

脊髄小脳失調症の霊長類モデルの作製と検証

業務担当責任者 : 平井宏和 群馬大学大学院医学系研究科

研究協力者 : 松崎泰教、今野歩、中村和裕 群馬大学大学院医学系研究科

研究要旨

過去 20 年に渡って様々な脊髄小脳失調症 (SCA) モデルマウスが作成され、病態解明と治療法開発が大きく進んだ。しかし、これまでのところマウスで明らかになった治療法は一つも臨床応用されていない。原因の一つとして非ヒト霊長類モデルがないことが上げられる。本研究では、異常伸長した CAG 繰返し配列をもつ SCA3 型原因遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを、マーモセット小脳に注射することで SCA3 モデルマーモセット作成を目指した。ウイルスベクター注入 8 ヶ月後に評価したところ、変異遺伝子を発現するマーモセットは顕著な小脳失調を示し、組織学的には小脳顆粒細胞、小脳核の神経細胞に変異タンパク質凝集体が観察された。

A. 研究目的

非ヒト霊長類の疾患モデルが出来ると、疾患の治療法開発と臨床応用が飛躍的に早まる。近年、レンチウイルスベクターを用いて受精卵に疾患遺伝子を導入することで疾患モデルマーモセットが作成されている。これは有用な技術ではあるが、マウスのように短期間で繁殖するわけではないので、実験に必要な数の疾患モデルマーモセットを確保するにはかなり長い年月と大きな飼育設備が必要となる。また、レンチウイルスベクターを用いた場合、多コピーの疾患遺伝子がマーモセットのゲノムに組み込まれることが一般的で、子孫には少ないコピー数の遺伝子が遺伝することが多く、その場合、親と同じフェノタイプを示さない。本研究ではアデノ随伴ウイルス 9 型 (AAV9) ベクターを用いて、変異した脊髄小脳失調症 (SCA) 遺伝子を直接、成熟後のマーモセット小脳に発現させることで、SCA マーモセットモデルを作成することを

目的とした。

B. 研究方法

シナプシン I プロモーター制御下で 89 回のグルタミン繰返し配列をもつ ATXN1 タンパク質 (ATXN3[Q89]) を発現する AAV9 ベクターを生後 1 年 6 ヶ月のマーモセットの小脳に注射した。コントロールとして、15 回のグルタミン繰返し配列をもつ ATXN1 タンパク質 (ATXN3[Q15]) を発現する AAV9 ベクターを別の同年齢のマーモセット小脳に注射した。8 ヶ月後に小脳失調の有無について、独自に開発した 2 つの行動テストを用いて評価した。その後、小脳皮質、小脳核の遺伝子発現の様子を免疫組織学的に調べた。

(倫理面への配慮)

実験計画は遺伝子組換え安全委員会、動物実験委員会により承認されており、動物愛護に十分配慮して行った。

C. 研究結果

ATXN3[Q89]を発現させたマーモセットは、ベクター注入 1~2 ヶ月後から、ケージの隙間に足を滑らせたり、高いところにあるバーに捕まり損ねたりするなど、小脳失調と思われる動きの失敗が見られるようになった。このような動きは ATXN3[Q15]を発現させたコントロールマーモセットでは見られなかった。注射 8 ヶ月に、餌をとる手の動き及び、高いところからステップを下らせる行動を評価したところ、ATXN3[Q89]発現マーモセットは何も処置をしていないマーモセットや ATXN3[Q15]を発現するコントロールマーモセットと比べて有意に低い成績を示した。その後、小脳の組織を観察したところ、顆粒細胞と小脳核のニューロンを中心に広範囲に ATXN3[Q89]が発現しており、凝集体は核内に局在していた。また多くの小脳核のニューロンは脱落していた。

D. 考察

この方法で同程度のフェノタイプを、同様の時間経過で示す SCA モデルマーモセットが安定して得られるのか今後検討が必要である。これらのモデルマーモセットにマウスで効果が示されている SCA の治療法を施し、症状の進行が抑えられ、あるいは改善が見られるのかを検討することで、マウスで明らかになった治療法の患者への臨床応用が促進することが期待される。

E. 結論

AAV9 ベクターを用いて、変異した脊髄小脳失調症 (SCA) 遺伝子を直接、成熟後のマーモセット小脳に発現させることで、行動学的及び、組織学的に SCA 患者と類似のフェノタイプを示すマーモセットモデルを作成することに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Matsuura S, Shuvaev AN, Iizuka A, Nakamura K, Hirai H. Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Cerebellar Pathology in a Mouse Model of Spinocerebellar Ataxia Type 1. *Cerebellum* 2014 Jun;13(3):323-30.
- 2) Huda F, Konno A, Matsuzaki Y, Goenawan H, Miyake K, Shimada T and Hirai H. Distinct transduction profiles in the CNS via three injection routes of AAV9 and the application to generation of a neurodegenerative mouse model. *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development* 1, Article number: 14032 (2014) doi:10.1038/mtm.2014.32
- 3) Saida H, Matsuzaki Y, Takayama K, Iizuka A, Konno A, Yanagi S, Hirai H. One-year follow-up of transgene expression by integrase-defective lentiviral vectors and their therapeutic potential in spinocerebellar ataxia model mice. *Gene Therapy* 2014 Sep;21(9):820-7.
- 4) Nakamura K, Mieda T, Suto N, Matsuura S, Hirai H. Mesenchymal Stem Cells as a Potential Therapeutic Tool for Spinocerebellar Ataxia. *Cerebellum* 2014 Oct 4. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) 平井宏和. Molecular mechanisms and potential therapies of the

spinocerebellar ataxia and the future perspective of the clinical application. International congress on Neuroscience. クラスノヤルスク (ロシア) . June 20, 2014.

- 2) Huda F, Konno A, Matsuzaki Y, Goenawan H, Miyake K, Shimada T, Hirai H. Distinct transduction profiles resulting from direct cortical, intrathecal or intravenous injection of AAV9 in the CNS. 9th Federation of European Neuroscience Societies. ミラノ (イタリア) . July 5-9, 2014.
- 3) Hosoi N, Hirai H. Abnormalities of metabotropic glutamate receptor (mGluR)-mediated signaling at cerebellar parallel fiber-purkinje cell synapses in spinocerebellar ataxia type 1(SCA1) model mice. ミラノ (イタリア) , July 5-9, 2014.
- 4) Huda F, Konno A, Matsuzaki Y, Goenawan H, Miyake K, Shimada T, Hirai H. Cerebellar transduction profiles after ssAAV9 injection via cortical, intrathecal or intravenous routes. 第 37 回日本神経科学学会大会

横浜. Sep. 11-13. 2014.

- 5) 今野歩、平井宏和. AAV による遺伝子導入を介した脊髄小脳変性症 3 型モデルマウスの作出. 第 37 回日本神経科学学会大会 横浜. Sep. 11-13. 2014.
- 6) 松崎泰教、齊田英恵、高山清彦、飯塚朗、今野歩、柳茂、平井宏和. インテグレーションを欠損させたレンチウイルスベクターによる一年間の遺伝子発現の経過観察と遺伝性神経変性疾患モデルマウスを用いた遺伝子治療での有効性の検討. 第 37 回日本神経科学学会大会 横浜. Sep. 11-13. 2014.
- 7) 平井宏和. シンポジウム [Synaptic regulation in the cerebellum and motor control] Impairment of synaptic transmission that induces cerebellar ataxia and the underlying molecular mechanisms. 第 37 回日本神経科学学会大会 横浜. Sep. 11-13. 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

なし