

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670476

研究課題名(和文)世界初のヒスチジンリピート病のモデルマウス作成と疾患概念の確立

研究課題名(英文)The world's first establishment of disease concept and mouse model creation about histidine repeat disease

研究代表者

難波 栄二 (NANBA, EIJI)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・教授

研究者番号：40237631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：HOXA1遺伝子のヒスチジンリピート伸長アレルをホモ接合で持つ患者の遺伝子診断による探索、並びにヒスチジンリピート病の疾患病態の解明及び概念の確立を目的として研究を実施した。国立精神・神経センターの知的障害バイオリソースで収集された106名の検体を用いて遺伝子診断を行ったが、ヘテロ接合多型をもつサンプルは3例、ホモ接合で持つ例は認められず、ホモ接合のアレル頻度は、2,500人に1人程度と算出した。今後も検体数を増やし、さらに解析を進める。また、ヒトHOXA1遺伝子プロモーター下流にHOXA1 cDNA とルシフェラーゼ遺伝子を繋いだ発現コンストラクトの作成し、培養細胞での機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：We have conducted the genetic and functional analyses of polyhistidine tract expansion mutations in HOXA1 gene. Genetic analyses were performed in 106 samples, collected as the Intellectual Disability Bioresources in National Center of Neurology and Psychiatry, and identified heterozygous mutations in three cases. The allele frequency of homozygous mutation was estimated to be 1/2500. We also made an expression constructs containing human HOXA1 cDNA under the HOXA1 promoter fused with luciferase gene and conducted functional analyses in cultured cells.

研究分野：小児神経学

キーワード：HOX遺伝子 ヒスチジンリピート 知的障害 遺伝子変異

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト *HOXA1* 遺伝子は 39 種類が同定され、A-D の 4 つのクラスターに分類され、胎児期において脊髄中枢神経系、体軸、骨格、四肢、消化管、生殖器などの形成に重要な役割を果たす。この一つである *HOXA1* 遺伝子は後脳の発達に必須の遺伝子であり、本遺伝子の欠損型変異マウスは自閉的表現型などを示す。我々は、本遺伝子の新たなヒスチジンリピート長の多型 (正常は 10 リピートであるが 11 リピート、12 リピートならびに 7 リピートの多型) を見いだした (Paraguison et al, Biochem Biophys Res Commun, 2005)。さらに、本リピート多型で延長したアレルは、培養神経芽細胞株において核内凝集体を形成し神経分化の異常を来すことを示した (Paraguison et al, J Neurosci Res, 2007)。

(2) 本リピート延長をヘテロ接合でも正常人が存在し、アレル頻度からホモ接合が 10,000 人に 2-3 人程度存在すると推定された。そこで、本リピートのホモ接合を持つ場合には、常染色体性劣性遺伝病となるとの仮説を立て、発達障害などのサンプルにおいて遺伝子解析を行ってきた。そして、*HOXA1* の本リピート延長 (11 のアレルをホモでもつ) 患者を世界で初めて発見した。本患者は発達障害、小脳の形態異常などを伴っている。

## 2. 研究の目的

(1) 発達障害や小脳異常をもつ患者さんなどの遺伝子解析を行い、さらに患者の発掘を行う。そして、臨床的な特徴を明らかにする。

(2) *HOXA1* ヒスチジンリピート延長の脳形成異常の分子病態を解析するために、培養神経細胞での機能解析およびモデルマウスの作成を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子解析

国立精神・神経センターの知的障害バイオリソースをはじめ、小児神経の専門医などに働きかけて検体 (採血) のリクルートを行った。これらの検体から DNA を分離し、*HOXA1* のリピート解析を行った。方法は PCR 法で増幅した検体をキャピラリー電気泳動で測定するもので、すでに確立しているものを用いた。また、iPS 細胞作成拠点との連携を検討した。

(2) 培養神経細胞系の樹立と機能解析ならびにモデルマウスの作成

### 発現コンストラクトの作成

正常ヒト *HOXA1* cDNA、およびヒスチジンリピート多型をもつ cDNA は以前我々が作成し

た発現コンストラクトを鋳型に用いる (Paraguison et al, 2005, 2007)。ゲートウェイクローニングシステムを用い、ヒト *HOXA1* 遺伝子プロモーター下流に *HOXA1* cDNA とルシフェラーゼ遺伝子 (NanoLuc, Promega) をつないだコンストラクト (pHOXA1-NanoLuc) を作成した。

### 培養神経細胞系での検討

作成したコンストラクト pHOXA1-NanoLuc と pPBX1 をヒト培養神経芽細胞腫細胞株 (SK-N-SH 細胞) を用い、リポフェクション法または Nucleofector 法により一過性に導入後、*HOXA1* 蛋白質の発現、および転写活性測定 (ルシフェラーゼアッセイ) により機能解析を行った。また、レチノイン酸とジブチル-cAMP 刺激による神経分化誘導細胞における、神経分化異常および *HOXA1* 転写活性について検討を行った。*HOXA1* 蛋白質の細胞内局在解析は、GFP 融合 *HOXA1* cDNA 発現ベクター (Paraguison et al, Biochem Biophys Res Commun, 2005) を培養 SK-N-SH 細胞に導入後、共焦点レーザー顕微鏡を用い、蛍光画像取得を行った。

### ES 細胞由来神経分化誘導系における検討

マウス ES 細胞からの神経分化誘導細胞系に pHOXA1-NanoLuc を導入し、神経初期発生細胞における *HOXA1* ヒスチジンリピート多型の影響を細胞学的に検討する。

### トランスジェニックマウスモデルの作成

pHOXA1-NanoLuc (コンストラクト) をトランスジーンしたマウスを作成する。マウス受精卵に通常の方法でコンストラクトを導入し、マウスを作成する。本マウスを用いて *in vivo* での *HOXA1* ヒスチジンリピート多型の発現、機能解析 (ルシフェラーゼアッセイ) を行う。

### *HOXA1* 遺伝子欠損マウスとの交配によるモデルマウスの作成

pHOXA1-NanoLuc トランスジェニックマウスと、*HOXA1* 遺伝子欠損マウスとの交配により、常染色体性劣性遺伝病モデルマウス系の樹立を目指す。

## 4. 研究成果

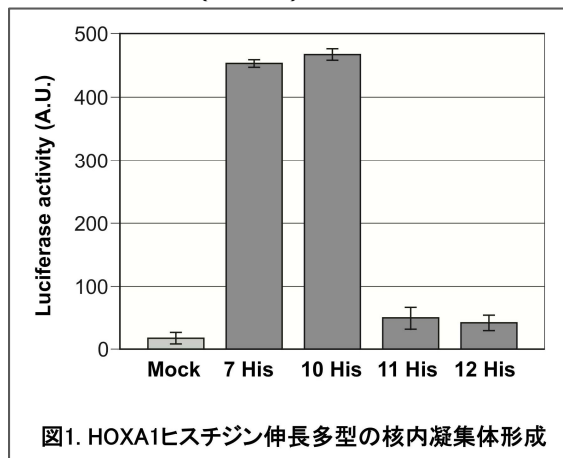
### (1) 遺伝子解析

国立精神・神経センターの知的障害バイオリソースで収集された 106 名の検体で遺伝子診断を実施し、遺伝子異常を持つ患者の探索を行った。ヘテロ接合多型 (7 リピート/10 リピート) をもつサンプルが 3 例あったが、ホモ接合多型を持つ新たな例は認められなかった。以前の私たちの正常人サンプルを用

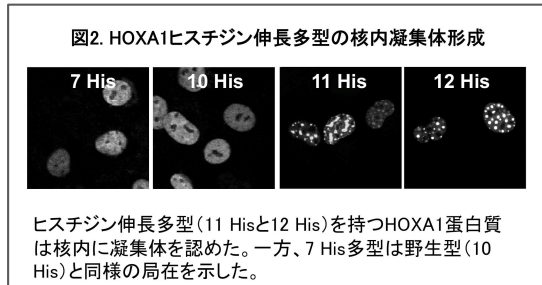
いた解析では、336 検体中 11 検体で 7 リピート/10 リピートを検出したことと比較すると (Paraguison et al, Biochem Biophys Res Commun, 2005)、今回の解析もほぼ同頻度であることが分かった。今後、さらに検体数を増やし、リピート伸長多型の検出解析を進める必要があると考えられた。

## (2) 発現コンストラクト及びモデルマウスの作成

ヒスチジンリピート多型を持つ *HOXA1* の機能解析を最終的にマウス個体で行う目的で、NanoLuc ルシフェラーゼ遺伝子 (NanoLuc, Promega) を融合した発現ベクター pHOXA1-NanoLuc を作成した。正常および多型をもつ各ベクターと、*HOXA1* の cofactor である *PBX1* 発現ベクターを培養 COS7 細胞に一過性に導入後、ルシフェラーゼアッセイを行った結果、野生型 (10 His) に比べ、リピート伸長多型 (11 His と 12 His) では有意な転写活性の低下を認めた (図 1)。一方で、リピート短縮多型 (7 His) では、野生型と同等



の転写活性を検出した。これらの結果は、以前の私たちの解析と同様の結果で (Paraguison et al, J Neurosci Res, 2007)、今回作成したベクター系が、機能性が確認できた。また、同様の解析を培養神経芽細胞腫細胞株 SK-N-SH 細胞でも行い、COS 細胞と同様の結果が得られた (データ未提示)。*HOXA1* 蛋白質の細胞内局在解析について、培養 SK-N-SH 細胞を用いた結果、リピート伸長多型 (11 His と 12 His) において、核内凝集体を認め、7 His 多型では野生型と同様



の蛋白質局在を認めた (図 2)。*HOXA1* の転写活性は、*PBX1* と複合体を形成し機能することから、核内凝集体を形成したリピート多型では、*PBX1* との相互作用の異常が起因となり、転写活性が低下していることが考えられた。現在、リピート伸長多型を有する pHOXA1-NanoLuc 発現細胞系を用い、転写活性低下と凝集体形成に対し、抑制効果を示すプロテアソーム阻害剤化合物の検索を行っている。

一方で、7 His 多型については、転写活性と蛋白質局在解析における異常は見いださなかった。しかし、以前の私たちの解析では、7 His 多型を発現させた神経芽細胞株において、神経分化が著しく抑制された (Paraguison et al, J Neurosci Res, 2007)。今後は、神経分化過程における *PBX1* との相互作用など、より詳細な解析を行うことで 7 His 多型の機能異常を見いだすことができると考えている。

今回の解析では、動物個体で *HOXA1* 転写活性を測定可能なルシフェラーゼベクターについて、培養細胞実験系で機能の検証結果をえることが出来た。今後は、このベクター系をもとにモデルマウスを作成し、発生初期および動物個体、特に脳での機能解析を行って行く必要がある。一方で、従来の方法でモデルマウスを作成するには、キメラマウス、さらにヘテロ接合マウスを順次作成し、最終的にホモ接合マウスを作成しなければならず、さらに多くの時間と労働力が必要と考えられた。今後はゲノム編集などの新たな技術を用いることで、より効率的にモデルマウスの作成を進める必要があると考えている。

## 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)

取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

難波 栄二 (NANBA, Eiji)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・教授

研究者番号：40237631

(2)研究分担者

檜垣 克美 (HIGAKI, Katsumi)  
鳥取大学・生命機能研究支援センター・准  
教授  
研究者番号： 9 0 2 9 4 3 2 1

足立 香織 (ADACHI, Kaori)  
鳥取大学・生命機能研究支援センター・助  
教  
研究者番号： 5 0 6 0 9 2 3 7

大林 徹也 (OOBAYASHI, Tetsuya)  
鳥取大学・生命機能研究支援センター・准  
教授  
研究者番号： 8 0 3 4 8 8 0 4

(3)研究協力者

後藤 雄一 (GOTO, Yu-ichi)