

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07438

研究課題名（和文）多系統萎縮症モデルマウスを用いた画期的ミクログリア標的療法の開発

研究課題名（英文）Development of innovative microglia-targeted therapy using multiple system atrophy model mice

研究代表者

松瀬 大（Matsuse, Dai）

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：70596395

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：私たちが作成した新規多系統萎縮症（MSA）モデルマウスにて、組織学的にはミクログリアの著明な増加がみられ、病態への関与が考えられた。CSF1R阻害薬にてミクログリアの一部を除去すると、運動症状、組織学的所見はむしろ悪化することが分かり、single cell RNA sequencingにより、病態の悪化に関与するミクログリアの同定を行った。をまた、 α -Synuclein除去治療もを行い、発症前投与では有効性を見出した。また α -Synucleinのオリゴマーは発症前に発現がピークとなるのに対し、リン酸化 α -Synucleinは病期の進行とともに徐々に蓄積することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多系統萎縮症は、まだ治療法のない、最重症の神経難病の一つである。その治療法の確立のためには、まず病態を解明し、病態の増悪に関わる因子を明確にすることが必要不可欠である。私たちはそのために、多系統萎縮症の病態を反映し、また急速に進行するマウスモデルを作成した。進行が早いこのモデルを解析することで、本疾患の病態の解明や、治療薬の効果判定が速やかに可能となる。本研究で、病気の要因と考えられる α -Synucleinの動態や、病態増悪に関わるミクログリアの特徴、また適切な治療介入時期について新たな知見を得ることができた。現在進行中のさらなるモデル動物解析や候補治療薬の実験により、研究の進歩が期待される。

研究成果の概要（英文）：In the new multiple system atrophy (MSA) mouse model we created, a marked increase in microglia was observed histologically, suggesting that they may be involved in the pathology. It was found that when some microglia were removed using a CSF1R inhibitor, the motor symptoms and histological findings actually worsened, and single cell RNA sequencing was used to identify the microglia involved in the worsening of the pathology. We also performed α -Synuclein removal therapy and found that it was effective when administered before onset of symptoms. It was also found that the expression of α -Synuclein oligomers peaks before the onset of symptoms, whereas phosphorylated α -Synuclein gradually accumulates as the disease stage progresses.

研究分野：神経内科学

キーワード：多系統萎縮症 モデルマウス ミクログリア α -Synuclein

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多系統萎縮症 (MSA) は シヌクレイノパチーに分類され、オリゴデンドログリアへの不溶化した α -Synuclein の蓄積が MSA の発症、進展に重要な役割を演じている。私たちは、MSA 患者髄液では GM-CSF、IL-6、IL-7、IL-12 などの炎症性サイトカインが非炎症性神経疾患患者と比較し有意に上昇していること、MSA 患者において髄液中 MCP-1 値と罹病期間が負に相関し、かつ髄液中 IL-6 値と橋底部径が負に相関することを初めて見出し報告した (Yamasaki, et al. J Neuroinflammation 2017)。また、多系統萎縮症患者の末梢血において、Intermediate 単球の割合が特に病初期で減少していることを発見した (Matsuse, et al. J Neuroimmunol 2020)。これらは MSA 初期病態への炎症の関わりを強く示唆する。私たちは tet-off システムを利用し、オリゴデンドログリア特異的にヒト変異 α -Synuclein A53T を任意の時期に発現するモデルマウスを作成した。本モデルは髄鞘完成後の成熟期以降に発現させると小脳失調を主徴とする MSA-C 様病態に移行する。発病や進行も早く、病態解明や治療法開発に有用な動物モデルである。本モデルでは arginase-1 陽性ミクログリアの顕著な活性化、TLR2 の発現増加、コネクシン (Cx) 群の広汎な脱落をすでに確認している。また本モデルの運動症状発症直後に α -Synuclein の発現を停止すると、症状や病理学的所見はほぼ完全に回復するが、発症後約 1 か月後に α -Synuclein の発現を停止すると、症状や病理学的所見の回復は部分的にとどまることが分かった。オリゴデンドログリアに α -Synuclein が蓄積すると、続いてミクログリアが活性化され、種々のサイトカインを産生すると考えられる。また、病勢の進行とともにオリゴデンドログリアに蓄積する α -Synuclein は拡散し、それと共にミクログリアの活性化も拡大し、神経細胞障害も増悪する可能性が考えられる。

これらをふまえ、今後 MSA の治療法を考える上で、 α -Synuclein の蓄積や伝播をターゲットにするか、ミクログリアをターゲットにするかいずれかが有効な治療法になりうると考えるに至った。

2. 研究の目的

MSA の病態を解明するため、すでに作成した新規 MSA モデルマウスを用い、 α -Synuclein の蓄積・伝播と炎症の関係を明らかにすることを目指した。炎症に関しては、特にミクログリアの関与について注目し、解明を進める。モデルマウスは髄鞘形成後に α -Synuclein を発現させ、臨床症状、運動機能、病理学的所見などについて評価し、MSA の病態のより深い解明を行う。また、 α -Synuclein やミクログリアをターゲットとした治療的介入も行い、本疾患の新規治療開発を目指した。

さらに、ヒト MSA 病理の解析も進め、マウスモデルで得た知見との比較や、動物モデルに関する妥当性の検証を行った。

3. 研究の方法

Tet0- SynA53T Tg/+ マウスと PLP-tTA Tg/+ マウスをさらに交配させ Tet0- SynA53T Tg/+; PLP-tTA Tg/+ マウスを得る。交配中および、髄鞘形成が完成する生後 8 週までは Doxycycline (DOX) 添加の餌を与え Syn A53T の発現を抑制する。生後 8 週齢より通常餌を与え Syn A53T をオリゴデンドログリア特異的に持続的に発現させる。その後、行動学的解析 (rotarod) 組織学的解析、生化学的解析を行い、ミクログリア、アストログリアがどの時期に脳脊髄のどの部位で活性化するかを明らかにする。またそれらの細胞を、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、マイクロアレイなどを用いて、種々のマーカーの発現を評価し、どのような性質の細胞が病態悪化、保護に関与しているか明らかにする。

治療的なアプローチとしては、まずは α -Synuclein をターゲットにした治療法として、ユビキチン - プロテアソーム経路による α -Synuclein 分解を促進するために、E3 リガーゼを特異的に動員する PROTAC (proteolysis targeting chimera) 化合物をもちいた薬物治療法を行った。症状発現後 4 週間にわたり、脳室内注射を週 2 回実施した。その後、毎週の体重測定と rotarod を実施した。

また、MSA 病態に関与しているミクログリア集団を調べるために、CSF1R 阻害剤投与実験も行った。CSF1R 阻害剤である BLZ945 (El-Gamal et al., 2018) を 17~21 (18.6 \pm 0.4) 週齢の無症候性 Tg マウス (n=10) に連日 4 週間経口投与した。vehicle 群では、17~21 (18.6 \pm 0.6) 週齢の無症候性 Tg マウス (n=5) に同量のメチルセルロースを 4 週間毎日投与した。CSF1R 阻害の治療効果を調べるために、23~25 (24.2 \pm 0.2) 週齢の症候性 Tg マウス (n=6) に BLZ945 を 4 週間毎日経口投与した。vehicle 群では、22~25 (23.5 \pm 0.5) 週齢の症候性 Tg マウス (n=5) を同量のメチルセルロースで毎日 4 週間治療した。BLZ945 をメチルセルロースで 30 mg/ μ l に希釈し、体重 1g あたり 300 μ g (10 μ l) の用量で投与した。その後、毎週の体重測定とロータロッドテストを実施した。

本モデルマウスのミクログリアの特徴を調べるため、Single cell RNA sequencing (scRNAseq) を施行。また、CSF-1R 阻害剤によるミクログリアの変化を確認するため、CSF-1R 阻害剤治療実験における、CSF-1R 阻害剤投与群、vehicle 群の比較も行った。

ヒト MSA 剖検 15 例を用いた神経病理学的検討を行った。まずミクログリアに注目し、モデルマウスで増加しているミクログリアのサブポピュレーションが、ヒトでも増加していないか

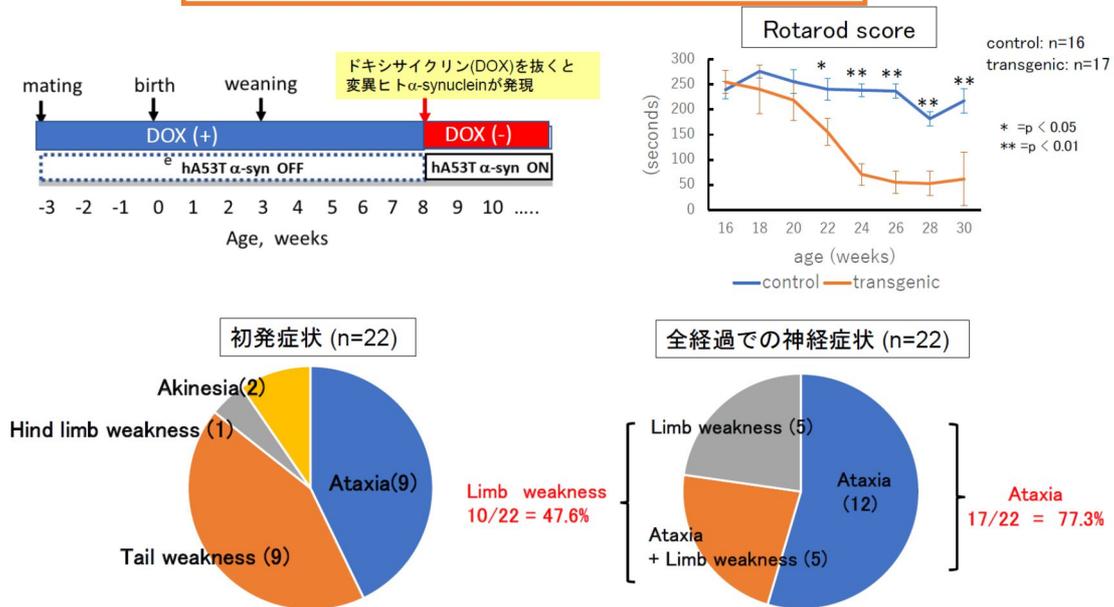
など調べた。-synuclein の蓄積が顕著な橋横走線維や小脳白質の入力線維における脱髄パターンやランビエ絞輪部蛋白の脱落について評価し、脱髄病変におけるコネクシン蛋白群の発現変化および炎症細胞浸潤程度との関連性について解析を行った。

4. 研究成果

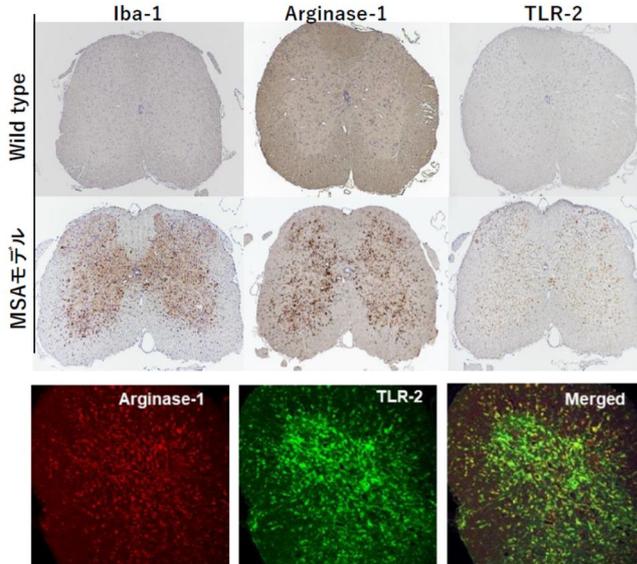
Tet0- SynA53T Tg/+ マウスと PLP-tTA Tg/+マウスを交配させ Tet0- SynA53T Tg/+; PLP-tTA Tg/+ マウスを得た。まず、成年マウスとなった生後 8 週以降に Syn 発現させることで、多系統萎縮症のモデルマウスを作成した。マウスは平均 22.1 週齢で発症したが、その表現型は失調歩行のほか、尾や後肢の麻痺、鼻動など多岐にわたった。症状は発症後徐々に進行し、体重減少や rotarod score の悪化がみられた (図 1)。病理学的所見では シヌクレインの沈着や脱髄所見が脳、小脳、脳幹、脊髄にみられ、それに伴い arginase-1 陽性ミクログリアの顕著な浸潤 (図 2)、またアストロサイトのコネクシン 43/30、オリゴデンドロサイトのコネクシン 47/32 の広汎な脱落を認めた。マイクロアレイにて遺伝子発現を解析したところ、炎症や免疫に関する遺伝子群の発現が上昇していた。

発症直後からの治療的介入として行った PROTAC 投与実験では、統計学的に有意ではないものの、rotarod での運動機能が軽度改善し、血清 neurofilament L が低下した。また、Western Blot では TBS-T 可溶性 p- -Synuclein の脳幹、脊髄レベルでの低下、TBS-T 不溶性 p- -Synuclein の脊髄レベルでの低下を認めた。十分な治療効果ではなかったものの、一定の効果の所見が見られ、本剤のさらなる改良が、治療薬につながる可能性は示唆された。

(図1) MSAモデルマウスの行動解析と主な神経症状



(図2) MSAモデルマウス24w齢 (発症直後) の病理所見と、CNSミクログリア/マクローファージのFCM解析



CSF1R 阻害薬の、発症後での治療的投与実験は明らかな運動機能、病理学的変化を来さなかった。発症前での予防的投与では、むしろ運動機能は悪化し、病理学的にも p- -Synuclein の蓄積が高度になって脱髄が悪化した (図 3)。

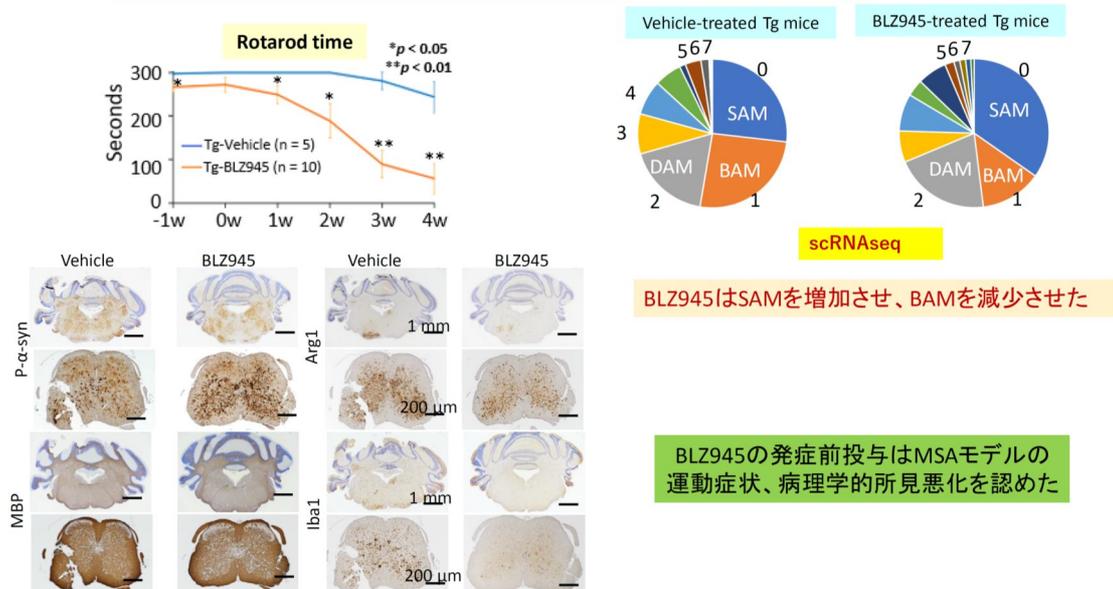
モデルマウスの脳幹・脊髄からソーティングした CD11 陽性ミクログリアを scRNAseq で解析したところ、複数のサブpopulationが得られた。その中では、既報告でアルツハイマー病やALSで発見された DAM や、パーキンソン病やアルツハイマー病で発見された BAM といった神経保護作用があるとされるミクログリアも見られた。一方、Tgm2、Tlr2、Arg1、Sdc4、Ccl12、Msr1、および炎症性サイトカイン遺伝子の高発現を特徴とするユニークなミクログリアクラスターが存在しており、これをシヌクレイノパチー関連ミクログリア (SAM) と暫定的に呼ぶことにした。このクラスターは、予防的 CSF-1R 阻害治療後に

増加しており (図 3)、病理学的にも Msr1 陽性 Iba1 陽性ミクログリアの豊富な浸潤が p- -

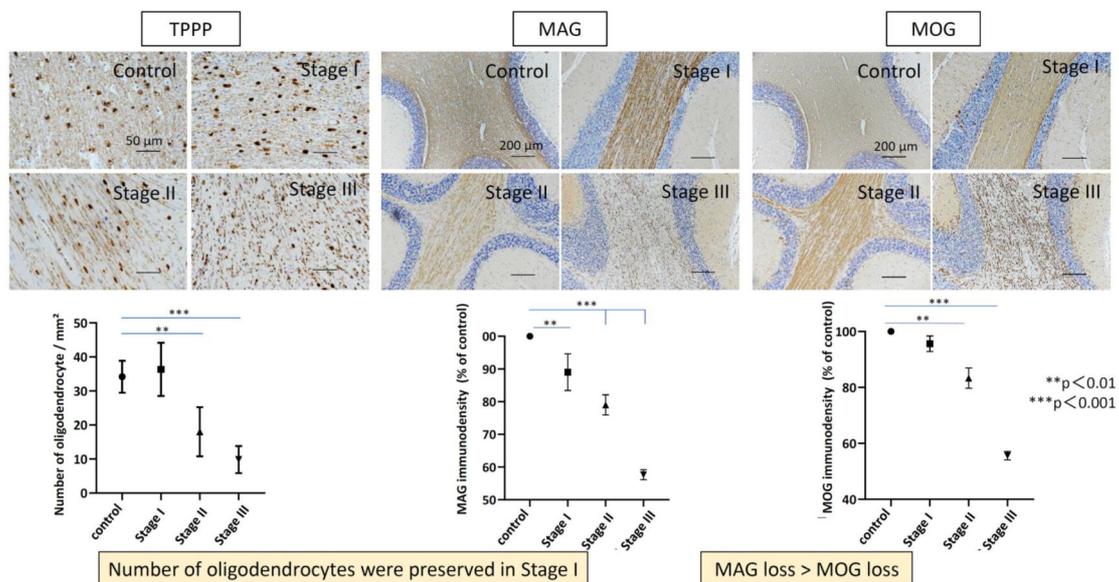
Synuclein 浸潤部位に認めた。SAM が本モデル動物の病態増悪に関与している可能性が考えられた。ヒト病理でもやはり Msr1 陽性ミクログリアが沈着した p-Synuclein に密接して存在しており、動物モデルで認めた SAM に類似したミクログリアが病態の悪化に関与している可能性を考えている。-Synuclein のオリゴマーは発症前に発現がピークとなるのに対し、リン酸化-Synuclein は病期の進行とともに徐々に蓄積することが分かった。

ヒト病理のさらなる解析として、まず Kluver-Barrera 染色に基づいて脱髄病変を軽症のものから stage I-III の3段階に分類して解析を行った(図4)。MAG はステージ I で優先的に減少したが、MOG は減少しなかったことから、distal oligodendroglipathy 型脱髄を呈していることが示唆された。オリゴデンドロサイトにおける p-Synuclein の蓄積は、ステージ I で目立ったものの、stage II, III では減少した。TPPP/p25 陽性オリゴデンドロサイトは、ステージ I では保たれていたが、ステージ II, III では徐々に減少した。Cx32 stage I ですでに顕著に減少しており、GCI と共同在した。Cx47 は stage の進行に従ってオリゴデンドロサイトで徐々に減少したが、GCI と共同在しなかった。アストロサイトの Cx43 は、ステージ I では減少していた、ステージ II および III では上昇しており、これはアストログリオシスを反映していた。Cx43/Cx47 ギャップ結合はステージ I から III まで著しく減少した。活性化されたミクログリア/マクrophage および T 細胞は、ステージ II および III ではなくステージ I に浸潤していた。したがって、グリアCxの早期かつ広範な変化、特にCx32 喪失がMSAで起こり、グリア間コミュニケーションの破壊を通じて遠位希突起膠症型脱髄および結節/傍結節機能不全を促進する可能性があると考えられた。

(図3) MSAモデルマウス発症直前期のCSF-1R阻害剤投与実験



(図4) MSA患者の脳病理



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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuji Nishimura, Katsuhisa Masaki, Dai Matsuse, Hiroo Yamaguchi, Tatsunori Tanaka1, Eriko Matsuo, Shotaro Hayashida, Mitsuru Watanabe, Takuya Matsushita, Shoko Sadashima, Naokazu Sasagasako, Ryo Yamasaki, Noriko Isobe, Toru Iwaki, Jun-ichi Kira	4. 巻 -
2. 論文標題 Early and extensive alterations of glial connexins, distal oligodendroglipathy type demyelination, and nodal/paranodal pathology are characteristic of multiple system atrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Pathology	6. 最初と最後の頁 e13131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bpa.13131.	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 Yu Hashimoto, Ryo Yamasaki, Senri Ko, Eriko Matsuo, Yuko Kobayakawa, Katsuhisa Masaki, Dai Matsuse, Noriko Isobe	4. 巻 23
2. 論文標題 Connexin 30 Deficiency Ameliorates Disease Progression at the Early Phase in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis by Suppressing Glial Inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 16046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms232416046.	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 Jun Mitsui, Takashi Matsukawa, Yukari Uemura, et al	4. 巻 -
2. 論文標題 High-dose ubiquinol supplementation in multiple-system atrophy: a multicentre, randomised, double-blinded, placebo-controlled phase 2 trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eClinicalMedicine	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） なし	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 松瀬大	4. 巻 なし
2. 論文標題 進行性核上性麻痺	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 最新主要文献とガイドラインでみる脳神経内科学レビュー2022-23'	6. 最初と最後の頁 121-127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Dai Matsuse, Hiroo Yamaguchi, Katsuhisa Masaki, Yuji Nishimura, Tatsunori Tanaka, Toru Saiga, Kenji Tanaka, Ryo Yamasaki, Noriko Isobe, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 A population of inflammatory microglia exacerbates a novel mouse model of multiple system atrophy
3. 学会等名 63rd Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuji Nishimura, Katsuhisa Masaki, Dai Matsuse, Hiroo Yamaguchi, Tatsunori Tanaka, Shoko Sadashima, Ryo Yamasaki, Toru Iwaki, Noriko Isobe, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 Early loss of connexin 32 in multiple system atrophy; implication for pathogenesis of demyelination
3. 学会等名 63rd Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村由宇慈, 眞崎勝久, 松瀬大, 山口浩雄, 田中辰典, 貞島祥子, 笹ヶ迫直一, 山崎亮, 磯部紀子, 岩城徹, 吉良潤一
2. 発表標題 多系統萎縮症におけるconnexin蛋白群の早期かつ広範な変化と脱髄病態との関連
3. 学会等名 第34回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松下拓也, 西村由宇慈, 眞崎勝久, 松瀬大, 山口浩雄, 吉良潤一, 磯部紀子
2. 発表標題 中枢神経脱髄におけるオリゴデンドログリア変性によるミクログリア活性化メカニズムの解明
3. 学会等名 第34回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口浩雄, 西村由宇慈, 松瀬大, 眞崎勝久, 田中辰典, 雑賀徹, 原田雅也, 田中謙二, 山崎亮, 磯部紀子, 吉良潤一
2. 発表標題 小脳型多系統萎縮症モデルマウスを用いた新規創薬ターゲットの探索
3. 学会等名 第40回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松瀬大, 原田幸子, 岩木三保, 齋藤聖子, 深川知栄, 橋本侑, 磯部紀子
2. 発表標題 難病診療連携コーディネーターの配置状況と業務実態 5年前の調査と比較した近年の傾向と問題点
3. 学会等名 第10回日本難病医療ネットワーク学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroo Yamaguchi, Yuji Nishimura, Dai Matsuse, Katsuhisa Masaki, Tatsunori Tanaka, Toru Saiga, Masaya Harada, Kenji Tanaka, Ryo Yamasaki, Noriko Isobe, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 Identification of synucleinopathy associated microglia in a novel mouse model of multiple system atrophy (MSA)-cerebellar type
3. 学会等名 Neuroscience 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jun-ichi Kira, Hiroo Yamaguchi, Yuji Nishimura, Dai Matsuse, Katsuhisa Masaki, Ryo Yamasaki, Noriko Isobe
2. 発表標題 Synucleinopathy-Associated Microglia Uncovered by a Novel Multiple System Atrophy-Cerebellar Type (MSA-c) Mouse Model
3. 学会等名 147th Annual Meeting American Neurological Association (国際学会)
4. 発表年 2022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・運動障害疾患コンgres
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dai Matsuse, Ryo Yamasaki, Guzailiyi Maimaitijiang, Hiroo Yamaguchi, Jun-ichi Kira, Noriko Isobe
2. 発表標題 Early decrease of peripheral blood intermediate monocytes in multiple system atrophy cerebellar-type
3. 学会等名 62nd Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nishimura Yuji, Masaki Katsuhisa, Matsuse Dai, Yamaguchi Hiroo, Saiga Toru, Tanaka Tatsunori, Sadashima Shoko, Yamasaki Ryo, Tanaka Kenji, Iwaki Toru, Kira Jun-ichi
2. 発表標題 Elimination of CSF1R-positive microglia exacerbates a novel mouse model of multiple system atroph
3. 学会等名 62nd Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaki Katsuhisa, Nishimura Yuji, Matsuse Dai, Yamaguchi Hiroo, Saiga Toru, Tanaka Tatsunori, Sadashima Shoko, Yamasaki Ryo, Tanaka Kenji, Iwaki Toru, Kira Jun-ichi
2. 発表標題 Early dysregulation of connexins in astroglia and oligodendroglia in multiple system atrophy
3. 学会等名 62nd Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (国際学会)
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
4. 発表年 2021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	山口 浩雄 (Yamaguchi Hiroo) (00701830)	九州大学・大学病院・特任講師 (17102)	
研究分担者	眞崎 勝久 (Masaki Katsuhisa) (90612903)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	

	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	原田 雅也 (Harada Masaya)	九州大学・大学院医学研究院・特別研究学生	
研究協力者	西村 由宇慈 (Nishimura Yuji)	九州大学・大学院医学研究院・大学院生	

6. 研究組織（つづき）

	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	吉良 雄一 (Kira Yuuichi)	九州大学・大学院医学研究院・大学院生	
研究協力者	吉良 潤一 (Kira Jun-ichi) (40183305)	国際医療福祉大学・医学研究科・教授 (32206)	

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