

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 22 年度 ～ 平成 23 年度

課題番号：22790825

研究課題名（和文）GFAP 遺伝子変異によるグリア細胞の機能変化およびその修飾因子の解明

研究課題名（英文）Functional alteration of astrocytes induced by *GFAP* mutation and the modified factors

研究代表者

吉田 誠克（YOSHIDA TOMOKATSU）

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：90457987

研究成果の概要（和文）：アレキサンダー病の原因である GFAP 遺伝子変異がグリア細胞にあたえる機能変化やその修飾因子について、培養細胞モデルを用いたマイクロアレイおよびリアルタイム PCR による解析、患者 DNA を用いたプロモーター遺伝子の多型解析にて検討した。結果、シャペロン蛋白が変異 GFAP の異常凝集に重要な役割を果たす可能性、プロモーター遺伝子多型による GFAP 発現量変化が臨床症状を修飾する可能性を示した。さらに新たな病態モデルとして変異 *GFAP* 導入ショウジョウバエモデルを作成した。

研究成果の概要（英文）：Alexander disease is a rare neurodegenerative disease caused by the mutations encoding glial fibrillary acidic protein (GFAP). To identify modified factors to clarify functional alteration of glial cells with mutant GFAP, we performed microarray analysis, real-time PCR or GFAP promoter gene analysis using cell models or patient's DNA. These studies indicated α B-crystallin may play an important role in mutant GFAP cells and the alteration of GFAP expression controlled by GFAP promoter gene may modify the clinical course. We also prepared *Drosophila* model constructed by inducing GFAP gene as a new disease model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：アレキサンダー病、GFAP、ショウジョウバエ、プロモーター遺伝子、グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

2001年にアレキサンダー病の原因遺伝子として*GFAP*が同定された。それまで病理学所見以外に診断ができず、乳幼児に認められる

まれな予後不良の疾患と認識されていたが、緩徐進行性の延髄・頸髄症状を呈し、*GFAP*変異を示す成人型アレキサンダー病が報告されるようになった。われわれの施設でも口蓋ミオクロー

ヌスと著明な脊髄萎縮を示す家系例において、アレキサンダー病では報告されていない新しい*GFAP*変異を報告し、さらに2002年からは他施設からの依頼も含めて成人型アレキサンダー病を中心に遺伝子解析を行い、*GFAP*変異とその表現型の関係について報告してきた。また、2009年度には本邦におけるアレキサンダー病の全国調査を行い、診断基準に着手した。

また、基礎研究面では当施設で解析した変異*GFAP*導入発現ベクターを作成し、アストロサイト由来の培養細胞内で発現させ、細胞レベルにおける*GFAP*変異がグリア細胞に与える形態的・機能的変化を免疫組織化学、migration assayにより検討した。その結果、変異*GFAP*発現細胞は形態的な変化を生じるだけではなく、凝集体が形成される以前にグリア細胞の機能変化が生じることを示し、グリア細胞内外の修飾因子の存在を示唆した。さらにGFPでタグを付した変異*GFAP*をグリア細胞内に発現させ、実際の運動の様子についてタイムラプス解析を行った。結果、細胞質に認められる*GFAP*の凝集過程は変異が存在するドメインにより異なること、また凝集体の存在する細胞では細胞分裂過程が阻害されていることを見出した。

海外でも変異*GFAP*導入培養細胞や変異*GFAP*導入トランスジェニックマウスから得たアストロサイトを用いた研究により凝集体の可溶性低下やシャペロン蛋白の関連が報告されたが、病態・臨床表現型を十分に反映されるモデルの作成には至っていなかった。

2. 研究の目的

本研究ではアレキサンダー病の原因遺伝子である*GFAP*変異がグリア細胞に与える影響と病態を修飾する因子をリアルタイムPCRやDNAチップを用いて解明することを目的とす

る。また、新たな病態モデルとしてショウジョウバエモデルを作製し、治療法開発の足掛かりとすることを計画した。最終的にはターゲットを定めて治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)アレキサンダー病ショウジョウバエモデルの作成：ヒト野生型と各ドメインの変異*GFAP*(R70W・R239C・R416W)をショウジョウバエで過剰発現させるため GAL4 結合配列をプロモーターに持つTFWベクターへクローニングした。野生型または変異型ベクターをショウジョウバエ受精卵へ微量注入し、P因子法により、遺伝子導入ショウジョウバエ系統(Tg-D^{GFAP})を作製した。次に各組織特異的に発現を制御できる GAL4 ドライバー系統と交配させることにより、表現型に異常を生じるかを解析した。また複眼や複眼原基、神経系において病理学的にアレキサンダー病で認められる Rosenthal fiber の有無を解析した。

(2)変異*GFAP*導入培養細胞の網羅的遺伝子解析：変異*GFAP*(V87G, R88C, R416W)を導入したアストロサイト由来細胞より mRNA を抽出し、Affymetrix社のオリゴヌクレオチドアレイを用いて、その発現パターンをヒト野生型*GFAP*導入細胞と比較検討した。

(3)アレキサンダー病における*GFAP*遺伝子重複の検討：アレキサンダー病を疑われ、当院に遺伝子解析依頼のあった12症例(変異*GFAP*陽性4例、*GFAP*多型4例(1例は変異もあり)、臨床的に本病と矛盾しない変異陰性例5例、コントロール2例)に対して、SYBR greenを試薬としてリアルタイムPCRを行い比較C_T法による相対定量を行った。

(4)アレキサンダー病患者における GFAP プロモーター遺伝子多型解析：当施設で解析した GFAP 変異を伴うアレキサンダー病患者 11 名(大脳優位型(1 型)2 名、延髄・脊髄型(2 型)5 名、中間型(3 型)4 名)に対して、直接シーケンス法にて GFAP 遺伝子上流 2kb の塩基配列を決定した。さらに -250bp 遺伝子多型において C/A のホモ接合体を認めた症例についてはさらにサブクローニングにより、プロモーター遺伝子多型と GFAP 変異との遺伝子座の位置関係を検討した。

4. 研究成果

(1)スクリーニングにて変異 GFAP を導入したショウジョウバエに赤眼がみられた(wild-type、R239C、R416W)。赤眼を呈するショウジョウバエを 1 匹ずつ回収し、バランス染色体をもつショウジョウバエ系統と交配し、次世代で生まれてくるショウジョウバエで line 化を行い、野生型 GFAP 導入ショウジョウバエを 3 系統、R239C GFAP 導入ショウジョウバエを 5 系統、R416W GFAP 導入ショウジョウバエを 6 系統樹立した。複眼原基特異的な GAL4 driver 系統(GMR-GAL4)と野生型 GFAP 導入ショウジョウバエ系統および変異 GFAP 導入ショウジョウバエをそれぞれ交配し、次世代について電子顕微鏡ならびに蛍光染色にて観察した。免疫染色では各ショウジョウバエ系統において幼虫の複眼原基での GFAP の発現がみられ、変異 GFAP ではコントロール、野生型に比べて凝集体の出現を認めた(図 1)。複眼構造においては野生型では明らかな複眼構造の変化は見られなかったものの、各単眼における剛毛の発現がみられなかった(図 2)。一方、変異 GFAP 導入

ショウジョウバエでは明らかな複眼構造の破壊がみられた。

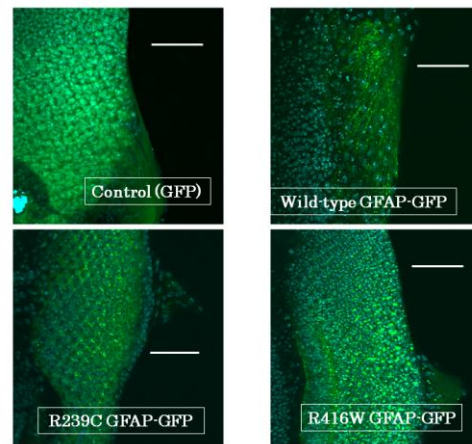


図 1：GFAP 遺伝子導入ショウジョウバエ(幼虫)の複眼原基。

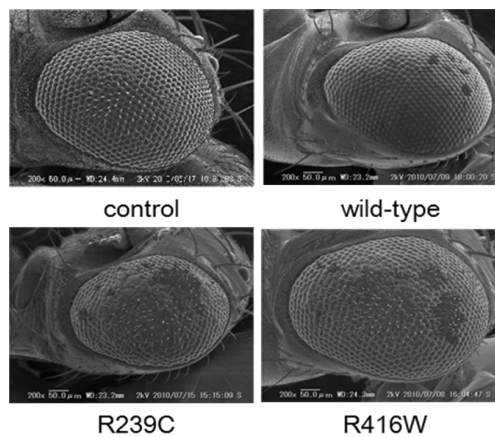


図 2：GFAP 遺伝子導入ショウジョウバエ(成虫)の複眼構造。

(2) 変異 GFAP 導入細胞では proteolipid protein 1 や S100B の down-regulation が認められた。また、R416W では α B クリスタリンの up-regulation が認められた。 α B クリスタリンについては GFAP 凝集抑制として重要な役割を担うことが他の研究報告にてすでに示されており、これを支持する結果となった。

(3) 変異 GFAP 陽性例、GFAP 多型症例、臨床

的に本病と矛盾しない変異陰性例のいずれにおいても *GFAP* の gene dose に有意差は見られず、今回検討した症例群において *GFAP* の multiplication は存在しないものと判断した。

(4) -250bp *GFAP* プロモーター遺伝子多型は4例がCアレル、2例がAアレルのホモ接合体、5例がC/Aのヘテロ接合体であった。ヘテロ接合体症例においてはいずれのアレルが *GFAP* 変異と同一遺伝子上に存在するかにより臨床表現型の差は認めなかった。また、Cアレルをホモ接合体でもつ症例では歩行不能例が多い傾向にあった。プロモーター遺伝子多型は臨床病型を決定する因子ではないが、臨床症状を修飾する因子である可能性が示唆された。

	性別	検査時年齢(歳)	発症時年齢(歳)	臨床病型	初発症状	歩行不能年齢(歳)	<i>GFAP</i> 変異	プロモーター遺伝子多型
1	M	16	1	1型	痙攣	6	R239L	C/A
2	M	4	4	1型	痙攣	-	R88C	A/A
3	M	67	64	2型	嚙下障害	-	R70W	C/A
4	M	56	51	2型	歩行障害	-	M74T	C/A
5	M	53	51	2型	構音障害	-	M74T	C/A
6	M	24	18	2型	歩行障害	-	L357P	C/C
7	M	58	12	2型	歩行障害	30歳代	E362G	C/C
8	F	31	1	3型	歩行障害	-	V87L	C/A
9	M	37	36	3型	歩行障害	-	R79H	A/A
10	F	51	5	3型	歩行障害	43	R79H	C/C
11	F	47	3	3型	脳炎症状	42	A268D	C/C

図3：アレキサンダー病患者10例の *GFAP* 遺伝子変異とプロモーター遺伝子多型の関係

本研究によりシャペロン蛋白が変異 *GFAP* を有するグリア細胞の機能に何らかの関与を示す可能性を示し、プロモーター遺伝子多型による *GFAP* 発現量増加は臨床症状を修飾する可能性を示した。以上の結果から変異 *GFAP* を有するアレキサンダー病の治療標的として分子シャペロンや *GFAP* 凝集体そのものが候補になりうる可能性が示唆された。また、ショウジョウバエモデルは遺伝子スクリ

ーニングや薬物スクリーニングを検討することにより修飾因子の病態への関与や治療法の開発に役立つものと考え。なお、アストロサイトの重要な機能としてニューロンや血管との相互作用が知られており、今後は分子シャペロンや *GFAP* 凝集体がアストロサイトを中心とするネットワークにどのような影響を与えるかを検討することが病態解明に重要と考える。

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2件)

- ① Yoshida T, Nakagawa M. Clinical aspects and pathology of Alexander disease, and morphological and functional alteration of astrocyte induced by *GFAP* mutation. *Neuropathology* 査読有 2011. DOI: 10.1111/j.1440-1789.2011.01268.x
- ② Yoshida T, Sasaki M, Yoshida M, Namekawa M, Okamoto Y, Tsujino S, Sasayama H, Mizuta I, Nakagawa M. Nationwide survey of Alexander disease in Japan and proposed new guidelines for diagnosis. *J Neurol* 査読有 2011; 258: 1998-2008. <http://www.springerlink.com/>

[学会発表] (計8件)

- ① 吉田誠克. アレキサンダー病の臨床・病理および *GFAP* 遺伝子変異がアストロサイトにもたらす形態・機能異常. 第52回日本神経病理学会総会学術研究会. 2011年6月2日; 京都.
- ② 笹山博司. 変異 *GFAP* 導入による Alexander 病ショウジョウバエモデル作成. 第52回日本神経学会総会. 2011年5月18日; 名

古屋.

- ③吉田誠克. アレキサンダー病の全国有病者数調査および二次調査結果—乳児型、若年型を中心に—. 第53回日本小児神経学会総会. 2011年5月28日; 東京
- ④吉田誠克. アレキサンダー病の全国有病者数調査および臨床的特徴に関する二次調査結果の報告. 第51回日本神経学会総会. 2010年5月20日; 東京.
- ⑤Yoshida T. Alexander disease and glial fibrillary acidic protein. Neuro2010. Sep. 4 2010. Kobe.
- ⑥Sasayama H. A *Drosophila* model of Alexander disease constructed using mutant *GFAP*. Neuro2010. Sep. 4 2010. Kobe.
- ⑦Yoshida T. Clinical manifestations of Alexander disease in Japan. EFNS 2010. Sep. 27, 2010. Genova.
- ⑧吉田誠克. 全国調査により得られたアレキサンダー病の *GFAP* 変異と表現型の関連に対する検討. 第55回日本人類遺伝学会. 2010年10月30日; 大宮.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

特記すべき事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 誠克 (YOSHIDA TOMOKATSU)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 9045798

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者: なし