

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22310122

研究課題名(和文)鉄代謝異常を伴う先天性運動失調マウスの病理学的及び分子生物学的解析

研究課題名(英文)Pathological and molecular biological investigations of congenital ataxia mouse bearing abnormal iron metabolism

研究代表者

橋本 尚詞 (HASHIMOTO, Hisashi)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：80189498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円、(間接経費) 4,170,000円

研究成果の概要(和文)：若齢期に抗癌剤を投与された雄マウスの子孫に由来する先天性運動失調マウスは、2番染色体のrs13476689の近傍に原因遺伝子があることが判明し、1653カ所の変異が見つかった。また、Gm13912の第2イントロンに7048bpの欠損が見出された。これらの変異を利用してgenotypingを行い、系統維持に利用することは可能となったが、変異遺伝子そのものを確定するには至らなかった。脊髄神経や三叉神経に見いだされた空胞変性はNF200陽性神経細胞の軸索の膨隆であり、運動失調発症前より神経変性をきたしていた。腎臓での鉄の沈着は2価イオントランスポーターの減少によるものと推測された。

研究成果の概要(英文)：Our congenital ataxia mouse had genetic alterations in the vicinity of rs13476689 in chromosome 2. Mutation analysis identified 1653 mutations including SNP, insertion and deletion. In addition, 7048 bp deletion was found in the second intron of Gm13912 gene. These genetic alterations made it possible to genotype individual animals to maintain the strain. However, the responsible genetic alterations for ataxia could not be determined. Vacuolar degenerations found in the spinal and trigeminal nerves were the spheroid formation in the axon of NF200 positive neuron. The neurodegenerations had been occurred before the onset of the disease. Real-time PCR analysis of gene expression suggested that iron deposition in the kidney was caused by diminished divalent metal ion transporter.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：運動失調 モデルマウス 鉄代謝 NF200 知覚神経

## 1. 研究開始当初の背景

(1)運動失調症は様々な原因で起こりうるが、若齢時にシクロフォスファミドを投与された雄マウスの子孫で見出された先天性運動失調マウス(以下、運動失調マウス)は、常染色体劣性遺伝形式で遺伝し、生後30日頃より後肢の動きに障害を生じ始め、週齢を重ねるにつれて運動障害が重篤化していく。

(2)運動失調マウスを病理組織学的に調べたところ、筋・骨格系には顕著な異常は認められず、脊髄神経や小脳髄質に多数の空胞変性像が見られた。また、肝臓と腎臓に顕著な鉄の沈着が認められた。

## 2. 研究の目的

(1)本研究の目的は、この鉄代謝異常を伴った運動失調マウスの連鎖解析による変異遺伝子領域の特定、その遺伝子領域の塩基配列の解析、変異遺伝子の決定、病態発症機序の解明、系統維持法の確立である。

(2)病態発症機序を解明するために、変異遺伝子の決定と平行して、病理組織学的解析と病態に関連すると考えられる遺伝子発現の解析を行うことである。

## 3. 研究の方法

### (1)遺伝学的解析

この運動失調マウスはICR系統由来であるため、全ゲノム上のSNPパターンの判明しているC57BL/6J及びC3H/HeJと交配させた交雑群を作製し、SNPパターンと運動失調発症の連鎖解析を行い、運動失調発症に関連した遺伝子領域の推定を行う。次いで、関連した遺伝子領域の塩基配列を決定し、原因遺伝子を特定する。

### (2)病理組織学的解析

運動失調マウスと同腹の見かけ正常マウスの中枢神経系、末梢神経系、並びに肝臓、腎臓を還流固定後に摘出し、病理組織学的、超微形態学的ならびに免疫組織化学的に解析する。

### (3)分子生物学的解析

各種鉄代謝関連遺伝子の発現を運動失調マウスと同腹の見かけ正常マウス、あるいはgenotypingによって同定されたHomo, Hetero, Wild typeでRealtime PCR法にて比較検討する。

## 4. 研究成果

### (1)遺伝学的解析

#### 連鎖解析

ICR由来の運動失調マウスとC57BL/6J系との交雑群より、運動失調発症個体34匹、ヘテロ確定個体16匹、ヘテロ確定個体同士の交配で産まれた見かけ正常個体18匹、C3H/HeJ系との交雑群より運動失調発症個体15匹、

ヘテロ確定個体6匹、見かけ正常個体7匹の合計96匹について、Illumina社Mouse MD Linkage Panelを用いて全ゲノム中の1391カ所のSNPパターンを解析した。運動失調発症との関連をManhattanプロットを作成して調べたところ、2番染色体に特にP値の高いSNPが3つ見られた(図1)。これらのSNP名はrs13476666、rs13476689、rs4138562であり、rs13476689が最高値であった。rs13476689の塩基はICRではT、C57BL/6JではAであり、C3H/HeJではTであって、C3H/HeJとの交雑系では識別能がなかった。しかし、C57BL/6Jとの交雑系では、運動失調発症個体はすべてTTであり、ヘテロ確定個体はAT、見かけ正常個体はAAあるいはATであり、運動失調の発症と100%連鎖していた。

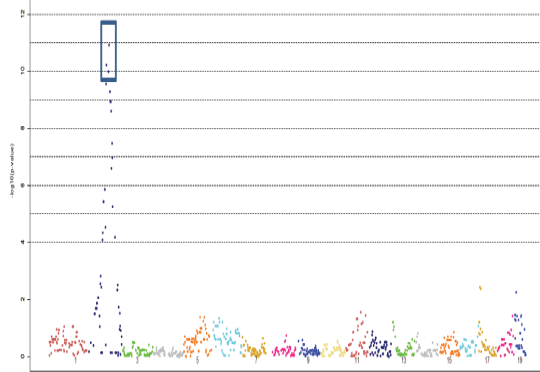


図1 SNPパターンと運動失調発症との関連を示すManhattanプロット

### genotyping法の確立

rs13476689のSNPを含む前後の塩基配列は、C57BLではAAAAGCTTT(下線部がSNP)でHindの切断サイトになるが、ICRはAAATGCTTTで切断サイトになっていなかった。これを利用し、このSNPを含む514bpの領域をPCR法で増幅し、Hindで処理した。そうすると、このSNPがC57BL由来の場合はPCR産物が切断されて2本のバンドになり(図2のWt)、ICR由来の場合は切断されないためバンドが1本のみであり(図2のHo)、ヘテロの場合

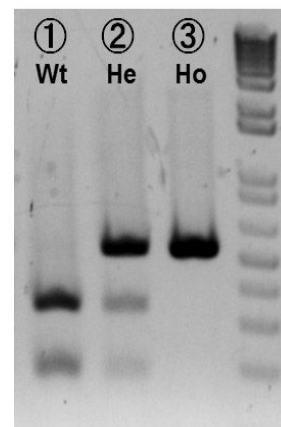


図2 rs13476689を利用したgenotyping

は両者を含むので3本のバンドとなり(図2のHe)、C57BL/6Jとの交雑系においてはgenotypingが可能であった。交雑系で、このrs13476689を利用したgenotypeでhe同士を交配させ、生まれた仔について、genotypeと発症の関係を調べたところ、総計の産仔数212匹のうち、Wtが50匹、heteroが109匹、homoが53匹となり、homoと判定された個体は、全例運動失調を発症した。

#### 遺伝子解析1

大よその変異遺伝子を含むと推定される領域が特定できたことから、この領域の塩基配列を決定し、変異遺伝子の同定を試みた。運動失調マウス雌雄各2匹、ヘテロ確定雌雄各2匹、正常確定雌雄各1匹の計10匹について、rs13476666からrs33283452までの約10MbpをAgilent社のSureSelect Systemを利用して分離、濃縮し、Illumina社のHiSeqによって塩基配列を決定した。HiSeqで得られた100bpのフラグメントの塩基配列をC57BLの参照配列にマップし、塩基の変異について、運動失調発症個体ではhomo、ヘテロ確定個体ではhetero、正常確定個体では発症個体と異なる塩基のhomoとなっている領域を検索すると、1653カ所の変異部位が見出された。これらは、どれもタンパク質のcoding領域ではなく、SNPが1477カ所、Deletionが125カ所、1~3塩基のInsertionが51カ所であった。

#### 遺伝子解析2

HiSeqで得られた塩基配列を参照配列にマップしたデータを再検討してみると、発症個体で大幅に欠損している部位が見出された。HiSeqの塩基配列データを手動で並べ替え、詳細に検討した結果、lncRNAであるGm13912の遺伝子の第2イントロンで、7048bpが欠失していた。この欠失部位の両端を挟んだ領域を増幅するPrimerを設計し、PCRで増幅して産物を調べてみると、正常確定個体では両端が増幅されて2本のバンド(図3のWt)が、発症個体では欠失部位を跨いだ1本のバンド(図3のHo)が、ヘテロ確定個体では両者の3本のバンド(図3のHe)が検出され、この部位でのgenotypingも可能となった。Gm13912の機能は全く解析されておらず、このlncRNAが運動失調に関わっている可能性が考えられるが、げっ歯類に特異的なlncRNAであり、その発現等について調査中である。

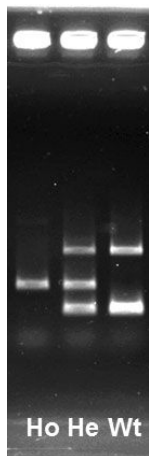


図3 Gm13912の欠失によるgenotyping

## (2)神経系の病理組織学的解析

### 末梢神経系1

運動失調発症個体の脊髄神経、脊髄神経節、後根に見られる空胞変性は、腰神経のみならず胸神経、頸神経、馬尾でも観察された。各種神経マーカーで免疫染色を行った結果、空胞変性部位はNF200陽性であり、軸索が膨隆して空胞状を呈していることが明らかとなった。一部のNF200陽性の膨隆部には、NF200陰性の空胞が生じていた。このNF200陰性の空胞は、各種神経線維マーカーにすべて陰性であった。脊髄神経節でも同様であり、変性した神経細胞体はNF200陽性を示した。インソレクチンB4(IB4)との重染色を行ったところ、IB4陽性神経細胞には全く変化はなく、一部のNF200陽性の大型神経細胞のみが変性していた。重度の運動失調マウスでも後肢が麻痺しているわけではなく、時に動かすことがある。NF200陽性の大型神経細胞は筋の固有知覚を伝えていることから、運動失調は筋からの情報伝達の異常によって生じている可能性が高い。

### 末梢神経系2

脳神経系における異常の有無を調べたところ、眼球や視神経には異常無く、三叉神経と頭蓋骨内の顔面神経に空胞変性が認められた。三叉神経を免疫組織化学的に調べると、脊髄神経と同様にNF200陽性の軸索の膨隆が認められた。また、一部のNF200陽性の膨隆部内には、脊髄神経と同様に、NF200陰性の空胞が生じていた。三叉神経節においてもNF200陽性の変性した神経細胞体が見られたが、IB4陽性神経細胞には変化なかった。三叉神経には脊髄神経よりも重度の変性像が見られるにも関わらず、その表現形は明らかではない。

### 末梢神経系3

運動失調個体の脊髄神経と三叉神経を電子顕微鏡で観察すると、軸索の膨隆部や変性した細胞体では不規則な方向に走るニューロフィラメントの蓄積が認められ、その間に退縮したミトコンドリア様や小胞様の膜性構造物が散在していた。髄鞘は菲薄化しており、髄鞘の細胞膜間あるいは髄鞘と軸索の細胞膜間が解離して、空胞様の腔を生じていた。この腔内には殆ど構造物が認められなかった。

### 末梢神経系4

上記の遺伝学的解析で交雑系においては、rs13476689のSNPでgenotypingが可能なることから、運動失調発症前の個体における末梢神経系の変化を調べたところ、Hoの個体では生後8日目まではWtと違いはないが、生後9日目から三叉神経と脊髄神経の両方でNF200陽性の空胞変性が生じ始め、生後13日目には神経細胞体にNF200が蓄積し、変性し始めていた。電子顕微鏡で観察すると、生後9日

目は髄鞘形成が進行中の時期であり、膨隆はシュワン細胞の細胞質内にある軸索と髄鞘に取り巻かれつつある軸索の両方で認められた。成獣では運動失調発症個体でも大脳皮質のパレル構造が観察されたことより、知覚神経の発生過程は正常に進行するが、成熟過程で何らかの障害が生じているものと考えられる。脊髄神経は運動失調を発症する以前より変性を生じ始めているにも関わらず、運動失調発症には時間差があり、何が発症の引き金となっているのかを解明することは、神経変性疾患で病理学的変化と症候との関連を明らかにする上で重要な意味を持つと考えられる。

#### 中枢神経系

小脳髄質や小脳核に認められる空胞は NF200 を含めた各種神経マーカーに陰性であり、この領域に軸索を伸ばしているプルキンエ細胞のマーカーの Calbindin にも陰性であった。中枢神経系を詳細に見直したところ、前庭神経核や三叉神経脊髄路、三叉神経脊髄路核にも同様の空胞変形が生じているのが認められた。

#### (3)鉄代謝

##### 腎臓における鉄沈着

運動失調発症個体の腎臓における鉄の沈着を経時的に調べたところ、生後 50 日頃までは全く鉄が検出されず、その後、急激に増加し、生後 100 日頃以降は重度の鉄沈着となって、そのまま推移した。鉄沈着は雄よりも雌の方が重度であり、この系統の見かけ正常個体も同様のパターンで中等度の鉄沈着を生じた。しかしながら、別系統の ICR 系雌マウスや C57BL/6J では、老齢であっても鉄の沈着はごく軽度であった。鉄の沈着部位を電子顕微鏡で調べたところ、鉄が沈着しているのは、近位尿細管上皮細胞の尖頂側のライソゾーム内であり、通常の透過型電子顕微鏡では電子密度の高い粒状物として認められた。この粒状物に鉄が含まれているのは、EDX 装置による特性 X 線の分析によって証明された。

##### 肝臓と腎臓における鉄代謝関連遺伝子発現

12 と 34 週齢の運動失調マウス系統の発症個体と見かけ正常個体、4、8、12、16 週齢の交雑系の運動失調発症 (Ho)、ヘテロ (He)、正常 (Wt) で各種鉄代謝関連遺伝子の発現を Real time PCR 法にて調べた。その結果、運動失調発症個体の肝臓では Hamp (ヘプシジン) と Trfr2 (トランスフェリンレセプター 2) \ Fth1 (フェリチンヘビーポリペプチド 1) の発現が概して低く、腎臓では Trfr2 が元々少ないのに加えて、運動失調発症個体では Tfrc (トランスフェリンレセプター) が 4 週では高いのが、鉄沈着が起こる 8 週から 12 週では低くなっており、Slc11a1 (2 価金属イオントランスポーター、メンバー 1) も同様の変

化を示していた。Fth1 は 4 週では高いものの、その後は低いままであった。また、腎臓ではライソゾーム内の 3 価の鉄を 2 価に還元するメタロリダクターゼである Steap family の発現が若干低下しているようであった。肝臓では、正常マウスでも鉄が貯蔵されており、遺伝子発現の変化が意味することは明確ではないが、腎臓ではライソゾームから鉄を運び出すトランスポーターの発現が減少しているためにライソゾームに鉄が沈着し、そのためにトランスフェリンレセプターの発現が低下し、また細胞質の鉄は減少するためにフェリチンの発現が抑制されていると考えられた。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

橋本尚詞、立花利公、日下部守昭 . 新規進行性後肢運動失調マウスの病理組織学的解析 . 第 129 回成医学会総会、2012 年 10 月 12 日、東京。

日下部守昭、山浦 唯、下村海咲、山口 隼、横藤田純子、立花利公、河邊友範、福田隆浩、橋本尚詞 . Histopathological changes in the peripheral nervous system of the novel ataxia mouse before the onset of ataxia. 第 35 回日本神経科学会、2012 年 9 月 19 日、愛知県名古屋市。

日下部守昭、立花利公、丹澤美貴、河邊友範、Jorge E Zavaleta-Ahane、福田隆浩、橋本尚詞 . Novel ataxia mouse had heavy neuropathological changes in the dorsal root ganglion neurons. 2010 年 9 月 4 日、兵庫県神戸市。

[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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 尚詞 (HASHIMOTO, Hisashi)  
東京慈恵会医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80189498

### (2) 研究分担者

日下部 守昭 (KUSAKABE, Moriaki)  
東京大学・農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：60153277

立花 利公 (TACHIBANA, Toshiaki)  
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：80163476

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：