

201433005A

厚生労働科学研究委託費
創薬基盤推進研究事業

(委託業務題目) 神経変性疾患に対する革新的創薬研究のための
新たな霊長類モデルの確立

(課題番号 : H26 - 創薬 - 一般 - 005)

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 関 和彦

平成 27 年 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の創薬基盤推進研究委託事業による委託業務として、(独)国立精神・神経医療研究センターが実施した平成 26 年度「神経変性疾患に対する革新的創薬研究のための新たな霊長類モデルの確立」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費

創薬基盤推進研究事業

(委託業務題目) 神経変性疾患に対する革新的創薬研究のための
新たな霊長類モデルの確立に関する研究 (H26-創薬-一般-005)

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 関 和彦

平成27 (2015) 年 3月

委託業務成果報告書目次レイアウト (参考)

目 次

I. 委託業務成果報告 (総括)	
神経変性疾患に対する革新的創薬研究のための新たな霊長類モデルの確立	
関 和彦	----- 1
II. 委託業務成果報告 (業務項目)	
1. 遺伝子改変マーマーモセットを用いた神経変性疾患研究の総合的推進	
関 和彦	----- 5
2. ポリグルタミン病モデルマーマーモセットのヒト疾患モデルとしての妥当性の検証	
永井義隆	----- 7
3. 最新の遺伝子編集技術を用いた新たな疾患モデルマーマーモセットの開発	
富岡郁夫	----- 11
III. 学会等発表実績	----- 13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 15

神経変性疾患に対する革新的創薬研究のための新たな霊長類モデルの確立

担当責任者：関 和彦

(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所モデル動物開発研究部 部長

研究要旨 モデル動物として広く用いられる齧歯類の脳の構造や機能は解剖学的・生理学的観点からヒトと大きく異なる。従って、中枢神経系を対象とした細胞治療のモデル動物としては最適とは言い難く、動物実験での実験結果がヒト臨床で再現されないリスクがある。本研究では、第一にこの世界初の疾患モデルマーマセットのヒト疾患モデルとしての妥当性の検証を行う。そのために、当該モデル動物の病理解析及びライン化を行い、さらに発症時期を人為的に制御できるシステムを導入する。その後、開発されたモデル動物を対象とした当該疾患の化学・脳イメージング・行動バイオマーカー検索を行う。またマーマセットを対象とした遺伝子編集技術など新規の実験技術を開発する。

関 和彦・(独)国立精神・神経医療研究センター
神経研究所モデル動物開発研究部部長

永井義隆・(独)国立精神・神経医療研究センター
神経研究所疾病四部室長

富岡郁夫・信州大学 バイオメディカル研究所
助教

A. 研究目的

神経変性疾患の患者数は極めて多いが、基本的に根治可能な治療法や薬剤が存在しない。現在まで、効果的な治療薬が存在しない一因は有効な動物モデルが存在しなかったためである。本研究では、出生後に発症するヒト疾患遺伝子を導入したトランスジェニックマーマセット（ポリグルタミン病）の作出及びライン化を行い、非侵襲脳機能イメージング、マルチオミックス解析、行動評価、病理解析などからヒトにも適用可能なバイオマーカー検索を進める。

B. 研究方法

3つの研究項目を設定するが、個別に研究を進めるのではなく、頻りに相互の進展状況を確認することによって連関をとりながら研究を進めてゆ

く。研究項目は1) 遺伝子改変マーマセットを用いた神経変性疾患研究の総合的推進、2) ポリグルタミン病モデルマーマセットのヒト疾患モデルとしての妥当性の検証、3) CRISPR/CAS9システムによるパーキンソン病モデルマーマセットの作出である。

C. 結果

本年度は大別して4つの研究成果が認められた。第一に、マーマセットを対象とした自動歩様解析システムが確立した。第一世代は早期発症であり、歩行解析は困難であったが、次年度以降獲得される第二世代ラインのうち、発症時期が遅いラインがあればヒトと同様に歩行や重心動揺が発症バイオマーカーとなりうるか検討できる。これまでに確立した日内活動量計測、握力計測法と合わせてライン化個体の行動表現型解析の準備が整いつつある。第二に、第一世代の病理解析や表現型解析を終了し、論文投稿を行なった事である。この解析の結果変異 ataxin-3 遺伝子を導入したポリグルタミン病モデルトランスジェニックマーマセットが世界で初めて作成されたことが確認された。第3に非侵襲的脳機能イメージングによってマーマセット脳構造画像の定量評価を行う

技術を確立した事である。その結果、ヒトの疾患と同様の第四脳室拡大がモデル動物において認められた。この構造画像も発症前バイオマーカーの有力な候補になる。最後に、マーモセットにおいて CRISPR/CAS9 システムの開発を行い、切断効率の高い3つのベクターを得ることに成功した事である。また、さらにそれらのベクターが実際のマーモセット細胞において、ターゲットゲノムを特異的にノックアウトすることも確認できた。当該遺伝編集技術は、現在齧歯類を対象として広く用いられているが、マーモセットではまだ報告が少ない。本研究成果によって、遺伝子改変技術によるパーキンソンモデルマーモセット作出の可能性が開けてきた。

D. 考察

プロジェクト1年目は、主に第一世代の解析やライン化に向けた主に発生工学的な研究環境・研究技術の確立、及びパーキンソンモデルのための技術開発を行い、上記の通りそれぞれ成果が上がった。次年度は、第二世代の獲得に注力し、また新たに脳機能イメージングの専門家を分担研究者に迎えて、第二世代を対象としたバイオマーカー検索研究を本格化させる必要がある。

E. 結論

第一世代の行動や病理解析結果をまとめて検討することによって、ポリグルタミン病モデルマーモセットの基本的な表現型解析技術は確立した。また、当該モデルの次世代獲得、遺伝子編集技術によるパーキンソン病モデル作出の準備が整った。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. PUENTES, T. KAIDO, T. HANAKAWA, N. ICHINOHE, T. OTSUKI AND K. SEKI. Internal capsule stroke in the common marmoset: *Neuroscience* 284 400-411, 2015
- 2) 大屋知徹・関和彦 中脳赤核と運動機能一

系統発生的観点から一 Red Nucleus and Its Motor Function - A Phylogenetic Perspective- *Spinal Surgery* 28(3) 258-263, 2014

- 3) Saitoh Y., Fujikake N., Okamoto Y., Popiel H.A., Hatanaka Y., Ueyama M., Suzuki M., Gaumer S., Murata M., Wada K., *Nagai Y. p62 plays a protective role in the autophagic clearance of polyglutamine aggregates in polyglutamine disease model flies. *J. Biol. Chem.* 290(3): 1442-1453 (2015)
- 4) Miura E., Hasegawa T., Konno M., Suzuki M., Sugeno N., Fujikake N., Geisler S., Tabuchi M., Oshima R., Kikuchi A., Baba T., Wada K., Nagai Y., Takeda A., Aoki M. VPS35 dysfunction causes retromer depletion and impairs lysosomal degradation of α -synuclein, leading to exacerbation of α -synuclein neurotoxicity in *Drosophila*. *Neurobiol. Dis.* 71: 1-13 (2014)
- 5) Azuma Y., Tokuda T., Shimamura M., Kyotani A., Sasayama H., Yoshida T., Mizuta I., Mizuno T., Nakagawa M., Fujikake N., Ueyama M., Nagai Y., Yamaguchi M. Identification of ter94, *Drosophila* VCP, as a strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of Caz, *Drosophila* FUS. *Hum. Mol. Genet.* 23(13): 3467-3480 (2014)
- 6) Takeuchi T., Popiel H.A., Futaki S., Wada K., *Nagai Y. Peptide-based therapeutic approaches for treatment of the polyglutamine diseases. *Curr. Med. Chem.* 21(23): 2575-2582 (2014)
- 7) 上山盛夫、藤掛伸宏、永井義隆. その他のFTLD—異常蛋白の視点から. *Clinical Neuroscience* 33 (3): 312-314 (2015)
- 8) 永井義隆. ポリグルタミン病における神経変性. *BRAIN MEDICAL* 26 (3): 225-229 (2014)

2. 学会発表

- 1) 大屋知徹、武井智彦、関和彦: 運動駆動細胞群の筋シナジー創出機構, 平成26年度生理学研究所研究会「行動システム脳科学の新展開」, 生理学研究所 20150109-10
- 2) H. Yaguchi, D. Kowalski, T. Takei and K. Seki: Posture dependency of the twitch responses induced by intraspinal microstimulation to the primate spinal cord, Society for Neuroscience 2014, Washington D.C., 11.15-19
- 3) K. Seki: Subcortical control of voluntary movement, 18th Thai Neuroscience Society Conference 2014 and 2nd CU-NIPS Symposium "Frontier in Neuroscience Research", Bangkok, Thailand, December 22-23, 2014
- 4) 大屋知徹, 武井智彦, 関和彦: 赤核の回路と

- 機能における推察, 第 8 回 Motor Control 研究会, つくば, 8.7-8.9, 2014
- 5) 荻原直道, 斉藤剛, 武井智彦, 関和彦: 3次元筋骨格モデルに基づくニホンザル精密把握動作の逆力学解析, Inverse dynamic analysis of precision grip in the Japanese macaque based on a three-dimensional musculoskeletal model. 第 37 回日本神経科学大会, 横浜, 9.11-9.13, 2014
 - 6) 大屋知徹, 武井智彦, 関和彦: 異なる下行路系から生み出される筋投射構造と筋シナジーへの収斂, 第 37 回日本神経科学大会, 横浜, 9.11-9.13, 2014
 - 7) 関和彦, 梅田達也: 完全埋め込み型 ECoG 記録・送信システムの開発に関わる基礎研究, 革新脳キックオフミーティング, 名古屋, 12.24, 2014
 - 8) 富岡郁夫, 石橋英俊, 本橋秀之, 高山修, 斉藤裕子, 皆川栄子, ポピエルヘレナ明子, プエンテスサンドラ, 山本和弘, 野口悟, 米川貴博, 田中洋子, 藤田尚子, 鈴木ひかる, 菊池寿枝, 相澤修, 尾張健介, 中谷輝実, 長野清一, 山田大輔, 西野一三, 一戸紀孝, 和田圭司, 高坂新一, 永井義隆, 関和彦: ポリグルタミン病マーモセットの作出, NCNP 研究所発表会, 小平, 3.4-5, 2015
 - 9) 尾張健介, 藤田尚子, 中谷輝実, 富岡郁夫, 関和彦: CRISPR/Cas9 System によるコモナーモセット標的遺伝子改変, NCNP 研究所発表会, 小平, 3.4-5, 2015
 - 10) Nagai Y. Misfolding and aggregation of the polyglutamine protein and its suppression by intercellular transmission of molecular chaperone. Hungary-Japanese Symp on Mechanism and regulation of aberrant protein aggregation (Nov 17-21, 2014, Osaka, Japan)
 - 11) Minakawa et al. Investigating the role of ubiquilin-2 in the pathomechanism of ALS/FTD. GRC on Neurobiol Brain Dis (Jul 27-Aug 1, 2014, Girona, Spain)
 - 12) Nagai Y., et al. Dysfunction of microtubule-dependent transport triggers oligomerization and cytoplasmic accumulation of TDP-43, leading to neurodegeneration. CSHL 2014 Neurodeg Dis meeting (Dec 3-6, 2014, CSH, NY, USA)
 - 13) Saitoh Y., et al. p62 plays a protective role in the autophagic degradation of polyglutamine protein oligomers in polyglutamine disease model flies. CSHL 2014 Neurodeg Dis meeting (Dec 3-6, 2014, CSH, NY, USA)
 - 14) Ishiguro T., et al. Expanded UGGAA repeat RNA associated with SCA31 causes progressive neurodegeneration in Drosophila. CSHL 2014 Neurodeg Dis meeting (Dec 3-6, 2014, CSH, NY, USA)
 - 15) 永井義隆, 他. 2光子 in vivo イメージング解析による SCA1 マウスにおけるシナプス異常の解明. 第 55 回 日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24, 福岡)
 - 16) 藤掛伸宏, 他. DCTN1 依存的輸送の障害は TDP-43 のオリゴマー形成を促進する. 第 55 回 日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24, 福岡)
 - 17) 鈴木マリ, 他. ポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する. 第 55 回 日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24, 福岡)
 - 18) 斉藤勇二, 他. ポリグルタミン病モデルにおいて p62 はオートファジー分解系を介して保護的に作用する. 第 55 回 日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24, 福岡)
 - 19) Minakawa E.N., et al. Investigating the Role of Ubiquilin-2 in the Pathomechanism of ALS/FTD. 第 55 回 日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24, 福岡)
 - 20) 東裕美子, 他. FUS-ALS モデルショウジョウバエの表現型を修飾する因子の探索. 第 55 回 日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24, 福岡)
 - 21) 三浦永美子, 他. VPS35 障害はカテプシン D 活性低下を介し α シヌクレイン蓄積・神経変性を惹起する. 第 55 回 日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24, 福岡)
 - 22) 石黒太郎, 他. SCA31 (UGGAA)_n リピートはショウジョウバエで進行性神経障害を引き起こす. 第 55 回 日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24, 福岡)
 - 23) 鈴木マリ, 他. 神経変性疾患モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する. 第 37 回 日本神経科学学会 (H26.9.11-13, 横浜)
 - 24) 斉藤勇二, 他. p62/SQSTM1 はポリグルタミン病モデルショウジョウバエにおいて、ポリグルタミン蛋白質凝集体をオートファジー分解系で除去することで保護的役割を果たす. 第 37 回 日本神経科学学会 (H26.9.11-13, 横浜)
 - 25) Minakawa et al. Investigating the role of ubiquilin-2 in the pathomechanism of ALS/FTD. 第 37 回 日本神経科学学会 (H26.9.11-13, 横浜)
 - 26) 石黒太郎, 他. 異常伸長 UGGAA リピート RNA はショウジョウバエにおいて神経毒性を引き起こす. 第 37 回 日本神経科学学会 (H26.9.11-13, 横浜)
 - 27) 上山盛夫, 他. GGGGCC リピート RNA を発現する新規 ALS モデルショウジョウバエの樹立と病態解析. 第 86 回 日本遺伝学会大会 (H26.9.17-19, 長浜)
 - 28) 永井義隆, 他. 微小管依存的 TDP-43 輸送の障害はオリゴマー形成を促進し、神経変

性を惹き起こす。第 33 回 日本認知症学会
学術集会（H26.11.29-12.1、横浜）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

遺伝子改変マーモセットを用いた神経変性疾患研究の総合的推進

担当責任者：関 和彦

(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所モデル動物開発研究部 部長

研究要旨 本研究では、遺伝子改変マー

モセットの作出や維持からバイオマーカー検索に至るまでの技術開発や至適環境の検討を包括的に実施した。具体的には疾患マーモセットの飼育に適切な給餌や飼育諸環境の検討や、遺伝子改変動物作出に必要な人的・物的環境整備、疾患別にみた発症動物の飼育技術の開発、病理解析環境の整備、などを行なった。また遺伝子改変動物に欠かせない安定した仮親の効率的育成方法の検討などを行なった。さらに、研究成果報告会を企画・運営を行なった。また遺伝子改変マーモセットの行動評価として、日内活動量や握力の計測方法を改善するとともに、歩行機能評価を新たに確立した。

研究協力者：

尾張健介 (独) 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 科研費研究員

藤田尚子 同上 科研費研究員

中林円 同上 流動研究員

中谷輝実 同上 科研費補助員

(例えば、摂食機能の低下が顕著になった場合の給餌技術、移動機能が低下した場合の介護技術など)の確立を本プロジェクト専任の獣医師とともに行った。胚回収などの際の麻酔管理の安全性の向上、病理解析環境の整備などを購入機器の検討などを通して実現した。また、分担研究者の移動に伴う、研究体制の再構成を実施した。

A. 研究目的

本委託費研究では遺伝子改変技術を用いた神経変性疾患モデルマーモセットを作出し、作出された動物を用いて疾患バイオマーカーの確立と創薬研究への展開する事が目的である。本研究では計画されている複数の研究が円滑に進展するようなプロジェクトの統括、個体維持環境整備、表現型評価に必須の行動評価方法を確立する事が目的である。

B. 研究方法

他の研究項目及び本計画内の行動評価方法の進展に合わせて、個体の飼育管理技術の更新を行う。ライン化個体の獲得に備えて、より簡便に行うことのできる行動評価方法を確立する。論文発表前のため非公開の研究成果報告会を実施する。

C. 結果

プロジェクトの総合推進

本年度は研究項目2及び3を円滑に進めるための研究環境の整備を行った。具体的には、神経変性疾患発症個体を性成熟まで維持するために必要な飼育技術

マーモセットの行動評価に関わる技術開発

発症個体の日内活動量や握力と病態との関連についての解析結果から、適切な計測方法の検討を行った。歩様解析については、自動解析ソフトを用いて、齧歯類用の測定パラメタを変更してマーモセットに適用した。具体的には、足圧センサを、マーモセットに合わせて増量すると同時に、マーモセットの重力方向の動きを制限するために専用のアクリルトンネルの中で歩行計測に成功した。また、歩行開始前の静止に重心動揺を定量的に解析することに成功した。

研究成果報告会の実施

1月26日に神経研究所本館第二会議室において研究成果報告会を実施した。プロジェクト関係者18名の参加があり、今後のプロジェクトの進め方などについて意見交換がなされた。

D. 考察

プロジェクトの総合推進という観点からは研究分担者の年度途中の異動に対して、発生工学的手法の変更が必要になり、それに伴う研究機器の整

備などを円滑に行うことができた。行動評価についても一定の進展があったと評価して良い。

E. 結論

次年度は本年度の研究体制を維持するとともに、モデル動物のライン化を実現するため、研究環境の調整を遅延なく行う必要がある。また、来年度からは非侵襲的脳機能イメージングを専門とする研究者の新規参加が予定されているので、MRIやPET撮像を行うための個体の準備を行う。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. PUENTES, T. KAIDO, T. HANAKAWA, N. ICHINOHE, T. OTSUKI AND K. SEKI. Internal capsule stroke in the common marmoset: Neuroscience 284 400-411, 2015
- 2) 大屋知徹・関和彦 中脳赤核と運動機能—系統発生的観点から— Red Nucleus and Its Motor Function - A Phylogenetic Perspective - Spinal Surgery 28(3) 258-263, 2014

2. 学会発表

- 1) 大屋知徹、武井智彦、関和彦: 運動駆動細胞群の筋シナジー創出機構, 平成26年度生理学研究所研究会「行動システム脳科学の新展開」, 生理学研究所 20150109-10
- 2) H. Yaguchi, D. Kowalski, T. Takei and K. Seki: Posture dependency of the twitch responses induced by intraspinal microstimulation to the primate spinal cord, Society for Neuroscience 2014, Washington D.C., 11.15-19
- 3) K. Seki: Subcortical control of voluntary movement, 18th Thai Neuroscience Society Conference 2014 and 2nd CU-NIPS Symposium “Frontier in Neuroscience Research”, Bangkok, Thailand, December 22-23, 2014
- 4) 大屋知徹, 武井智彦, 関和彦: 赤核の回路と機能における推察, 第8回 Motor Control 研究会, つくば, 8.7-8.9, 2014
- 5) 荻原直道、斉藤剛、武井智彦、関和彦: 3次元筋骨格モデルに基づくニホンザル精密把握動作の逆動力学解析, Inverse dynamic analysis of precision grip in the Japanese macaque based on a three-dimensional musculoskeletal model. 第37回日本神経科学大会, 横浜, 9.11-9.13, 2014
- 6) 大屋知徹、武井智彦、関和彦: 異なる下行路系から生み出される筋投射構造と筋シナジーへの収斂, 第37回日本神経科学大会,

横浜, 9.11-9.13, 2014

- 7) 関和彦, 梅田達也: 完全埋め込み型 ECoG 記録・送信システムの開発に関わる基礎研究, 革新脳キックオフミーティング, 名古屋, 12.24, 2014
- 8) 富岡郁夫, 石橋英俊, 本橋秀之, 高山修, 斉藤裕子, 皆川栄子, ポピエルヘレナ明子, プエンテスサンドラ, 山本和弘, 野口悟, 米川貴博, 田中洋子, 藤田尚子, 鈴木ひかる, 菊池寿枝, 相澤修, 尾張健介, 中谷輝実, 長野清一, 山田大輔, 西野一三, 一戸紀孝, 和田圭司, 高坂新一, 永井義隆, 関和彦: ポリグルタミン病マーマーモセットの作出, NCNP 研究所発表会, 小平, 3.4-5, 2015
- 9) 尾張健介, 藤田尚子, 中谷輝実, 富岡郁夫, 関和彦: CRISPR/Cas9 System によるコモンマーマーモセット標的遺伝子改変, NCNP 研究所発表会, 小平, 3.4-5, 2015

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

ポリグルタミン病モデルマーマセットのヒト疾患モデルとしての妥当性の検証

担当責任者：永井 義隆（独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所 室長

研究要旨 本研究では、脳の構造・機能や代謝経路がヒトに近い霊長類のうち、最近遺伝子改変技術が確立されたマーマセットを用いて、世界初のポリグルタミン病モデルマーマセットの作製に成功した。変異 ataxin-3 遺伝子を導入した脊髄小脳失調症 3 型モデルトランスジェニックマーマセットのうち、3 頭において生後 3-4 カ月頃より体重増加率低下、進行性の日内活動量低下、筋力低下などの神経症状を発症した。うち 1 頭では、脳 MRI 解析にて小脳第 4 脳室の有意な開大を認めた。病理学的解析の結果、小脳、脊髄などで神経変性を認め、脳幹、脊髄などで抗ポリグルタミン抗体陽性の封入体、ミクログリアの活性化を認めた。筋肉においてもポリグルタミン封入体、慢性筋原性変化を認めた。以上のことから、ヒトポリグルタミン病病態を反映する世界初のトランスジェニックマーマセットの樹立に成功した。

研究協力者：

皆川 栄子 同上 科研費研究員

菊地 寿枝 同上 科研費研究補助員

A. 研究目的

日本では高齢化社会を迎え、加齢に伴って発症するアルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病などの難治性神経変性疾患を克服することは厚生労働行政上の重要な課題である。これらの疾患の病態解明・治療法開発へ向けて、これまで様々な遺伝子改変疾病モデルマウスが開発されてきたが、げっ歯類は脳の解剖学的構造・生理学的機能や代謝経路がヒトとは大きく異なるという問題点がある。ヒト疾患病態をより正確に反映し、前臨床研究に適した疾患モデルを確立するために、脳の構造・機能や代謝経路がヒトに近い霊長類を用いた疾病モデルの開発が急務である。霊長類のうち、繁殖効率の高さからモデル動物としての適性が高いマーマセットについて、遺伝子改変技術が最近確立されたが、ヒト疾患モデルは未だ開発されていない。

私たちはこれまでに、遺伝子改変技術による病態再現性に優れかつ早期発症が期待できるポリグルタミン病に着目し、その一つ脊髄小脳失調症 3 型（SCA3）モデルのトランスジェニックマ-

マセットを作製した。ポリグルタミン病は、原因蛋白質内のポリグルタミン鎖の異常伸長（>約 40 回）により発症する 9 つの神経変性疾患の総称であり、アルツハイマー病など他疾患と同様に異常蛋白質のミスフォールディング・凝集により共通の分子メカニズムで発症すると考えられている。

本研究では、私たちが作出に成功したポリグルタミン病モデルマーマセットについて、その病態解析を行って、ヒト疾患モデルとしての妥当性を検証し、疾患バイオマーカーを開発することを目的として、以下の研究を行った。

B&C. 研究方法、結果

1) ポリグルタミン病モデルマーマセットの樹立

ポリグルタミン病の中でも世界的に高頻度である脊髄小脳失調症 3 型（SCA3）を対象とし、原因遺伝子 ataxin-3 内に 120 回の異常伸長 CAG リピート配列を挿入した変異遺伝子を CMV プロモーター下に組み込んだレンチウイルスベクターを作製し、マーマセット初期胚に感染させ、胚移植、妊娠を経て、計 7 頭の産仔を得た。産仔の胎盤や線維芽細胞の PCR 解析により確かに変異 ataxin-3 遺伝子が導入されていることを確認した。

2) ポリグルタミン病モデルマーモセットの行動解析

作製したSCA3トランスジェニックマーモセットについて、経時的にビデオ観察、赤外線センサーによる日内活動量測定、握力測定計による筋力測定などを行った。その結果、7頭中変異 ataxin-3 遺伝子発現量が比較的高い3頭において、生後3-4カ月頃より体重増加率が低下し、徐々に日内活動量の低下、筋力低下などの表現型が出現し、徐々に進行した。進行期には、四肢の筋力低下・関節拘縮が進行し、自力での歩行、摂食が困難となった。

このうち比較的重症の MJD1 について、13.5ヶ月齢の時点で脳 MRI 解析を行った結果、小脳第4脳室の有意な開大を認めた。

3) ポリグルタミン病モデルマーモセットの病理学的解析

上記の発症 SCA3トランスジェニックマーモセットのうち、病態の進行により体重増加率がほぼ0となり、自力での摂餌が不可能となった2頭について、国の法律・指針および当研究機関の霊長類研究施設倫理指針を遵守の下、安楽殺実験を行った。病理学的解析の結果、小脳、脊髄などで神経細胞の変性・脱落を認め、脳幹、脊髄など広範囲に抗ポリグルタミン抗体陽性の封入体、ミクログリアの活性化を認めた。筋肉においてもポリグルタミン封入体を認め、Rimmed vacuole の出現を伴う慢性筋原性変化を認めた。肝臓など他の末梢臓器については、明らかな異常を認めなかった。生化学的解析では、RT-PCR、Western blot により脳、脊髄などの中枢神経のみならず、末梢臓器広範囲に変異 ataxin-3 遺伝子の発現を認めた。

(倫理面への配慮)

本研究では、実験動物の取り扱いにあたっては国の法律・指針および国立精神・神経医療研究センター霊長類研究施設倫理指針を遵守した。

D. 考察

以上の結果より、ヒトポリグルタミン病病態を

反映する世界初のトランスジェニックマーモセットの樹立に成功した。まずは得られた F0 founder から変異遺伝子の伝達を確認された次世代 F1 を得て、遺伝学的に均一なポリグルタミン病モデルマーモセット系統の樹立を目指す。

今後、これまでマウスモデルを用いた研究から同定された治療薬候補化合物に対して、新規ポリグルタミン病モデルマーモセットを用いた薬効・安全性評価を行い、ヒト患者への臨床応用可能な治療薬開発を目指す。そして、比較的採取が容易である血液、尿、脳脊髄液などを経時的に採取し、マルチオミックス解析により病態を反映し、かつ発症前から検出可能な鋭敏な疾患バイオマーカーを開発する。さらに、MRI や PET などを用いた非侵襲的脳機能画像解析により、発症前から神経症状発現、最終病理像完成までに至る過程の脳機能形態変化、その進行様式を明らかにする。

E. 結論

変異 ataxin-3 遺伝子を導入したポリグルタミン病モデルトランスジェニックマーモセットの作製に成功した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saitoh Y., Fujikake N., Okamoto Y., Popiel H.A., Hatanaka Y., Ueyama M., Suzuki M., Gaumer S., Murata M., Wada K., *Nagai Y. p62 plays a protective role in the autophagic clearance of polyglutamine aggregates in polyglutamine disease model flies. *J. Biol. Chem.* 290(3): 1442-1453 (2015)
- 2) Miura E., Hasegawa T., Konno M., Suzuki M., Sugeno N., Fujikake N., Geisler S., Tabuchi M., Oshima R., Kikuchi A., Baba T., Wada K., Nagai Y., Takeda A., Aoki M. VPS35 dysfunction causes retromer depletion and impairs lysosomal degradation of α -synuclein, leading to exacerbation of α -synuclein neurotoxicity in *Drosophila*. *Neurobiol. Dis.* 71: 1-13 (2014)
- 3) Azuma Y., Tokuda T., Shimamura M., Kyotani A., Sasayama H., Yoshida T., Mizuta I., Mizuno T., Nakagawa M., Fujikake N., Ueyama M., Nagai Y., Yamaguchi M. Identification of *ter94*, *Drosophila VCP*, as a strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of

Caz, Drosophila FUS. Hum. Mol. Genet. 23(13): 3467-3480 (2014)

- 4) Takeuchi T., Popiel H.A., Futaki S., Wada K., *Nagai Y. Peptide-based therapeutic approaches for treatment of the polyglutamine diseases. *Curr. Med. Chem.* 21(23): 2575-2582 (2014)
- 5) 上山盛夫、藤掛伸宏、永井義隆. その他のFTLD—異常蛋白の視点から. *Clinical Neuroscience* 33 (3): 312-314 (2015)
- 6) 永井義隆. ポリグルタミン病における神経変性. *BRAIN MEDICAL* 26 (3): 225-229 (2014)

2. 学会発表

- 1) Nagai Y. Misfolding and aggregation of the polyglutamine protein and its suppression by intercellular transmission of molecular chaperone. *Hungary-Japanese Symp on Mechanism and regulation of aberrant protein aggregation* (Nov 17-21, 2014, Osaka, Japan)
- 2) Minakawa et al. Investigating the role of ubiquilin-2 in the pathomechanism of ALS/FTD. *GRC on Neurobiol Brain Dis* (Jul 27-Aug 1, 2014, Girona, Spain)
- 3) Nagai Y., et al. Dysfunction of microtubule-dependent transport triggers oligomerization and cytoplasmic accumulation of TDP-43, leading to neurodegeneration. *CSHL 2014 Neurodeg Dis meeting* (Dec 3-6, 2014, CSH, NY, USA)
- 4) Saitoh Y., et al. p62 plays a protective role in the autophagic degradation of polyglutamine protein oligomers in polyglutamine disease model flies. *CSHL 2014 Neurodeg Dis meeting* (Dec 3-6, 2014, CSH, NY, USA)
- 5) Ishiguro T., et al. Expanded UGGAA repeat RNA associated with SCA31 causes progressive neurodegeneration in *Drosophila*. *CSHL 2014 Neurodeg Dis meeting* (Dec 3-6, 2014, CSH, NY, USA)
- 6) 永井義隆、他. 2光子 in vivo イメージング解析による SCA1 マウスにおけるシナプス異常の解明. 第55回日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24、福岡)
- 7) 藤掛伸宏、他. DCTN1 依存的輸送の障害は TDP-43 のオリゴマー形成を促進する. 第55回日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24、福岡)
- 8) 鈴木マリ、他. ポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する. 第55回日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24、福岡)
- 9) 斉藤勇二、他. ポリグルタミン病モデルにおいて p62 はオートファジー分解系を介して保護的に作用する. 第55回日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24、福岡)
- 10) Minakawa E.N., et al. Investigating the Role of Ubiquilin-2 in the Pathomechanism of ALS/FTD. 第55回日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24、福岡)

- 11) 東裕美子、他. FUS-ALS モデルショウジョウバエの表現型を修飾する因子の探索. 第55回日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24、福岡)
- 12) 三浦永美子、他. VPS35 障害はカテプシン D 活性低下を介し α シヌクレイン蓄積・神経変性を惹起する. 第55回日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24、福岡)
- 13) 石黒太郎、他. SCA31 (UGGAA)_n リピートはショウジョウバエで進行性神経障害を引き起こす. 第55回日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24、福岡)
- 14) 鈴木マリ、他. 神経変性疾患モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する. 第37回日本神経科学学会 (H26.9.11-13、横浜)
- 15) 斉藤勇二、他. p62/SQSTM1 はポリグルタミン病モデルショウジョウバエにおいて、ポリグルタミン蛋白質凝集体をオートファジー分解系で除去することで保護的役割を果たす. 第37回日本神経科学学会 (H26.9.11-13、横浜)
- 16) Minakawa et al. Investigating the role of ubiquilin-2 in the pathomechanism of ALS/FTD. 第37回日本神経科学学会 (H26.9.11-13、横浜)
- 17) 石黒太郎、他. 異常伸長 UGGAA リピート RNA はショウジョウバエにおいて神経毒性を引き起こす. 第37回日本神経科学学会 (H26.9.11-13、横浜)
- 18) 上山盛夫、他. GGGGCC リピート RNA を発現する新規 ALS モデルショウジョウバエの樹立と病態解析. 第86回日本遺伝学会大会 (H26.9.17-19、長浜)
- 19) 永井義隆、他. 微小管依存的 TDP-43 輸送の障害はオリゴマー形成を促進し、神経変性を惹き起こす. 第33回日本認知症学会学術集会 (H26.11.29-12.1、横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

最新の遺伝子編集技術を用いた新たな疾患モデルマーマーモセットの開発

担当責任者： 富岡 郁夫 信州大学 バイオメディカル研究所 助教

研究要旨

中枢神経系疾患に対する創薬における大きなハードルが動物実験からヒト臨床試験への移行 (translation) である。これまで多くの前臨床試験はラットやマウスなどの齧歯類を用いて行われてきた。しかし、齧歯類の脳の構造や機能は解剖学的・生理学的観点からヒトと大きく異なり、中枢神経系を対象としたモデル動物としては最適とは言えない。そこで本研究においては、遺伝子改変技術を用いた神経変性疾患モデルマーマーモセットを作出し、作出された動物を用いて疾患バイオマーカーの確立と創薬研究への展開を目標とする。

A. 研究目的

近年、TALEN や Zinc-finger nuclease といった特異的にゲノム編集可能な技術が発展し、2013年には原核生物の獲得免疫システムを利用した CRISPR/Cas9 System によるマウスのゲノム編集が報告され、その後この System を使用してさまざまな生物種でのゲノム編集が行われている。CRISPR/Cas9 が急速に普及した理由として、そのデザインの簡便さが挙げられ、標的配列中の PAM 配列 (NGG) と、隣接する 20 塩基からなる sgRNA (single guide RNA) をデザインするだけで適用できるところにある。

一方、小型霊長類のコモンマーマーモセット（以下マーマーモセット）については、2009年にトランスジェニック技術が確立されたが、上記のような技術を用い特異的に標的遺伝子の改変を行った報告はされていない。そこで本研究は CRISPR/CAS9 システムを疾患モデルマーマーモセットの作出に最適化し、それを用いてパーキンソン病など社会的需要の高い疾患モデルマーマーモセットの作出をおこなう。この目的を達成するため、本年度は in vitro の細胞評価系を用いて、CRISPR/Cas9 ベクターの構築および検証をおこなった。

B. 研究方法

本年度は CRISPR/CAS9 システムをマーマーモセットを対象とした発生工学に用いるための基礎

的技術の開発をおこなった。

1. 標的疾患のガイド RNA を持った CRISPR/CAS9 ベクターの作製

パーキンソン病の原因遺伝子の一つである PARK2 遺伝子 Exon2 をターゲットとし、sgRNA デザインソフトの CRISPR direct を利用し、特異性が高いと予想される 5 種類の sgRNA/Cas9 発現ベクターを作製した。

2. 最適な CRISPR/CAS9 ベクターの選択

マーマーモセット PARK2 Exon2 周辺領域をクローニングし、293 細胞内での各々の sgRNA と Cas9 nuclease によるターゲット切断効率を、ターゲットの切断と修復により GFP が発現する実験系で検証した。さらに、マーマーモセット内在性 PARK2 Exon2 に対して CRISPR/Cas9 System が機能するか確認するため、野生型マーマーモセット骨髄細胞に sgRNA および Cas9 発現ベクターを導入し、ゲノムからターゲット領域を増幅、変性、リアニリング後、heteroduplex DNA を認識し、切断する T7E1 nuclease を用いることで、ターゲット領域内に塩基の挿入、欠失といった改変が生じているか、T7E1 assay を用いて確認した。

（倫理面への配慮）

組換え DNA 実験および動物実験に関して、国

が定める法律・基本指針および国立精神・神経医療研究センター霊長類研究施設倫理指針を遵守して実施した。

C. 研究結果

作製した 5 種類の CRISPR/CAS9 ベクターうち、ヒト株化細胞を用いてノックアウト効率の良いベクターを 3 種類に絞り込んだ。さらに、この 3 種類のベクターを導入したマーモセット細胞を用い T7E1 アッセイを行った結果、全てのサンプルにおいて T7E1 による DNA 切断が起こっていた。よって、マーモセット細胞を用いて標的遺伝子がノックアウトされている事を確認した。

D. 考察

マーモセットにおいて CRISPR/CAS9 システムの開発をおこなった結果、切断効率の高い 3 つのベクターを得ることに成功した、さらにそれらのベクターが実際のマーモセット細胞において、ターゲットゲノムを特異的にノックアウトすることが分かった。霊長類において Park2 ノックアウト動物の作出は報告されておらず、新規性の高い研究である。

E. 結論

本年度はノックアウトマーモセット作出の準備が全て整った。来年度からノックアウト動物の作出を試みる。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

富岡郁夫. ポリグルタミン病モデルマーモセットの作出. 国立精神・神経医療研究センター研究所発表会 (2015.03.05.)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「神経変性疾患に対する革新的創薬研究のための新たな霊長類モデルの確立」

機関名 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
運動駆動細胞群の筋シナジー創出機構	大屋知徹、武井智彦、関和彦	平成26年度生理学研究所研究会「行動システム脳科学の最新展開」,生理学研究所	2015年1月9日	国内
Posture dependency of the twitch responses induced by intraspinal microstimulation to the primate spinal cord	H. Yaguchi, D. Kowalski, T. Takei and K. Seki	Society for Neuroscience2014, Washington D.C.	2014年11月15日	国外
Subcortical control of voluntary movement	K. Seki	18th Thai Neuroscience Society Conference 2014 and 2nd CUNIPS Symposium "Frontier in Neuroscience Research", Bangkok, Thailand	2014年12月22日	国外
赤核の回路と機能における推察	大屋知徹、武井智彦、関和彦	第8回Motor Control研究会, つくば	2014年8月7日	国内
3次元筋骨格モデルに基づくニホンザル精密把握動作の逆動力学解析	荻原直道、斉藤剛、武井智彦、関和彦	第37回日本神経科学大会, 横浜	2014年9月11日	国内
異なる下行路系から生み出される筋投射構造と筋シナジーへの収斂	大屋知徹、武井智彦、関和彦	第37回日本神経科学大会, 横浜	2014年9月11日	国内
完全埋め込み型ECOG記録・送信システムの開発に関わる基礎研究	関和彦、梅田達也	革新脳キックオフミーティング,名古屋	2014年12月24日	国内
ポリグルタミン病マーマーセットの作出	富岡備夫, 石橋英俊, 本橋秀之, 高山修, 斉藤裕子, 皆川栄子, ポピエールヘレナ明子, プエンテスサンドラ, 山本和弘, 野口悟, 米川貴博, 田中洋子, 藤田尚子, 鈴木ひかる, 菊池寿枝, 相澤修, 尾張健介, 中谷輝実, 長野清一, 山田大輔, 西野一三, 一戸紀孝, 和田圭司, 高坂新一, 永井義隆, 関和彦	NCNP研究所発表会, 小平	2015年3月5日	国内
CRISPR/Cas9 Systemによるコモンマーマーセット標的遺伝子改変	尾張健介、藤田尚子、中谷輝実、富岡備夫、関和彦	NCNP研究所発表会, 小平	2015年3月5日	国内
Misfolding and aggregation of the polyglutamine protein and its suppression by intercellular transmission of molecular chaperone. (口頭)	Nagai Y.	Hungary-Japanese Symposium on Mechanism and regulation of aberrant protein aggregation	2014年11月19日	国外
Investigating the Role of Ubiquitin-2 in the Pathomechanism of ALS/FTD. (ポスター)	Minakawa E.N., Sharkey L.M., Chen K.-C., Thayer M., Lyons J., Ivanova M., Wada K., Nagai Y., Paulson H.L.	Gordon Research Conference on Neurobiology of Brain Disorders	2014年7月27日	国外
Dysfunction of microtubule-dependent transport triggers oligomerization and cytoplasmic accumulation of TDP-43, leading to neurodegeneration. (ポスター)	Nagai Y., Fujikake N., Kimura N., Saitoh Y., Hatanaka Y., Onodera O., Wada K.	CSHL 2014 Neurodegenerative Diseases meeting: Biology & Therapeutics	2014年12月4日	国外
p62 plays a protective role in the autophagic degradation of polyglutamine protein oligomers in polyglutamine disease model flies. (ポスター)	Saitoh Y., Fujikake N., Okamoto Y., Wada K., Nagai Y.	CSHL 2014 Neurodegenerative Diseases meeting: Biology & Therapeutics	2014年12月4日	国外
Expanded UGGAA repeat RNA associated with SCA31 causes progressive neurodegeneration in <i>Drosophila</i> . (ポスター)	Ishiguro T., Fujikake N., Sato N., Ueyama, M., Mizusawa H., Wada K., Nagai Y., Ishikawa K.	CSHL 2014 Neurodegenerative Diseases meeting: Biology & Therapeutics	2014年12月4日	国外
2光子 in vivo イメージング解析によるSCA1マウスにおけるシナプス異常の解	永井義隆、畑中悠佑、和田圭司	第55回日本神経学会学術大会	2014年5月21日	国内
DCTN1 依存的輸送の障害はTDP-43のオリゴマー形成を促進する(口頭)	藤掛伸宏、本村辰之、長野清一、斉藤勇二、横関明男、小野孝理、和田圭司、永井義隆	第55回日本神経学会学術大会	2014年5月21日	国内
ポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する(口頭)	鈴木マリ、藤掛伸宏、和田圭司、永井義隆	第55回日本神経学会学術大会	2014年5月21日	国内
ポリグルタミン病モデルにおいてp62はオートファジー分解系を介して保護的に作用する(口頭)	斉藤勇二、藤掛伸宏、岡本佑馬、和田圭司、永井義隆	第55回日本神経学会学術大会	2014年5月21日	国内

Investigating the Role of Ubiquitin-2 in the Pathomechanism of ALS/FTD. (口頭)	Minakawa E.N., Sharkey L.M., Chen K.-C., Thayer M., Lyons J., Ivanova M., Wada K., Nagai Y., Paulson H.L.	第55回 日本神経学会学術大会	2014年5月21日	国内
FUS-ALSモデルショウジョウバエの表現型を修飾する因子の探索(ポスター)	東裕美子、徳田隆彦、京谷茜、吉田誠克、木田依久子、水野俊樹、中川正法、藤掛伸宏、上山盛夫、永井義隆、山口政光	第55回 日本神経学会学術大会	2014年5月21日	国内
VPS35障害はカテプシンD活性低下を介し α シヌクレイン蓄積・神経変性を惹起する(ポスター)	二浦永美子、長谷川隆文、今野昌俊、菅野直人、大嶋龍児、菊池昭夫、鈴木マリ、永井義隆、武田 健、森本正志	第55回 日本神経学会学術大会	2014年5月21日	国内
SCA31 (UGGAA)nリピートはショウジョウバエで進行性神経障害を引き起こす(ポスター)	石黒太郎、石川欽也、藤掛伸宏、上山盛夫、永井義隆、和田圭司、水澤英洋	第55回 日本神経学会学術大会	2014年5月21日	国内
神経変性疾患モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する(口頭)	鈴木マリ、Anne-Marie Neumann、斎藤勇二、藤掛伸宏、和田圭司、永井義隆	第37回 日本神経科学会	2014年9月11日	国内
p27 ^{Skip} はポリグルタミン病モデルショウジョウバエにおいて、ポリグルタミン蛋白質凝集体をオートファジー分解系で除去することで保護的役割を果たす(口頭)	斎藤勇二、藤掛伸宏、岡本佑馬、和田圭司、永井義隆	第37回 日本神経科学会	2014年9月11日	国内
Investigating the Role of Ubiquitin-2 in the Pathomechanism of ALS/FTD. (口頭)	Minakawa E.N., Sharkey L.M., Chen K.-C., Thayer M., Lyons J., Ivanova M., Wada K., Nagai Y., Paulson H.L.	第37回 日本神経科学会	2014年9月11日	国内
異常伸長 UGGAA リピート RNA はショウジョウバエにおいて神経毒性を引き起こす(口頭)	石黒太郎、藤掛伸宏、佐藤望、水澤英洋、和田圭司、永井義隆、石川欽也	第37回 日本神経科学会	2014年9月11日	国内
GGGGCC リピート RNA を発現する新規 ALS モデルショウジョウバエの樹立と病態解析(口頭)	上山盛夫、石黒太郎、藤掛伸宏、今野昌俊、小山哲秀、小野寺理、和田圭司、永井義隆	第86回 日本遺伝学会大会	2014年9月17日	国内
微小管依存的 TDP-43 輸送の障害はオリゴマー形成を促進し、神経変性を惹起起こす(ポスター)	永井義隆、藤掛伸宏、木村展之、長野浩一、斎藤勇二、小野寺理、和田圭司	第33回 日本認知症学会学術集会	2014年11月29日	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所(学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Internal capsule stroke in the common marmoset	S. PUENTES, T. KAIDO, T. HANAKAWA, N. ICHINOHE, d T. OTSUKI AND K. SEKI	Neuroscience 284 400-411	2015	国外
中脳赤核と運動機能—系統発生的観点から— Red Nucleus and Its Motor Function—A Phylogenetic Perspective—	大塚知徹・関和彦	Spinal Surgery 28(3) 258-263	2014	国内
p62 plays a protective role in the autophagic clearance of polyglutamine aggregates in polyglutamine disease model flies.	Saitoh Y., Fujikake N., Okamoto Y., Popiel H.A., Hatanaka Y., Ueyama M., Suzuki M., Gaumer S., Murata M., Wada K., Nagai Y.	J Biol Chem 290(3): 1442-1453	2015	国外
VPS35 dysfunction causes retromer depletion and impairs lysosomal degradation of α -synuclein, leading to exacerbation of α -synuclein neurotoxicity in <i>Drosophila</i> .	Miura E., Hasegawa T., Konno M., Suzuki M., Sugeno N., Fujikake N., Geisler S., Tabuchi M., Oshima R., Kikuchi A., Baba T., Wada K., Nagai Y., Takeda A., Aoki M.	Neurobiol Dis 71: 1-13	2014	国外
Identification of <i>ter94</i> , <i>Drosophila VCP</i> , as a strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of <i>Caz</i> , <i>Drosophila FUS</i> .	Azuma Y., Tokuda T., Shimamura M., Kyotani A., Sasayama H., Yoshida T., Mizuta I., Mizuno T., Nakagawa M., Fujikake N., Ueyama M., Nagai Y., Yamaguchi M.	Hum Mol Genet 23(13): 3467-3480	2014	国外
Peptide-based therapeutic approaches for treatment of the polyglutamine diseases.	Takeuchi T., Popiel H.A., Futaki S., Wada K., Nagai Y.	Curr Med Chem 21(23): 2575-2582	2014	国外
その他のFTLD—異常蛋白の視点から	上山盛夫、藤掛伸宏、永井義隆	Clin Neurosci 33 (3): 312-314	2015	国内
ポリグルタミン病における神経変性	永井義隆	BRAIN MEDICAL 26 (3): 225-229	2014	国内

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

IV. 研究成果の刊行物・別刷

INTERNAL CAPSULE STROKE IN THE COMMON MARMOSET

S. PUENTES,^a T. KAIDO,^b T. HANAKAWA,^c
N. ICHINOHE,^d T. OTSUKI^b AND K. SEKI^{a*}

^a Department of Neurophysiology, National Institute of Neuroscience, 4-1-1 Ogawa-Higashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

^b Department of Neurosurgery, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa-Higashi, Kodaira, Tokyo 187-8551, Japan

^c Department of Advanced Neuroimaging, Integrative Brain Image Center, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa-Higashi, Kodaira, Tokyo 187-8551, Japan

^d Department of Ultrastructural Research, National Institute of Neuroscience, 4-1-1 Ogawa-Higashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

Abstract—White matter (WM) impairment and motor deficit after stroke are directly related. However, WM injury mechanisms and their relation to motor disturbances are still poorly understood. In humans, the anterior choroidal artery (AChA) irrigates the internal capsule (IC), and stroke to this region can induce isolated motor impairment. The goal of this study was to analyze whether AChA occlusion can injure the IC in the marmoset monkey. The vascular distribution of the marmoset brain was examined by colored latex perfusion and revealed high resemblance to the human brain anatomy. Next, a new approach to electrocoagulate the AChA was developed and chronic experiments showed infarction compromising the IC on magnetic resonance imaging (MRI) scanning (day 4) and histology (day 11). Behavioral analysis was performed using a neurologic score previously developed and our own scoring method. Marmosets showed a decreased score that was still evident at day 10 after AChA electrocoagulation. We developed a new approach able to induce damage to the marmoset IC that may be useful for the detailed study of WM impairment and behavioral changes after stroke in the nonhuman

primate. © 2014 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: anterior choroidal artery, internal capsule, motor impairment, nonhuman primate, white matter stroke.

INTRODUCTION

Stroke is a devastating disease, being the major cause of acquired disabilities around the world (Donnan et al., 2008). To understand the injury mechanisms and develop new strategies aimed to improve the motor conditions of stroke survivors, several animal models have been developed (Canazza et al., 2014). Owing to the heterogeneous nature of stroke and additional features such as age, sex, race and comorbidities that vary among patients, there is no ideal animal model of human stroke (Mergenthaler and Meisel, 2012); however, the developed models have tried to mimic as much as possible the human condition. Because the middle cerebral artery (MCA) is the most commonly affected artery among stroke patients (Rordorf et al., 1998), one of the most common models for stroke research is MCA occlusion (MCAO) in rodents (Tamura et al., 1981; Kohno et al., 1995). Although these models have helped to unveil the effects of cortical ischemia (Astrup et al., 1981; Neumann-Haefelin et al., 2000; Dijkhuizen et al., 2001), they mislead the researchers' attention to gray matter (GM) injury. Owing to the fact that the GM/white matter (WM) ratio found in the rat neocortex (GM:WM = 87:13) is significantly higher than in humans (GM:WM = 61:39, Zhang and Sejnowski, 2000), the rodent MCAO stroke model induces large infarcts affecting mainly the GM. This feature has inspired the development of neuroprotective agents focused on GM protection aiming for neuron rescue; although such therapies succeed in the rodent recovery after stroke, they fail in clinical trials (Xu and Pan, 2013). This discrepancy between rodent models and human trials has drawn the attention to the essential brain structural differences between both species: the WM ratio.

Recent imaging studies done in stroke survivors have highlighted the importance of WM damage, demonstrating that corticospinal tract (CST) integrity can be considered as a reliable predictor of stroke severity and clinical outcome (Thomalla et al., 2004; Puig et al., 2011; Rosso et al., 2013). Additionally, there is evidence that motor dysfunction after MCA stroke is more dependent on WM than GM damage (Rosso et al., 2011). Because both GM and WM differ importantly in the initial

*Corresponding author. Tel: +81-42-346-1724; fax: +81-42-346-1754.

E-mail addresses: sandra@ncnp.go.jp (S. Puentes), kaido@ncnp.go.jp (T. Kaido), hanakawa@ncnp.go.jp (T. Hanakawa), nichino@ncnp.go.jp (N. Ichinohe), otsukit@ncnp.go.jp (T. Otsuki), seki@ncnp.go.jp (K. Seki).

Abbreviations: ACA, anterior cerebral artery; AChA, anterior choroidal artery; AChAO, anterior choroidal artery occlusion; AMG, autometallographic; BA, basilar artery; CST, corticospinal tract; DW, distilled water; FA, flip angle; FOV, field of view; FS, Freret neurologic score; GM, gray matter; HSD, honestly significant difference; IC, internal capsule; ICA, internal carotid artery; MCA, middle cerebral artery; MCAO, middle cerebral artery occlusion; MNS, marmoset neurologic score; MRI, magnetic resonance imaging; NHP, nonhuman primate; OR, orbital rim; OT, optic tract; PB, phosphate buffer; PCA, posterior cerebral artery; PcomA, posterior communicating artery; SCA, superior cerebellar artery; TE, echo time; TM, temporal muscle; TR, repetition time; WM, white matter.

responses to ischemia (Hughes et al., 2003), some researchers suggest that WM ischemia may have a longer therapeutic window (Muñoz Maniega et al., 2004; Koga et al., 2005). Therefore, it is imperative to deepen the research on WM ischemia owing to its potential for the development of new therapies for stroke patients.

To investigate the effect of subcortical WM injury, different animal models have been developed; a rodent model (Frost et al., 2006; Lecrux et al., 2008) that induces direct damage on the internal capsule (IC), and a mini-pig model (Tanaka et al., 2008) that attempts to impair the IC by occlusion of the anterior choroidal artery (AChA). Although both approaches induced motor impairment, the damage was subtle and transient in contrast to human strokes that compromise the AChA territory (Derflinger et al., 2013). Stroke of the AChA in the human brain can lead to infarction of the posterior limb of the IC, which induces isolated motor deficits due to disruption of the CST (Rascol et al., 1982; Nelles et al., 2008; Likitjaroen et al., 2012). The development of relevant animal models to study this condition may help to identify critical factors related to WM changes after ischemia and for the development of new approaches focused on the rescue of WM (Sozmen et al., 2012).

Because nonhuman primates (NHPs) are phylogenetically closer to the human, where the WM volume is larger than rodents' (GM/WM ratio: 79/21. Zhang and Sejnowski, 2000; Bailey et al., 2009; Okano et al., 2012), the development of an alternative model of WM ischemia in such species may provide relevant information about WM responses after stroke and improve further translational research. The common marmoset (*Callithrix jacchus*) is a NHP similar to *Homo sapiens*, with a brain five times larger than the rat's, representing approximately 2.7% of its body weight, which is equivalent to human proportions (Abbott et al., 2003; Okano et al., 2012). Moreover, the neocortical GM/WM ratio is smaller in comparison with rodents (Zhang and Sejnowski, 2000), and marmoset ergonomics are closer to the human's. We consider that the similarities in WM proportions and ergonomics between marmosets and humans may offer a promising scenario for the study of WM changes after ischemia.

The aim of this study was to establish whether a vessel homologous to the human AChA exists in the marmoset brain and to evaluate the effect of its occlusion on the IC. To our knowledge, there is no established method to induce an infarct in the marmoset IC as a model of WM stroke.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Twenty-two laboratory-bred adult common marmosets (*C. jacchus*) ~4.5 years old at the start of the experiments were used. Two already euthanized marmosets (fixed and long-term freeze-preserved: cadaveric preparations) were used for carotid artery cannulation and colored latex intravascular perfusion (Alvernia et al., 2010). Twelve marmosets were used to evaluate brain vascular anatomy (non-operated side)

and test the reproducibility of the AChA occlusion (AChAO; operated-side) by the injection of colored latex perfusion after surgery (acute experiments). The remaining eight marmosets were divided into two groups to perform AChAO ($n = 5$) and sham operation ($n = 3$). These animals were observed for 11 days before euthanasia (chronic experiments). All monkeys were kept within a large colony to allow good visual and auditory interaction with other marmosets. All procedures were performed in accordance with the National Institute of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Animal Research Committee at the National Institute of Neurosciences in Tokyo, Japan.

AChA identification

To identify the vascular anatomy of the marmoset, liquid latex was used as previously described (Alvernia et al., 2010), with some modifications as follows: For cadaveric preparations, the animals were unfrozen at room temperature, and bilateral dissection of the common carotid arteries was performed. Cannulation was achieved using an 18-gauge catheter (18G × 2" catheter; Nipro, Osaka, Japan), and both catheters were perfused with tap water followed by liquid red latex solution (Ward's Natural Science 37-2571, Columbus Chemical Industries, Columbus WI, USA) using a 10-cc syringe until leakage from the contralateral carotid artery and vertebral arteries was evident. After 20 min, the brain was dissected carefully and vascular exploration was performed. To evaluate the consistency of the vascular patterns, pictures were taken, hand drawings from the right side of the intracranial vessels emerging from the internal carotid artery (ICA) were performed, and the distance between the AChA and ICA bifurcation was measured. The same evaluation was performed for the non-operated side of animals used to test the surgical procedure accuracy (see below). In total, 14 animals were used for the evaluation of the vascular pattern.

Surgical procedures

Surgical preparation. Marmosets were anesthetized with Isoflurane (1–2% (v/v); Mylan Pharmaceutical Co., Ltd. Morgantown WV, USA) delivered initially via an animal face mask, then through endotracheal intubation (6 Fr catheter, length 6.5 cm). Two g/kg of *D*-Mannitol (20% (w/v); Yoshindo Inc., Toyama, Japan) were slowly injected from the catheterization of the femoral vein (26G × 3/4" catheter; Nipro, Osaka, Japan) as a bolus, followed by continuous infusion (0.7 ml/h) containing Remifentanyl (0.18 µg/h; Ultiva 5 mg; Janssen Pharmaceutical, Tokyo, Japan) and Rocuronium Bromide (24 µg/h; Eslax, 25 mg/2.5 ml; MSD Co., Ltd., Tokyo, Japan) before starting artificial ventilation (A.D.S. 2000; Engler, Hialeah FL, USA) (flow rate: 1.65 ± 0.4 l/min; peak inspiratory pressure: 15 cm of H₂O; respiratory rate: 9.5 ± 1 breaths per minute). During surgery, heart rate (189.7 ± 16.4 beats per minute) and arterial oxygen saturation (SaO₂: $96.4 \pm 2.5\%$) were monitored with a pulse oximeter (8600V NONIN medical Inc., Plymouth MN, USA). Electrocardiographic traces