

平成 21 年 6 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18790754

研究課題名（和文） 神経型ゴーシェ病のモデルマウスの開発と治療に関する研究

研究課題名（英文） Development of Gaucher disease mouse models with neurodegeneration.

研究代表者 山田 穰

（YAMADA MINORU）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター研究所・研究員

研究者番号：40416243

研究成果の概要：

ゴーシェ病の中枢神経症状に対する病態解明と治療法の開発を目的として新たなゴーシェ病のモデルマウスの開発を行う。マウスのグルコセラブロシダーゼ遺伝子に変異を導入したターゲティングベクターを作成した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,200,000	0	2,200,000
2007 年度	100,000	0	100,000
2008 年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	30,000	2,430,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児科・先天代謝異常・神経

1. 研究開始当初の背景

現在までに報告されているゴーシェ病のモデルマウスは、生後間もなく死亡するか、神経症状の無い軽症のものが多く、治療研究には有用ではない。従って新たなモデルマウスの開発を計画した。特徴は、中枢神経障害の頻度が高い日本人に比較的多い変異をマウスに導入すること、コンディショナルノックアウトの手法を用いてマウスの症状をコントロールする点である。このマウスの特徴は少なくとも1つは、点変異のアリルを持っている、即ち変異型の酵素を持っているという点にある。中枢神経障害が出現し、かつある程度の期間生存できるゴーシェ病マウスが開発できれば、治療研究も進展すると考えら

れその意義は大きい。

2. 研究の目的

ゴーシェ病の中枢神経症状に対する病態解明と治療法の開発を目的として新たなゴーシェ病のモデルマウスの開発を行う。方法は、1) 日本人に多い L444P 変異、F213I 変異を導入したマウスの作成、2) L444P 変異のホモマウスは生直後に死亡するが、コンディショナルノックアウトを組み合わせたことにより、このマウスの生直後の死亡を防ぐ。即ち重症ではあるが程度の期間生存できるマウスを作成する。3) 得られた変異マウスについて症状、酵素活性、脂質の蓄積などについて評価する。4) 神経症状を徐々に発症し、半年程度で死亡するようなマウスが

得られた場合、治療を試み、その有効性を明らかにする。

3. 研究の方法

マウスグルコセプロシダーゼのゲノムに変異を導入したノックインマウスを作成する。導入する変異については、グルコセプロシダーゼのL444P変異、F213I変異とする。マウスのグルコセプロシダーゼ遺伝子に変異を導入したターゲティングベクターを作成し、マウスES細胞へ電気穿孔法を用いて導入する。そしてES細胞中の目的とするグルコセプロシダーゼ遺伝子の配列をターゲティングベクター中の変異遺伝子による相同組み換えによって置換する。相同組み換えは、グルコセプロシダーゼ遺伝子ゲノムDNA配列と、ターゲティングベクター中の非改変部分との配列との相同性を利用して、ある確率をもって生じさせることができる。得られた組み換えES細胞につき、相同組み換えが起こっているかどうかまずネオマイシンの薬剤耐性因子によりスクリーニングを行う。更にPCR法により、スクリーニングを行う。この方法においてネオマイシン耐性因子の配列の存在がグルコセプロシダーゼの発現に影響を与える可能性を除外するためにネオマイシン耐性因子領域をCre/loxPシステムで削除する。ターゲティングベクターのネオマイシン耐性因子の両側にloxP配列をあらかじめ導入しておく。組み換えの起きたES細胞中でCre酵素を一時的に発現させる事により、ネオマイシン耐性因子を持たないES細胞が得られる。こうして得た変異遺伝子を持つES細胞を、マイクロインジェクション法を用いて野生型マウスの胚盤胞に導入する。そして、このES細胞胚を偽妊娠状態の仮親マウスの子宮に移植し、出産させることによりキメラ動物を作製する。同様の方法を用いて、グルコセプロシダーゼのコンディショナルノックアウト用マウスを作成する(loxP-GBA)。

4. 研究成果

18年度から19年度にかけてマウスグルコセプロシダーゼのゲノムに変異を導入したターゲティングベクターを作成した。ターゲティングベクターの作成にはBAC recombineering systemを用いた。まず、マウスグルコセプロシダーゼ遺伝子を含むBACを基にしてそのイントロン領域へ両端をCre配列で挟んだネオマイシン耐性遺伝子を挿入した。次に、このBACに一塩基置換となる変異(3018T A)を導入した。この変異は、ヒトグルコセプロシダーゼのF213I変異に相当する。このBACのグルコセプロシダーゼ遺伝子を含む領域をプラスミドにrecombineeringを用いて大腸菌内でサブク

ローニングすることでターゲティングベクターを作成した。20年度はこのベクターの配列の確認を行った。また、マウスES細胞へ導入するための準備として細胞培養の準備を行った。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

山田 穰(YAMADA MINORU)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター研究所・研究員
研究者番号：40416243

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし