

平成21年5月15日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005～2008

課題番号：17390109

研究課題名（和文） Alexander 病の疾患モデルマウスの作製と解析

研究課題名（英文） Generation and analysis of mice model for Alexander disease

研究代表者

五味 浩司（GOMI HIROSHI）

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：90293240

研究成果の概要：Alexander 病の原因遺伝子であるグリア線維性酸性タンパク質(GFAP)がどのようにアストログリアの形態異常に関わっているのかを解明するため、GFAP 欠損細胞の反応特性をプリオン感染時に誘導される反応性グリオーススを指標に解析を行った。その結果、GFAP 欠損下でも、アストログリアの膨化、GFAP 以外のフィラメントタンパク質であるビメンチンの発現上昇といった反応性グリオーススが誘導されることを見出し、細胞の膨化程度と突起伸長度が野生型に比べ有意に減少していた。また、細胞の増殖形態を反映すると思われる Pired cells 形成の顕著な亢進を見だし、反応性グリオーススにおける GFAP の役割を解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	3,900,000	0	3,900,000
2006年度	2,900,000	0	2,900,000
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
総計	12,200,000	1,620,000	13,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：Alexander 病、グリア線維性酸性タンパク質、反応性グリオースス

1. 研究開始当初の背景

アレクサンダー(Alexander) 病は、アストログリアの異常に起因することが明らかとなった唯一のヒト遺伝病である。臨床的には、脳室の拡大を伴う巨脳症（水頭症）、痙攣、精神運動発達遅延、痙性四肢麻痺を示し、主に乳児期に発症する。2001年に米国のグループによって、Alexander 病がアストログリア特異的に発現するグリア線維性酸性蛋白質（GFAP）遺伝子の変異により生じることが報告された。乳児期発症型は進行性で予後が悪

く、発症後数カ月から数年で死亡し、病気の進行を止める有効な治療法は見つかっていない。病理学的には、特徴的なローゼンタール線維（Rosenthal fiber）がアストログリア内に凝集体として出現する。Rosenthal fiber は、生化学的及び免疫電顕によって成分解析がなされ、GFAP の他に α B-crystallin、HSP27、ubiquitin が主要成分であることなどが明らかにされている。これまで、Brenner ら(2001)によって、ヒト GFAP を過剰発現させたトランスジェニックマウス（Tg）が作製

され、アストログリア内に GFAP とともに α B-crystallin、HSP27 が蓄積し、Alexander 病と同様の Rosenthal fiber の出現が認められた。しかし、高発現系統の Tg は生後 1-2 週間で致死となるため、疾患モデルとしての系統化が不可能である。また、低発現系統の Tg では 1 年以上の生存は認めるものの、Rosenthal fiber の脳内蓄積は極めて少なく、*in vivo* 疾患モデルとは成り得ていない。そこで我々は、GFAP 遺伝子の変異型体に基づく Rosenthal fiber の性状特性と病態形成との関連を解析できる疾患モデルを確立できないかという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、Alexander 病と同様の変異型体を導入し、Rosenthal fiber の性状特性と病態形成との関連を解析できる疾患モデルマウスを作製する。疾患モデルとしての解析は、発症週齢、生存期間、臨床所見（巨脳症・痙攣・運動発達・麻痺など）、病理所見（光顕・電顕）、Rosenthal fiber の性状特性（生化学的分析）及び行動特性などについて解析し、有効な治療法が見つからない本疾患の遺伝子治療に向けての基礎的知見の集積を目指す。また、アストログリアにおける GFAP の機能を明らかにするため、これまでに我々が作成した、GFAP 欠損マウスやヒト型 GFAP リン酸化部位変異マウスを用いて、GFAP フィラメントがアストログリアフィラメントの構成および可塑的变化においてどのような役割を果たしているのかについて、病理学的な反応性グリオシスの形態解析を指標にして解析を行う。

3. 研究の方法

対象とする GFAP 遺伝子の変異型体として、最も多くの症例で報告されている R239C 変異（乳児型の典型例）と病態への修飾作用が示唆されている P47L 変異（乳児型の重複変異例）、家系内での遺伝性が明らかにされており発症年齢の遅延と臨床症状の軽症化が認められる V87G 変異（成人型）について作製する。Alexander 病は、アレルのヘテロ変異によって発症する優性機能獲得型変異（dominant-gain of function）であることが明らかにされている。このことは特に、乳児型モデルの作製において、通常の Tg 作製手法により野生型アレルの存在下で変異型 GFAP を発現させても、Tg 自体が幼齢発症により系統化できないことを意味している。

また Tg では、変異の意義を評価する上で発現量の'フレ'が問題となることが懸念される。そこで我々は、これらの点を回避するために、マウス ES 細胞を用いたノックイン法で GFAP 遺伝子座に変異を導入する。ノックイン・アレルでは、*loxP* 配列で挟んだ薬剤マーカーカセット（*loxP-pgk-neo-loxP*）を標的部位に挿入することで、その時点での変異型 GFAP の発現を抑制する。こうして得られた親系統マウスと組換え酵素 Cre を発現する Tg 系統（*CAG-Cre* マウス）とを交配し、仔世代において *loxP-pgk-neo-loxP* を除去すると同時に変異型 GFAP の発現をスイッチングさせる。また、アストログリアにおける GFAP の機能を明らかにするため、反応性グリオシスを指標にした形態学的解析を行う。その際、グリオシス誘導系として、GFAP のリガンド候補であるプリオンタンパク質に着目し、スクレイピープリオンの感染実験を用いる。

4. 研究成果

(1) Alexander 病における GFAP の変異型体に対応する変異マウスの作製を目的として、乳児発症型として最も多くの症例が報告されている変異型である R239C の単独変異、この R239C 変異との重複によってその病態の軽症化に関連している可能性がある P47L との重複変異を導入したジェノミックコンストラクトを作成用の 129Sv マウスに由来するジェノミック DNA ライブラリーより野生型 GFAP 遺伝子クローンを分離し、特定の変異を導入後、ターゲティングベクターを作製した。

(2) マウス ES 細胞に導入実験に先立つ本研究課題実施中に海外の研究グループにより、同一のストラテジーによって変異マウスが作製され、上記に提案した解析特性のいくつかについて報告がなされた。そこで、同一変異個体の重複作製実験の遂行を断念し、当該変異マウスについて電顕形態学的解析ならびに行動学的解析に主眼をおいた共同研究を開始する準備を整えた。また、電顕形態学的解析において基礎となる GFAP 存在下あるいは欠損下でのアストログリアの反応特性を明らかにするため、申請者がすでに作製した GFAP 欠損マウスにおいて、反応性グリオシスを誘導するプリオン感染脳の標本を作成し、形態学および生化学的に解析を行った。

(3) 変異 GFAP の代謝不全にまつわる問題を解明するため、電顕形態学的解析において変異型 GFAP の存在下、または GFAP 欠損下で

のアストログリアの反応特性を明らかにした。GFAP 欠損マウスにおいては、プリオン感染時に誘導される反応性グリオシスの定性および定量的解析を行った。その結果、GFAP 欠損下でも、アストログリアの細胞膨化が認められ、GFAP 以外のグリアフラメント構成成分であるビメンチンの発現上昇を見出した。しかしながら、ビメンチンの発現上昇はグリアフラメントの主要成分である GFAP を量的に相補するものではなく、微量な程度に留まっていた。これらのことから、グリアフラメントの大部分が欠失しても、反応性グリオシスそのものは誘導されることを示したものである。さらに、グリア細胞の膨化程度と突起伸長度が野生型に比べ有意に減少していることが定量的に示され、また、細胞の増殖形態を反映すると思われる典型的な Piled cells formation が顕著に亢進していることを見出した。

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 9 件)

① Kasai K, Fujita T, Gomi H, Izumi T, (Docking is not a prerequisite but a temporal constraint for fusion of secretory granules), *Traffic*, 9, 1191-1203, 2008, 査読有

② Yu M, Kasai K, Nagashima K (他 6 名、8 番), (Exophilin4/Slp2-a targets glucagon granules to the plasma membrane through unique Ca^{2+} -inhibitory phospholipid-binding activity of the C2A domain), *Molecular Biology of the Cell*, 18 (2), 688-696, 2007, 査読有

③ Gomi H, Mori K, Itohara S, Izumi T, (Rab27b is expressed in a wide range of exocytic cells and involved in the delivery of secretory granules near the plasma membrane), *Molecular Biology of the Cell*, 18 (11), 4377-4386, 2007, 査読有

④ Izumi T, Kasai K, Gomi H, (Secretory vesicle docking to the plasma membrane: molecular mechanism and functional significance), *Diabetes Obesity and Metabolism*, 9 (2), 109-117, 2007, 査読有

⑤ Mizutani S, Gomi H, Hirayama I, Izumi T, (Chromosome 2 locus Nidd5 has a potent effect on adiposity in the TSOD mouse), *Mammalian Genome*, 17 (5), 375-384, 2006, 査読有

⑥ Kato T, Shimano H (他 11 名、14 番目), (Granuphilin is activated by SREBP-1c and involved in impaired insulin secretion in diabetic mice), *Cell Metabolism*, 4 (2), 143-154, 2006, 査読有

⑦ Otani N, Nawashiro H, Fukui S, Shima K, Gomi H, Brenner M, (Enhanced hippocampal neurodegeneration after traumatic or kainate excitotoxicity in GFAP-null mice), *Journal of Clinical Neuroscience*, 13(9), 934-938, 2006, 査読有

⑧ Gomi H, Mizutani S, Kasai K, Itohara S, Izumi T, (Granuphilin molecularly docks insulin granules to the fusion machinery), *Journal of Cell Biology*, 171 (1), 99-109, 2005, 査読有

⑨ Izumi T, Gomi H, Torii S, (Functional analysis of Rab27a effector granuphilin in insulin secretion), *Methods in Enzymology: GTPases Regulating Membrane Targeting and Fusion*, 403 (18), 216-229, 2005, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 藤田卓二, (インスリン分泌顆粒の開口放出における Rab27a およびそのエフェクター Granuphilin の役割), 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2008. 5. 22-23, 東京

② Kasai K, (Exophilin4/Slp2-a targets glucagon granules to the plasma membrane through unique Ca^{2+} -inhibitory phospholipids-binding activity of the C2A domain), The 8th Servier-IGIS Symposium, 2007. 3. 6-7, France

③ Kasai K, (Exophilin4/Slp2-a targets glucagon granules to the plasma membrane through unique Ca^{2+} -inhibitory

phospholipid-binding activity of the C2A domain), 第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会合同大会, 2007. 5. 28-30, 福岡

④

水谷伸, (肥満を伴う 2 型糖尿病モデルマウス TSOD における脂肪重量に関わる遺伝子領域の解析), 第 20 回糖尿病動物研究会, 2006. 2. 9, 東京

⑤

Kasai K, (Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation), The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, 2005. 6. 15-16, Omiya

[その他]

ホームページ等

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/molend/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五味 浩司 (GOMI HIROSHI)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：90293240

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：