

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591273

研究課題名(和文)変異GFAP遺伝子導入アレキサンダー病疾患モデルに対する薬剤効果研究

研究課題名(英文)Research for drug effectiveness in Alexander disease model

研究代表者

吉田 誠克 (Yoshida, Tomokatsu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90457987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：アレキサンダー病は、アストロサイト特異的に発現するGFAPをコードする遺伝子の変異を認める神経変性疾患である。本研究では、安定発現系細胞モデルを作成して薬物投与実験を行い、RNAseq法によるトランスクリプトーム解析を試みた。変異GFAPショウジョウバエモデルに対して、薬物スクリーニングおよびclimbing assayを行った。変異GFAP遺伝子導入モデルマウスの海馬より分離したアストロサイトを用いて、マイクロアレイ解析を試みた。は現在解析中である。は、4種類の薬剤を用いて薬物スクリーニングとclimbing assayを試みたが明らかな変化は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Alexander disease is a neurodegenerative disorder, in which the genetic mutation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), which is specifically expressed in astrocytes, is observed. To study the contribution of GFAP gene mutation to this disease, we applied three kinds of investigation as follows. 1) We established a stable astrocyte cell strain expressing wild or mutant GFAP and, then, applied transcriptome analysis using RNAseq method following drug screening. 2) We applied drug screening and climbing assay to mutant GFAP inducing drosophila model. 3) We applied microarray analysis to astrocytes derived from hippocampus in mutant GFAP mice model. At present, 1) and 3) are under analysis. As for 2), we applied drug screening using four kinds of drugs and performed climbing assay. However, neither improvement of abnormal compound eye structure nor change of the speed of climbing assay was found.

研究分野：臨床神経内科学、臨床遺伝学

キーワード：アレキサンダー病 GFAP アストロサイト トランスクリプトーム解析

1. 研究開始当初の背景

アレキサンダー病はアストロサイト細胞質に認められる glial fibrillary acidic protein (GFAP)を主成分とする凝集体蓄積を病理学的特徴とする稀な難治性神経変性疾患で、その約 97%の症例で GFAP 遺伝子の変異を認める。申請者らは培養細胞を用いた発現実験およびタイムラプス解析を用いた動態解析により変異 GFAP が GFAP 異常凝集体を形成する以前にアストロサイト機能に影響を与える可能性を報告した。

2. 研究の目的

アレキサンダー病においては GFAP の異常凝集が病態に深く関与することは確実と思われるが、申請者らのこれまでの検討から変異 GFAP によりアストロサイトの機能異常が誘導され病態に大きな影響を与えることが推測される。また、臨床的にも乳児から成人まで多様な臨床表現型、重症度をとらうることからアストロサイトだけでなく、ニューロンとの相互作用(トリパータイト・シナプス)にも複雑に影響を与える病態が推測された。

以上をふまえて、アストロサイトの機能およびグリア-ニューロン相互作用の観点から本病の治療法を確立することを目的とした。本研究ではわれわれが確立した疾患モデルを用いて GFAP 凝集抑制作用を有する薬剤あるいはアストロサイトに作用する薬剤投与実験を行い、アストロサイトの機能およびグリア-ニューロン相互作用の観点から本病の治療法を探索する。

3. 研究の方法

アストロサイトそのものは電気生理学的にはサイレントな細胞であり、ニューロンおよびそのほかのグリア細胞と相互作用することによりその活動が発揮されると思われる。その点では in vitro よりも in vivo での

研究が適切と思われるが、ヒトのアストロサイトはげっ歯類のそれよりも複雑な機能を保有することも指摘されている。また、われわれが以前に作成したショウジョウバエモデルはライフサイクルの短さや遺伝子スクリーニングや薬物スクリーニングに対する利便性が利点であるが、GFAP 自体がショウジョウバエのホモログにみられないことが欠点である。以上の点から、細胞モデルを用いた in vitro の系、マウスモデルおよびショウジョウバエを用いた in vivo の系いずれも一長一短あると思われ、それぞれのモデルによる比較検討が必要と思われた。本研究ではその利点・欠点の検討も含めて下記の通り、3 種類のモデルを用いた研究を試みた。

(1)これまでわれわれが GFAP-GFP を導入したアストロサイトマ由来の細胞では、GFP タグの分子量が大きく (GFAP50kD, GFP27kD)、病態評価に影響を与える可能性が考えられた。そこで、GFAP と GFP を別々に発現するベクター(pTracer CMV ベクター)を導入した新たな細胞モデルを作成した。このベクターにヒト GFAP 遺伝子を導入し、アストロサイトマ由来細胞にトランスフェクションして安定発現系を作成した。この安定発現系細胞モデルを用いて、アストロサイトへの作用が報告されている既存の薬剤(抑肝散、ゾニサミド)による薬物投与実験を行った。薬物を投与した細胞系列から RNA を抽出、次世代シーケンサー(イルミナ製 HiScanSQ)を用いて RNAseq 法によるトランスクリプトーム解析を行い、薬物を投与していないコントロールと比較して、誘導あるいは抑制される因子を同定する。

(2)すでに作成したショウジョウバエモデル(GMR-GAL4 driver(複眼原基特異的発現)とヒト GFAP 遺伝子(野生型、R239C、R416W)を交配して作成)に対して、バルプロ酸 Na、ゾニサミド、ロセフィン、抑肝散を投与して、複眼構造の回復および climbing assay の変化

を評価した。

(3)ヒト野生型および R239H 変異 GFAP 遺伝子を導入したモデルマウスの海馬より、MACS テクノロジーを用いてアストロサイトを分離して RNA を抽出、マイクロアレイにて解析する。

4. 研究成果

(1)(3) いずれの解析も報告症作成時は進行中である。今後、同定された候補因子に対して、細胞あるいは動物(ショウジョウバエあるいはマウス)を用いた機能解析を行い、病態解明ならびに候補薬物探索を発展させることを計画している。

(2)100nM のバルプロ酸ナトリウム、ゾニサミド、ロセフィンと 100 μg/ml の抑肝散にて drug screening を試みたが複眼構造の回復ならびに climbing assay の変化は認められなかった。

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)

1. Yoshida T, Mizuta I, Saito K, Kimura Y, Park K, Ito Y, Haji S, Nakagawa M, Mizuno T. Characteristic abnormal signals in medulla oblongata-‘eye spot’ sign: four cases of elderly-onset Alexander disease. Neurology clinical practice. 2015 online published.
2. Yoshida T, Mizuta I, Saito K, Ohara R, Kurisaki H, Ohnari K, Riku Y, Hayashi Y, Suzuki H, Shii H, Fujiwara Y, Yonezu T, Nagaishi A, Nakagawa M. Effects of a polymorphism in the GFAP promoter on age of onset and ambulatory disability in late-onset Alexander disease. J Hum Genet 58:635-638, 2013.
3. 永石彰子, 中根俊成, 福留隆泰, 松尾秀徳,

吉田誠克. 小児期発症が疑われ, 長期間進行停止後に増悪したと考えられた Alexander 病の 1 例. 臨床神経 53: 474-477:2013.

[学会発表](計2件)

1. 吉田誠克, 水田依久子, 斉藤光象, 中川正法, 木村康義, 朴貴瑛, 伊藤康男, 椎裕章, 高橋義秋, 井手俊宏, 土師正太郎, 水野敏樹. 延髄前部の MRI 異常信号は成人期発症アレキサンダー病の特徴的な所見である. 第 55 回日本神経学会学術大会. 2014 年 5 月 22 日; 福岡.
2. 吉田誠克, 水田依久子, 斉藤光象, 中川正法. アレキサンダー病の臨床診断指針に対する有用性の検討. 第 54 回日本神経学会学術大会. 2013 年 5 月 31 日; 東京.

[図書](計2件)

1. 吉田誠克. アレキサンダー病. 別冊 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.26 神経症候群(第2版) III. 859-863, 2014.
2. 吉田誠克. アレキサンダー病と類縁疾患. 別冊 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.26 神経症候群(第2版) IV. 154-158, 2014.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

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・大学院医学研究科・神経内科・講師

研究者番号: 90457987

(2)研究分担者

水田 依久子 (MIZUTA, Ikuko)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・神
経内科・講師

研究者番号：80397760