

平成30年6月28日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21114

研究課題名(和文)先天性後肢麻痺ミュータントラットの神経軸索ジストロフィーモデルとしての樹立

研究課題名(英文) Establishment of KK rat strain as a model for neuroaxonal dystrophy

研究代表者

田中 美有 (Tanaka, Miyuu)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：00756893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、若齢時から後肢の歩行異常を呈し、病理学的に神経軸索ジストロフィー(NAD)と診断されたミュータントラット系統(KKラット)に着目した。まず、KKラットの原因遺伝子kk(未発表データ)とその変異を同定した。また、詳細な病理学的解析によって、スフェロイド病変が深部(固有)感覚に関連する感覚神経路に主座すること、KKラットでは軸索輸送の障害やシナプス機能の異常が、スフェロイド・軸索変性の発生メカニズムに関与していることを明らかにした。本研究で同定した遺伝子kkは、NADや他の神経疾患の原因遺伝子として報告されておらず、KKラットが新たなNADモデル動物として有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The KK rat, induced mutant rat strain, shows gait abnormality of hind limb and was histopathologically diagnosed as neuroaxonal dystrophy (NAD). We identified a novel mutation in kk gene (unpublished data) as the most likely causative gene of the KK rat. We also found that axonal spheroids were located mainly within the sensory systems, and the axonal transport deficits and synaptic dysfunction may be involved in spheroid formation and axonal degeneration in the KK rat. The kk gene has not yet been reported as a causative gene of NAD or other neurodegenerative diseases in mammals. Our results highlighted the importance of the KK rat as an animal model of NAD.

研究分野：獣医学，実験動物学

キーワード：神経軸索ジストロフィー 神経変性疾患 脳神経疾患 疾患モデル 病理学 スフェロイド

1. 研究開始当初の背景

神経軸索ジストロフィー (NAD) は、神経系組織におけるスフェロイド (腫大軸索) 形成を伴う神経軸索変性を特徴とする、まれな神経変性疾患である。NAD に分類される疾患は、いずれも根治療法はなく、予後も不良である。また、一部の疾患は原因遺伝子が特定されつつあるものの、その病態メカニズムは十分には解明されていない。そのため、治療法の確立を目指して、NAD の詳細な病態解明が課題となっている。

NAD はまれな疾患であり、研究対象とする症例数が少ないため、その病態解析・治療法評価の上で疾患モデル動物の果たす役割は非常に大きい。しかしながら、これまでに報告された NAD モデル動物は、INAD モデルである Pla2g6 ノックアウト・変異マウス (Wada et al. Am J Pathol. 2009 and Sumi-Akamaru et al. Neuropathology. 2015)、逆行性軸索変性モデルである gad (gracile axonal dystrophy) マウス (Yamazaki et al. Proc Soc Exp Biol Med. 1988) などのマウスモデル数種に限られており、ラット NAD モデルは報告されていなかった。マウスモデルの解析からは、NAD・軸索変性とミトコンドリア変性・酸化ストレス等との関連が報告されてきている。さらには、獣医学領域においても、犬種特異的な NAD が国内外で知られ、その一部では原因遺伝子の解析も進んでおり (Nibe et al. J Vet Med Sci. 2007 and Tsuboi et al. PLoS One. 2017)、それらの診断・治療方法、モデル動物としての応用の両面を目指した病因解明が進められている。

近年、我々は、F344/NSlc ラットを用いた ENU ミュータジェネシスにおいて、若齢時より後肢の歩行異常・後肢麻痺を呈し、次第に消瘦して死亡する個体を発見し、系統化することに成功した。このミュータント系統 (仮称: KK ラット) は、4 週齢頃から体重の減少が認められ、6~7 週齢頃に後肢麻痺を発症し、その後約 3 週間で死亡する (図 1)。

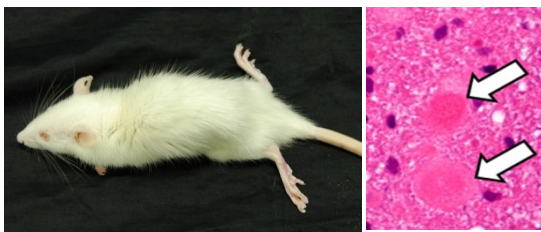


図 1. 9 週齢 KK ラット (左) と腫大軸索 (右)

先行研究での遺伝子マッピングによって得られた候補原因遺伝子には、これまでに NAD や他の神経疾患の原因遺伝子として報告されているものはない。さらに、予備的な病理組織学的解析の結果、KK ラットの脊髄の背索を中心として多数の腫大軸索 (図 1) が観察され、NAD と診断された。

2. 研究の目的

本研究では、病理組織学的に NAD と診断されたミュータント系統である KK ラットに着目した。KK ラットの原因遺伝子 *kk* の同定と、KK ラットの詳細な病態評価を行うことによって、本系統を新たな NAD モデル動物として樹立すること目的とした。

3. 研究の方法

(1) KK ラットの原因遺伝子の同定

これまでの解析により得られた 7 つの候補遺伝子について、RT-PCR 法、シーケンス解析により、遺伝子変異を検索した。遺伝子変異の同定後は、Cycleave PCR 法によって KK ラットの遺伝子診断を行った。

(2) CRISPR/Cas システムによる *kk* 遺伝子変異ラットの作製

研究開始当初は、KK ラットの原因遺伝子の立証を目的としたトランスジェニックレスキュー実験を実施するため、*kk* 遺伝子のトランスジェニックラットの作製を試みていた。しかし、複数のラインを得たものの、導入遺伝子の発現レベルが低く、レスキュー実験に供することができないことが予備検討で判明した。そのため、研究 2 年目からは、CRISPR/Cas システムを用いた検討方法に切り替えることとなった。

平成 29 年度 (2 年目) には、CRISPR/Cas システムによる *kk* 遺伝子変異ラットの作製に着手した。CRISPR/Cas9 と長鎖一本鎖 DNA (lssDNA) を用いて、エレクトロポレーションにより、KK ラット型の *kk* 遺伝子変異を、野生型ラット (F344 系統) の *kk* 遺伝子にノックインすることとした。(なお、本研究課題は、科研費採択課題を対象とした、先端モデル動物支援プラットフォーム「モデル動物作製支援」に採択された。)

(3) KK ラットの詳細な病理組織学的解析

発症前の 3 週齢、5 週齢、および発症後の 7 週齢、9 週齢のホモ型ラット (*kk/kk*) および対照型ラットの中枢神経系と造血器 (脾臓・胸腺) 等を採材し、HE 染色により病理組織学的評価を経時的に行った。中枢神経系は、スフェロイドの出現部位の分布についても詳細に評価した。

また、シナプス関連タンパクや細胞骨格タンパク (ニューロフィラメントなど) などに對する各種マーカーを用いた免疫組織化学染色や、電子顕微鏡観察により、KK ラットの病理組織学的特徴であるスフェロイド・変性軸索の性状を詳細に評価した。

4. 研究成果

(1) KK ラットの原因遺伝子の同定

7つの候補遺伝子の中から、KK ラットの原因遺伝子 *kk* (論文未発表データ) と、その変異 (ミスセンス変異) を同定した。

本研究で同定された原因遺伝子 *kk* は、ヒト・モデル動物いずれにおいても、NAD や他の神経疾患の原因遺伝子としての報告は全くなく、*kk* 遺伝子変異による NAD 発症メカニズムや、*kk* 遺伝子の中枢神経系における詳細な機能は不明である。今後は、リコンビナント KK タンパクを用いた機能解析や、他分子との相互作用解析などの実施も検討している。

(2) CRISPR/Cas システムによる *kk* 遺伝子変異ラットの作製

平成 29 年度より、先端モデル動物支援プラットフォームの「モデル動物作製支援」プログラムの元で、*kk* 遺伝子変異ラットの作製に着手したが、本研究期間内に目的の遺伝子改変ラットを得ることができなかった。

引き続き遺伝子改変ラットの作製作業を進め、目的とする *kk* 遺伝子変異ラットが得られ次第、その詳細な表現型を経時的に解析する予定である。具体的には、体重変化、歩行異常・後肢麻痺発症の有無、神経系を中心とした病理組織学的異常の有無を検索する。KK ラットの原因遺伝子が立証でき次第、本研究によって得られた成果を学術誌に投稿する予定である。

(3) KK ラットの詳細な病理組織学的解析 (国内学会において発表済み：学会発表①および②)

①中枢神経系病変

スフェロイド病変は発症前の 3 週齢から、脊髄・小脳・脳幹において認められ、発症後により重度となる傾向にあった。脊髄では胸髄・腰髄・仙髄の背索を中心に (図 2)、脳幹では、主に延髄薄束核・楔状束核・副楔状束核に多く局在していた。このことから、KK ラットのスフェロイド病変は、既報のヒトや動物、マウスモデルの NAD 同様、深部 (固有) 感覚に関連する感覚神経路に主座することが明らかとなった。

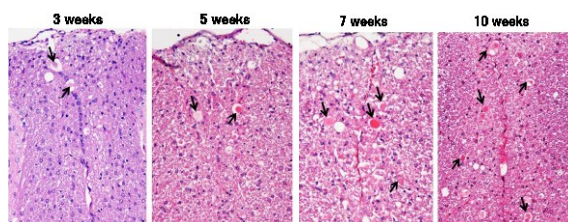


図 2. 腰髄背索でのスフェロイド病変

また、免疫組織化学的に、スフェロイドはシナプス関連蛋白、ニューロフィラメント、ユビキチンに陽性を示し、電子顕微鏡観察では、スフェロイド内に dense body、変性したミトコンドリア、膜状・管状構造が多数蓄積していたため、軸索輸送の障害やシナプス機能の異常が示唆された。さらに、小脳顆粒層では、スフェロイドに関連して大小の空胞病変が認められた。今後は、さらに詳細なスフェロイドの性状解析を進め、本系統におけるスフェロイド・軸索変性の発生機構の解明を目指す。

②造血器病変

発症前の 3 週齢から、脾臓の腫大・うっ血・リンパ濾胞の萎縮と、胸腺の萎縮が認められた。脾臓の腫大は発症の時期に最も顕著で、症状が進行し重篤化すると萎縮する傾向にあった。胸腺は、主に皮質の萎縮が顕著で、週齢が進むにつれて、皮質・髓質の境界が不明瞭化・消失し、最終的には胸腺全体が重度に萎縮した。詳細なメカニズムは不明であるが、KK ラットにおける造血器の異常が示唆された。

なお、病理組織学的に顕著な異常が検出された中枢神経系 (脊髄)、脾臓、胸腺については、発現変動のある遺伝子を確認するため、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を実施しており、現在、その解析データを詳細に検討中である。

本研究では、NAD の病態解析において必要不可欠である疾患モデル動物として、KK ラットが有用であることを初めて示し、また、その発症メカニズムの一端を明らかにした。同定した *kk* 遺伝子は、ヒト・動物のいずれにおいても、NAD や他の神経疾患の原因遺伝子としての報告は全くない。よって、*kk* 遺伝子を新規の NAD・軸索変性関連遺伝子として証明できることが期待される。また、本研究成果は、特発性の NAD の病因解明の一助にもなりうると考えられる。加えて、NAD の発症メカニズムに新たな知見をもたらすのみならず、神経変性疾患において認められる、軸索変性の普遍的なメカニズムの解明にも貢献しうるものである。

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 2 件)

① 田中美有、桑村 充、庫本高志、神経軸

索ジストロフィーモデルラットの病理組織学的検討. 第 132 回関西実験動物研究会、京都府立医科大学（京都府）、平成 28 年 12 月 9 日.

②田中美有、桑村 充、庫本高志. 神経軸索ジストロフィーモデルラットにおける中枢神経系病変の解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会、日本大学（神奈川県）、平成 28 年 9 月 6 日～8 日.

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 美有 (TANAKA, Miyuu)
京都大学・医学研究科・特定研究員
研究者番号： 00756893

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし