

称号及び氏名	博士(獣医学) 武田 周二
学位授与の日付	2024年9月23日
論文名	Pathological studies on aspartoacylase ( <i>Aspa</i> ) knockout rat, an animal model for Canavan disease (カナバン病モデル <i>Aspa</i> ノックアウトラットの病理学的解析)
論文審査委員	主査 桑村 充 副査 金子 武人 副査 鳩谷 晋吾

## 論文要旨

### 緒言

カナバン病 (CD) は、ヒトの発育不全と精神発達遅滞を特徴とする稀な神経変性疾患であり、通常は生後 2~6 カ月で発症し、その後ほとんどの患者は 5 歳までに死亡する。また、CD に対する効果的な治療法は現在確立されていない。CD は、アスパルトアシラーゼ (*Aspa*) 遺伝子の変異による潜性形質遺伝疾患で、ASPA 酵素を欠損する。病理学的には中枢神経系 (CNS) における空胞化を特徴とする。ASPA タンパク質はオリゴデンドロサイトで高度に発現される酵素であり、N-アセチル-アスパラギン酸 (NAA) の加水分解に関与している。したがって、ASPA の欠乏は NAA の蓄積をもたらし、酢酸とアスパラギン酸の生成を減少させ、ミエリン関連脂質の欠乏をもたらす。

*Aspa* 遺伝子ノックアウトマウス (*Aspa* ノックアウトマウス) は、震え、発作、運動失調などの CD 患者と同様の症状を示し、脳白質の空胞化、尿および脳中の NAA が高値を示す。これらの病態は CD 患者の典型的な特徴であるため、ヒト CD の病因を理解するために有用なモデル動物であると考えられ、遺伝子治療を含む新しい治療アプローチがこのマウスモデルを用いて研究されている。

TALEN 技術を用いて *Aspa* ノックアウトラットが新たに作製された。このラットでは、生後 12 週で CNS における NAA の蓄積および CD と同様の病理学的変化が認められ、CD の動物モデルとしての潜在的な有用性が報告されている。しかしながら、*Aspa* ノックアウトラットの詳細な病理学的研究はまだ実施されていない。そこで、本研究では更なる潜在的有用性を検討することを目的とし、生後 4~40 週の *Aspa* ノックアウトラット

トの CNS のおける病理学的変化について詳細に観察した。

## 第 1 章 *Aspa* ノックアウトラットの CNS における病理学的解析

*Aspa* ノックアウトラット (F344-*Aspa*<sup>em34Kyo</sup>) が、京都大学ナショナルバイオリソースプロジェクトから提供され、大阪公立大学りんくうキャンパス動物科学教育研究センターで継代維持された。これらのラットは神経症状を示さず、生後 40 週齢以上まで生存した。本研究に用いたすべての *Aspa* ノックアウトラットにおいて、空胞形成が CNS 全体、特に大脳の前質、小脳、橋、延髄および脊髄の灰白質で認められた。また、軽度な空胞形成が、頸髄、胸髄および腰髄の前質でも認められた。さらに、脳全体の詳細な病理組織学的検査では、一次体性感覚野、一次運動野、視床、小脳核、小脳顆粒層および分子層、梨状皮質ならびに前交連に特徴的に空胞化が局在していることが分かった。なお、これらの領域は呼吸、心拍数、血圧などの生命維持を制御し、上行・下行性運動ニューロン経路、聴覚、嗅覚および視覚を支配する領域であった。生後 24 週齢以上のラットにおいては、顕著な石灰化が視床、橋、延髄の実質および血管周囲領域で認められたものの、その発生機序と病理学的な意義については不明であった。加えて、脊髄前質および灰白質におけるミエリン形成不全および軸索の腫大が認められた。

## 第 2 章 *Aspa* ノックアウトラットの CNS における免疫組織化学および形態解析

*Aspa* ノックアウトラットの CNS において、空胞化を伴うミエリン形成不全が認められたことから、グリア細胞と神経細胞への影響を評価するため、免疫組織化学および画像解析を用いた形態計測による定量評価を行った。

F344 ラットと比較して、*Aspa* ノックアウトラットでは、大脳の視床および皮質、小脳核、橋、延髄ならびに脊髄の灰白質において、GFAP 陽性を示すアストロサイトの肥大および増加が認められ、アストロサイトの活性化が認められた。ミクログリアマーカーの Iba-1 抗体を用いた染色では、橋および小脳核で、細胞体が肥大した活性化ミクログリアの増加が認められた。その他、神経性細胞マーカーの NeuN 抗体および calbindin 抗体、ならびにオリゴデンドロサイトマーカーの Olig2 抗体を用いた免疫組織化学の結果、明らかな変化は認められなかった。

免疫組織化学において、Iba-1 抗体を用いた染色でミクログリアの肥大・増加が認められたものの、画像解析による形態計測では、陽性細胞の数、比率、平均面積、円形度および周辺長において、明らかな変化は認められなかった。ミクログリアの活性化では、細胞の形態変化が重要であることから、ミクログリアの活性化は生じていないと考えられた。その他、NeuN、calbindin および Olig2 抗体を用いた染色標本においても、神経細胞やオリゴデンドロサイトに明らかな形態変化は認められなかった。

## 第 3 章 ヒトカナバン病との病態比較について総合考察

神経変性疾患では、神経細胞の構造と機能が失われ、その結果、神経細胞の壊死とグリア細胞の活性化や増殖が起こる。また、神経細胞は再生しないと一般に考えられており、根本的な治療法はないと考えられていた。しかし、近年、神経変性疾患の治

療薬の研究が進み、アルツハイマー病に対する抗体医薬や、脊髄性筋萎縮症に対する核酸医薬や遺伝子治療薬が開発されている。これらの画期的な新薬の開発では、臨床試験が開始される前に、疾患モデル動物を用いた入念な実験が繰り返し行われ、その有効性が評価される。

*Aspa* ノックアウトマウスの CD モデルとしての有用性および組換えアデノ随伴ウイルスによる遺伝子治療に関する研究が報告されている。*Aspa* をコードする遺伝子を投与することにより、ASPA の発現が改善し、NAA の蓄積が抑制されるため、カナバン病の新たな治療法となる可能性が示されている。しかし、ヒト CD に対する遺伝子治療の適用に関しては、長期的な薬効作用が示されていない。また、これらの研究において、マウス以外の動物種を用いた研究報告もない。

以上のことから、*Aspa* ノックアウトラットは新たな CD 動物モデルとなることが考えられた。*Aspa* ノックアウトラットは *Aspa* ノックアウトマウスと同様の変化を多く示すが、神経症状を呈さず、長期間安定して生存できる点でマウスとは異なる。これまでの報告において、*Aspa* 遺伝子のみの変異では神経症状は生じないが、*Hcn1* 遺伝子との二重変異では生じることがラットで確認されている。こうした動物種における違いの原因は不明だが、感受性の違いを研究することで、ヒトにおける最適な治療条件の探索につながることを期待された。今後、*Aspa* ノックアウトラットを用いた更なる研究により、ヒトカナバン病の早期治療法が確立され、患者の QOL の向上に貢献することが期待される。

## 総括

本研究では、ヒトのカナバン病の原因であるアスパルトアシラーゼ (*Aspa*) 欠損症と同様に、*Aspa* 遺伝子をノックアウトしたラットを用いて病理学的解析を行い、以下の結論を得た。

1. *Aspa* ノックアウトラットは神経症状を示さずに長期間生存できる
2. *Aspa* ノックアウトラットでは 4 週間後から中枢神経系に空胞化病変が発生し、これらの病変は呼吸、心拍数、血圧などの生命維持を制御する領域（橋、延髄および脳幹網様体）に局在して認められた。また、上行・下行性運動ニューロン経路、聴覚、嗅覚および視覚を支配する領域（一次体性感覚野、一次運動野、視床、小脳核、小脳顆粒層および分子層、梨状皮質ならびに前交連）でも同様に認められた。
3. 生後 24 週齢以上の *Aspa* ノックアウトラットでは、中枢神経系の血管周囲に顕著な石灰化が認められた。
4. *Aspa* ノックアウトラットでは、神経細胞に変化は認められず、アストロサイトの肥大が認められたが、その他、グリア細胞に変化は認めなかった。
5. *Aspa* ノックアウトラットはヒトカナバン病モデルとして有用であり、将来的には遺伝子治療研究への応用ならびに動物種差解明への応用が期待される。

## 審査結果の要旨

カナバン病は、ヒトの発育不全と精神発達遅滞を特徴とする稀な神経変性疾患であり、通常は生後2~6カ月で発症し、ほとんどの患者は5歳までに死亡する。現在、カナバン病に対する効果的な治療法は確立されていない。カナバン病はアスパルトアシラーゼ(*Aspa*)遺伝子の変異による潜性遺伝性疾患で、病理学的には中枢神経系における空胞形成を特徴とする。カナバン病のモデル動物として *Aspa* ノックアウトマウスがあり、カナバン病患者と同様の症状を示し、カナバン病の病理発生を理解するために用いられている。また遺伝子治療を含む新しい治療アプローチにも、このモデルマウスが使用されている。最近、TALENを用いたゲノム編集技術を用いて *Aspa* ノックアウトラットが新たに作製されたが、その詳細な病理学的研究はまだ実施されていない。そこで、本研究では *Aspa* ノックアウトラットの潜在的な有用性を検討することを目的とし、生後4~40週の中枢神経系における病理学的変化について詳細に解析している。

第1章では *Aspa* ノックアウトラットの中枢神経系における病変を病理組織学的に調べている。*Aspa* ノックアウトラットは神経症状を示さず、生後40週齢以上まで生存した。*Aspa* ノックアウトラットにおいて、中枢神経系全体に空胞形成がみられ、特に大脳の白質、小脳、橋、延髄および脊髄の灰白質で認められた。一次体性感覚野、一次運動野、視床、小脳核、小脳顆粒層および分子層、梨状皮質ならびに前交連に特徴的に空胞病変が局在していることが分かった。生後24週齢以上のラットにおいては、顕著な硬質沈着が視床、橋、延髄の実質および血管周囲領域で認められている。

第2章では *Aspa* ノックアウトラットの中枢神経系における免疫組織化学および形態計測解析を行っている。F344ラットと比較して、*Aspa* ノックアウトラットでは、視床および大脳皮質、小脳核、橋、延髄ならびに脊髄の灰白質において、GFAP陽性を示すアストロサイトの肥大および増加が認められ、アストロサイトの活性化がみられた。神経性細胞マーカーのNeuN抗体およびカルビンジン抗体、ならびにオリゴデンドロサイトマーカーのOlig2抗体を用いた免疫組織化学の結果、*Aspa* ノックアウトラットにおいてこれらの細胞の明らかな変化は認められなかった。

Iba-1抗体を用いた免疫組織化学においてミクログリアの肥大・増加が認められたものの、画像解析による形態計測では、陽性細胞の数、比率、平均面積、円形度および周囲長において、Iba-1陽性ミクログリアの明らかな変化は認められなかった。

第3章では *Aspa* ノックアウトラットの中枢神経系における透過型電子顕微鏡による解析を行っている。*Aspa* ノックアウトラットの中枢神経に観察された空胞化領域の透過型電子顕微鏡によってミエリンや神経細胞の変化を観察した。胸髄の白質および灰白質において、空胞化病変は内部にミエリン様構造を有し、その一部はミエリンと連続していることがわかった。脊髄灰白質では、ミエリンの断裂および水腫性変性が認められた。神経細胞の軸索では、ミトコンドリアの大小不同と膨化が認められている。

第4章ではヒトカナバン病との病態比較について総合考察を行っている。*Aspa* ノックアウトマウスを用いて、カナバン病モデルとしての有用性の検討および組換えアデノ随伴ウイルスによる遺伝子治療効果に関する研究が報告されている。*Aspa* をコードする遺伝子を

投与することにより、ASPA の発現が改善し、病態の悪化に関与するとされる N-アセチル-アスパラギン酸の蓄積が抑制され、カナバン病の新たな治療法となる可能性が示されている。しかし、ヒトカナバン病に対する遺伝子治療の適用に関しては、長期的な薬効作用が示されていない。

*Aspa* ノックアウトラットは *Aspa* ノックアウトマウスと同様の変化を多く示すが、神経症状を呈さず、長期間安定して生存できる点でマウスとは異なる。これまでの報告において、*Aspa* 遺伝子のみの変異では神経症状は生じないが、*Hcn1* 遺伝子との二重変異では振戦症状を生じることがラットで確認されており、神経症状の発症には複数の因子が関与することが示唆されている。こうした動物種における症状発現の差異の詳細な原因は不明だが、発症メカニズムを研究することで、ヒトにおける最適な治療条件の探索につながることを期待された。これまでの研究において、マウス以外の動物種を用いた報告はなく、*Aspa* ノックアウトラットは新たなカナバン病の動物モデルとなることが示唆された。今後、*Aspa* ノックアウトラットを用いた更なる研究により、ヒトカナバン病の病理発生が解明され、有用な治療法が進展し患者の QOL の向上に貢献することが期待される。

本研究は新たなカナバン病モデルラットを病理学的に解析し、同じ空砲形成という神経病変を有する動物においても、神経症状の発症メカニズムには動物種差があること明らかとなり、*Aspa* ノックアウトラットがヒトカナバン病の新たな動物モデルとなることを示した。今回得られた成果は、難治性神経疾患であるカナバン病のメカニズム解明のための基礎獣医学ならびに基礎医学の発展・展開に貢献するものと考えられる。従って、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。