

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07329

研究課題名(和文) 新仮説に基づく前頭側頭葉変性症の発症メカニズム解明と治療薬開発戦略

研究課題名(英文) Investigation of pathogenic mechanism of frontotemporal lobe degeneration based on novel hypothesis

研究代表者

草苺 伸也 (Kusakari, Shinya)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：10510901

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)：神経変性疾患は神経細胞が変性または死滅することによって認知機能や運動機能などに障害が生じる。これまでに多くの神経変性疾患原因遺伝子が同定されているが根本的治療法および治療薬の確立には至っておらず、早期解決が求められている。これまでに同定された神経変性疾患原因因子の多くは、組織普遍的に発現しているものも多く、また脳内においても広く分布する。変性を受ける脳領域は限定的である。したがって、変性領域を決定する制御機構の存在がし、発症および病態に大きく影響している可能性が考えられる。本研究では、新たに作成した神経変性疾患モデルマウスを用いて神経変性領域の制御に関わるメカニズムの解明に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新たな神経変性疾患モデルマウスを作製し、このマウスが神経変性領域の制御メカニズムの解明に向けた研究ツールとして有効であること明らかにした。このモデルマウスを用いた解析は、神経変性疾患の発症メカニズムの解明のみならず、根本的治療法および治療薬の確立への基盤になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration, are caused by neuronal cell death, resulting in impairment of cognitive or motor functions. Although many neurodegenerative disease-causative genes have been identified, therapeutic agents have yet to be established.

Many of the proteins encoded by neurodegenerative disease-causative factors are ubiquitously expressed and widely distributed in the brain. But brain regions undergoing degeneration are limited by each neurodegenerative disease. Therefore, it is possible that there is a regulatory mechanism that determines the degenerative regions.

In this study, we generated novel mouse models of neurodegenerative diseases and investigated the mechanisms involved in the regulation of neurodegenerative regions.

研究分野：薬理学

キーワード：神経変性疾患 神経細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) やパーキンソン病 (Parkinson's disease : PD)、筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis : ALS) などの神経変性疾患は難治性疾患であり、名前が示す通り一部の神経細胞が変性または死滅することによって認知機能や運動機能などに障害が生じる。現在のところ、これら疾患の根本的治療法や治療薬はほとんど存在しておらず、最大の発症要因が加齢であることから高齢化が進む現代社会において患者の増加が深刻な問題となっている。このため、発症メカニズムの解明とこれに基づく治療法および治療薬の開発は喫緊の課題となっている。神経変性疾患の患者の一部は遺伝性であり、患者家系の解析からこれまでに多くの神経変性疾患原因遺伝子が同定されている。原因遺伝子にコードされたタンパク質は、遺伝子変異に伴って細胞内に異常タンパク質として蓄積するものが多く、これにより神経機能障害および神経毒性を引き起こすことが明らかとなっており、その成果は神経変性疾患研究を飛躍的に進展させた。

一方、これまでに同定された神経変性疾患原因遺伝子の中には、C9ORF72 や TDP-43 など ALS および前頭側頭葉変性症 (Frontotemporal lobar degeneration : FTL) の両方の原因となる因子が存在する。特に、ALS と FTL では多くの原因因子が一致し、両疾患を発症する患者が存在するなど、発症メカニズムに共通性を有する可能性が示唆されている。さらに、ALS または FTL 原因遺伝子の中には AD や PD のリスクファクターとなる遺伝子も存在しており、神経変性疾患全体においてなんらかの共通性が存在するものと思われる。

神経変性疾患原因遺伝子にコードされているタンパク質の多くは、組織普遍的に発現しているものも多く、また脳内においても広く分布する。しかしながら、ALS は運動神経細胞のみが変性し、PD は黒質ドパミン神経細胞、FTL は前頭側頭葉と変性を受ける脳領域は限定的である。このように、原因因子が重複し、これら原因因子の発現が広域であるにも関わらず、患者ごとに変性領域が異なるのは、変性領域を決定する制御機構の存在がし、発症および病態に大きく影響している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

神経変性疾患原因因子は脳内で広く発現するにもかかわらず、疾患特異的な領域のみが変性することから、発症の起因となる神経細胞死には、各疾患に応じた神経細胞にのみ備わる、もしくは備わっていない細胞機能の関与が考えられる。そこで、神経変性を受ける神経細胞と受けない細胞とを比較することで、変性領域制御に関わる機能が同定できるものと考えた。本研究では、変性領域制御に関わる神経機能を同定し細胞死との関連を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### ①神経変性疾患モデル動物の作製

神経変性疾患原因因子の遺伝子改変マウスが疾患モデルマウスとして、これまでに多くの動物が作製されている。しかし、これらのモデルマウスでは神経細胞以外への影響のための寿命が極端に短縮した系統や、神経変性疾患特有の領域だけではなく脳全体に障害を有する系統が多い。このため、本研究では独自に FTL 原因因子の発症に関わる変異体を発現する遺伝子改変マウスを作製した。

### ②作製した動物の FTL モデルとしての有効性の確認

作製した遺伝子マウスについて、8 から 12 カ月齢のマウスを用いて FTL モデルマウスとしての有効性の検証と経時的な神経機能の変化を観察した。特に FTL の表現型を確認するため、オープンフィールドテスト、ノーベルオブジェクトテストおよびローターロードテストを行った。また、組織化学的解析により神経変性の有無等を検討した。

### ③神経変性領域および発症時期の検討

作製した FTL モデルマウスについて、神経機能障害が認められる 12 カ月齢の高齢マウスを用いて神経変性領域と障害を受ける神経細胞サブセットの同定のため、神経細胞サブセットの各マーカーで染色を行い、検討した。また、グリオーシスをはじめとする神経変性様の所見確認を行った。さらに生後 1 カ月齢および 8 カ月齢マウスを用いて、同様の解析を行い、FTL 発症時期の検討をおこなった。

### ④神経変性領域を制御するメカニズムの解明

変性の有無や神経変性が確認された神経細胞の経時的変化を観察するため、転写因子やシナプスマーカーなどの組織染色を行い、神経機能を評価した。

## 4. 研究成果

#### ①神経変性疾患モデル動物の作製

FTLD 原因因子の発症に関わる変異体を発現する遺伝子改変マウスを作製した。FTLD 原因因子と同様に組織普遍的かつ脳全体に発現するようなプロモーターを選択し、発現量の異なる数ラインの遺伝子改変マウスを確保し、これらの中から繁殖可能で、少なくとも 12 カ月齢までは生存可能なラインを選別し、以降の解析に用いた。

#### ②作製した動物の FTLD モデルとしての有効性の確認

まず、作製した遺伝子改変マウスの経時的变化を観察したところ、加齢に伴って下肢の痙縮 (Clasping) と振戦、そして一部のマウスでは下肢のマヒが認められた。また、このマウスでは野生型マウスに比べ寿命が短くなる傾向がみられた。この寿命短縮は、運動機能の低下が原因である可能性が考えられた。一方、体重には明らかな差異は認められなかった。これらの違いはオス、メスともに認められ、雌雄差はないものと考えられた。

次に行動解析により神経機能の検討を行った。まず、オープンフィールドでは、活動量および探索行動のひとつである Rearing 回数の増加が認められ、多動傾向であることが明らかとなった。一方、オープンフィールドテストにおいて明らかな不安様行動は認められなかった。下肢マヒが生じていないマウスのみを用いてローターロッドテストを行ったところ、ローターロッドから落下するまでの時間が遺伝子改変マウスでは優位に低下しており、小脳依存の運動協調性の異常が認められた。さらに、マウスの握力を測定したところ、遺伝子改変マウスでの低下が認められた。ノーベルオブジェクトテストにより、認知機能について解析したところ、野生型マウスが高い興味を示す新規オブジェクトに対して、遺伝子改変マウスでは探索行動が低下していたことから、認知機能に異常がある可能性が考えられた。

12 カ月齢のマウスを用いて、組織化学的解析を行った。その結果、まず小脳プルキンエ細胞の欠失が認められた。この欠失はローターロッドテストでの成績低下と一致しており、小脳変性を示唆する結果であった。さらに、大脳皮質の萎縮および海馬の一部の神経細胞の欠失が認められた。さらに、脳全域においてアストロサイトマーカーである GFAP 陽性細胞の増加とミクログリアマーカーである Iba1 陽性細胞の増加が認められた。

以上の結果から、作製した遺伝子改変マウスは FTLD 様の表現型を示すものと考えられた。

#### ③神経変性領域および発症時期の検討

まず、発症時期を特定するため、1 カ月齢マウスを用いて組織化学的解析を行った。その結果、12 カ月齢で認められた神経細胞の欠落は認められなかった。したがって、このマウスにおける神経細胞の欠落は神経細胞への分化異常によるものではなく、加齢に伴った神経細胞死が関連しているものと考えられた。また、グリオシスも同様に1カ月齢では認められなかった。さらに、8カ月齢マウスでは12カ月齢マウスと同様にグリア細胞の異常増殖が観察されることから、少なくとも1カ月から8カ月齢の間で神経変性が生じるものと考えられる。

神経変性領域について解析を行ったところ、まず Iba1 陽性のミクログリアの分布は偏りなく脳全体で増殖しているように観察された。一方、GFAP 陽性アストロサイトでは皮質の一部の層や小脳の特定領域で強い増殖が認められた。神経細胞の欠落は、領域によって偏りがあり、プルキンエ細胞のように神経細胞種によって影響を受けやすいサブセットと耐性を示すサブセットが存在することが明らかとなった。

#### ④神経変性領域を制御するメカニズムの解明

今回行った組織化学的解析では、ミクログリアの増殖は認められるものの、その局在は均一であり、一方のアストロサイトは神経細胞の欠落が強い領域に近い部分で増殖している傾向が認められた。これまで、ミクログリア細胞からの炎症性サイトカイン等の放出により細胞死が誘導されることが報告されているが、少なくともこのマウスでは神経脱落にミクログリアの異常活性が直接かかわる可能性は少ないものと考えられる。アストロサイトもまた、神経細胞死誘導に関わることが報告されているが、このマウスでみられるアストロサイトの増殖が、神経細胞死に直接関与しているのか、それとも神経細胞死にともなって二次的に起こった現象なのか、今回の解析からは不明である。今後はこれを明らかにするため、アストロサイト特異的な遺伝子改変マウスを作製し、同様の表現型か認められるか、またアストロサイトを単離して細胞死誘導に関わる分子の発現などを解析する予定である。

このような解析を通して、発症に関わる分子メカニズムの同定と、治療法および治療薬の確立を目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hashimoto Yuichi, Kusakari Shinya, Nawa Mikiro, Okamoto Koichi, Toyama Yuka, Matsuoka Masaaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Restoration of the reduced CLSP activity alleviates memory impairment in Alzheimer disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41398-020-01168-8	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 -
1. 著者名 Hara I, Suzuki H, Kusakari S, Matsuoka M	4. 巻 155
2. 論文標題 Practical training of pharmacokinetics with an web-based simulation application	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nihon Yakurigaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 51, 55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.19057	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 Kusakari Shinya, Nawa Mikiro, Hashimoto Yuichi, Matsuoka Masaaki	4. 巻 13
2. 論文標題 CLSPCOL rescues Alzheimer's disease mouse models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Neuroscience	6. 最初と最後の頁 11~19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1515/tnsci-2022-0209	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 -
1. 著者名 Jingu Daiki, Iino Mika, Kawasaki Joji, Urano Eriko, Kusakari Shinya, Hayashi Yuriko, Matozaki Takashi, Ohnishi Hiroshi	4. 巻 569
2. 論文標題 Protein tyrosine phosphatase Shp2 positively regulates cold stress-induced tyrosine phosphorylation of SIRP in neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 72~78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.06.084	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 草苺伸也、小林悠理、鈴木宏昌、松岡正明
2. 発表標題 Analysis of molecular mechanism underlying cell death induced by an ALS/FTD-causative gene CHCHD10
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科大学薬理学分野ホームページ <a href="http://www.tokyo-med.ac.jp/pharmacol/top.html">http://www.tokyo-med.ac.jp/pharmacol/top.html</a>
--

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

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