

遺伝子改変カニクイザルを用いた前頭側頭葉変性症の病態解明

等 誠司

滋賀医科大学 生理学講座 統合臓器生理学

【研究の背景】

前頭側頭葉変性症(FTLD)は、若年発症を特徴とする認知症の1つで、病理学的に沈着する変性タンパク質によってFTLD-tau, FTLD-TDP, FTLD-FUSなどに分類される。これら変性タンパク質が神経細胞死を引き起こすと考えられるものの、細胞死に至るメカニズムや、前頭葉・側頭葉の神経細胞が特に脆弱である理由はわかっていない。病態の解明が遅れている一因として、ヒトでは発症早期の神経細胞を解析することがほぼ不可能であることに加え、前頭葉の発達が弱い齧歯類では、前頭側頭葉変性症の病態を忠実に再現することが困難であることが挙げられる。

近年、ゲノム編集技術が飛躍的に進歩し、齧歯類のみならず非ヒト霊長類における遺伝子改変が現実的なテーマになってきた。実際、ここ数年のうちに精神神経疾患のサルモデルの報告が相次ぎ、齧歯類では不十分であった表現型が明瞭になるケースも散見される。申請者が所属する滋賀医科大学では、約700頭のカニクイザルを飼育する国内有数のコロニーを保持するのに加え、霊長類に対する遺伝子改変技術を磨いてきた。これらのことを背景に、本研究課題を計画した。

【目 的】

カニクイザルを用いて、ヒト変異型 FUS 遺伝子を過剰発現するトランスジェニックカニクイザルを作製し、発症超早期の病態を明らかにする。前頭葉・側頭葉の神経細胞が特異的に障害される理由や、病態に基づく新規治療法の開発に資する知見を得ることを目的とする。

【方 法】

FUSは、RNA binding 機能を持つタンパク質で、家族性 ALS では核移行シグナルが存在する C 端付近に変異が集中しているため、本研究でも若年発症の ALS を引き起こすヒト FUS^{P525L} 変異遺伝子を用いた。一方で、FUS^{P525L} 変異遺伝子の恒常的な過剰発現は、カニクイザルの初期発生や神経発生を障害する可能性が高い。そこで、テトラサイクリン発現誘導システム(TetOne システム)を用い、テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン存在下でのみ FUS^{P525L} 変異遺伝子を発現する piggybac プラスミドおよびレンチウイルスを作製した。

トランスジェニックカニクイザルの作製に先立ち、カニクイザル ES 細胞を用いてヒト FUS^{P525L} 変異遺伝子をドキシサイクリン存在下で発現させられる piggybac プラスミドを導入し、薬剤耐性で発現クローンを選別・樹立した。この ES 細胞を用い、ヒト ES 細胞で報告されている手法に準じて神経細胞への分化誘導を行った。

GnRH (gonadotropin releasing hormone) アゴニストおよび hCG (human chorionic gonadotropin)を投与して過排卵を誘導したメスのカニクイザルを用い、腹腔鏡観察下で、成熟卵胞から成熟卵子を採卵した。成熟オス個体から採取した精子を卵子に注入し、顕微授精を行って作製した受精卵に対して、テトラサイクリン誘導性変異型ヒト FUS 遺伝子を含むレンチウイルスをマイクロインジェクションにて導入した。受精卵は胚盤胞期まで培養し、レンチウイルスゲノムから発現する赤色蛍光(Kusabira Orange)によって感染が成立した胚を選別した。これらの胚を仮親の卵管に注入し、妊娠を継続させた。

【結 果】

テトラサイクリン誘導型 piggybac プラスミドを導入したカニクイザル ES 細胞を用い、ヒト FUS^{P525L} 変異遺伝子過剰発現の効果を検討した。レチノイン酸による embryoid body 形成を経て Erk 阻害剤・GSK-3 阻害剤などによる分化誘導をかけることにより、MAP2 陽性の神経細胞が誘導されたので、さらにドキシサイクリンを添加して培養した。その結果、正常 FUS の過剰発現では核に局在して明らかな異常を示さないのに対し、変異 FUS を過剰発現させた場合は細胞質にも分布して凝集体を形成したのに加え、神経突起の伸長が抑制されることがわかった(図 1)。

次いで、レンチウイルスを用いてヒト FUS^{P525L} 変異遺伝子のトランスジェニックカニクイザルの作製を行った。図 2 に示すように、胚盤胞期胚でレンチウイルスゲノムから発現する赤色蛍光が観察されたので、この胚を仮親に移植して妊娠継続し、出産に至った。同時に娩出された胎盤から線維芽細胞を樹立・培養し、ドキシサイクリン添加によってヒト FUS^{P525L} 遺伝子が発現誘導されるかどうかを検証したところ、図 3 に示すように FUS^{P525L} タンパク質に付加されている Flag タグの発現が確認された。

本研究の期間内には正常出産にて 1 頭のトランスジェニックカニクイザルが誕生した。霊長類研究における滋賀医科大学の倫理的規定から、母ザルに養育されている新生児に対して実験的処置は行えないので、現在は経過観察を行っている。今後は、採血して血球細胞から iPS 細胞を樹立し、FUS^{P525L} タンパク質の発現誘導を確認するのに加え、個体にドキシサイクリンを投与して臨床症状を観察する予定である。また、同様の方法で作成した胎児に対し、妊娠 30 日からドキシサイクリンを 2 週間(母ザルに)経口投与した上で、帝王切開によって胎児を摘出して、遺伝子発現や FUS^{P525L} タンパク質の発現や、凝集体形成などの in vivo 解析を行う予定である。

【考 察】

今回の研究では、ヒト FUS^{P525L} 変異タンパク質を過剰発現させた大脳皮質神経細胞の観察までは行えなかったが、構築したシステムが期待通りにワークしていることは確認できた。

齧歯類を用いた研究と比べ、霊長類研究は長い時間がかかることや、多数のサンプルを用いた解析が難しいことなど、多くの困難があるが、一方で、齧歯類やヒトの臨床研究では得られない知見を獲得できる利点は極めて大きい。現時点(令和 4 年 12 月)で遺伝子改変による

前頭側頭葉変性症モデルザルの報告はないが、水面下でさまざまな疾患モデルザルが作製されているとの情報がある。我々の研究のアドバンテージと言える、マカク属を用いていること、テトラサイクリン発現誘導システムであることなどを活かし、他の研究グループと協働することで、効率的に研究を進めていきたい。

図 1: カニクイザル ES 細胞に Flag-FUS/FUS^{P525L} を過剰発現させ、MAP2 陽性神経細胞に分化させた。

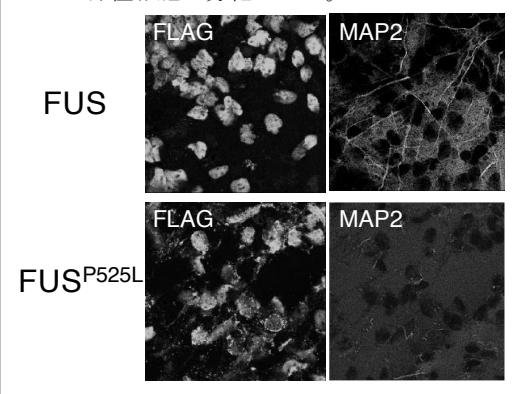


図 2: レンチウイルスに感染させたカニクイザル胚盤胞(上段左, 明視野; 上段右, 蛍光像)。下段はウイルス導入した胎児(左)と産児(右)。

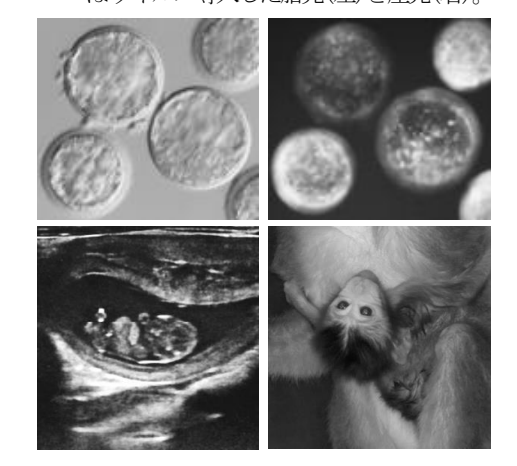
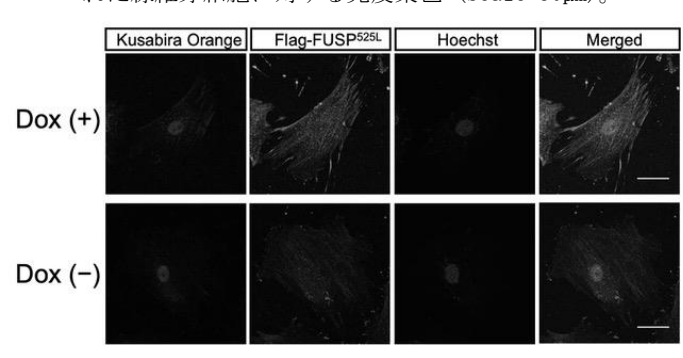


図 3: ヒト FUS^{P525L} トランスジェニックザルの胎盤から培養された線維芽細胞に対する免疫染色 (Scale=50μm)。



【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究で作製されたヒト FUS^{P525L} トランスジェニックサルを用いて発症超早期の解析を行うことで、新たなバイオマーカーの同定や新規治療戦略の構築に繋がれば、臨床医学に大きく貢献できる。また、ヒトにおける病態を忠実に反映する疾患モデル動物として、前臨床試験を行うことができる点でも非常に有用と考えられる。

【参考・引用文献】

Seita Y., Tsukiyama T., Iwatani-Tsuchiya C., Tsuchiya H., Matsushita J., Azami T., Okahara J., Nakamura S., Hayashi Y., Hitoshi S., Imamura T., Miyoshi H., Saitou M., Ogasawara K., Sasaki E., Ema M.

Generation of transgenic cynomolgus monkeys that express green fluorescent protein throughout the whole body.

Scientific Reports 6; 24868, 2016