名 The 13th Japan-China Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中義久、近藤洋一
2. 発表標題 アレキサンダー病患者由来iPS細胞株への一塩基編集技術の導入
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 元野誠、加藤英政、近藤洋一
2. 発表標題 新型ヒトiPS細胞を用いた特定の脳領域の高効率な分化誘導法の開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤英政、元野誠、徳澤佳美、齋藤彩佳、和田俊輔、加藤知輝、濱田遼、益本凌汰、清澤秀孔、近藤洋一
2. 発表標題 新型ヒトiPS細胞(T-iPS細胞)を用いたヒト分化多能性の再検証
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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	元野 誠 (Motono Makoto) (30619622)	大阪医科薬科大学・医学部・助教 (34401)	
研究分担者	濱岡 仁美 (黒瀬仁美) (Hamaoka Hitomi) (80545608)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	井上 順治 (Inoue Junji) (20814859)	大阪医科薬科大学・医学部・助教 (34401)	

	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
研究協力者	小坂 仁 (Osaka Hitoshi)		

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
---------	---------