

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06480

研究課題名（和文）神経セロイドリポフスチン症カニクイザルに関する研究資源の開発と整備

研究課題名（英文）Development of research resources in cynomolgus monkeys with neuronal ceroid lipofuscinosis

研究代表者

下澤 律浩（Shimozawa, Nobuhiro）

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター・主任研究員

研究者番号：50300786

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）：3頭のCLN2カニクイザルを元に変異遺伝子を持つ（ヘテロ型）と想定された先祖の子孫の中に多数のヘテロ型個体を確認した。CLN2疾患の3頭の脳組織を調べたところ、ヒトCLN2のそれと非常に似ていた。さらに、発症前から行った観察および病態解析では、ヒトの発症年齢に近いところで発症し、脳容量は発症前から萎縮が認められ、行動は経過とともに悪化し、発症から約1年後に安楽殺に至った。CLN2個体から樹立したiPS細胞の性状は他の非ヒト霊長類ES細胞と同様であった。これら生物資源はヒトCLN2のモデルとして有用なものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経セロイドリポフスチン症の2型（CLN2）は難病指定されている致死性の疾患である。ヒトとカニクイザルは同じ霊長類であり、他の実験動物よりもヒトとの類似性が高く、CLN2カニクイザルは有用な研究資源になり得る。そのような生物資源を整備するために、変異遺伝子を持つ（ヘテロ型）個体を多数特定し、変異遺伝子を二つ持つ（ホモ型、性成熟に達しない）個体を生産可能な基盤があることを確認した。さらに、生体の代替利用が可能なiPS細胞の樹立にも成功した。このようなCLN2カニクイザルおよびそのiPS細胞はヒトCLN2の治療法開発に有用な生物資源である。

研究成果の概要（英文）：Based on three CLN2 cynomolgus macaques, we identified an ancestor that was assumed to have one mutated gene (heterozygous), and numerous heterozygous macaques in the progeny. Detailed examination of the brain tissues on three CLN2 macaques confirmed that they were histologically similar to humans. Furthermore, clinical observations and behavioral analysis conducted before the onset of the disease showed that the onset of the disease was close to the age of onset in humans, brains on CLN2 macaques were atrophied even before onset, and behavior worsened over time, leading to euthanasia one year after onset of disease. Properties of iPS cells established from somatic cells of a CLN2 macaque were similar to those of primate ES cells. These bioresources may be useful as models for human CLN2.

研究分野：実験動物学

キーワード：カニクイザル 非ヒト霊長類 神経セロイドリポフスチノーシス CLN2 ライソゾーム病 iPS細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小児で多く発症する神経セロイドリポフスチン症(NCL)は、難病指定されているライソゾーム病(告示番号19)の一つであり、重篤な神経症状を呈し、性成熟前に致死に至る希少疾患である。発症時期や原因遺伝子によって14の型(CLN1~CLN14)に分類される。根本的な治療法はなく、酵素補充療法、遺伝子治療、幹細胞移植などによる治療研究が進められている。このような状況の中、霊長類医学研究センターのカニクイザルコロニーに、神経セロイドリポフスチン症の2型(CLN2)個体が世界で初めて発見された。ヒトと同じ霊長類であるカニクイザルは手指を使うなど他の実験動物にはない特徴をもち、ヒト CLN2 患者を模倣した病態の治療効果が CLN2 カニクイザルを用いた時に検証しやすいものと考えられる。このようなカニクイザルが CLN2 の治療法開発の疾患モデルとして質を高め、研究に広く利用されるためには、CLN2 カニクイザルに関する基礎情報および生産コロニーなどの整備は研究資源として必要である。さらに、CLN2 の細胞レベルでの基礎的な研究に利用できる CLN2 カニクイザルの細胞から疾患特異的 iPS 細胞の樹立も重要な研究資源になる。

### 2. 研究の目的

ヒト CLN2 患者に対する画期的なモデル動物となり得る可能性を持つ CLN2 カニクイザルを CLN2 疾患の発症機序や治療法開発の研究に役立つ高品質な生物資源とするためには、変異遺伝子をヘテロ型に持つ個体をコロニー内から抽出すること、CLN2 疾患個体の各種基礎情報の収集、CLN2 カニクイザルコロニーの構築および CLN2 疾患個体の安定生産を可能にする繁殖体制を整備する必要がある。さらにその疾患特異的 iPS 細胞を樹立することで、細胞から個体までをカバーできる CLN2 研究に特化した一連の生物資源を開発および整備することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 生産体制の整備

霊長類センターのコロニー内に見つかった CLN2 個体の先祖(ファウンダー)を家系から調べた。その先祖個体の子孫について、生存個体およびその出産直後の個体から血液あるいは口腔粘膜を採取し、遺伝子検査を行った。さらに、妊娠中に胎児の遺伝子検査が可能かを調べるために、母体血および羊水を採取し、血漿および羊水より cell-free DNA を採取し、検査を行った。

#### (2) 疾患個体の病態解析

疾患個体の安楽殺時に採取した脳組織を詳細に調べるためにアストロサイトおよびミクログリアの同在について免疫組織学的な解析を行うとともに、細胞内の微細な蓄積物質を観察するために電子顕微鏡解析を行った。さらに、疾患の進行状況などを調べるために継時的な病態解析および行動解析を行った。

#### (3) iPS 細胞の樹立

安楽殺時に採取した CLN2 個体由来の体細胞に対してセンダイウイルスベクターを用いた iPS 細胞の樹立を行った。形成された iPS 細胞様の細胞は、未分化マーカーの検出、テラトーマ形成能および核型検査などの性状解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 生産体制の整備

##### ・ヘテロ個体の抽出

ファウンダー個体を元に変異遺伝子検査を行い、ヘテロ型個体のスクリーニングを行ったところ、雄24頭および雌27頭を確認し、それらの内それぞれ6頭および18頭が繁殖年齢に達している。また、妊娠中の雌の胎児において早期診断を行うために、血中の cell-free DNA を用いて検査したところ、その判別にはさらなる検討が必要であった。しかし、同時に採取した羊水の上清および沈殿物の二つに分けて検査したところ、両者の結果は一致し、羊水採取により胎児の遺伝子型の判別は可能であった。血中の cell-free DNA 検査で判別できなかった理由として、胎児由来の DNA が少なかったことが理由である可能性が推察された。

##### ・自然交配成績

ホモ型疾患個体は繁殖年齢に達する前に症状悪化により安楽殺に至る。そのため、ヘテロ型の雌雄間で自然交配を進めることで、ホモ型個体を生産する必要がある。また、親あるいは兄弟との交配は近親交配になるため、これを避けた交配を進めているが、新たなホモ型個体は確認されなかった。なお、他のコロニー内の個体の繁殖成績と遜色はなく、ヘテロ型個体の繁殖に問題はないと考えられ、ホモ型個体の出生が認められない理由は、出現確率が25%と低いことが原因と考えられた。

### ・人工授精

自然交配に加え、人為的に妊娠を得ることができる生殖補助技術の一つである人工授精を行った。2頭のヘテロ型雄から採取した精子を使用したところ、ヘテロ型雌は妊娠成立した。その雄の1頭は自然交配で妊娠を確認することができなかった個体であったが、人工授精を利用することで、妊娠性を確認することができた。自然交配での妊娠の不成立は交尾に至っていないことが原因であると考えられた。このため、ホモ型の疾患個体を生産するためにも、自然交配のみでの繁殖方式に加え、人工授精は十分に意義があるものと考えられた。また、流産も確認されたが、これはワイルド型雌雄の人工授精でも確認されるため、必ずしも変異遺伝子の影響ではないものと考えられた。

### (2) 疾患個体の病態解析

#### ・脳のグリア等の病理と電顕像

既に安楽殺したホモ型個体において、詳細な CLN2 疾患の病態を明らかにするために、萎縮した脳(図1a)におけるアストロサイト、ミクログリアおよびオリゴデンドロサイトの局在をそれぞれ GFAP、Iba-1 および MBP 抗体を用いて免疫組織学的に解析した結果、それらのびまん性増殖や変性が確認された(図1b-d)。これらが脳・小脳の萎縮に大きく関与していると考えられた。また、既に安楽殺した個体で検査できなかった CLN2 疾患特有の curvilinear profile (CLP) と呼ばれる細胞内の微細な蓄積物質の有無を電子顕微鏡で観察するために、3頭目の CLN2 個体を安楽殺時に採取した脳組織で探索したところ、ヒトと同様に CLP を確認した(図1e)。

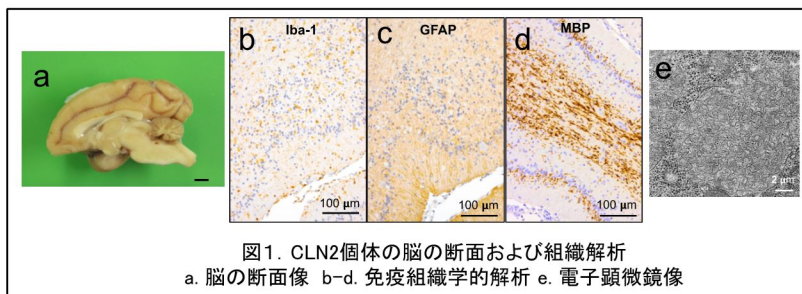


図1. CLN2個体の脳の断面および組織解析  
a. 脳の断面像 b-d. 免疫組織学的解析 e. 電子顕微鏡像

#### ・継時的な行動解析

3頭目の CLN2 個体において、その前に見つかった2頭と同様に軽度な身体の震えのような神経症状が2歳齢で観察された。しかし、MRI 撮像では無症状であったそれ以前に脳の萎縮が認められ、発症と脳の状態は一致するものではないことが推察された。さらに、震戦や転倒も継時的に悪化していく様子も観察された。手指で物を掴む能力を調べるために、リンゴ片を用いた食物回収試験を行ったところ、りんごを掴んで食べるという行動も継時的に悪化し、りんごを落としてしまうことも後半ではかなり目立つ状態であった。

### (3) 疾患特異的 iPS 細胞の整備

ES 細胞と同様な巨大な核を持った iPS 細胞様のフラットな形態のコロニーが複数形成された。このコロニーを細胞小塊にし、新鮮な繊維芽細胞上に継代した結果、安定的にコロニーを維持することができた。この iPS 様細胞を 37 環境から一時的に 39 環境下で培養した後で、センダイウイルスや初期化誘導に利用された Oct3、SOX2、KLF4 および MYC は検出されなかった。また、Oct3、Nanog、SSEA4 などの未分化マーカーの発現(図2a-c)が確認されるとともに、80%の細胞で正常核型(2n=42,XY)が維持されていることを確認した。また、免疫不全マウスへの移植によって三胚葉性のテラトーマ形成(図2d-f)が確認され、多能性を持つことも明らかにした。

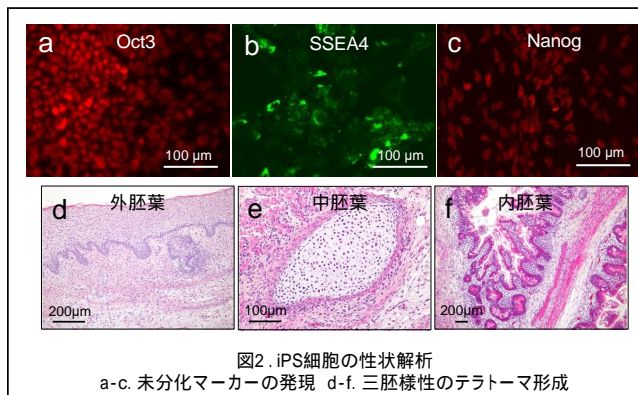


図2. iPS細胞の性状解析  
a-c. 未分化マーカーの発現 d-f. 三胚葉性のテラトーマ形成

## 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 Koinuma Shingo, Shimozawa Nobuhiro, Yasutomi Yasuhiro, Kimura Nobuyuki	4. 巻 106
2. 論文標題 Aging induces abnormal accumulation of A $\beta$ in extracellular vesicle and/or intraluminal membrane vesicle-rich fractions in nonhuman primate brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Aging	6. 最初と最後の頁 268 ~ 281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neurobiolaging.2021.06.022	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 Shimozawa Nobuhiro, Ageyama Naohide, Nakayama Shunya, Koie Hiroshi, Yasutomi Yasuhiro	4. 巻 60
2. 論文標題 Ultrasound-guided, Transabdominal, Intrauterine Artificial Insemination for Cynomolgus Macaques ( <i>Macaca fascicularis</i> ) Based on Estimated Timing of Ovulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Association for Laboratory Animal Science	6. 最初と最後の頁 125 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.30802/AALAS-JAALAS-20-000038	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 Shimozawa, N., Iwata, T., Yasutomi, Y.	4. 巻 71
2. 論文標題 A controlled ovarian stimulation procedure suitable for cynomolgus macaques.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 426-432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.21-0198	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 2. Munesue Y, Ageyama N, Kimura N, Takahashi I, Nakayama S, Okabayashi S, Katakai Y, Koie H, Yagami K, Ishii K, Tamaoka A, Yasutomi Y, Shimozawa N.	4. 巻 363
2. 論文標題 Cynomolgus macaque model of neuronal ceroid lipofuscinosis type 2 disease.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 114381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2023.114381	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下澤律浩、揚山直英、中山駿矢、鯉江 洋、保富康宏
2. 発表標題 カニクイザルの推定された排卵時期における超音波ガイド下での経腹的子宮腔内人工授精法の開発
3. 学会等名 第37回日本霊長類学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 棟居 佳子、石井一弘、玉岡晃、八神健一、揚山直英、保富康宏、下澤律浩
2. 発表標題 神経セロイド・リポフスチン症2型カニクイザルに関する病理組織学的解析
3. 学会等名 第29回サル疾病ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下澤律浩
2. 発表標題 人為的な卵胞発育刺激および採卵を行ったカニクイザルにおける繁殖能力
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 棟居 佳子、小野文子、揚山直英、八神健一、石井一弘、玉岡 晃、保富康宏、下澤律浩
2. 発表標題 神経セロイド・リポフスチン症2型カニクイザルに対する行動解析の検討
3. 学会等名 第27回日本ライソゾーム病研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 棟居佳子、中山駿矢、鯉江 洋、八神健一、揚山直英、石井一弘、玉岡 晃、下澤律浩
2. 発表標題 神経セロイドリポフスチン症 2 型カニクイザルにおける経時的な病態変化
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会
4. 発表年 2022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	揚山 直英  (Ageyama Naohide)  (50399458)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター・主任研究員   (84420)	
研究分担者	石井 一弘  (Ishii Kazuhiro)  (70323293)	筑波大学・医学医療系・准教授   (12102)	

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