

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07976

研究課題名(和文) 髄鞘形成期の変異 シヌクレイン発現による世界初の一次進行型多発性硬化症モデル開発

研究課題名(英文) Establishment of primary-progressive multiple sclerosis (PPMS)/multiple system atrophy (MSA) mice model

研究代表者

山口 浩雄 (Yamaguchi, Hiroo)

九州大学・医学研究院・学術研究員

研究者番号：00701830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：多系統萎縮症(MSA)と多発性硬化症(MS)では、神経炎症、オリゴデンドログリアの喪失、脱髄、ミクログリアの活性化が見られ、共通の病理が示唆される。Tet-offシステムを用い、8週齢および3週齢よりオリゴデンドログリアで変異型ヒト α -SYNを発現させることにより、独自の新規 MSA-CおよびPPMSのマウスモデルの開発に成功した。MSAマウス脳のアレイ解析では、向炎症性グリアのマーカー遺伝子の増加を認めた。scRNA-seq解析で、炎症性サイトカイン増加を伴う新規のミクログリア亜集団を見出した。この新しいMSA-C/PPMSマウスモデルは、治療法開発のための強力なツールとなると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PPMSおよびMSAは根治療法のない神経疾患で、これまで適切な動物モデルはなかったが、私たちは、これまでに報告の無いTet-offシステムを用いた、独自の新規 PPMS/MSAモデルマウスを開発に成功した。これまでのMSAモデルマウスと比較し、より運動症状(小脳失調)が強く、病理学的にも脳幹小脳、脊髄を中心に強い炎症性病変がみられる。このMSAマウスを用い、私たちは世界で初めて脳内ミクログリアのscRNA-seq解析を行い、MSAに特異的なミクログリア亜群を同定した。このマウスはPPMS/MSA治療法開発のための有用なツールとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neuroinflammation, loss of oligodendrocytes, demyelination, and activation of microglia have been reported in both multiple system atrophy (MSA) and multiple sclerosis (MS) suggesting a common pathological mechanism. Using Tet-off system, we succeeded in developing unique new MSA, cerebellar type (MSA-C) and primary-progressive multiple sclerosis (PPMS) mice models by expressing mutant human α -synuclein in oligodendrocytes starting from 8 and 3 weeks of age, respectively. Microarray analysis of MSA mouse brain showed an increase in the marker gene for pro-inflammatory microglia and astroglia. scRNA-seq analysis revealed a novel microglial subpopulation with increased inflammatory cytokines. This new MSA-C / PPMS mice model will be a powerful tool for therapeutic development.

研究分野：神経内科学

キーワード：多系統萎縮症 多発性硬化症 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) は、遺伝的要因と環境要因の相互作用で発症する中枢神経脱髄疾患である。発病時より慢性進行性の経過をとる一次性進行型 MS (primary progressive MS, PPMS) はオリゴデンドロサイトの脱落を主とする primary oligodendrocyte dystrophy を呈するが、その機序は未解明であり、PPMS の動物モデルがないことが病態解明の大きな障壁となっている。MS 病巣には α -シヌクレイン (α -Syn) がオリゴデンドログリア、ミクログリア、ニューロンに蓄積し髄液で上昇していること、また α -Syn は Th2 細胞や B 細胞の分化と IgG 産生を誘導することに注目して、凝集性が強く細胞障害性が高いヒト A53T 変異 α -Syn を Tet-off システムを用いて生後 3 週齢の髄鞘形成期からオリゴデンドログリア特異的に発現できるマウスを樹立した。本マウスは、単麻痺/片麻痺/対麻痺/小脳失調等の多彩な症候と脳幹から胸髄にかけての顕著な脱髄、並びに活性化ミクログリアや T 細胞の浸潤を伴う PPMS 様病態を呈した (PPMS マウスモデル)。多系統萎縮症 (multiple system atrophy, MSA) の病理学的特徴は、オリゴデンドロサイトに α -Syn 陽性 GCI が存在することで、さらに脱髄所見も頻繁に見られる。MSA と MS は、神経炎症、オリゴデンドロサイトの喪失、脱髄、ミクログリアの

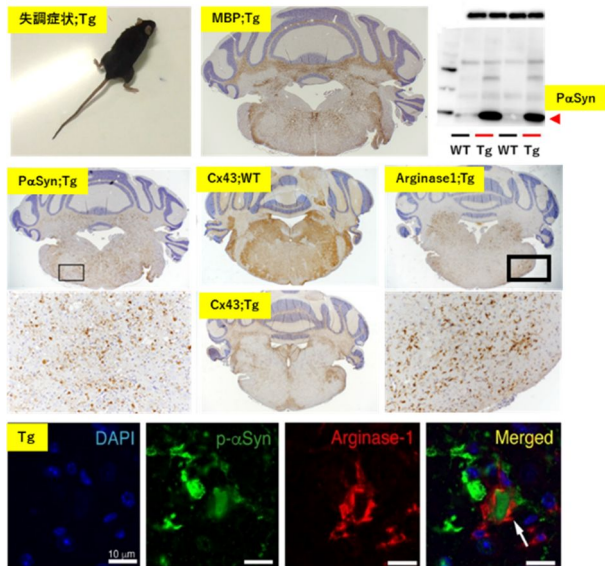


図 1 左上; 失調症状を示すマウス 右上; 不溶画分のリン酸化 α Syn 免疫染色: MBP; 広範な脱髄 p α Syn; リン酸化 α Syn の蓄積 Cx43; Cx43 の脱落 Arginase1; Arginase1 陽性ミクログリアを示す 下段; Arginase1 陽性ミクログリアはリン酸化 α Syn と近接している WT; 野生型 Tg; MSA マウス

活性化が両者で見られ、MSA と MS の病理には共通のメカニズムが示唆される。私たちは、同様に Tet-off システムを用い、マウスの 8 週齢以降に、オリゴデンドログリア特異的にヒト A53T 変異 α -Syn を発現させるマウスの樹立に成功した。このマウスは小脳失調を呈し、病理学的にも脳幹小脳、脊髄を中心に強い炎症性病変がみられ、MSA-C (小脳型) の特徴を有していた (MSA マウスモデル) (図 1)。PPMS マウスモデルでは、髄鞘形成期のオリゴデンドログリアの変異 α -Syn の発現とミスfold 蛋白化が、脳内炎症や自然・獲得免疫を誘導し PPMS を惹起するとの仮説をたて実験を行った。

2. 研究の目的

- (1) PPMS および MSA-C の病態解明、とくにグリア炎症について明らかにする。
- (2) PPMS および MSA-C の治療法開発として、ミクログリアを標的とした Colony Stimulating Factor 1 Receptor (CSF1R) の

投与を行う、また、 α -Syn の脳内負荷を減少させることが治療につながるかを明らかにする。

3. 研究の方法

MSA マウスモデルを用いて実験を行う。

- (1) MSA マウスの脳幹小脳、脊髄のマイクロアレイ解析および、脳幹小脳、脊髄よりミクログリアを回収し、scRNA-seq による詳細なミクログリアの遺伝子発現解析を行う。
- (2) MSA マウスに CSF1R 阻害剤である BLZ945 を投与し、ミクログリアを減少させる。
経過中、飼料にドキシサイクリンを加えることにより、MSA マウスの α -Syn の発現を抑制する。

4. 研究成果

(1) 私たちが樹立した MSA マウスの脳幹小脳、脊髄のマイクロアレイ解析では、対照マウスと比較し、炎症に関連する様々な遺伝子、Arginase1 遺伝子、および TLR2 遺伝子、TLR パスウェイを含む炎症に関連するパスウェイの遺伝子の発現が有意に増加していた (図 2)。これまでに報告された MSA 患者の小脳白質で高発現している遺伝子群を gene set として、私たちの MSA マウスのアレイ変動遺伝子で Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行った。その結果、MSA 患者の小脳白質で高発現している遺伝子群は、有意に MSA マウスでも増加がみられ、MSA 患者の脳で高発現している遺伝子は、私たちの MSA マウスでも発現が増加していることが示された。

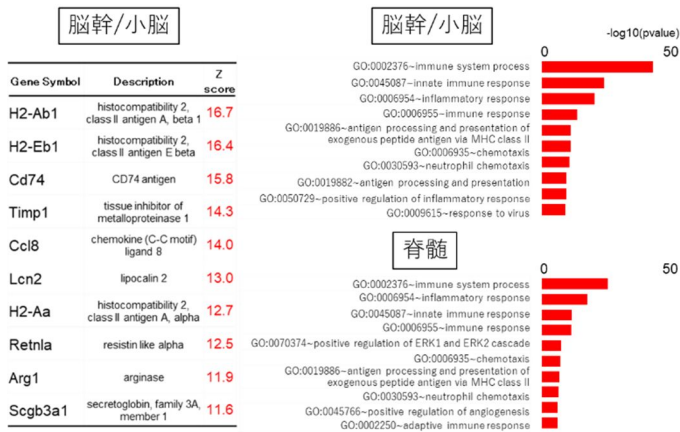


図2 マイクロアレイ解析
 左 MSAマウスの脳幹/小脳で発現が増加している遺伝子Top10
 右 MSAマウスの発現変動遺伝子で enrich している GO term

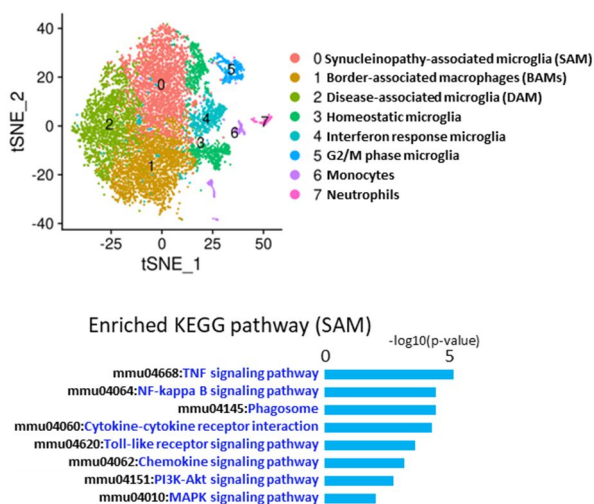


図3 scRNA-seqによるミクログリアの遺伝子発現解析(MSAマウスの脳幹小脳、脊髄)

タロッドスコアは対照マウスと同じレベルに改善した。27週齢からの Syn の発現抑制では、ロタロッドスコアは部分的に改善した。23週齢からの Syn の発現抑制では、Arginase 1 陽性ミクログリアの増加、リン酸化 -Syn の蓄積、および脱髄は、対照マウスと同じレベルに回復した。27週齢からの Syn の発現抑制では、これらの組織学的変化は部分的な改善のみを示した。

私たちは、脳幹/小脳および脊髄に顕著なグリア炎症および脱髄を伴い、単麻痺/片麻痺/対麻痺/小脳失調を呈する PPMS/MSA-C マウスモデルを樹立した。MSA-C マウスモデルの scRNA-seq 解析で、MSA に特異的なミクログリアのサブポピュレーションを初めて同定した。治療的試みとして、発症前の CSF1R 阻害剤投与ではむしろ運動機能の増悪、リン酸化 Syn の蓄積や脱髄を悪化させる傾向がみられた。このことは、ごく初期に保護的ミクログリアが優位で、その後は神経障害性のものが優位になるため、初期の CSF1R 阻害剤投与で保護的ミクログリアを相対的に強く抑制した可能性が考えられた。私たちが同定した MSA に特異的なミクログリアのサブポピュレーションを標的とした治療法の確立が重要と考えられた。Syn の早期除去は PPMS/MSA-C の新しい治療法である可能性があり、私たちのモデルはこれらの疾患における薬物スクリーニングまたはメカニズム分析のための有用なツールと考えられる。

私たちは、MSA マウスモデルとしては世界で初めて 脳幹小脳、脊髄よりミクログリアを回収し、scRNA-seq による詳細なミクログリアの遺伝子発現解析を行い、複数の活性化したミクログリアクラスターの同定に成功した(図3)。このうち、クラスター0は、Arginase 1 遺伝子、TLR2 遺伝子高発現で、多くの炎症性サイトカイン遺伝子の発現増加を認め、同時に NfKb、TLR pathway 等、の遺伝子発現も上昇しており、Syn の蓄積に反応したミクログリアであると考えられ、MSA に特異的なミクログリアのサブポピュレーションと考えられた (Synucleinopathy-associated microglia (SAM) と命名)。

(2) CSF1R 阻害剤である BLZ945 を、発症の前後に投与した。Tg マウスで観察された Iba1 陽性ミクログリアおよび Arginase 1 陽性ミクログリアの増加は、CSF1R 阻害剤の発症前の予防的および、発症後の治療的投与によって減少した。運動機能を見るロタロッドスコアは、発症前の投与では、増悪が見られた。一方、発症後の投与はロタロッドスコアに影響を与えなかった。病理所見では、発症前の投与は、リン酸化 -Syn の蓄積、および脱髄を悪化させる傾向がみられた。発症後の投与はこれら病理学的変化に影響を与えなかった。

飼料にドキシサイクリンを加えることにより、23週齢または27週齢から Syn の発現を抑制した。23週齢からの Syn の発現抑制では、ロ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松瀬大、山口浩雄、眞崎勝久、西村由宇慈、田中辰典、雑賀徹、田中謙二、山崎亮、吉良潤一
2. 発表標題 オリゴデンドロサイト特異的 シヌクレイン蓄積による小脳型多系統萎縮症モデルの樹立
3. 学会等名 第14回パーキンソン病運動障害疾患 कांग्रेस
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村 由宇慈, 眞崎 勝久, 松瀬 大, 山口 浩雄, 雑賀 徹, 田中 辰典, 貞島 祥子, 山崎 亮, 田中 謙二, 岩城 徹, 吉良 潤一
2. 発表標題 Eliminaion of CSF1R-positive microglia exacerbates a novel mouse model of multiple system atrophy
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞崎 勝久, 西村 由宇慈, 松瀬 大, 山口 浩雄, 雑賀 徹, 田中 辰典, 貞島 祥子, 山崎 亮, 田中 謙二, 岩城 徹, 吉良 潤一
2. 発表標題 Early dysregulation of connexins in astroglia and oligodendroglia in multiple system atrophy
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松瀬大、山口浩雄、眞崎勝久、西村由宇慈、田中辰典、雑賀徹、田中謙二、山崎亮、吉良潤一、磯部紀子
2. 発表標題 新規小脳型多系統萎縮症モデルのCSF-1R阻害剤治療
3. 学会等名 第15回パーキンソン病運動障害疾患 कांग्रेस
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 浩雄、松瀬 大、眞崎 勝久、雑賀 徹、西村 由宇慈、田中 辰典、田中 謙二、山崎 亮、吉良 潤一、磯部 紀子
2. 発表標題 小脳型多系統萎縮症/一次進行型多発性硬化症モデルマウスの樹立とこれら疾患の新規創薬ターゲットの探索
3. 学会等名 第39回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 浩雄、田中 辰典、松瀬 大、西村 由宇慈、眞崎 勝久、雑賀 徹、渡邊 充、山崎 亮、田中 謙二、吉良 潤一
2. 発表標題 Gene expression profile of multiple system atrophy/primary progressive multiple sclerosis mice model
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村 由宇慈、眞崎 勝久、松瀬 大、山口 浩雄、雑賀 徹、田中 辰典、渡邊 充、山崎 亮、田中 謙二、吉良 潤一
2. 発表標題 Drug targets for multiple system atrophy and primary progressive multiple sclerosis by a novel model
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 辰典、西村 由宇慈、眞崎 勝久、松瀬 大、山口 浩雄、雑賀 徹、渡邊 充、山崎 亮、田中 謙二、吉良 潤一
2. 発表標題 多系統萎縮症および一次進行型多発性硬化症モデルマウスを用いた治療標的探索
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroo Yamaguchi, Dai Matsuse, Katsushisa Masaki, Toru Saiga, Yuji Nishimura, Mitsuru Watanabe, Ryo Yamasaki, Kenji Tanaka, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 Expression of mutant α -synuclein in oligodendrocytes induces remarkable glial inflammation and demyelination in the spinal cord and brainstem/cerebellar white matter: A novel model of multiple system atrophy-cerebellar type and primary progressive multiple sclerosis
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru Saiga, Hiroo Yamaguchi, Dai Matsuse, Katsuhisa Masaki, Yiwen Cui, Ryo Yamasaki, Kenji Tanaka, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 A novel model of primary progressive multiple sclerosis by oligodendroglial mutant alpha-synuclein
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Dai Matsuse, Hiroo Yamaguchi, Toru Saiga, Katsuhisa Masaki, Yiwen Cui, Ryo Yamasaki, Kenji Tanaka, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 A novel mice model of PPMS/MSA by oligodendroglial overexpression of mutant alpha-synuclein
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会 / 第62回日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsuhisa Masaki, Dai Matsuse, Hiroo Yamaguchi, Toru Saiga, Yuji Nishimura, Tatsunori Tanaka, Mitsuru Watanabe, Ryo Yamasaki, Kenji Tanaka, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 A novel model of multiple system atrophy-cerebellar type and primary progressive multiple sclerosis
3. 学会等名 The 24th Annual Meeting of the Japan Glia
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真崎勝久、松瀬大、山口浩雄、雑賀徹、西村由宇慈、田中辰典、渡邊充、田中謙二、山崎亮、吉良潤一
2. 発表標題 オリゴデンドロサイト特異的 シヌクレイン蓄積による小脳型多系統萎縮症・一次進行型多発性硬化症モデル
3. 学会等名 第31回日本神経免疫学会学術集会
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	雑賀 徹 (Saiga Tohru) (00744880)	九州大学・医学研究院・学術研究員 (17102)	
研究分担者	松瀬 大 (Matsuse Dai) (70596395)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	山崎 亮 (Yamasaki Ryo) (10467946)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	

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