

令和 3 年 5 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06442

研究課題名(和文) ムコ多糖症ニホンザルモデルの作製、維持と治療に関する基礎研究

研究課題名(英文) Basic research on establishment, maintenance, and therapy of non-human primate model of mucopolysaccharidosis

研究代表者

大石 高生 (Oishi, Takao)

京都大学・霊長類研究所・准教授

研究者番号：40346036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：京都大学霊長類研究所で継代飼育しているニホンザル集団に、指定難病であるライソゾーム病の一種であるムコ多糖症I型(MPSI)を引き起こすアルファ-L-イデオニダーゼ遺伝子変異が蓄積していること、MPSIの症状を示すサルがいることを発見した。MPSIの霊長類モデルはこれまで存在していなかった。酵素補充療法や遺伝子治療などの開発を進めるためにはMPSI霊長類モデル生産コロニーの確立が必要である。MPSI発生集団の家系解析、変異解析を実施し、モデル生産コロニー確立のための個体選定の基礎データを得た。脳や心臓に有効なMPSI酵素補充療法の開発を目指し、糖鎖改変ヒト型酵素の投与の予備実験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

指定難病であるライソゾーム病の一種であるムコ多糖症I型の霊長類モデルを世界で初めて発見した。現在行われている治療法は非常に高額であるうえに、脳や心臓の症状に対しては治療効果が不十分である。これらの問題を改善するためには、新規治療法開発に用いることができる霊長類モデルが必要である。この霊長類モデルを効率的に生産するための基礎データの取得に成功した。また、新規治療法研究に着手した。

研究成果の概要(英文)：A missense mutation was found in alpha-L-iduronidase, which results in mucopolysaccharidosis type I (MPSI), among the Japanese monkeys kept in a colony of Primate Research Institute, Kyoto University. Four monkeys were homozygous and showed MPSI symptoms. Some others were heterozygous and showed no symptoms. It is necessary to establish an effective production system of MPSI monkeys to develop and improve enzyme replace therapy (ERT) or gene therapy. To establish the system, pedigree analyses and mutation analyses were executed for the colony. Moreover, to develop a new ERT which is effective to symptoms of MPSI on the brain or the heart, ERT for a homozygous monkey with several sugar chain-modified enzymes were prepared.

研究分野：霊長類学、神経科学

キーワード：ライソゾーム病 疾患モデル ニホンザル ムコ多糖症 ハーラー病 家系解析 霊長類 繁殖コロニー

1. 研究開始当初の背景

ムコ多糖症はライソゾームに関連する酵素が欠損することにより、ムコ多糖が組織に異常に蓄積して各種身体機能の障害を引き起こす疾患である。特定疾患に指定されており、現時点では非常に高額な酵素補充療法しか治療法がない。代表的なムコ多糖症には、I型(ハーラー症候群、シャイエ症候群を含む)、II型(ハンター症候群)、III型(サンフィリポ症候群)、IV型(モルキオ症候群)がある。いずれも特定の遺伝子の異常が原因である遺伝性疾患で、I型は-L-イズロニダーゼ、II型はイズロン酸-2-スルファターゼ、III型は4種の酵素、IV型は2種の酵素のいずれかに対する遺伝子が責任遺伝子であることが知られている。かつては有効な治療法がないとされていたが、近年は欠損した酵素を遺伝子工学的手法で生産し、点滴で血中に補う酵素補充療法が行われている。しかし、非常に高額の治療費がかかる上に、中枢神経障害、骨病変、弁膜症に関しては効果が得られにくいという問題がある。

創薬研究には自然発症食肉類モデルが用いられてきているが、ヒトと共通性の高い身体構造や代謝を持つ霊長類モデルは存在しない。そのため、重症患者で問題となる認知機能の低下などには十分にアプローチできていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ムコ多糖症霊長類モデルの確立と、それを用いたムコ多糖症の治療法開発のための基礎研究である。京都大学霊長類研究所で発見されたムコ多糖症の疑いがきわめて高い複数の個体と、未発症キャリア個体をシーズにして霊長類モデルを作製するシステムを確立する。さらに、遺伝子レベル、個体レベル、細胞レベルの研究を駆使して、ムコ多糖症による中枢神経症状の本態解明と、中枢神経系に効果があり経済的な画期的治療法(糖鎖改変型酵素の補充療法および遺伝子治療)の開発に関する基礎研究を実施する。

3. 研究の方法

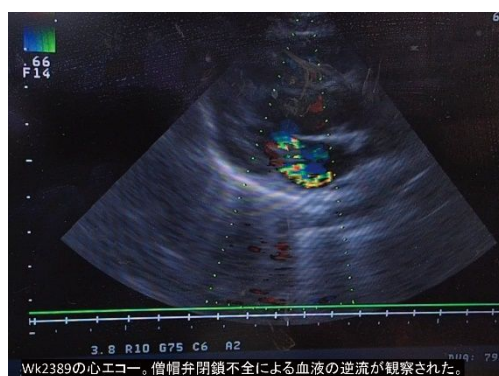
-1 ムコ多糖症疑い個体が、ムコ多糖症I型(MPSI)を発症していることを確認するために、アルファ-L-イズロニダーゼ(IDUA)の血中活性測定、培養細胞での活性測定、尿中ムコ多糖の定量を行った。また、肉眼観察、生体測定、単純エックス線撮像、エックス線CT、MRI、心エコー、腹部エコー、行動検査(恐怖反応、聴覚検査)を行った。

-2 MPSIニホンザル個体と父母のトリプレット解析から明らかになったIDUA遺伝子のミスセンス塩基変異が、その個体の属する繁殖コロニー若桜群にどのように分布しているか、それがどのような来歴で存在しているのかを明らかにするために、PCR法による確認を行った。また、部分的に進んでいたDNA検査によるニホンザルの父子判定を推進した。これに基づき、若桜群の家系図作成、血縁関係の決定を行った。

酵素補充療法の対象個体が少数であり、検討すべき糖鎖改変組換え酵素が複数あるため、新たな投与プロトコルを検討した。投与対象個体を隔離飼育し、投与前の発症状態を記録した。

4. 研究成果

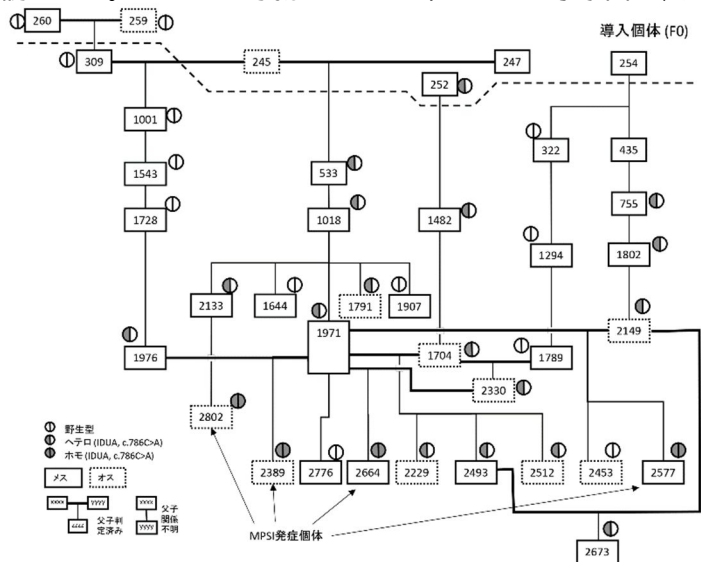
霊長類研究所に1974年に導入し、集団で継代飼育しているニホンザル若桜群に、指定難病であるライソゾーム病の一種であるムコ多糖症の患者に似た顔貌の個体を複数生むメス(この個体自体には類似の特徴なし)が発見された。ムコ多糖症疑い個体1頭(Wk2389)と、その父母のトリプレットに対するエクソーム解析から、MPSI(ハーラー症候群、シャイエ症候群を含む)の原因となるIDUA遺伝子にミスセンス塩基変異をヘテロに持つ親個体から、一塩基置換ホモ個体が生まれ、その個体がMPSIを発症していると考えられた。Wk2389では、血漿や皮膚片から培養した線維芽細胞に含まれるIDUA活性が正常個体に比較して低下しており、尿中に排泄されたムコ多糖は正常個体より多かった。このことから、Wk2389はMPSIを発症しており、一次病因はIDUA遺伝子の塩基変異であることが確定できた。Wk2389は、ガーゴイル様顔貌、骨変形、骨粗しょう症、関節拘縮などの進行性の症状を示し、歯肉肥厚、気道狭窄、僧帽弁閉鎖不全、心



正常なニホンザル(左)は棒を突き出されると恐れる。Wk2389(中)も恐れた(ただし、運動障害があるため、全身運動はなかった)が、Wk2577は恐怖心を示さず、棒を咬みはじめた。

肥大、肝腫脹、全身発育不良などのため、9歳時点で人道的観点から安楽殺した。Wk2389には難聴、恐怖反応の欠如はなく、剖検時に軽度の脳萎縮が見られた。Wk2389の同母異兄妹Wk2577は1歳で死亡したが、強度の脳萎縮と恐怖反応の欠如を示していた。Wk2389の同母異兄妹Wk2664は中程度の脳萎縮はあったが、難聴も恐怖反応の欠如もなかった。この3兄妹は母親は同じで、父親はすべて違う。IDUAの共通の一塩基置換をホモに持つ点は共通しているが、中枢症状が異なっており、その原因究明は今後の課題である。

霊長類研究所には若桜群以外にも集団飼育ニホンザルが複数群ある。いずれも、導入元で群れを成していた個体群の末裔で、他の出自の個体を導入することなく継代飼育してきた。ニホンザル若桜群では、導入当初に繁殖に関わったメスは9頭、オスは最大5頭であった。現在、母系で最大第8世代まで進み、成熟メス約20頭、成熟オス約10頭、子ザル約20頭からなる。MPSI個体は母系第4世代ではじめて出現した。若桜群以外にはMPSI様のサルはおらず、IDUAの同一一塩基変異も確認されていない。MPSIモデルザル作成のため、若桜群でこの変異がどこで生じ、どのように推移し、現在どのように分布しているかを、個体簿調査と父子判定による家系図作成とPCRによる変異検出を併用して調査した。Wk2389の母親Wk1971を中心とした家系図に、遺伝子型(野生型、ヘテロ、ホモ)を書き込んだ導入個体以来の家系図を示す。ニホンザルは集団内で乱婚を行うため、父子判定はDNA検査が必要であり、不足分を補ったが、DNA試料の欠損のため、完全ではない。導入繁殖個体のうちメス1頭はヘテロ個体、メス3頭とオス1頭は野生型個体であることが確認できた。他の個体に関しては少なくとも1頭(Wk245またはWk247)がヘテロ個体であることが推定できるが、それ以外は未確認である。導入した個体のうち複数



が IDUA の共通の一塩基置換を持っていたことから、突然変異は出自地域で導入よりもかなり以前に生じていたと結論できる。導入メス9頭のうち、子孫が残っているのは5母系である。父系は多様性に乏しく、現存個体には特定の雄の子孫が多かった。原因は、ファウンダー雄が2ないし5頭と少ないうえに、群れに残す雄の数が雌に比べて少ないことなどがあげられる。さらに2000年ころから、IDUA遺伝子野生型雄個体よりも明らかに多く子を残したヘテロ雄個体が複数おり、これがMPSIを発症するホモ個体の出現につながったと考えられる。今後のMPSI疾患モデル作成のための繁殖小コロニー作成のための個体選定は、今回の解析に基づいた母系・父系と年齢、個体間の相性を元を実施する。

酵素補充療法はMPSIに対する有効な治療法であるが、現在使われている酵素は非常に高額であり、脳や心臓にはほとんど効果がない。この問題を解決するため、研究協力者である徳島大学の伊藤孝司教授は、ヒトIDUAを組換えカイコで生産し、糖鎖を改変したものを開発している。生存しているMPSI発症個体は2頭しかいないため、糖鎖の異なる複数の組換えカイコ由来ヒトIDUAを、休薬期間を置きながら順次投与して、それぞれの治療効果と安全性を検討する研究計画を立てた。投与対象個体に関しては、事前の皮膚厚、関節可動域などの各種身体計測、心エコー、恐怖情動反応の有無の確認や血液や尿の酵素活性測定、ムコ多糖含量測定などを行った。投与する酵素の調製が遅れたため、投与開始は2021年4月になった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugiyama Y, Oishi T, Yamashita A, Murata Y, Yamamoto T, Takashima I, Isa T, Higo N	4. 巻 1714
2. 論文標題 Neuronal and microglial localization of secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) in intact and damaged motor cortex of macaques.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 52-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2019.02.021	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 -
1. 著者名 大石高生	4. 巻 71
2. 論文標題 脳におけるヒトと他の霊長類の違い	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE	6. 最初と最後の頁 807-813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1416201354	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 -
1. 著者名 Xu C, Li Q, Efimova O, He L, Tatsumoto S, Stepanova V, Oishi T, Uono T, Yamaguchi K, Shigenobu S, Kakita A, Nawa H, Khaitovich P, Go Y	4. 巻 28
2. 論文標題 Human-specific features of spatial gene expression and regulation in eight brain regions.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Research	6. 最初と最後の頁 1097-1110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gr.231357.117.	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 該当する
1. 著者名 Higo N, Sato A, Yamamoto T, Oishi T, Nishimura Y, Murata Y, Onoe H, Isa T, Kojima T	4. 巻 526
2. 論文標題 Comprehensive analysis of area specific and time dependent changes in gene expression in the motor cortex of macaque monkeys during recovery from spinal cord injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 1110-1130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24396	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 Takao Oishi
2. 発表標題 Two genetic diseases found in the Primate Research Institute
3. 学会等名 NPRCT-CU SYMPOSIUM “Non-human Primates in Biomedical Research: Industry-Academia Partnerships in Solving Global Health Problems”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Oishi T, Ueno-Nigh R L, Takada M
2. 発表標題 Automatic time-recording test apparatus for marmoset using Raspberry pi.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ueno-Nigh R L, Oishi T, Takada M
2. 発表標題 Developing an automated system for behavioral analyses of a parkinsonian model marmoset.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石高生, 香田啓貴, 森本真弓, 井戸みゆき, 安江美雪, 田中洋之
2. 発表標題 霊長 類研究所のニホンザル繁殖集団若桜群における産子数の解析.
3. 学会等名 第36回日本霊長類学会大会
4. 発表年 2020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
研究協力者	伊藤 孝司 (Itoh Kohji)		
研究協力者	郷 康弘 (Go Yasuhiro)		
研究協力者	今村 公紀 (Imamura Masanori)		

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