

令和元年6月14日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15207

研究課題名（和文） B1-クリスタリン単独欠損ハムスターの創出とその心臓病研究への応用

研究課題名（英文） Creation and application of a new hamster line lacking beta-B1 crystallin

研究代表者

阪本 英二（Sakamoto, Aiji）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：40291067

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）： 難治性疾患に対する新たな治療法の開発は、今日の医学において極めて重要な課題である。そのための創薬には標的分子の探索が不可欠であり、我々はそのための独自の戦略として突然変異が原因で疾患を発症するハムスターを活用している。面白いことに、心筋症ハムスターには症状の異なる様々な亜系統が存在し、全ての系統で SG遺伝子が欠損している。我々は各系統において心筋症の表現型を修飾する変異遺伝子の同定を通じ、心不全の発症と進展に関わる意外性のある分子機構の解明と応用を目指している。今回は心筋肥大が特に顕著なBI014.6ハムスターに注目し、心臓病研究に資する新しい疾患モデル動物の系統の創出を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで B1-クリスタリンは、水晶体に特異的なタンパク質と考えられてきた。すなわち、水晶体のクリスタリンは分子量により、の3種類の複合体に分類され、それぞれはいくつかの単量体から構成される。しかし今後は、本研究で開発した新しい疾患モデル動物を活用することで、これまで想像すらされなかった B1-クリスタリンによる心筋の機能制御という新しい基礎医学分野の開拓が期待される。その上、ヒトの死因の3分の1を占める心臓病に対する新しい遺伝子診断と治療戦略の開発を可能にする予想外の可能性も切り開かれることであろう。

研究成果の概要（英文）： We are aiming to explore unexpected molecular mechanisms underlying various diseases by using spontaneously-occurring mutant hamsters. In this study, we made use of BI014.6 cardiomyopathic hamster which exhibits marked cardiac hypertrophy. By crossing normal and BI014.6 hamsters, we created a new hamster line lacking B1-crystallin protein. This study will be a starting point to elucidate the functional roles of B1-crystallin in both normal and failing hearts.

研究分野：分子医学

キーワード：分子病態 探索研究

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

難治性疾患に対する新たな治療法の開発は、今日の医学においてきわめて重要な課題である。そのための創薬には標的分子の探索が不可欠であり、アカデミアに対する期待は大きい。疾患の分子病態を解明するためのアプローチの一つとして、実験動物モデルが挙げられる。例えばノックアウト動物は、特定遺伝子の生体内における機能解析に極めて有用である。一方、突然変異動物は、興味深い症状を引き起こす原因遺伝子の特定に有用である。近年、この古典的とも言える突然変異動物が見直されるようになり、N-エチル-N-ニトロソウレアなどの薬剤を用いた突然変異マウス作成の大規模なプロジェクトが行われつつある。

我々は創薬の標的分子すなわち新たな疾患関連分子を探索するための独自の戦略として、突然変異で心筋症を発症するハムスターを活用している。その分子病態の解明を通じ、新薬の開発に貢献したいと考えている。

心筋症ハムスターには、新たな疾患分子群を探索する上で2つの利点がある。一つは、遺伝性のモデル動物であるため、個体間における症状のバラツキが軽微であること。もう一つは、発症原因となる遺伝子変異がノックアウト動物とは異なり偶発的であるため、何らかの新たな疾患分子群を発見できる可能性があることである。心筋症ハムスターの原因遺伝子がジストロフィン結合タンパク質の一つである - サルコグリカンであることを我々が同定した後、 - サルコグリカン遺伝子の異常がヒトでもマウスでも同様の心筋症を発症することが明らかになった。このことから、心筋症ハムスターはヒト型心不全モデルとして有用であると認識され、心不全に対する細胞移植の基礎研究などに用いられている。

面白いことに、心筋症ハムスターには症状の異なる様々な亜系統が存在するが、我々は全ての系統で - サルコグリカン遺伝子が欠損していることを明らかにした。その結果、心筋形質膜を安定化させる機能を有するジストロフィン結合タンパク質複合体の2次の崩壊、ひいては心筋細胞の変性に至ることが明らかになった。

その後、我々は各系統において心筋症の表現型を修飾する変異遺伝子の同定を通じ、ヒトにおける心不全の発症と進展に関わる分子機構の解明に役立つ糸口を模索している。今回注目したBI014.6は、様々な心筋症ハムスターの中でも心肥大が著明である。その原因はBI014.6には - サルコグリカン以外にも別の遺伝子異常が存在するのではないかと我々は考え、その探索を続ける中から今回の研究を立案した。

### 2. 研究の目的

我々は数多くの心筋症ハムスターの個体を観察する過程で、BI014.6のみが高頻度に白内障を伴うことに気がついた。そして、水晶体のタンパク質を解析することで、BI014.6の水晶体ではB1-クリスタリン分子が欠損していることを見出した。その後、B1-クリスタリンは正常では心筋でも発現しており、BI014.6では水晶体のみでなく心臓でも欠損しているのではないかと閃いた。本研究は、その直感的予想が正しいことを証明する上で重要な位置を占める。

実際に調べてみると、予想通りB1-クリスタリンは正常では心筋でも発現しており、BI014.6では水晶体のみでなく心臓でも欠損していることが分かった。そうしたB1-クリスタリンが生体の心臓でどのような機能を担っているかを解析可能にしようとするのが、本研究に着手するきっかけとなった。

心臓におけるB1-クリスタリンの機能を解析するためには、それが単独で欠損する実験モデル動物が必要である。これまでに、そのようなノックアウトマウスは存在しない。また、BI014.6は、B1-クリスタリンのみでなく - サルコグリカンも欠損するため、B1-クリスタリン単独の機能を調べるには不向きである。そこで、BI014.6を正常ハムスターと交配させることで、目的とするB1-クリスタリン単独ハムスターを作出しなければならない。

ハムスターは、マウスやラットと異なり、母親による産児の食殺が頻繁に起こる。その理由はいくつかあるが、結果としてハムスターの交配ならびに系統維持は、非常に難しいことが予想される。しかし、B1-クリスタリンによる心臓機能の調節機構という新たな分野を開拓するためには、B1-クリスタリン単独ハムスターを是が非でも作出しなければならない。

### 3. 研究の方法

BI014.6と正常ハムスターとを以下のように交配する。BI014.6と正常ハムスターは - サルコグリカン遺伝子とB1-クリスタリン遺伝子に関して異常ホモ(-/-, -/-)と正常ホモ(+/, +/)であり、次の第1世代は全例でヘテロ(+/-, +/-)になる。第2世代で - サルコグリカンが(+/)になる確率は1/4、かつB1-クリスタリンが(-/-)になる確率は $1/4 \times 1/4 = 1/16$ 、それがあるいはである確率は $1/16 \times 1/2 = 1/32$ である。このとを交配させた第3世代は、全例で(+/, -/-)になる。例えば、最初に8組交配すると、ハムスターの平均産児数を6匹(3組)とすると、第2世代では生まれる144匹(= 8組 x 3組 x 6匹)の1/32、つまり目的とするとがそれぞれ4~5匹ずつ得られることが期待される。これは、第3世代以降の創出に十分な数である。

各個体の遺伝子型は、 - サルコグリカンとB1-クリスタリン遺伝子の正常と異常アレルの診断を可能にするPCRの系を確立し、ゲノムDNAのPCRで決定する。尚、ハムスターにはマウスやラットと異なり尻尾が無いため、遺伝子診断に必要なゲノムDNAは耳介から抽出する。

#### 4. 研究成果

予想通り、ハムスターの交配は食殺の問題もあり、単純計算通りには行かなかった。しかし、忍耐強く交配を試みることで、 $\delta$ -サルコグリカン遺伝子が正常ホモ、B1-クリスタリン遺伝子が病気ホモである個体、すなわち、B1-クリスタリン単独ハムスターを と 共に数匹ずつ得ることができた。それらをさらに交配させることで、最終的に B1-クリスタリン単独ハムスターを と 共に一定数ずつ得ることに成功した。また様々な試行錯誤の結果、この新規に作成した系統の交配における特性もおおよそ理解することができるようになった。今後はこうした経験と知識を活かし、実際に研究が行えるように計画的で大規模な繁殖を可能にする体制を整える予定である。

本研究により、B1-クリスタリン単独ハムスターという新しい疾患モデル動物を創出することができた。このモデル動物の誕生によって、B1-クリスタリンによる心臓機能の調節機構を詳細に解析することが可能になった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

・ PCS 4th World Congress of Cardiothoracic-Renal Diseases-2017 (2017.11, Lisbon, The Republic of Portugal):

“Cardiomyopathic hamsters: delta-sarcoglycan and beyond”

A. Sakamoto, K. Ono

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。