

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590404

研究課題名(和文) 家族性アミロイドポリニューロパチーのダブルヒト化モデルマウスによる治療実験

研究課題名(英文) Experimental therapy using double humanized mouse model for familial amyloidotic polyneuropathy.

研究代表者

李 正花 (LI, Zhenghua)

熊本大学・生命資源研究支援センター・特任助教

研究者番号：80398239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスRbp4遺伝子をヒトRBP4遺伝子で、マウスTtr遺伝子をヒト正常TTR遺伝子およびヒト変異TTR遺伝子で置換したヒト化マウスの作製を行った。このダブルヒト化マウスを用いて、アミロイド沈着を解析したところ、従来のTg(6.0-hTTRMet30)と消化管等ではほぼ同等の、心臓ではより多量の、そして坐骨神経においてもアミロイド沈着を観察した。さらに、CHF5074投与により、TTR 4量体は安定化され、血中TTRレベルが上昇すること、心臓や胃におけるアミロイド沈着防止効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：We produced three strains of double humanized mice, Rbp4hRBP4: TtrhTTRVal/Val, Rbp4hRBP4: TtrhTTRVal/Met, Rbp4hRBP4: TtrhTTRMet/Met, by replacing mouse Rbp4 and Ttr gene with human RBP4 and normal or mutant TTR gene, respectively. Although the serum hTTR levels were much lower than those in Tg(6.0-hTTRMet30) or Tg(6.0-hTTRMet30):Ttr-/-, similar amount of amyloid deposition was observed in alimentary tracts. In addition, amyloid deposition was observed in heart and sciatic nerve in Rbp4hRBP4: TtrhTTRVal/Val and Rbp4hRBP4: TtrhTTRMet/Met. Administration of CHF5074 to these mice resulted in increase of serum TTR by stabilizing TTR tetramers and in decrease of amyloid deposition in heart, stomach and sciatic nerve, suggesting that CHF5074 have a preventing effect on amyloid deposition.

研究分野：医歯薬学

キーワード：分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

TTR は主に肝臓で発現し、4 量体として血中に分泌され、甲状腺ホルモンやレチノール結合タンパク(RBP)と結合し、T4、T3、レチノール等の運搬に参与する。これまでに、変異 TTR タンパクがアミロイド沈着に至るには、(1) 4 量体の単量体への遊離、(2) 単量体の修飾、(3) 修飾単量体の凝集、(4) 凝集単量体から不溶性アミロイド線維への変換、(5) 血清アミロイド P タンパク(SAP)のアミロイド線維への付着による安定化、を経過すると考えられている。しかし、有効な治療法として肝臓移植以外になく、アミロイド沈着に参与する要因の解析を通して、誰でもが受けることのできる新たな治療法の開発が重要な課題である。

申請者の研究室において作製した Tg マウスモデルの解析から、ヒト FAP の患者とほぼ同様の組織でアミロイド沈着を生じ、ヒトモデルになることをまず世界で始めて明らかにしている。しかし、以下のような問題点が指摘されている。(1) ヒトとマウスでは、127 個中 25 個のアミノ酸が異なっており、物理化学的な性質が異なること、(2) それゆえマウス TTR 遺伝子が残存していると、マウスとヒトの TTR 間でヘテロ 4 量体を形成し、ヒトの 4 量体よりも安定化されること、(3) ヒトとマウスの雑種 4 量体が形成されるモデルでは、治療法の正確な検証ができないことである。

上記問題の解決には、マウス遺伝子をノックアウト(KO)した上で、ヒト変異遺伝子を持つ Tg マウスを作製する必要があるが、KO と Tg が別々の系統であれば、何度も交配が必要で、労力がかかる。そこで、申請者らは第 1 段階でマウス TTR 遺伝子を完全破壊し、その後マウス Ttr 遺伝子座にいかなるヒト変異遺伝子も自在に挿入できる方法(可変型相同組換え法)を開発した。

この方法を用いて、ヒト正常 TTR(Val) 遺伝子及び変異遺伝子(Met)を挿入した遺伝子ヒト化マウス、Ttr^{hVal} および Ttr^{hMet} を作製し解析を行い、置換したヒト TTR 遺伝子の組織特異性はマウス Ttr 遺伝子とまったく同じであり、脳の脈絡層で発現し、かつ発現量も Val³⁰ および Met³⁰ で同じであり安定して発現することが分かった。また、マウスとヒトの両方の TTR 遺伝子を持つヘテロマウス(Ttr^{+/hVal}) とヒト TTR のみを持つヒトホモマウス(Ttr^{hVal/hVal}) を比較すると、肝臓でのヒト TTR の mRNA 及びタンパクの発現量は、予想通り Ttr^{hVal/hVal} は Ttr^{+/hVal} の 2 倍である。ところが、血清中の TTR 量は Ttr^{hVal/hVal} は Ttr^{+/hVal} に比し 40% 程度であること、その理由は、ヒト TTR ホモ 4 量体はヒト/マウス TTR ヘテロ 4 量体よりも不安定なためであること、さらにその不安定な理由はヒト TTR ホモ 4 量体は、肝臓内でマウス RBP とうまく結合できないためであることを明らかにしている(Zhao et al. Genes Cell 2008)。したがって、マウスの TTR

および RBP が存在する限り、種々の治療法を試みても、正確な検証はできないと考えられた。そこで、マウス Rbp 遺伝子もヒト化する実験を行った。すなわち、(1) マウス RBP の完全破壊マウス(Rbp^{tm2})の作製、(2) ヒト RBP 遺伝子で置換したマウスの作製(Rbp4^{hRBP4})である。これらのマウスを解析したところ、肝臓および血清でのヒト RBP の mRNA 及びタンパクの発現量は、予想通り Rbp4^{hRBP4/hRBP4} は Rbp4^{+/hRBP4} の 2 倍であることが分かった。

2. 研究の目的

研究には以下の 5 系統が必要であるが、Rbp4^{hRBP4} と Ttr^{hVal} または Ttr^{hMet} との交配により、Rbp4^{hRBP4};Ttr^{hVal/hVal}、Rbp4^{hRBP4};Ttr^{hVal/hMet}、Rbp4^{hRBP4};Ttr^{hMet/hMet} を得る。また、すでに作製済みの Tg(6.0-hTTR Met)、Ttr^{-/-}:Tg(6.0-hTTR Met)を増産する。これらについて、以下のような略称を用いる。

Rbp4^{hRBP4};Ttr^{hVal/hVal} ⇨ RBP4:V/V

Rbp4^{hRBP4};Ttr^{hVal/hMet} ⇨ RBP4:V/M

Rbp4^{hRBP4};Ttr^{hMet/hMet} ⇨ RBP4:M/M

Tg(6.0-hTTR Met) ⇨ Tg

Tg(6.0-hTTR Met):Ttr^{-/-} ⇨ Tg:Ttr^{-/-}

本研究の目的は、(1) 遺伝子ヒト化マウスの有用性の検証、(2) CHF5074 の短期投与効果の検証、(3) CHF5074 の長期投与効果の検証を行うことである。

なお、これまで Ttr^{hMet30} と同程度の血清 TTR レベル(2-3mg/dl)を持つ他のトランスジェニックマウスにおいてアミロイド沈着を観察している(Transgenic Res. 6: 261-269, 1997)ことから、TTR 遺伝子及び RBP 遺伝子とともにヒト化したマウスにおいてもアミロイド沈着が十分期待できる。

CHF5074 は、イタリアの CHIESI FARMACEUTICI S.P.A が、アルツハイマー病の治療薬として開発したものであるが、既知の Diflunisal とは側鎖の違いにより anti-cox 活性が低くなり、副作用としての胃腸障害が少なく、より有望であると考えられている。これは TTR の 2 量体と 2 量体の間、いわゆる central channel に Tyroxine (T4)と同じ部位に結合し(中央下の青い部分)、同程度にアミロイド化を防止するとの結果を得ている。なお、CHF5074 により T4 が TTR と結合できなくても、アルブミン等がその運搬に参与でき、T4 の欠乏等の問題は生じないことが明らかとなっている。したがって、治療薬として使用できる可能性が高い。

これらのマウスを用いて CHF5074 による治療実験を行い効果が確認されれば、大きな負担がかかる肝臓移植をする必要がなくなることから、その意義は極めて大きい。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子ヒト化マウスの有用性の検証

上記のマウス系統を conventional condition で飼育し、生後 1 年、1 年半、2

年の時点で、脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、骨格筋、胃、小腸、大腸、坐骨神経におけるアミロイド沈着を解析する。また、抗ヒト TTR 抗体及び抗アミロイド A 抗体を用いて、免疫染色を行い、TTR によるアミロイド沈着であるかどうかを解析する。

(2)短期投与実験

CHF5074 の短期的効果を解析するため、4 週間投与し、血中の hTTR、hRBP4 量を測定する。また、肝臓における hTTR および hRBP4 の mRNA の発現量、hTTR の 4 量体の量を解析する。

(3)長期投与実験

上記のマウス系統に、in vitro ではヒト TTR 4 量体を安定化させることが実証されている CHF5074(これが含まれた餌をすでに入手済みである)を用いて、アミロイド沈着を防止できるかどうかの治療実験を行う。また、CHF5074 投与による全身への影響を見るため、継時的に体重測定、血液生化学、血液学等の解析を行い、諸臓器での異常が出現するかどうかを解析する。

4. 研究成果

(1) 遺伝子ヒト化マウスの有用性の検証

4 系統のマウス(RBP4:V/V, RBP4:V/M, Tg, Tg:Ttr^{-/-})に CHF5074 を投与し、生後 1 年、1 年半、2 年の時期に、脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、骨格筋、胃、小腸、大腸、坐骨神経を採取し、組織切片を作製した。組織切片をコンゴレッド染色後に、偏光顕微鏡下で観察し、apple-green の変更を発するかどうかで、アミロイド沈着を解析した。その結果、全般的には、RBP4:V/V, RBP4:V/M においては、血中の TTR 濃度が低いにもかかわらず、アミロイド沈着は、Tg や Tg:Ttr^{-/-}と比較しても、遜色なかった。RBP4:V/V, RBP4:V/M では、心臓においても沈着がみられ、ヒトと同様の組織で沈着することが確認された。RBP4:V/M では、坐骨神経の神経上膜にもアミロイド沈着が観察された。heat shock transcription factor 1 欠損の遺伝背景のヒト変異 TTR トランスジェニックマウスで観察されているが、そのような状況ではなく坐骨神経に沈着が観察されたのは、世界で初めてである。RBP4:V/V においても、アミロイド沈着が観察されたことは、ヒトの老人性 amyloidosis のモデルになり得ることを示唆している。

(2)短期投与実験

RBP4:V/V および RBP4:M/M における血中の TTR 濃度を測定したところ、それぞれ 4.20 ± 0.40 および 0.67 ± 0.27 であり、約 6.3 倍の違いがあることが分かった。肝臓での遺伝子発現レベルは同じであることから、血中レベルの違いは、M/M が不安定であるためと考えられた。

RBP4:V/V と RBP4:M/M に CHF5074 を 375ppm の濃度で含む餌を 4 週間与えた。RBP4:V/V において CHF5074 投与前の血中 hVal 量は、4.04

± 0.15 \square g/mL であった。CHF5074 投与後 3 日目から上昇し、1.5 倍となり、そのレベルが持続した。RBP4:M/M においては、CHF5074 投与前の血中 hVal 量は、 0.56 ± 0.14 \square g/mL であり、Rbp4^{hRBP4};Ttr^{hVal/hVal} の 14%であった。投与後 3 日目から上昇し、最大 5 倍となり、その後は、1.7 倍から 2.7 倍のレベルが持続した。

血中レベルの増加が、hTTR の発現上昇によるのか、あるいは TTR 安定性の増加によるかどうかを、RT-PCR および glutaraldehyde 法を用いて解析した。その結果、mRNA 量は不変であること、一方正常または変異 TTR とともに 4 量体の量が増加すること、TTR 4 量体の安定性が増加していることがわかった。したがって血中 TTR の上昇は、TTR 4 量体の安定化によることが分かった。

上記のことは、CHF5074 は、正常及び変異 TTR とともに 4 量体を安定化し、血中レベルを増加させること、hMet の 4 量体は hVal の 4 量体と比較し、極めて不安定であること、しかし、CHF5074 の投与後は安定化され血中レベルが増加することが示唆された。

また、CHF5074 およびすでに臨床試験が開始されている diflunisal について、computer simulation による、retino-RBP4-TTR との結合親和性を解析した。その結果、正常 TTR に対しては、CHF5074 のほうが、diflunisal よりも結合親和性が高いこと、一方、変異 TTR に対しては両者の結合親和性はほぼ同じであること、患者は正常と変異のヘテロ TTR^{Val/Met} であることから、CHF5074 のほうがより高い効果を持つことが推察された。

(3)長期投与実験

CHF5074 を 125ppm または 375ppm 含まれた餌を投与し、アミロイド沈着への影響を解析した。その結果、Tg や Tg:Ttr^{-/-}への効果は観察されなかった。心臓における沈着が、RBP4:V/V への 375ppm 投与において、有意に少なかった。胃における沈着が、RBP4:V/V への 375ppm 投与において、有意に少なかった。坐骨神経における沈着が、RBP4:V/V への 125ppm および 375ppm 投与において、少ない傾向にあった。

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 3 件)

Mu, Y., Jin, S., Shen, J., Sugano, A., Takaoka, Y., Qiang, L., Imbimbo, B. P., Yamamura, K. and Li, Z. CHF5074 (CSP-1103) stabilizes human transthyretin in mice humanized at the transthyretin and retinol-binding protein loci. FEBS Lett. 査読有 589: 849-856, 2015. Doi: 10.1016/j.febslet.2015.02.020. Murakami, T., Sango, K., Watabe, K.,

Niimi, N., Takaku, S., Li, Z., Yamamura, K., Sunada, Y. Schwann cells contribute to neurodegeneration of transthyretin amyloidosis. J. Neurochem. 査読有 in press. Doi: 10.1111/jnc.13068
Hayashi, H., Sato, Y., Li, Z., Yamamura, K., Yoshizawa, T. and Yamagata, K. Roles of hepatic glucokinase in intertissue metabolic communication: examination of novel liver-specific glucokinase knockout mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有 460: 727-732, 2015. Doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.097

〔学会発表〕(計 3 件)

李正花, 牟彦双, 荒木喜美, 山村研一: Ttr および Rbp 遺伝子座のダブルヒト化による血中ヒト TTR の増加, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012.12.11-12.14, 福岡 (マリンメッセ福岡)

Li, Z., Mu, Y., Shen, J., Araki, K., Yamamura, K.: Improvement of retinal function and vitamin A availability in humanized mice at retinol-binding protein locus, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013.12.3-12.6, 兵庫 (神戸ポートアイランド)

Tatsufumi Murakami, Kazunori Sango, Kazuhiko Watabe, Zhenghua Li, Ken-ichi Yamamura, Yoshihide Sunada. Schwann cells affect neurodegeneration in transthyretin amyloidosis. 第 37 回日本神経化学大会, 2014.9.11-13, 神奈川 (パシフィコ横浜)

〔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 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.irda.kumamoto-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

李 正花 (LI ZHENGHUA)

熊本大学・生命資源研究支援センター・特任助教

研究者番号 : 80398239

(2) 研究分担者

なし

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし

研究者番号 :