

29. マイクログリアの機能調節を介した新規 MLD 治療法の開発

日本医科大学大学院医学研究科分子遺伝医学分野 教授 酒井 真志人

概要

本研究は、異染性白質ジストロフィー（MLD）における病態進展機構を明らかにし、マイクログリアの機能調節を介した新規治療標的を見出すことを目的として実施した。MLD は、ARSA 欠損によりスルファチドが蓄積し、進行性の脱髄と中枢・末梢神経障害をきたすライソゾーム病であるが、既存の遺伝子治療や造血幹細胞移植にはなお限界があり、病態進展の分子機構の解明が求められている。そこで本研究では、MLD の病態におけるマイクログリアの役割、とりわけ I 型インターフェロン応答の病態生理学的意義に着目した。具体的には、CSF1R 阻害剤である PLX5622 を用いて MLD モデルマウスのマイクログリアを長期的に除去し、ロータロッドテストにより神経症状への影響を評価した。さらに、マイクログリアを系統追跡可能な MLD モデルマウスを作製し、脳から分取したマイクログリアに対して RNA-seq および ATAC-seq を実施することで、転写・エピゲノム変化を解析した。加えて、I 型インターフェロン応答の活性化に関与する経路を標的とした阻害剤を投与し、病態進展への影響を検討した。

その結果、マイクログリアを除去すると MLD モデルマウスの神経学的症状は有意に増悪し、マイクログリアが病態進展を抑制する保護的側面を有することが示された。一方、MLD のマイクログリアでは I 型インターフェロン応答関連遺伝子群の発現上昇が認められ、当該経路の阻害により運動機能低下が改善したこと、I 型インターフェロン応答の亢進が病態進展に寄与する可能性が示唆された。以上より、MLD におけるマイクログリアは、病態進展を抑制する保護的側面を有する一方で、I 型インターフェロン応答の亢進を伴う特徴的な活性化状態を示すことが明らかとなった。今後は、マイクログリアの保護的機能を維持・増強しつつ、インターフェロン応答を適切に制御する治療法の開発が課題である。本助成により、以上の研究を計画的に推進することが可能となった。

背景および目的

異染性白質ジストロフィー（Metachromatic leukodystrophy: MLD）は、アリルスルファターゼ A（ARSA）の欠損によりスルファチドが中枢神経系をはじめとする組織に蓄積し、進行性の脱髄と中枢・末梢神経障害を来すライソゾーム病である。MLD に対しては、これまで ARSA 遺伝子を導入するアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いた遺伝子治療や造血幹細胞移植などの治療法開発が進められてきた（引用文献 1-3）。しかし、既存の方法には、脳内広範囲への効率的な遺伝子導入が容易でないこと、神経症状を十分に改善できないこと、すでに症状を呈した成体個体では治療効果が限定的であることなどの課題が残されている。したがって、MLD の病態進展に関わる細胞・分子機構をさらに深く理解し、新たな治療標的を見出すことが必要である。

マイクログリアは脳に常在する胎生由来の組織マクロファージであり、MLD の進行に伴い活性化する。しかし、MLD においてマイクログリアが病態を促進しているのか、あるいは逆に防御的役割を果たしているのかについては十分に明らかになっていなかった。そこで本研究では、まず MLD モデルマウスにおいてマイクログリアを薬理的に除去した際の影響を検討し、MLD の病態形成におけるマイクログリアの機能的意義を明らかにすることを試みた。さらに、マイクログリアの機能的役割と疾患依存的な転写・エピゲノム変化を解析すること

で、MLD の新規治療標的を探索することを目的とした。特に、病態の進行に伴って誘導される I 型インターフェロン応答に着目し、マイクログリアが示す保護的機能と、その機能が病態進展の過程でどのように破綻していくのか、その実態を明らかにすることを目指した。

方法

1. MLD の病態形成におけるマイクログリアの役割の解析

MLD の病態形成におけるマイクログリアの役割を直接検証するため、MLD モデルマウス (ARSA 欠損マウス) および対照マウスに、CSF1R 阻害剤 (PLX5622) 含有飼料を給餌し、マイクログリアを長期にわたり除去した。具体的には、12 か月齢のマウスに 1200 mg/kg の PLX5622 含有飼料を 4 か月間給餌し、その間、経時的にロータロッドテストを実施して運動機能の変化を評価した。この実験系により、マイクログリアの存在が MLD の神経学的表現型に及ぼす影響を検討した。

2. MLD におけるマイクログリアの活性化機構の解析

MLD における胎生由来マイクログリアの系統追跡を行うためにマイクログリアと単球由来マクロファージを区別可能な MLD モデルマウスを作製した。タモキシフェン投与によりマイクログリアが蛍光タンパク質 EYFP で標識される Rosa26-LSL-EYFP^{+/+}; Cx3cr1-CreERT2^{+/-}マウスに ARSA 欠損マウスのバックグラウンドを導入し、ARSA^{-/-}; Rosa26-LSL-EYFP^{+/+}; Cx3cr1-CreERT2^{+/-}マウスと、そのコントロールである ARSA^{+/+}; Rosa26-LSL-EYFP^{+/+}; Cx3cr1-CreERT2^{+/-}マウスを作製した。これらのマウスの出生後 1, 2 日目に、タモキシフェン投与を行い、マイクログリアを EYFP で標識した。これらのマウスの脳から、セルソーターにより EYFP 陽性マイクログリアを分取して、RNA-seq による遺伝子発現解析と ATAC-seq による網羅的オープンクロマチン解析を実施した。

3. MLD のマイクログリアの I 型インターフェロン応答の病態生理学的意義の解析

MLD のマイクログリアにおける I 型インターフェロン応答の活性化の病態生理学的意義を明らかにするため、MLD モデルマウスおよびそのコントロールマウスに対して、I 型インターフェロン応答の活性化に関与する経路を標的とした阻害剤を投与した。投与後は、ロータロッドテストを経時的に行い、運動機能の変化を指標として神経症状を評価した。これにより、当該経路の抑制が MLD の病態進展に及ぼす影響を検討した。

結果および考察

マイクログリアは MLD の進行に伴い活性化する。そこで、MLD の治療開発においてマイクログリアを標的とすることの妥当性を検証するため、MLD モデルマウスにおいてマイクログリアの薬理的除去を行った。CSF1R 阻害剤 (PLX5622) を用いたマイクログリア除去実験の結果、野生型マウスと比較して、MLD モデルマウスではロータロッドテストにおける回転棒上の維持時間が有意に低下した。すなわち、MLD 病態下においてマイクログリアを除去すると神経学的症状が増悪することが明らかとなった。この結果は、MLD におけるマイクログリアが、少なくとも一定の条件下では病態進展を抑制する方向に作用していることを示唆する。

次に、MLD モデルマウスおよびそのコントロールマウスの脳からセルソーターによりマイクログリアを分取し、RNA-seq による遺伝子発現解析を実施した。その結果、307 遺伝子の発現変動が認められ、内訳は発現上昇 185 遺伝子、発現低下 122 遺伝子であった。Gene Ontology 解析の結果、特に I 型インターフェロン応答に関連する遺伝子群の発現上昇が顕著であり、MLD におけるマイクログリア活性化の主要な特徴の一つがインターフェロン応答の亢進であることが示された。一方で、*Igfl* を含む神経保護関連遺伝子群の発現上昇も認められた。これらの遺伝子群には *ApoD* も含まれており、*ApoD* は脂質代謝、酸化ストレス応答、細胞保護に関与する分子として知られていることから、MLD マイクログリアが病的環境に適応し、神経保護的機能を発揮している可能性が示唆された。

さらに、MLD モデルマウスおよびそのコントロールマウスの脳から分取したマイクログリアを用いて ATAC-seq を実施した。その結果、MLD モデルマウスのマイクログリアに特異的なオープンクロマチン領域において、転写因子 IRF の結合モチーフの有意な濃縮が認められた。この所見は、MLD モデルマウスのマイクログリアにおいて I 型インターフェロン応答関連遺伝子群の発現が増加していることを、エピゲノムの観点からも支持する結果であった。

加えて、MLD のマイクログリアにおける I 型インターフェロン応答の活性化に関与する経路を標的とした阻害剤を 12 か月齢から投与したところ、コントロール群と比較して、MLD モデルマウスのロータロッドテストにおける回転棒上の維持時間は有意に増加した。すなわち、当該経路の阻害により運動機能低下が抑制され、神経症状が改善することが示された。この結果は、MLD における I 型インターフェロン応答の活性化が病態進展に寄与している可能性を示唆するものである。

以上の結果より、MLD におけるマイクログリアは、病態進展を抑制する保護的側面を有する一方で、I 型インターフェロン応答の亢進を伴う特徴的な活性化状態を示すことが明らかとなった。したがって、MLD の治療戦略としては、マイクログリアの保護的機能を維持・増強しつつ、病態の増悪に関与する I 型インターフェロン応答を適切に制御することが有望であると考えられる。

(完)

引用文献

- 1) Kurai T, Hisayasu S, Kitagawa R, Migita M, Suzuki H, Hirai Y, Shimada T. AAV1 mediated co-expression of formylglycine-generating enzyme and arylsulfatase efficiently corrects sulfatide storage in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Mol Ther*. 2007 Jan;15(1):38-43.
- 2) Iwamoto N, Watanabe A, Yamamoto M, Miyake N, Kurai T, Teramoto A, Shimada T. Global diffuse distribution in the brain and efficient gene delivery to the dorsal root ganglia by intrathecal injection of adeno-associated viral vector serotype 1. *J Gene Med*. 2009 Jun;11(6):498-505.
- 3) Miyake N, Miyake K, Sakai A, Yamamoto M, Suzuki H, Shimada T. Treatment of adult metachromatic leukodystrophy model mice using intrathecal administration of type 9 AAV vector encoding arylsulfatase A. *Sci Rep*. 2021 Oct 15;11(1):20513.