

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



令和 6 年 3 月 31 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06461

研究課題名(和文)疾患モデルラットを用いた神経軸索ジストロフィーの新たな病態メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of new pathomechanisms of neuroaxonal dystrophy using a rat disease model

研究代表者

田中 美有(Tanaka, Miyuu)

大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・助教

研究者番号：00756893

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)：本研究によって、神経軸索ジストロフィー(Neuroaxonal dystrophy: NAD)の新規疾患モデル動物として、Hspa8(heat shock protein family A (Hsp70) member 8)遺伝子変異ラットを確立した。Hspa8遺伝子のV95Eミスセンス変異により、中枢神経系では主に深部感覚に関連する感覚神経路において、また軽度ではあるが、末梢神経系(坐骨神経)にもスフェロイド形成を伴う軸索変性が引き起こされることを明らかにした。Hspa8遺伝子変異によるNADの発症メカニズムとしては、軸索輸送やシナプス前終末部の異常が疑われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NADはまれな神経変性疾患であり、根治療法はなく、治療法の確立に向けて詳細な病態解明が課題となっている。NADの病態解析・治療法評価における疾患モデル動物の重要性は非常に高い。本研究によって、Hspa8遺伝子のV95Eミスセンス変異によってNADが引き起こされることを初めて示し、Hspa8遺伝子変異ラットを新たなNADモデルラットとして確立した。ヒト・動物のいずれにおいても、Hspa8遺伝子はNADを含めた神経変性疾患の原因遺伝子として報告されておらず、NAD・軸索変性の新たな病態メカニズム解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：We established the Hspa8(heat shock protein family A (Hsp70) member 8) mutant rat as a novel animal model of neuroaxonal dystrophy (NAD). The V95E missense mutation of the Hspa8 gene causes neuroaxonal degeneration with spheroid formation in the central nervous system, mainly in the sensory tracts associated with proprioceptive sense (deep sensation), and peripheral nervous system (sciatic nerve). Abnormalities in axonal transport and presynaptic terminals were suspected as the mechanism of NAD caused by Hspa8 gene mutations.

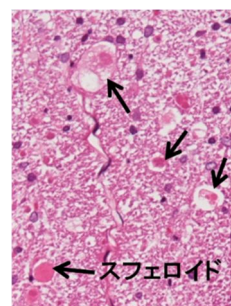
研究分野：獣医病理学

キーワード：神経軸索ジストロフィー 神経変性疾患 疾患モデル ラット 病理学

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。

## 1. 研究開始当初の背景

神経軸索ジストロフィー (Neuroaxonal dystrophy: NAD) は、神経系組織におけるスフェロイド (腫大軸索) 形成を伴う神経軸索変性を特徴とする、まれな神経変性疾患である。乳児型神経軸索ジストロフィー (INAD) などの NAD に分類される疾患は、いずれも根治療法はなく、予後不良である。また、一部の疾患は原因遺伝子が特定されつつあるものの、その病態メカニズムは十分には解明されていない。そのため、治療法の確立を目指して、NAD の詳細な病態解明が課題となっている。NAD はまれな疾患であり、研究対象とする症例数が少ないため、その病態解析・治療法評価の上で疾患モデル動物の果たす役割は非常に大きい。しかしながら、これまでに報告された NAD モデル動物は、INAD モデルである *Pla2g6* ノックアウト・変異マウス (Wada et al. 2009, Sumi-Akamaru et al. 2015) 逆行性軸索変性モデルである *gad* (gracile axonal dystrophy) マウス (Yamazaki et al. 1988) などのマウスモデル数種に限られており、ラットモデルは報告されていなかった。マウスモデルの解析からは、NAD・軸索変性とミトコンドリア変性・酸化ストレス等との関連が報告されてきている。さらに、獣医学領域においても、犬種特異的な NAD が国内外で知られており、それらの診断・治療方法、モデル動物としての応用の両面を目指した病因解明が進められている。



研究代表者らは、F344/NSIc ラットを用いた ENU ミュータジェネシスにおいて、若齢時より後肢の歩行異常・運動失調を呈し、次第に消瘦して死亡する個体を発見し、系統化した。このミュータント系統 (KK ラット; F344-*kk/kk* ラット) は、3~4 週齢頃から体重の減少が認められ、6~7 週齢頃に明らかな後肢の歩行異常・運動失調を発症し、神経症状や衰弱は徐々に進行、その後、3 週間程度で死亡する。病理組織学的解析の結果、KK ラットでは、脊髄背索を中心とする中枢神経系において多数の腫大軸索 (スフェロイド) が観察され、病理組織学的に NAD と診断した。また、先行研究での遺伝子マッピングおよびシーケンズ解析の結果、KK ラットの原因遺伝子として、ラット第 8 染色体上の *Hspa8* (heat shock protein family A (Hsp70) member 8) 遺伝子における V95E ミスセンス変異を同定した (Tanaka et al. Frontiers in Neuroscience, 2024)。これまでに、ヒト・動物のいずれにおいても、*Hspa8* 遺伝子変異による神経変性疾患 (NAD を含む) は報告されていない。



## 2. 研究の目的

本研究では、若齢時から後肢の歩行異常・運動失調を呈し、病理組織学的に NAD と診断されたミュータント系統である KK ラットに着目した。本研究の目的は、新規の NAD モデル動物である KK ラットを疾患モデルラットとして用いることで、NAD の新たな病態メカニズムを解明することである。

## 3. 研究の方法

### (1) *Hspa8* 遺伝子が KK ラットの真の責任遺伝子であることの立証

CRISPR/Cas9 と長鎖一本鎖 DNA (lssDNA) を用いて、KK ラット型の *Hspa8* 遺伝子変異を野生型ラット (F344/Jcl 系統) の *Hspa8* 遺伝子にノックイン (KI) した。ファウンダーラット作出は、先端モデル動物支援プラットフォーム「モデル動物作製支援」プログラムの支援を得て実施した。作製した KI ラット (F2 世代以降) の表現型 (体重変化、後肢の歩行異常などの臨床徴候や神経病理組織学的異常の有無など) を経時的に評価し、KK ラットと同様の表現型が認められるかどうかを検討した。

### (2) KK ラットの詳細な病理組織学的解析

KK ラットの中枢・末梢神経系および造血器 (脾臓・胸腺) について、経時的变化も含めた詳細な病理組織学的解析を行った。

### (3) 変異 HSPA8/HSC70 蛋白の機能解析

*Hspa8* 遺伝子は、HSPA8/HSC70 (Heat shock cognate 71 kDa protein) 蛋白をコードする。*Hspa8* 遺伝子変異ラットの本型・野生型ラットの中枢神経系における *Hspa8* 遺伝子および HSPA8/HSC70 蛋白の発現レベルを調べた。さらに、共同研究先において、野生型 HSPA8 蛋白および変異型 HSPA8/HSC70 蛋白の発現・精製を行い、ATPase 活性測定、リフォールディングアッセイ、蛍光偏光 (Fluorescence Polarization; FP) アッセイ、示差走査蛍光定量法 (Differential Scanning Fluorimetry; DSF) によって、変異 HSPA8/HSC70 蛋白の特性・機能を *in vitro* で解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *Hspa8* 遺伝子が KK ラットの真の責任遺伝子であることの立証

CRISPR/Cas システムによって、目的の *Hspa8* 遺伝子変異を有するファウンダー (F0) ラットが 4 匹得られた。得られたファウンダーラットを F344/Jcl に戻し交配後、F2 ラットを作り出し、最終的に、目的の *Hspa8* 遺伝子のホモ型変異を有するラットが 2 ライン得られた。いずれのラインにおいても、作製した *Hspa8* 遺伝子ホモ型変異ラットは、若齢時より、後肢の歩行異常・運動失調や低体重を呈した。病理組織学的には、脊髄（特に胸髄・腰髄の背索において病変が強い）および脳幹、小脳を中心とする中枢神経系において多数のスフェロイドが観察された。これら *Hspa8* 遺伝子変異ラットの表現型は、KK ラットで認められたものと同様であった。発症後の臨床徴候（歩行異常や消瘦）の進行の程度は、KK ラットと比較するとやや緩やかな傾向にはあった。以上より、我々が同定した *Hspa8* 遺伝子が KK ラットの NAD の真の責任遺伝子であることが示された。



##### (2) KK ラットの詳細な病理組織学的解析

**神経系病変：***Hspa8* 遺伝子変異ラット作出の過程において、中枢神経系だけでなく、末梢神経系（坐骨神経）においてもスフェロイドが形成されることがわかった。同様の所見は KK ラットの坐骨神経においても確認された。*Hspa8* 遺伝子変異ラットの坐骨神経の病理組織学的変化を経時的に評価したところ、3 週齢以降のホモ型ラットの坐骨神経でスフェロイドが認められた。週齢が進むにつれ、スフェロイドの数は増加傾向にあったが、中枢神経系と比較すると少数（病変が軽度）であった。また、これらスフェロイド内には、中枢神経系に認められたものと同様、シナプス関連蛋白、ニューロフィラメント、ユビキチンが蓄積しており、軸索傷害マーカーである Amyloid Precursor protein にも強陽性を示した。さらに、症状が進行した個体においては、坐骨神経の神経線維密度の低下傾向が認められた。なお、脊髄神経根には明らかなスフェロイドは観察されなかった。今後、坐骨神経の電子顕微鏡観察などの詳細な解析を進める予定である。中枢神経系については、大脳を含めたさらに詳細な病変分布の確認と、神経細胞の変性や小脳皮質変性の有無、グリア細胞の反応などにも着目して、神経系病変の詳細な解析を続ける予定である。

**造血器病変：**KK ラットでは、神経系病変以外に、脾臓の腫大・うっ血および白脾髄の萎縮と、胸腺皮質の萎縮を認めた。これらの異常について詳細に解析した。KK ホモ型ラットの脾臓は、3~5 週齢頃から肉眼的に腫大・うっ血を呈しており、組織学的には、うっ血と白脾髄領域の萎縮/縮小が観察された。リンパ球系マーカー（CD3・CD20）を用いた免疫染色の結果、CD3 陽性 T 細胞の分布に著変は認められなかったが、CD20 陽性 B 細胞領域の萎縮が確認された。一方で、胸腺重量の減少および組織学的な萎縮病変は、歩行異常の発症後、とくに病変が重篤化する 9 週齢頃から認められ、臨床徴候が進行・重篤化するとともに、皮質・髄質の境界不明瞭化が進行し、最終的には胸腺全体が重度に萎縮した。詳細なメカニズムは不明であるが、KK ラットにおける造血器の異常が示唆された。なお、胸腺病変には、歩行異常や摂餌障害などのストレス状態による二次的変化も関与すると考えられた。今後は、骨髄病変の有無の解析を進めるとともに、RNA-seq 解析データも踏まえて、リンパ球分化や機能に関する遺伝子の発現動態などにも着目した解析を実施予定である。

##### (3) 変異 HSPA8/HSC70 蛋白の特性・機能解析

Western blot 解析により、*Hspa8* 遺伝子変異ホモ型ラットの中枢神経系では、野生型ラットと比較して、*Hspa8* 遺伝子がコードする HSPA8/HSC70 蛋白の発現低下が確認された。*in vitro* での変異 HSPA8/HSC70 蛋白の特性・機能解析の結果、V95E 変異 HSPA8/HSC70 蛋白は、co-chaperon DnaJB4 と BAG1 によって刺激された際、ATPase の最大加水分解速度が有意ではあるがやや低下した。このことから、V95E 変異 HSPA8/HSC70 蛋白の機能欠失・異常が示唆された。

また、HSPA8/HSC70 蛋白に対する免疫染色の予備検討では、ホモ型ラットのスフェロイド内に陽性所見がみられたことから、変異 HSPA8/HSC70 蛋白がスフェロイド内に蓄積している可能性が示唆された。今後、中枢神経系における HSPA8/HSC70 蛋白の局在についても、免疫染色および免疫電顕法によって詳細に調べる予定である。

以上、本研究によって、我々が同定した KK ラットの原因遺伝子 *Hspa8* が、KK ラットの NAD の真の責任遺伝子であることを証明し、NAD の新規疾患モデル動物として *Hspa8* 遺伝子変異ラットを確立した。*Hspa8* 遺伝子の機能としては、シャペロン介在性オートファジーや遅い軸索輸送への関与などが報告されている。*Hspa8* 遺伝子の V95E ミスセンス変異による NAD の発症メカニズムとしては、軸索輸送やシナプス前終末部の異常、シャペロン介在性オートファジーの異常が疑われた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tanaka Miyuu, Fujikawa Ryoko, Sekiguchi Takahiro, Hernandez Jason, Johnson Oleta T., Tanaka Daisuke, Kumafuji Kenta, Serikawa Tadao, Hoang Trung Hieu, Hattori Kosuke, Mashimo Tomoji, Kuwamura Mitsuru, Gestwicki Jason E., Kuramoto Takashi	4 . 巻 18
2 . 論文標題 A missense mutation in the Hspa8 gene encoding heat shock cognate protein 70 causes neuroaxonal dystrophy in rats	5 . 発行年 2024年
3 . 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6 . 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2024.1263724	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 田中美有、田中大資、 熊藤健太、藤川諒子、服部晃佑、井澤武史、真下知士、桑村充、芹川忠夫、庫本高志
2 . 発表標題 Hspa8遺伝子変異ラットの新規神経軸索ジストロフィーモデルとしての確立
3 . 学会等名 第69回日本実験動物学会総会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Ryoko Fujikawa, Miyuu Tanaka, Takahiro Sekiguchi, Kosuke Hattori, Takeshi Izawa, Tomoji Mashimo, Mitsuru Kuwamura, Tadao Serikawa, Takashi Kuramoto
2 . 発表標題 Neuropathological analyses of a novel neuroaxonal dystrophy model rat
3 . 学会等名 The 10th ASVP and 10th JCVP Joint Conference（国際学会）
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 田中美有
2 . 発表標題 Hspa8遺伝子変異ラットの新規神経軸索ジストロフィーモデルとしての確立
3 . 学会等名 第16回ラットリソースリサーチ研究会（招待講演）
4 . 発表年 2023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	桑村 充  (Kuamura Mitsuru)  (20244668)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授   (24403)	
研究 分担者	庫本 高志  (Kuramoto Takashi)  (20311409)	東京農業大学・農学部・教授   (32658)	

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			
米国	University of California San Francisco			