

平成30年6月27日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07235

研究課題名(和文) 自然発症ニホンザル個体を起点にした早老症モデルの確立

研究課題名(英文) Establishment of primate model for progeroid syndromes derived from sporadic patient Japanese monkeys

研究代表者

大石 高生(Oishi, Takao)

京都大学・霊長類研究所・准教授

研究者番号：40346036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの早老症によく似た症状を示したニホンザルN416(シワコ、PLoS One, 2014)の病因解明のため、主要臓器、脳について元素分析を行った。DNA修復関連酵素や抗酸化酵素に関わっている亜鉛が一部の臓器で正常個体より著しく低い値を示したため、亜鉛代謝異常が早老症的症状の発現の一因かと思われたが、詳細は未解明である。特異な顔貌と四肢拘縮を示すニホンザルMff2389とその妹2頭は、尿検査、エックス線検査などの結果から、難病指定されているムコ多糖症であることが強く疑われた。遺伝子検査の結果、ムコ多糖症I型の原因遺伝子IDUAに生じた一塩基置換が症状の原因である可能性が高いことが分かった。

研究成果の概要(英文)：To identify the cause of progeroid symptoms of a Japanese monkey N416 (PLoS One, 2014), element contents were measured in various organs. Amount of zinc in the heart, the liver, the kidney, but not in the lung or the cerebral cortex, or the hippocampus of N416, were lower than in that of normal monkeys. As zinc is essential for functions of DNA repair enzymes or antioxidant enzymes, low contents of zinc in these organs may lead to premature aging symptoms, though it does not account for shrinkage of the brain. Three Japanese monkeys, Mff2389 and two sisters, show gargoyle face. X-ray analysis and urine test supported that they suffer from mucopolysaccharidosis (MPS). Exosome analysis suggested that a homozygous missense mutation in IDUA gene lead to the symptoms in Mff2389. Genotype test showed that the sisters of Mff2389 were homozygous and half of the non-pedigree were heterozygous. This group can be a good source for the primate model for MPS, type I.

研究分野：神経科学、霊長類学

キーワード：早老症 モデル動物 ニホンザル ムコ多糖症 リソソーム病 自然発症

1. 研究開始当初の背景

京都大学霊長類研究所において、ヒト以外の霊長類ではまだ報告のなかった「早老症」と思われるニホンザルを発見した(Oishi et al, PLOS ONE, 2014)。非常にまれな遺伝病である早老症は治療法のない悲劇的な疾病であると同時に、老化に伴う心身機能の低下のメカニズムと対処法を解明するための重要な研究対象でもある。

2. 研究の目的

本研究では、死亡してしまった「早老症」個体(個体番号 N416)の表現型解析をさらに推進するとともに、ゲノム科学・細胞生物学分野の専門家と協力して老化に伴う心身の変化の分子メカニズムを追究する。また、広義の早老症に含まれる「ダウン症」に類似した表現型を持つニホンザル(個体番号 Mff2389)を発見したので、この個体に関する各種の解析を進める。これらを通じ、早老症モデル動物を確立することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

①「早老症」ニホンザル個体(個体番号 N416)の母親や妹、同じグループケージに飼育されていた他個体には、N416 と類似の症状は全く現れなかった。そのため、症状の原因が感染症である可能性は低く、何らかの遺伝子の de novo 突然変異もしくは劣性ホモ接合が原因である可能性が高いと考えられた。しかし、既知の早老症原因遺伝子や DNA 修復酵素には発症を引き起こすような変異は見られなかった(Oishi et al, 2014)ため、別の角度からのアプローチを試みた。亜鉛は、DNA 結合タンパク質や抗酸化酵素の一種であるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の補因子であり、さらにインスリン分泌や染色体安定化、細胞分裂などにも関わっている。そのため、亜鉛不足は皮膚障害や味盲、無精子症(いずれも細胞分裂の障害に起因する)、糖尿病などの原因となる。これらの症状は N416 が示したものと高い一致を示すため、亜鉛不足が N416 の発症と関連しているという作業仮説を立て、研究協力者の東超氏とともに各種臓器等から組織を採取し、亜鉛を中心とした元素分析を行った。分析した組織は、肺、肝臓、心臓、腎臓、大脳皮質(側頭葉、後頭葉)、海馬、大脳基底核、小脳であった。N416 と比較するために、新生児から 30 歳までの 30 個体の試料も合わせて分析した。元素分析は、組織を水洗後乾燥して、硝酸と過塩素酸を加えて、加熱して灰化し、高周波プラズマ発光分析装置(ICPS-7510、島津製)を用いて定量した。

②霊長類研究所の放飼場には、導入当初の個体群の産地ごとにニホンザルが飼育されている。その中の若桜群に、鼻が低く、目元が張れて赤く、舌を突き出し、関節が十分伸展しない個体 Mff2389 がいた。これらの特徴から Mff2389 は早老症の一種であるダウン症で

はないかと疑い、観察と計測を開始した。しかし、Mff2389 の同腹妹である Mff2577、Mff2664 にも類似の顔貌が見られ、若桜群の別の個体や、他の群の個体には類似の特徴は見られなかったことからむしろ遺伝病を疑うようになった。症状を子細に検討すると、最も可能性が高いと思われたのは難病指定されているリソソーム病に含まれるムコ多糖症であったため、その主症状を中心に解析を行った。解析には、頭部 MRI、単純エックス線撮影、pQCT による骨密度測定、尿中ムコ多糖測定(メチレンブルー法)、および行動観察、獣医学的観察が含まれる。

③Mff2389 の兄弟姉妹、それらの父親(父子判定で判明しているもののみ)、さらに若桜群内外の個体に関して、DNA 解析を行った。ムコ多糖症は主要なものだけでも I-IV 型があり、それぞれに関して  $\alpha$ -L-イブロンダーゼ(IDUA, I 型)、イブロン酸-2-スルファターゼ(IDS, II 型)など 8 種の欠損酵素がある。当初は IDUA, IDS の全エクソンの配列解析に取り組んだが、並行して行っていたエクソソーム解析から有力な情報が得られ、原因遺伝子を絞り込むことに成功した。PCR ダイレクトシーケンス法を用いて、IDUA に見つかったミスセンス突然変異に関する各個体の遺伝子型を調べた。

4. 研究成果

①N416 と種々の年齢の正常個体の元素分析を行った結果、以下のことが明らかになった。まず、タンパク質含量の指標となるイオウや核酸含量の指標になるリンは他個体と比べ

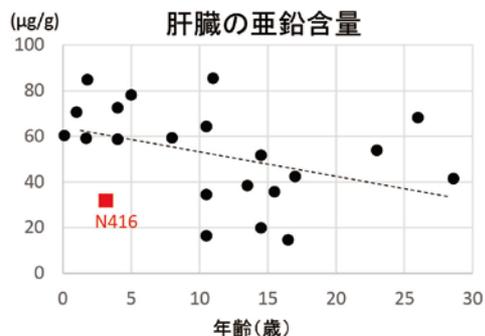


図1 正常個体では加齢に伴って肝臓の亜鉛含量が有意に低下した。N416は同年齢の個体よりも亜鉛含量が低かった。

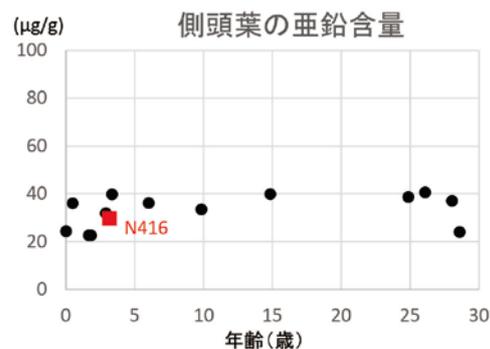


図2 正常個体では加齢に伴って側頭葉の亜鉛含量が変化しなかった。N416の側頭葉の亜鉛含量も正常個体のものと変わらなかった。

て際立った特徴を示さなかった。N416 の組織内で細胞の著しい減少などが無いことが示唆される。一方、亜鉛に関しては、正常個体の心臓、肺では加齢に伴って有意に減少していた。また、肝臓と腎臓でも加齢に伴って減少する傾向があった。これらはヒトにおける加齢変化と同様の傾向であった。N416 に関しては、心臓、肝臓、腎臓において、同年齢の個体よりも著しく亜鉛の含量が少なかった (図 1)。一方、脳ではどの部位においても、亜鉛の加齢に伴う現象は見られず、また N416 の亜鉛含量は正常個体と異ならなかった (図 2)。脳以外の部位においては、亜鉛含量の低下が細胞分裂能の低下や DNA 修復能の低下、インスリン分泌の減少を引き起こし、それが N416 の諸症状につながった可能性が高いと推測される。しかし、著しい萎縮が見られた海馬や大脳皮質側頭葉でも亜鉛の含量は低下していなかったことから、脳の病変には亜鉛低含量以外の原因が寄与していると考えられる。

②Mff2389、Mff2577、Mff2664 の特異な顔貌は、ムコ多糖症患者のガーゴイル様顔貌に類似していた (図 3)。頭部 MRI 撮像の結果、Mff2577 には脳溝や脳室の拡大が観察された (図 4)。Mff2389 にはこのような症状は見られなかった。単純エックス線撮影により、四



図3 2歳のときのMff2389。短い鼻梁、目の周りの皮膚の腫脹と発赤、舌の突き出しなど特異的な顔貌を示した。この顔貌はムコ多糖症患者のガーゴイル様顔貌に類似している。

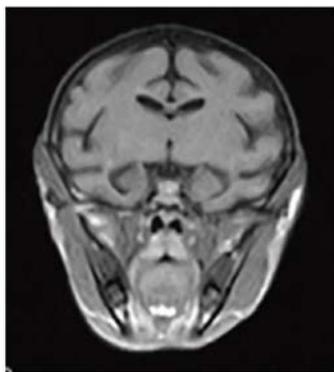


図4 Mff2577は、脳溝や脳室が拡大していた。

肢の長管骨の変形 (図 5) や、脊椎の後彎 (図 6) が観察された。pQCT 法によって Mff2389



図5 Mff2389の脛骨は正常なサルに比べ大きく彎曲していた。



図6 Mff2389の脊椎は正常なサルに比べ大きく後彎していた。

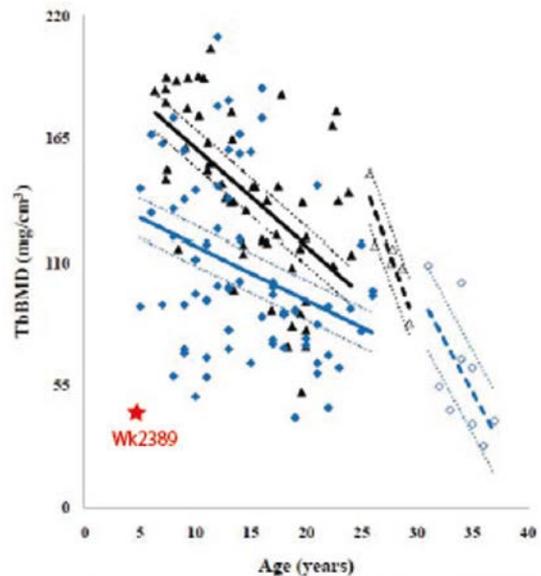


図7 5歳のときのMff2389の橈骨遠位部の海綿骨塩密度は同年齢個体よりも著しく低く、骨粗鬆症といえる。

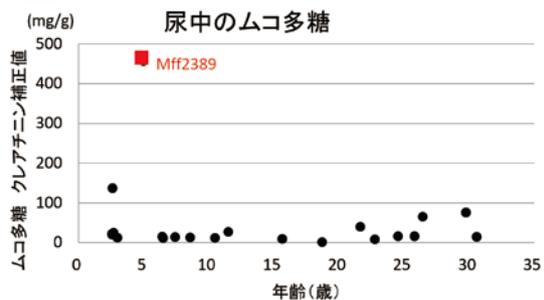


図8 Mff2389の尿中ムコ多糖濃度は正常個体に比べて極めて高く、ムコ多糖症患者と同レベルであった。

の橈骨遠位部の骨塩量を測定したところ、同年齢個体の平均値の約4割であり、骨粗鬆症を発症していることが分かった(図7)。尿中ムコ多糖濃度をメチレンブルー法で測定したところ、Mff2389は正常個体に比べて著しく高く、ムコ多糖症患者の値と同等であった



図9 8歳のときのMff2389の口。歯肉が肥厚し、歯がほとんど埋没していた。

(図8)。Mff2389は歯肉過形成(図9)や皮膚の肥厚が年々進行しており、現在、心臓弁膜症も発症している。

③IDUA、IDSなど8つの遺伝子に関して、Mff2389と母親Mff1971、父親Mff1976のトリプレットを対象にエクソーム解析を行ったところ、ムコ多糖症I型の原因遺伝子であるIDUA遺伝子の一塩基置換(c.786C>A)が、Mff2389ではホモに、両親ではヘテロに存在していることがわかった。この突然変異が発症に関わっているかどうかを検証するため、Mff2389の兄弟姉妹とその母親(Mff1971)、父親たち、その他の血縁個体と非血縁個体に関してPCRダイレクトシーケンス法を適用したところ、Mff2389、Mff2577、Mff2664の3頭だけがホモ、Mff2389の父親Mff1976、Mff2577の父親Mff2149はヘテロに変異を持っていた(図10)。Mff2389、Mff2577、Mff2664の3頭は、常染色体劣性遺伝であるムコ多糖症I型を発症していると結論できる。若桜群の非血縁個体も、調べたうち約半数がこの変異をヘテロに持っていた。100頭のエクソーム解析の範囲では、この変異は若桜群以外では見られなかった。放飼場若桜群が世界初のムコ多糖症霊長類モデル生産に利用できる可能性が示された。

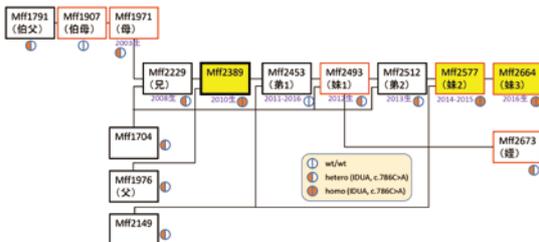


図10 Mff2389とその同種兄弟姉妹の血縁個体。赤い枠は雄、黒い枠は雌。黄色はMff2389同様の特徴を持つ個体。カッコ内はMff2389との続柄。IDUAのミスセンス突然変異をホモ接合で持つのは、Mff2389、Mff2577、Mff2664の3頭のみであった。

## 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 2件)

- ①大石高生、霊長類を用いた脳機能研究：人との違いと共通点、脳神経外科ジャーナル、査読有、25巻、6号、2016、480-484  
DOI: <https://doi.org/10.7887/jcns.25.480>
- ②Murata Y, Higo N, Oishi T, Isa T. Increased expression of the growth-associated protein-43 gene after primary motor cortex lesion in macaque monkeys. Vol. 526, No. 7, 1110-1130  
DOI: 10.1002/cne.24396.

[学会発表] (計 6件)

- ①大石高生、兼子明久、宮部貴子、今井啓雄、平崎鋭矢、郷康広、今村公紀、木下こづえ、釜中慶朗、橋本直子、森本真弓、高田昌彦、Mucopolysaccharidosis in captive Japanese monkey at Primate Research Institute, Kyoto University (KUPRI)、第95回日本生理学会、2018年、高松
  - ②大石高生、兼子明久、宮部貴子、今井啓雄、平崎鋭矢、郷康広、今村公紀、木下こづえ、釜中慶朗、橋本直子、森本真弓、平井啓久、高田昌彦、霊長類研究所における遺伝病疑い家系に関する報告、第6回生理研-霊長研-脳研合同シンポジウム、2017年、新潟
  - ③東超、大石高生、東野義之、東野勢津子、南武志、西真弓、サル輪状軟骨の元素蓄積の特徴、第121回日本解剖学会、2016年、福島
  - ④大石高生、「早老症」モデルニホンザル、シワコについて、第12回NBR公開シンポジウム、2015年、東京、招待講演
  - ⑤郷康広、岡本将司、Quin Li、Liu He、大石高生、鶴殿俊史、重信秀治、柿田明美、那波宏之、Philipp Khaitovich、ヒト脳と類人猿脳における時空間的比較トランスクリプトーム解析、日本進化学会第17回大会、2015年、東京
  - ⑥大石高生、霊長類を用いた脳機能研究：人との違いと共通点、第35回日本脳神経外科コンgres総会、2015年、横浜、招待講演
- [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

大石 高生 (OISHI Takao)  
京都大学・霊長類研究所・准教授  
研究者番号：40346036

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

平井 啓久 (HIRAI Hirohisa)  
今村 公紀 (IMAMURA Masanori)  
郷 康広 (GO Yasuhiro)  
東 超 (DONG, Cho)