

平成 30 年 9 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06909

研究課題名(和文) VWM型白質脳症の病態決定因子の探索

研究課題名(英文) Searching genes regulating VWM disease severity.

研究代表者

辻田 実加 (Tsujita, Mika)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：60397180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Vanishing white matter (VWM) 型白質脳症は発症時期や重症度に幅があることが知られているが、分子レベルでの病態決定因子は明らかにされていない。本研究では、VWM型白質脳症の原因遺伝子変異マウス(Toy)を用いて量的形質遺伝子座(Quantitative trait locus, QTL)解析と遺伝子発現解析を用いた影響因子探索を試みた。B6、C3H近交系統間の歩行異常の開始時期の差を指標としたQTL解析で関連の検出された領域ではイオントランスポーターやアポリポタンパク関連因子の発現差が顕著であった。本法はVWM型白質脳症の病態の分子レベル解明に有用だろう。

研究成果の概要(英文)：Vanishing white matter (VWM) disease is known to have a wide range of severity of, but the pathological determinants at the molecular level have not been clarified. In this study, we tried Quantitative trait locus (QTL) analysis and influence factor search using gene expression analysis using causative gene mutant mouse of VWM disease. In the genetic background of B6 and C3H strains, the difference in the start timings of walking abnormalities in mutant mice was evident, and as a result of QTL analysis using this as an indicator, correlated chromosomal regions were detected. In this region, several genes showed marked differences in expression levels (e.g., ion transporter and apolipoprotein related genes). This method will be useful for elucidating the molecular level of the pathology of VWM disease.

研究分野：神経科学

キーワード：モデル動物 連鎖解析 遺伝子疾患 小脳 白質脳症 病態決定因子

1. 研究開始当初の背景

EIF2B5 遺伝子は Vanishing white matter (VWM) 型白質脳症の原因遺伝子として 2001 年に報告された。VWM 型白質脳症は運動失調、痙性、大脳皮質白質病変に特徴づけられる。最初は小児の疾患とされていたが、近年では成人型も報告されている。eIF2B の 5 つのサブユニット変異はいずれも VWM 型白質脳症の原因となることがわかっており、中でも EIF2B5 遺伝子変異が患者の 65% を占めている。eIF2B は eIF2 (ヘテロ 3 量体) の G uanine nucleotide exchange factor (GEF) であり、翻訳開始因子としてタンパク質合成速度を調節している。ストレス時には eIF2 サブユニットのリン酸化により、eIF2 が eIF2B の競合的阻害因子となり、通常のタンパク質合成を阻害し、ストレス応答因子の発現を生じるストレス応答機能も担う。

EIF2B 変異に関連する疾患は症状の発現時期や重症度に幅があることが知られている。変異部位は酵素活性の低下の程度とは関連づけられるが、同じ変異を持つ場合でも発症時期や重症度が必ずしも一致しない。現時点では、発症時期やストレスなどが影響すると考えられているが、分子レベルでの病態決定因子は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、翻訳開始因子 eukaryotic translation initiation factor (eIF)2B サブユニット突然変異マウスの解析による Vanishing white matter (VWM) 型白質脳症の病態決定因子検索である。

本研究室で得られた突然変異マウスは、離乳後に発達不良、歩行異常などの表現型を示し、解析の結果 eIF2B サブユニットのミスセンス変異が原因であることがわかった。eIF2B は哺乳類の翻訳機構における主要コンポーネントで、進化の過程で良く保存されているヘテロ 5 量体 () であり、EIF2B1-5 遺伝子にそれぞれのサブユニットがコードされている。細胞におけるタンパク質合成過程において必須の役割を担い EIF2B を構成するサブユニットの変異はヒトにおいて VWM 型白質脳症をもたらすことが報告されている。なぜ全身に発現する遺伝子の異常で大脳皮質白質病変が優位に生じるのかはまだ明らかでなく、他の部位とは違う eIF2B 依存性の機能維持のメカニズムが存在すると考えられる。

突然変異マウスの表現型を解析する中で遺伝的バックグラウンド (近交系統) の違いによって発現時期や重症度が異なることが明らかとなった。近交系統間の遺伝子発現の違いがこの表現型の違いの原因と考えられたことから、量的形質遺伝子座 (Quantitative trait locus, QTL) 解析により、VWM 型白質脳症の病態決定因子同定の

可能性を検討した。

3. 研究の方法

B6 と C3H 系統に戻し交配した Toy マウスを用いて QTL 解析と遺伝子発現解析により病態決定因子を検索する。

1) 戻し交配系統の作成

最初の Toy マウスは B6 と C3H 系統の F1 (B6:C3H, 50%:50%) に B6 を交配した系統 (B6:C3H, 75%:25%) である。B6 と C3H 系間での表現型の違いを見るためにそれぞれの系統への戻し交配を実施した。それぞれの系統へ 4 回の戻し交配を行い、それぞれの遺伝的背景の寄与率が大きい個体を遺伝子背景検査により選択してその後の解析に用いた。

2) 指標とする表現型解析の確定

連鎖解析の指標とする表現型として体重変化、歩行異常、震えの出現をそれぞれ検討した。指標表現型と神経障害の関連性を確認するため、脳の病理学的解析として白質 (髄鞘) の変化を検討するため組織染色を行った。

3) 表現型の確認と遺伝子マッピング

戻し交配系統より得られた Toy ホモマウスは遺伝子抽出用に尾のサンプルを回収した。指標とする表現型を B6、C3H 各系統に 4 回戻し交配した B6N4 系統、C3N3 系統のそれぞれの Toy ホモマウスについて解析し、表現型の差が得られているかどうかを確認した。B6N4 と C3N3 の系統を一代交配した F1 マウス同士の交配による F2 の Toy ホモマウスは遺伝子抽出用に尾のサンプルを回収し、遺伝子マッピングを実施した。指標とする表現型を解析した。

4) QTL 解析、遺伝子発現解析 (マイクロアレイ)

指標とする表現型と遺伝子マッピング結果から連鎖解析を行い、表現型の重症化に関わる責任領域 (QTL) を検索した。また、B6N4、C3N3 の Toy および野生型マウスの小脳サンプルを用いてマイクロアレイにより網羅的な遺伝子発現解析を行った。

5) 候補遺伝子の検索

マイクロアレイのデータを解析し、発現量の差がみられた遺伝子と遺伝子マッピングで得られた QTL とを照らし合わせ、表現型重症化に関わる候補遺伝子を検索した。

4. 研究成果

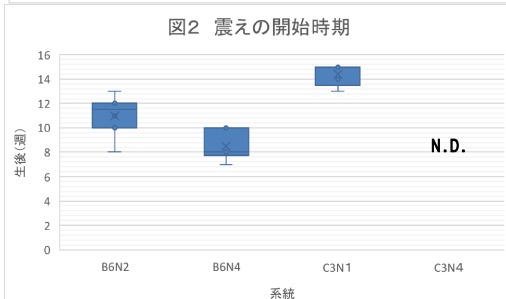
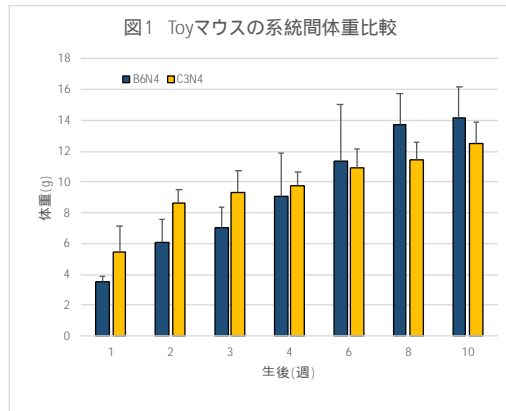
1) 戻し交配系統の作成

元系統から B6 系統、C3H 系統への戻し交配を 4 回行った上で連鎖解析用マウスの作出を行うこととした。通常交配により B6 系統、および C3H 系統への戻し交配を 4 回行った

(N4)。得られた B6N4 系統(B6 マウスへ 4 回の戻し交配を行った系統)、C3H N4 系統(C3H マウスへ 4 回の戻し交配を行った系統)の Toy ヘテロマウスに対して遺伝子マッピングにより遺伝的背景検査を実施し、それぞれの遺伝的背景の寄与率が高いマウスを連鎖解析用の交配に用いた。

2) 指標とする表現型解析の確定

連鎖解析の指標とする表現型解析の決定では、体重差、歩行異常の出現時期、震えの出現時期をそれぞれ検討した。この結果、体重差(図 1)では B6 系統、C3H 系統間で差が得られなかった。また、震えの出現(図 2)は B6N4 系統で早まる傾向が見られたが、C3N4 系統では、震えの表現型が出現しなかった。



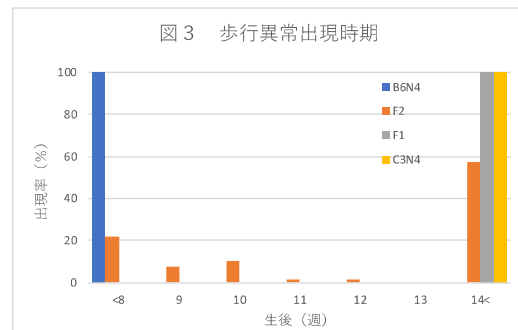
一方で、歩行異常の出現時期は B4N6 系統で 8 週令以前、C3N4 系統で 14 週令以降とはっきりした違いが得られた。これらの結果から、連鎖解析では歩行異常の出現時期を指標とすることに決定した。

病理学的解析では B6N4 系統、C3HN4 系統の Toy マウスの 12 週令で白質(髄鞘)の変化を検討するため KB 染色(髄鞘染色)、MBP(Myelin basic protein)抗体免疫組織染色を行ったが系統間で明らかな差はみられなかった。また、Toy の小脳 GFAP 抗体染色において、バグマングリアの進行性の形態異常が観察された。そこで Toy 小脳 4 週、12 週令における GFAP 抗体染色で系統間での比較を行ったが、明らかな差は見られなかった。

3) 表現型の確認と遺伝子マッピング

B6N4 系統、C3HN4 系統の Toy ヘテロマウスを交配して雑種の 1 代目である F1 系統を作製した。さらに F1 系統 Toy ヘテロマウス同士との交配により F2 Toy ホモマウスを得て解析に用いた。

F1 系統、F2 系統の Toy ホモマウス表現型解析を行った。歩行異常出現時期は、F1 系統ではすべて 14 週令以降に歩行異常が出現した。一方、F2 系統においては 8 週令以前から 14 週令以降まで、出現時期が分散した(図 3)。



表現型解析を行った F1 系統、F2 系統 Toy の尾をサンプリングし、遺伝子マッピングを実施した。その結果、染色体 15 番と X(雌個体)に正の相関、染色体 5 番と X(雄個体)に逆相関の可能性のある領域が検出された。

4) 遺伝子発現解析

B6N4 系統、C3HN4 系統を用いたマイクロアレイ解析を行った。

連鎖解析の指標として歩行異常を用いることから、遺伝子発現解析のサンプルとしては小脳を用いた。B6N4 系統、C3HN4 系統の Toy、野生型の解析を行い、B6N4 対 C3HN4、Toy 対野生型での 4 種類の比較を実施した。Toy において変異を生じている EIF2B5 の発現変動は見られなかった。両系統で eIF2B サブユニットの突然変異による機能異常を反映した小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現上昇がみられた。野生型においても系統間で発現量差が明らかな遺伝子が多く検出されたが、Toy に特徴的な系統差も検出された。

5) 候補遺伝子の検索

遺伝子発現解析、QTL 解析の結果を用いた形態決定因子の検索を行った。野生型、Toy のいずれも B6N4、C3HN4 系統間の比較で 10 倍以上の発現差を示す遺伝子が多く、中でもセリンプロテアーゼや脂質関連の遺伝子は共通して発現差が大きかった。野生型、Toy 間の比較では 10 倍以上の発現差を示す遺伝子は系統間での発現変動遺伝子数より少なく半数以下であった。B6N4 系統、C3HN4 系統のいずれの比較でも、野生型、Toy 間ではミトコンドリア機能異常や小胞体ストレス応答に関する遺伝子発現の差が大きかった。連鎖解析の結果、相関の可能性が認められた領域において遺伝子発現解析での結果を検索したところ、Toy の B6N4 系統、C3HN4 系統間に発現差がみられたのはイオントランスポーターやアポリポタンパク関連因子などであった。

6) まとめ

本研究では突然変異マウス Toy の QTL 解

析、遺伝子発現解析による VWM 型白質脳症の病態決定因子の探索を実施した。

連鎖解析の指標とする表現型検討において、B6N4 系統、C3HN4 系統の Toy マウス間では体重に差は見られなかったが、歩行異常、震えの開始時期にははっきりした差が検出された。震えについては C3HN4 系統で検出されないことから QTL 解析の指標に適さないことがわかった。病理解析では、Toy 小脳の GFAP 抗体染色によりバグマングリアの進行性の形態異常が観察された。歩行の表現型への関連が期待されたが系統間での違いは今回検出できなかった。歩行異常の開始時期に対する QTL 解析の結果、染色体 15 番と X(雌個体)に正の相関、染色体 5 番と X(雄個体)に逆相関の可能性のある領域が検出され、遺伝子発現解析の結果と併せて検討した結果、同領域ではイオントランスポーターやアポリポタンパク関連因子などで差が顕著であった。

本研究により、VWM モデル動物を用いた QTL 解析、遺伝子発現解析が病態決定因子の検索に有用である可能性を示すことができた。今回得られた一部のデータについては現在論文作成を進めているが、病態決定因子を同定し、病態の分子メカニズムを明らかにするためには、さらなる詳細な検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

照光(辻田)実加, 北浦 弘樹, 三浦 郁生, 小田 佳奈子, 清家 尚彦, 豊島 靖子, 若菜 茂晴, 五十嵐 博中, 中田 力
EIF2B5toy: 進行性の運動障害を示す突然変異マウスの発見と解析
第 39 回日本分子生物学会年会
2016 年 12 月 02 日 パシフィコ横浜(神奈川)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻田 実加 (TSUJITA, Mika)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号：60397180

(2) 研究分担者

ヒューバー ビンセント(HUBER, Vincent)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号：40422620

(3) 連携研究者

小田 佳奈子 (ODA, Kanako)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号：60708212

(4) 研究協力者

北浦 弘樹 (KITAURA, Hiroki)