

令和元年6月27日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09963

研究課題名(和文)疾患モデルフィッシュを用いたペルオキシソーム病発病因子の特定と治療法の開発

研究課題名(英文) Study of disease model fish with peroxisomal biogenesis disorder for identification of pathological agent and treatment.

研究代表者

高島 茂雄 (Takashima, Shigeo)

岐阜大学・研究推進・社会連携機構・助教

研究者番号：50537610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト先天性代謝異常疾患であるペルオキシソーム形成異常症の病態発症機構を明らかにするため疾患モデルフィッシュを作成してその解析を行った。疾患モデルフィッシュは、ヒト患者が示す神経・運動機能障害、脂肪肝、短寿命などの異常を示すことを確認し、質量分析装置を用いた解析から組織ごとに異常の原因となる可能性のある極長鎖脂肪酸などの特定の脂肪酸種が蓄積していることを明らかにした。さらに病態の進行に関係していると考えられる多くの遺伝子の発現に影響が及んでいることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトペルオキシソーム形成異常症は患者における病態発症機構がわかっておらず、治療法開発のためにもその解明が待たれている。本研究により、これまで明らかでなかった器官ごとに異なる異常な脂肪酸の蓄積が確認された。これらの異常脂肪酸はヒト患者において器官ごとの病態発症の引き金になっている可能性があり、今後その検証を行うことで発症の原因を明らかにできると考えられる。多岐にわたる遺伝子の働きにも影響が及んでいることも明らかになったことから本研究結果により病態の発症原因と進行過程の一端を明らかにできたと考える。

研究成果の概要(英文)：In this research, a disease model fish (pex2 mutant zebrafish) for human peroxisomal biogenesis disorder was established and analyzed. pex2 mutant fish was found to recapitulate human patients' symptoms such as the neuromotor defect, liver steatosis, short life span. Accumulation of distinct fatty acid species such as very-long-chain fatty acids in each organ was revealed by means of mass spectrometry assay. In the model fish, the expression of many other genes, which were thought to be involved in the progress of the defects, were also affected.

研究分野：発生生物学 脂肪酸代謝

キーワード：ペルオキシソーム ペルオキシソーム形成異常症 極長鎖脂肪酸 プラズマローゲン フィタン酸 PEX 遺伝子 ゼブラフィッシュ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究が対象とするヒトペルオキシソーム形成異常症は遺伝性の代謝性疾患である。細胞内小器官であるペルオキシソームの形成にかかわる PEX 遺伝子群が変異することが原因で引き起こされ、患者はペルオキシソームにおける様々な代謝が阻害される。本疾患は組織・器官の発生が進む胎児期に発症し、多くの器官に病態が生じる。代表的なものは中枢神経発生異常、神経性運動障害、肝障害、腎臓障害、骨形成異常である。

(2) ペルオキシソームは代謝性の細胞内小器官であり、主に脂質関連分子の代謝が行われている。代表的なものは極長鎖脂肪酸の分解、フィタン酸、プリスタン酸などの分枝脂肪酸の分解、プラズマローゲン、胆汁酸、ドコサヘキサエン酸 (DHA) の合成などである。ペルオキシソーム形成異常症では上記代謝産物の蓄積や欠乏が起こり、それによって病態が発症すると考えられている。しかしながら現在のところ異常代謝産物と病態発症との関連はわかっていない。

## 2. 研究の目的

ペルオキシソーム形成異常症は原因遺伝子が判明しているものの病態発症の直接原因となる代謝産物や病態発症機構の詳細が分かっていない。そのため治療法の開発も困難である。本研究はゼブラフィッシュを用いた疾患モデルの詳細な解析を通して未解明の原因物質と病態発症機構を明らかにすることで本疾患の病態に関する理解を深め、将来の治療につなげることを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究では発生遺伝学の研究で多用されるゼブラフィッシュを材料とした。ゼブラフィッシュは小型の硬骨魚類であり、ヒトと共通の基本的体構造と遺伝子群を持っており、遺伝学的・発生学的研究手法が確立していることからヒトの遺伝病を目的とした研究に適している。本種の卵は組織的に透明であり、その発生は産卵後母体外で進行し、組織や器官形成の過程を顕微鏡下で継続的に観察可能である。

(2) ヒトペルオキシソーム形成異常症のモデルとするためにゼブラフィッシュの *pex2* 遺伝子を人為的に破壊して疾患モデルフィッシュを作成した。*pex2* 遺伝子はヒトペルオキシソーム病の原因遺伝子の 1 つであるヒト *PEX2* 遺伝子の orthologue である。TALEN と呼ばれる人工核酸切断酵素を用いて *pex2* 遺伝子に欠失変異を導入した。

(3) 作成した疾患モデルフィッシュについて細胞レベル、個体レベルの表現型の解析を行った。またペルオキシソームの形成異常に伴う代謝異常を明らかにするために液体クロマトグラフィー-質量分析装置 (LC-MS) を用いてペルオキシソームで代謝が行われる極長鎖脂肪酸・フィタン酸・プリスタン酸・プラズマローゲンの量を測定し野生型個体と比較した。

(4) 肝臓における表現型に着目し詳細に解析した。肝臓の変色が細胞内における脂肪滴の蓄積であったことから、脂肪肝の原因の 1 つであると考えられる小胞体ストレス応答関連因子について検討した。

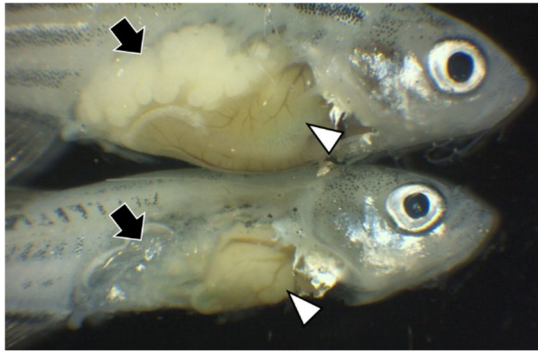
(5) 本疾患モデルフィッシュにおいて発現に影響が及ぶ遺伝子についてマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

## 4. 研究成果

1) ペルオキシソーム形成異常症のモデルフィッシュを作成するため、ペルオキシソーム形成に重要な *pex2* 遺伝子をターゲットに TALEN を用いて欠失変異を導入した。欠失変異個体を系統化した後、ヘテロ接合個体の交配により変異ホモ接合個体 (疾患モデルフィッシュ) を得た。異なる変異を持った 2 系統を確立した。変異ホモ接合個体と一緒に生まれたヘテロ接合個体や野生型ホモ接合個体を比較対象とした。

2) 得られた疾患モデルフィッシュについて表現型の解析を行った。作成した 2 系統はそれぞれ強変異型、弱変異型であり、異常の程度に明らかな差があった。生存期間も強変異型が最長 4 カ月程度であったのに対し、弱変異型は 9 カ月程度であった。しかしいずれの系統の変異個体も次世代を残すことはできなかった。成熟メス個体を解剖したところ卵巣が未発達であることが判明した (図 1)。一方成熟オス個体の精巣から取り出した精子の運動能

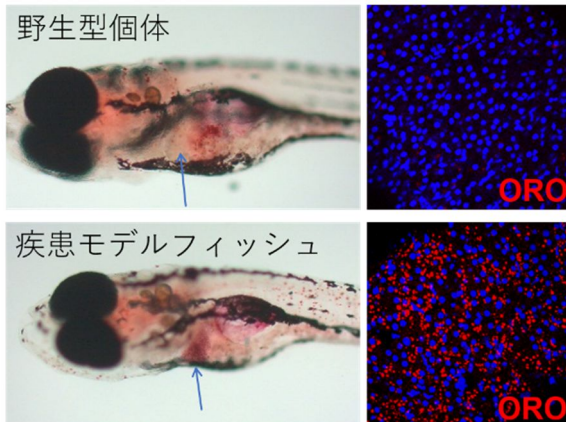
は正常であったことからオス不稔の原因は不明である。これ以後の実験はすべて強変異型システムを用いて行った。



**図1: 疾患モデルフィッシュの表現型**

肝臓の位置を矢じりで、卵巣を矢印で示している。野生型個体(上)では卵巣が発達し、卵細胞の成熟がみられるが、疾患モデル個体(下)では卵巣が未発達で、肝臓は白変し、変形している。写真はいずれも3カ月齢個体。

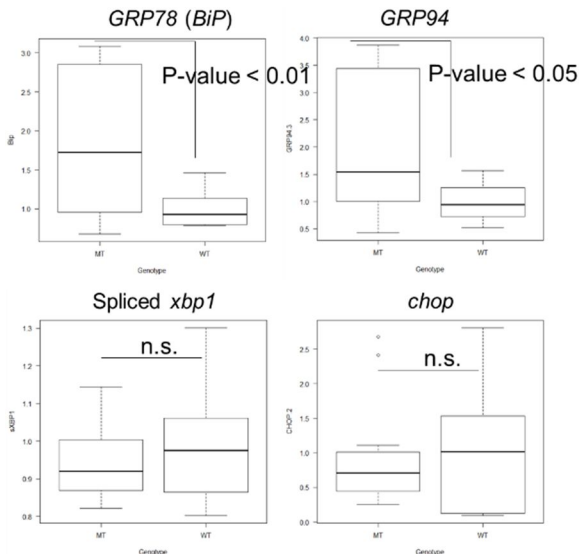
3) 疾患モデルフィッシュに特徴的な肝臓の異常について解析した。ゼブラフィッシュ胚は産卵後4~5日目から肝臓が顕微鏡下で確認できる。通常の個体では発生中の肝組織は透明だが、強変異型では産卵後5日目以降に肝臓全体が褐色に濁る。さらに成長した個体では肝臓全体が白変し形もいびつになる(図1)。中性脂質を染色できるOil Red O試薬を用いて検討した結果、この濁りは肝臓細胞内に中性脂質からなる脂肪滴が蓄積していることで生じることが判明した(図2)。個体が成長するにつれて脂肪滴の大きさも増加した。



**図2: 肝臓の表現型**

野生型(上段)と疾患モデルフィッシュ(下段)のOil Red O (ORO) 染色像。矢印は肝臓を示す。右側は共焦点レーザー顕微鏡像。疾患モデルフィッシュではOROで赤染される中性脂質の脂肪滴が肝臓細胞内に蓄積する。青色は核。

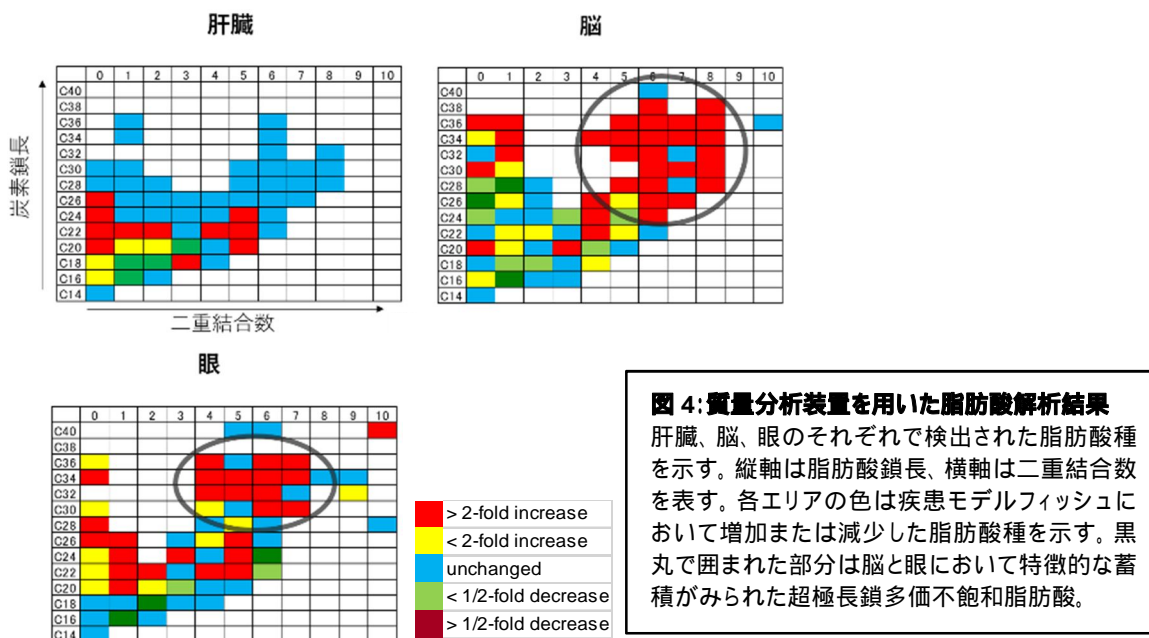
脂肪肝の原因の1つとして近年小胞体ストレス応答機構の関与が示唆されている。そこで疾患モデルフィッシュにおける小胞体ストレス応答関連遺伝子の変動をリアルタイム定量PCR法で解析した。その結果シャペロン因子であるGRP78とGRP94遺伝子の発現が疾患モデルフィッシュにおいて亢進していることが判明した(図3)。この結果から小胞体ストレスが亢進しており、応答経路のうちATF6経路が活性化していることが示唆された。



**図3: 小胞体ストレス応答関連遺伝子のリアルタイム定量PCR結果**

各グラフ中の左側が疾患モデルフィッシュ、右側が比較対象の野生型個体の結果を示す。GRP78とGRP94遺伝子の発現が疾患モデルフィッシュにおいて上昇している。Spliced *xbp1*と*chop*の発現には変化がない。

4) 疾患モデルフィッシュにおける代謝変動を明らかにするために液体クロマトグラフィー質量分析装置を用いて脂肪酸の網羅的測定を行った。疾患モデルフィッシュ及び野生型個体のそれぞれから脳、眼、肝臓を取り出し脂肪酸を抽出した。脂肪酸は逆相クロマトグラフィーによる分離後、質量分析装置で分子量を指標に検出した。得られた測定データをもとに脂肪酸鎖長、二重結合数(不飽和度)の違いを指標に各脂肪酸種を分類し、全脂肪酸量に対する存在比として網羅的に分析した。いずれの器官においても極長鎖脂肪酸の蓄積が見られたが、肝臓では炭素鎖長 22 から 26 (C22~C26)までの極長鎖脂肪酸(very long chain fatty acid, VLCFA)の蓄積が見られたのに対して、脳と眼では炭素鎖長 26 から 38 (C26~C38)までの超極長鎖脂肪酸 (ultra-very long chain fatty acid, UVLCFA) の蓄積が見られた。この器官特異的に蓄積した異なる脂肪酸種がそれぞれの器官における病態発症因子であることが示唆された。



ペルオキシソーム形成異常症は原因代謝産物や病態発症機構がわかっておらず、治療法の開発のためにもその解明が重要である。本研究では本疾患のモデルフィッシュの作成に成功し、その解析からこれまで明らかでなかった組織ごとの脂肪酸異常も確認された。今後は検出された異常脂肪酸の発症への関与を直接検討することで、本疾患の病態発症機構のさらなる理解を深め、治療補開発につなげたいと考えている。

## 5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 4 件)

1. Takashima S, Saitu H, Shimozawa N. Expanding the concept of peroxisomal diseases and efficient diagnostic system in Japan. Journal of human genetics Sep 2018.
2. Takashima S, Toyoshi K, Shimozawa N. Analyses of the fatty acid separation principle using liquid chromatography-mass spectrometry. Medical Mass Spectrometry 2(1) Jun 2018.
3. Hama K, Fujiwara Y, Morita M, Yamazaki F, Nakashima Y, Takei S, Takashima S, Setou M, Shimozawa N, Imanaka T, Yokoyama K. Profiling and Imaging of Phospholipids in Brains of Abcd1-Deficient Mice. Lipids 53(1) 85-102 Jan 2018.
4. Takashima S, Toyoshi K, Itoh T, Kajiwara N, Honda A, Ohba A, Takemoto S, Yoshida S, Shimozawa N. Detection of unusual very-long-chain fatty acid and ether lipid derivatives in the

fibroblasts and plasma of patients with peroxisomal diseases using liquid chromatography-mass spectrometry. Molecular genetics and metabolism 120(3) 255-268 Mar 2017.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Shoko Takemoto, Kayoko Toyoshi, Haruka Fujita, Akiko Ohba, Ken-taro Oh-Hashi, Yoko Hirata, Nobuyuki Shimozawa, **Shigeo Takashima**. Study of the molecular pathology of the human peroxisomal biogenesis disorder using zebrafish. (ゼブラフィッシュを用いたペルオキシソーム形成異常症発症機構の解明). 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. 2017 年 5 月.
2. **Shigeo Takashima**, Shoko Takemoto, Kayoko Toyoshi, Akiko Ohba, Haruka Fujita, Kentaro Oh-hashii, Yoko Morita, Nobuyuki Shimozawa. Establishment and phenotypic analysis of the disease-model zebrafish for Peroxisomal biogenesis disorder. 第 59 回日本先天代謝異常学会総会・第 15 回アジア先天代謝異常症シンポジウム. 2017 年 10 月.
3. **高島 茂雄**, 豊吉佳代子, 大場亜希子, 武本詳子, 下澤伸行. 液体クロマトグラフィー質量分析装置を用いたペルオキシソーム病関連代謝産物の一斉解析. 第 59 回日本先天代謝異常学会総会・第 15 回アジア先天代謝異常症シンポジウム. 2017 年 10 月.
4. **高島 茂雄**. 質量分析を応用したペルオキシソーム病代謝解析法の開発. 第 42 回日本医用マススペクトル学会年会 シンポジウム 質量分析の代謝異常症への応用. 2017 年 9 月.
5. **高島 茂雄**, 武本 詳子, 豊吉佳代子, 大場亜希子, 下澤 伸行. Zellweger syndrome モデルフィッシュを用いた病態研究. 第 60 回日本先天代謝異常学会総会・第 16 回アジア先天代謝異常症シンポジウム. 2018 年 11 月.
6. **Shigeo Takashima**, Kayoko Toyoshi, Akiko Ohba, Shoko Takemoto, Nobuyuki Shimozawa. Simultaneous analysis of peroxisomal metabolites using liquid-chromatography mass-spectrometry. 第 59 回日本先天代謝異常学会総会・第 15 回アジア先天代謝異常症シンポジウム. 2018 年 11 月.
7. 藤田遥, 大橋憲太郎, 平田洋子, 下澤伸行, **高島茂雄**. PEX3 変異細胞を用いたペルオキシソーム形成異常症発症因子の探索. 第 41 回日本分子生物学会年会. 2018 年 11 月
8. **Shigeo Takashima**, Shoko Takemoto, Kayoko Toyoshi, Akiko Ohba, Nobuyuki Shimozawa. Pathological study of Zellweger syndrome using a disease model fish. 第 41 回日本分子生物学会年会. 2018 年 11 月

〔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：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://stakashimaj.blogspot.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

研究代表者氏名：高島 茂雄

ローマ字氏名：TAKASHIMA, Shigeo

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：研究推進・社会連携機構 科学研究基盤センター

職名：助教

研究者番号（8桁）：50537610

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、研究者個人に帰属されます。