

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06455

研究課題名(和文)ポルフィリン症モデルマウスを用いた病態発症機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathoetiology of porphyria by using a mouse model

研究代表者

森 政之(Mori, Masayuki)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：60273190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Coproporphyrinogen oxidase遺伝子に活性低下型変異を有するマウスを用いた病理学的・分子遺伝学的解析により、本マウスがヒトの遺伝性ポルフィリン症と類似した肝臓病態を発症することを明らかとした。さらにその病態、および白内障の発症機序の一つは、過剰貯留したコプロポルフィリンが細胞内でタンパク質を凝集させ、小胞体ストレス反応を亢進させることであることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

指定難病の一つであり、多彩な病態を発現するが、その発症機序が不明、かつ有効な治療・薬剤が無い遺伝性ポルフィリン症の発症機序の一つが、細胞内でのタンパク質凝集と小胞体ストレスの亢進であることを示した。これらの経路を標的とした遺伝性ポルフィリン症の医療の開発に新たな方向性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Pathological and molecular genetic analysis of mice with a hypomorphic mutation in the coproporphyrinogen oxidase gene revealed that this mouse develops a pathological condition in the liver similar to that of human hereditary porphyria patients. It was also clarified that aggregation of proteins and the enhanced endoplasmic reticulum stress response caused by excessively accumulated coproporphyrin in cells underlie the pathological condition and cataracts of the mice.

研究分野：実験動物学

キーワード：ポルフィリン症 モデルマウス 遺伝子 組織障害 肝臓 皮膚 小胞体ストレス タンパク質凝集

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

遺伝性ポルフィリン症は、ポルフィリン生合成経路で働く一連の 8 種の酵素をコードする遺伝子のいずれかの変異により、ポルフィリン中間体が過剰に産生されて消化器症状、神経症状、皮膚症状などの多彩な病態を発現する疾患である。本症は、神経症状、筋力低下、消化器症状などを主徴とする急性型と、光線過敏症、線維化などの皮膚症状を主徴とする皮膚型に大別される。原因遺伝子変異についての知見の蓄積とともに正確な遺伝子診断が可能となっているが、ポルフィリン中間体がこれら多彩な病態を発現させる機序は未だ不明であり、そのために、それに立脚した有効な治療・薬剤が無い。ポルフィリン症は本邦でも平成 21 年度に難病に指定されており、発症機序の解明、およびその予防/遅延法の確立は喫緊の課題である。

ポルフィリン症の病態発現機序の解明や治療法の開発にはモデル動物を用いた研究が必須である。しかしながら、ヒトのポルフィリン症の原因となる遺伝子変異や病態などを模倣する良いモデル動物は無かった。従来、そのようなモデル確立の試みは原因遺伝子のノックアウトマウスの作出により行われていた。しかしながら、ヘムは生体にとって必須の分子であるため、この合成経路のどの段階であってもノックアウトアレルをホモ化して完全に遮断してしまうとマウスは胎生致死となる。一方、ノックアウトアレルと野生型アレルのヘテロ個体は野生型アレルホモ個体の 50%程度の十分な酵素活性を保持するために病態を発現しない。

本研究代表者は、遺伝性白内障モデルとして知られていた BALB/c-*nct* マウスの白内障原因遺伝子の同定を試みた。その結果、白内障の一義的原因は、ポルフィリン生合成経路の第 6 段階においてコプロポルフィリノーゲン III のプロトポルフィリノーゲン IX への変換を触媒するコプロポルフィリノーゲン酸化酵素 (CPOX) をコードする遺伝子の突然変異 (以下 *Cpox^{nct}*) であり、この突然変異の結果、BALB/c-*Cpox^{nct}* マウスの CPOX タンパク質の 380 番目のアミノ酸は野生型でのアルギニンとは異なるロイシンに置換されていることを明らかとした (*Exp. Eye Res.* 112: 44-50 (2013))。興味深いことに、ヒトの遺伝性コプロポルフィリン症の一家系において、CPOX での相同アミノ酸 (ヒトでは 391 番目) におけるアルギニンからトリプトファンへの置換変異があり、そのために CPOX 酵素活性が野生型の約 22%に低下していることが報告されていた。そこで BALB/c-*Cpox^{nct}* マウスを調査してみると、CPOX 活性が野生型の 15%程度に低下していることが分かった。また、BALB/c-*Cpox^{nct}* マウスにおいては若齢時よりレンズや肝臓を含めて全身的に野生型マウスの 100~500 倍程度のコプロポルフィリンが貯留しており、さらにヒトの遺伝性コプロポルフィリン症患者と同様に糞尿中にも大量のコプロポルフィリンを排泄していることも分かった。これらの結果は、BALB/c-*Cpox^{nct}* マウスがヒトの遺伝性コプロポルフィリン症の真のモデルであり、その解析を通じてポルフィリン症の病態発症機序の解明にも寄与できる可能性を示唆した。

2. 研究の目的

BALB/c-*Cpox^{nct}* マウスにおけるポルフィリン症病態特性、およびコプロポルフィリンの過剰蓄積による病態発症機序を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BALB/c-*Cpox^{nct}* マウスの皮膚・肝臓の病理学的解析

1~15 ヶ月齢のマウスの BALB/c-*Cpox^{nct}* マウス、および BALB/c マウス (正常対照) を安楽死させた後、心臓から採血した。皮膚、および肝臓を摘出し、ホルマリン固定した後にパラフィン包埋、組織切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色し、病理像を評価した。

(2) BALB/c-*Cpox^{nct}* マウスの病態発症の分子的基盤の解明

血清中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) とアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) の測定は専門業者に外注した。BALB/c-*Cpox^{nct}* マウス、および BALB/c マウスの肝臓をホモジナイズし、タンパク質に対する特異抗体を用いたウェスタン・ブロット解析により調査した。

(3) *Cpox* 遺伝子変異が白内障を惹起する分子遺伝学的機序の解明

BALB/c-*Cpox^{nct}* マウスのレンズにおける分子的变化を明らかとするために、4 週齢 (各群 $n = 5$) および 12 週齢 (各群 $n = 3$) の BALB.NCT-*Cpox^{nct}*、および BALB/c マウス (正常対照) を安楽死させた後にレンズを摘出し、そのホモジネートからトータル RNA を抽出した。cDNA ライブラリーの構築、RNA-Seq データの取得とパイオインフォーマティクス解析は専門業者に外注した。RT-PCR により転写発現レベルの確認を行なった。また、レンズのホモジネートに関しては、特異抗体を用いたウェスタン・ブロット解析によりタンパク質レベルの確認を行なった。レンズの TUNEL 染色によりアポトーシスを調査した。レンズのホモジネートを遠心して可溶性画分と不溶性画分に分離し、それぞれを SDS ポリアクリルゲル電気泳動した後に高分子領域のゲルからタンパク質を抽出し、LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析を行なった。蛍光基質を使用してレンズにおけるプロテアソーム活性を測定した。

(4) *Cpox* 遺伝子変異と wavy coat との関係の解析

Cpox^{nct} 変異アレルを有する NCT マウスの生後第一回目の発毛被毛の波状化 (wavy coat) の遺伝連鎖解析を行なった。(BALB/c x NCT)_{F1} x NCT 戻し交雑マウス群 (n = 199) を作出し、生後第一回目の発毛被毛の波状化の有無、および尾から抽出したゲノム DNA を用いて調査した *Cpox* 遺伝子変異、およびマーカー遺伝子型との連鎖解析を行なった。連鎖が確認された染色体領域の候補遺伝子の変異検索を行なった。さらに、変異が検出された protease, serine 53 (*Prss53*) 遺伝子について CRISPR/Cas9 法よりのノックアウトマウスを作出し、波状被毛との因果性を確認した。

4. 研究成果

(1) BALB/c-*Cpox^{nct}* マウスの臓器の病理学的解析

BALB/c-*Cpox^{nct}* マウスの臓器を病理学的に調査した結果、雄に限定されてはいたものの、遺伝性コプロポルフィリン症患者と同様に皮膚や肝臓にも病態を発症していることが分かった。皮膚に関しては、2 ヶ月齢以降の一部の雄マウスに真皮層の線維化と肥厚、皮下脂肪の薄化などの強皮症様の病態が認められた。しかしながら、その重篤度には個体間、および同一個体の中でも部位によってかなりの違いがあった。肝臓に関しては、雄では 2 ヶ月齢以降の全ての個体に肝細胞と細部核の肥大、脂肪滴の貯留、マロリー体の形成、クッパー細胞の過形成などの重篤な病理変化が認められた。肝細胞が障害されていることは、血液中の AST と ALT のレベルが有意に上昇していることから確認された。一方、雌の皮膚と肝臓にはどの月齢でも病理変化は認められなかった。このような病態発症の性差の原因は不明であるが、性ホルモンの関与が強く疑われる。さらに、握力低下、便秘様症状、乏尿など、ヒトのポルフィリン症の患者と類似した症状も呈することが分かった。以上のデータは BALB/c-*Cpox^{nct}* マウスが遺伝性コプロポルフィリン症患者を遺伝子変異、および病態の両面で模倣する他に類を見ないモデルであることを示している。

(2) BALB/c-*Cpox^{nct}* マウスの病態発症の分子的基盤の解明

BALB/c-*Cpox^{nct}* マウスの肝臓内のタンパク質をウェスタン・ブロット解析した結果、小胞体内においてタンパク質の折りたたみを触媒する酵素であるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、細胞質において細胞骨格を構成するケラチン 8、核膜の裏打ちタンパク質であるラミン A/C など、様々な細胞内小器官のタンパク質が凝集体を形成していることが確認された。これらのタンパク質は細胞と核の形態や恒常性の維持、遺伝子発現やタンパク質品質管理などに深く関与する。したがって、「これらを含めたタンパク質がコプロポルフィリンによって凝集されることでその機能が低下し、細胞の形態・機能が変化・攪乱され、BALB/c-*Cpox^{nct}* マウスの肝臓病態に帰結する」との機序が想定された。

(3) *Cpox* 遺伝子変異が白内障を惹起する分子遺伝学的機序の解明

レンズの RNA-Seq 解析の結果、BALB/c-*Cpox^{nct}* マウスのレンズにおいて 4 週齢 (病理学的には正常) および 12 週齢 (白内障発症) で共通して転写発現レベルが低下していた 15 個の遺伝子が、また共通して上昇していた 13 個の遺伝子が検出された。これらのデータの発現差異遺伝子解析、および遺伝子オントロジー解析の結果、*Cpox^{nct}* マウスのレンズでの小胞体ストレスの亢進が示唆された。リアルタイム PCR およびウェスタンブロット解析データからも、小胞体ストレス伝達経路である PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) シグナル経路の ATF4、CHOP、およびリン酸化 eIF2 α の上昇が確認された。また、PERK シグナル経路の活性化により細胞内でのタンパク質の翻訳産生が抑制されるが、レンズにおける主要構成タンパク質、かつ分子シャペロンでもある α -クリスタリンを含むタンパク質の量も *Cpox^{nct}* マウスでは低下していることが確認された。一方、持続的な小胞体ストレスはアポトーシスを誘導するが、TUNEL 染色の結果、*Cpox^{nct}* マウスのレンズ上皮細胞にはアポトーシス像は観察されなかった。さらに *Cpox^{nct}* マウスのレンズにおける可溶性凝集タンパク質、及び不溶化タンパク質の質量分析器を用いたプロテオーム解析の結果、可溶性凝集タンパク質としてケラチンが検出された。また、白内障レンズ内の大量の不溶化タンパク質はケラチンとクリスタリンであることが判明した。これらのタンパク質凝集に付随して、*Cpox^{nct}* マウスのレンズではプロテアソームの活性も上昇していることが分かった。以上のデータから、「BALB/c-*Cpox^{nct}* のレンズにおいて 1.コプロポルフィリンの慢性的かつ過剰な蓄積がタンパク質の凝集を誘発する、2.凝集タンパク質が小胞体ストレス経路の活性化を惹起しそれがクリスタリンを含むタンパク質の翻訳産生を抑制する、3.クリスタリン量が抑制されることでタンパク質の凝集と不溶性タンパク質がさらに増加する、の悪循環が生じており、これが最終的に白内障発症に帰結する」との発症機序が示唆された。

本研究において明らかとなった小胞体ストレス反応経路は、遺伝性ポルフィリン症の予防・遅延のための新たな標的となりうると考えられた。

(4) *Cpox* 遺伝子変異と wavy coat との関係の解析

遺伝連鎖解析において、(BALB/c x NCT)_{F1} x NCT 戻し交雑マウス群での wavy coat 発症率 32.2% (64/199 匹) は 50% より有意に低いことから、NCT マウスにおける wavy coat 表現型を規定する劣性遺伝子は単一ではないことが示唆された。wavy coat 発症戻し交雑マウス 64 個体は全て第 7 染色体上 65 cM 付近のマーカー遺伝子座において NCT アレルのホモ型であったことから、この領域に wavy coat の第一の原因遺伝子が存在することが分かった。また、第 9 染色体上 48 cM 付近のマーカーでの遺伝子型の分離比は NCT アレルのホモ型に有意に偏っていた (ホモ : ヘテロ = 47 : 17) ことから、この領域にも wavy coat の発症に対して弱い効果をも

つ遺伝子が存在することが示唆された。一方、第 16 染色体上に存在する *Cpox^{nct}* 変異遺伝子との連鎖は認められなかったことから、この変異遺伝子は wavy coat とは無関係であることが分かった。遺伝子変異検索の結果、NCT マウスは第 7 染色体 69.84 cM に存在する protease, serine 53 (*Prss53*) 遺伝子の第 1 イントロンに intracisternal A particle (IAP) レトロトランスポゾンの挿入変異を有することが判明した。CRISPR/Cas9 法により *Prss53* 遺伝子にエキソン欠失変異を導入された B6-*Prss53^{em}* マウスには NCT よりも軽微な wavy coat が認められた。遺伝相補性試験において、(B6-*Prss53^{em}* × NCT) F1 マウスには wavy coat は認められなかったが、(B6-*Prss53^{em}* × NCT) F2 マウス 24 匹のうち *Prss53^{em}* アレルのホモ個体や IAP 挿入型アレルとのヘテロ個体を含めた 17 個体には NCT と同程度の wavy coat が認められた。この結果は、NCT マウスの wavy coat の第一の原因は *Prss53* 遺伝子の IAP 挿入突然変異である一方で、発症には NCT のその他の遺伝子の関与も必須であることを示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 森 政之	4. 巻 70
2. 論文標題 ポルフィリン症の病態発現分子機序の新仮説：オンリーワンのモデルマウスの解析から見えるもの	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 信州医学雑誌	6. 最初と最後の頁 137-144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu C, Miyahara H, Dai J, Cui X, Li Y, Kang X, Higuchi K, Mori M	4. 巻 215
2. 論文標題 Involvement of increased endoplasmic reticulum stress in the development of cataracts in BALB.NCT-Cpoxnct mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Exp. Eye Res.	6. 最初と最後の頁 108905-108905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2021.108905	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori M, Liu C, Yoshizawa T, Miyahara H, Dai J, Igarashi Y, Cui X, Li Y, Kang X, Higuchi K	4. 巻 -
2. 論文標題 Polygenic control of the wavy coat of the NCT mouse: involvement of an intracisternal A particle insertional mutation of the protease, serine 53 (Prss53) gene, and a modifier gene	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mamm. Genome	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00335-021-09926-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 森 政之	4. 巻 53
2. 論文標題 遺伝性コプロポルフィリン症マウスにおける病態発症機序の解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 34-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 亢 暁静, 森 政之, 代 健, 宮原 大貴, 劉 暢, 五十嵐 佑一, 崔 小冉, 李 瑩, 樋口 京一
2. 発表標題 コプロポルフィリノーゲン酸化酵素遺伝子変異マウスは心筋変性を呈する
3. 学会等名 第50回日本心脈管作動物質学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 政之, 劉 暢, 吉沢 隆浩, 宮原 大貴, 代 健, 五十嵐 佑一, 崔 小冉, 李 瑩, 亢 暁静, 樋口 京一
2. 発表標題 NCTマウスのwavy coatの第一の原因はPrss53遺伝子のIAP挿入突然変異である
3. 学会等名 日本実験動物学会 第68回総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------