

令和元年6月2日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07087

研究課題名(和文) Chmp2A/B変異マウスを用いたESCRT異常による筋萎縮性側索硬化症の解析

研究課題名(英文) Analysis of Amyotrophic lateral sclerosis using Chmp2A / B mutant mice

研究代表者

高林 秀次 (Takabayashi, Shuji)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・助教

研究者番号：70372521

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)：我々は筋萎縮性側索硬化症(ALS)様病態を自然発症する新規突然変異マウスを発見し、その原因遺伝子がChmp2A遺伝子のミスセンス変異であることを見つけた。一方、そのファミリーであるCHMP2Bは神経変性疾患の原因遺伝子として報告されていた。特にヒトのALS患者においてミスセンス変異が多数報告されていた。本研究はChmp2AがALS様異常の原因遺伝子であることを明らかにするために行われた。本研究ではゲノム編集技術を応用した簡便な遺伝子改変マウス作製法(i-GONAD法)を開発し、それによりChmp2AおよびChmp2BのノックアウトおよびSNP変異を導入したノックインマウスを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトALSの原因遺伝子としていくつか同定されている。しかし、Chmp2AがALSの原因遺伝子であるという報告はまだない。本研究でChmp2A KOマウスはChmp2B KOよりシビアな表現型を示した。Chmp2A遺伝子の遺伝子異常はヒトにおいても致死性の病態を示す可能性が示唆された。しかし、Chmp2A-L173P KIマウスでは明らかな後肢麻痺の表現型を示したことから、Chmp2Aがまだ同定されていない原因遺伝子である可能性を示唆している。本研究によりChmp2Aおよび2B遺伝子改変マウスを作製した。これらマウスの解析からALSの病態の解明につながる知見が得られる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We found a novel mutant mouse that spontaneously develops Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like pathology and found that the causative gene is a missense mutation of the Chmp2A gene. On the other hand, its family, CHMP2B, has been reported as a causative gene for neurodegenerative diseases. Many missense mutations have been reported, particularly in human ALS patients. This study was conducted to clarify that Chmp2A is the causative gene for ALS-like abnormalities. In this study, we developed a simple gene modified mouse preparation method (i-GONAD method) to which genome editing technology was applied, thereby creating knock-in mice into which Chmp2A and Chmp2B were knockout and SNP mutations were introduced.

研究分野：実験動物学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 Chmp2A Chmp2B i-GONAD マウス ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は脊髄中の運動ニューロンが選択的に侵され、重篤な筋肉の萎縮をきたす神経変性疾患である。我々は ICR から ALS 様病態を自然発症する新規突然変異マウスを発見した。この ALS マウスは生後 3 週齢頃から後肢を引きずる歩行異常が認められ、平均寿命が約 4 ヶ月であった。クレアチンキナーゼ値は正常と変わらず、筋肉の壊死は見られなかったが、顕著な脊髄の萎縮と神経細胞の変性が認められ、神経原性の筋疾患であることが明らかとなった。我々はその原因遺伝子が *Chmp2A* 遺伝子のミスセンス点突然変異があり、この変異によりロイシンがプロリンへ置換する (p.L173P) ことを見つけた。

一方、CHMP2A のファミリーで ESCRT-III のサブユニットの一つである CHMP2B は神経変性疾患 (ALS 及び前頭側頭葉認知症) の原因遺伝子として報告されていた。特にヒトの認知症を伴う ALS (ALS-D) 患者において *CHMP2B* 遺伝子のミスセンス変異が多数報告されている (p.Q206H, D148Y など)。すなわち、CHMP2B の機能不全が神経細胞内でのタンパク質の異常蓄積を引き起こし、ALS の発症に関与していることが明らかとなった。しかしながら、*Chmp2B* 遺伝子改変マウスが作製されていないため個体レベルでの詳細な解析がなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 系を用いて、遺伝子改変マウスを作製し、ALS マウスの原因遺伝子が *Chmp2A* 遺伝子であることを明らかにする。さらに、*Chmp2B* 遺伝子のミスセンス変異を導入したマウスを作製し、ヒトで見られた病態がマウスにおいても観察されるかを確認する。そのため、簡便なゲノム編集マウス作製法の開発を目指して、*i*-GONAD 法を習得し、*Chmp2A* 及び *Chmp2B* 遺伝子改変動物の作製を目指す。

3. 研究の方法

本研究において多数の遺伝子改変動物を短期間で作成することが求められるため、*i*-GONAD 法に着目して遺伝子改変動物を作製した。*i*-GONAD 法は「受精卵の単離、受精卵への核酸の顕微注入及び核酸注入胚の偽妊娠マウスへの移植」などの熟練を要する煩雑な作業が回避できるため、エレクトロポレーション装置があれば、比較的簡単に遺伝子改変動物の作製が可能である。

本研究では遺伝子改変法として CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いた。CRISPR/Cas9 とは、DNA 二本鎖を切断してゲノム配列の任意の場所を切断 (ノックアウト, KO) 及び挿入 (ノックイン, KI) することができるゲノム編集技術である。切断したい標的塩基配列を含む ガイド RNA、Cas9 及びオリゴ DNA をマウス受精卵に導入することにより約 2 ヶ月で遺伝子改変マウスを作製することが可能である。本研究では *i*-GONAD 法と CRISPR/Cas9

システムを組み合わせることにより遺伝子改変マウスを作製した。具体的には ICR マウスを用いて *Chmp2A* KO、*Chmp2A*-L173P KI、*Chmp2B* KO、*Chmp2B*-Q206H KI、*Chmp2B*-D148Y KI および *Chmp2A* flox を作製した。マウスの外見上の異常の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) *Chmp2B* KO マウス

Chmp2B のエクソン 1 に対するガイド RNA を用いて作製した単純ノックアウトマウスである。結果的にエクソン 1 に 58bp 欠損を起こす変異が得られ、coding DNA の 20 番目までを欠失する (c.1-38_20del)。ホモ個体は正常に生まれ、同腹正常と体重および外見上違いがなかった (図 1 および 2)。



図 1. *Chmp2B*-KO マウス

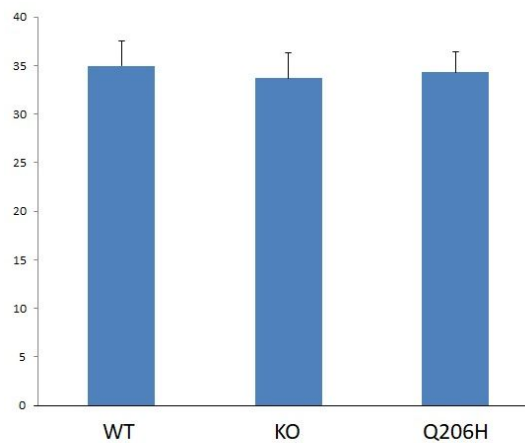


図 2. *Chmp2B* 遺伝子改変マウスの 8 週齢オスの体重

(2) *Chmp2B* Q206H KI マウス

coding DNA の 618 番目の塩基 A を C に置換させる 130bp のシングルストランドオリゴ DNA (ssODN) を相同組換えさせるような KI マウスを作製した (p.Q206A)。ホモ個体は正常に生まれ、同腹正常と体重および外見上違いがなかった (図 2 および 3)。

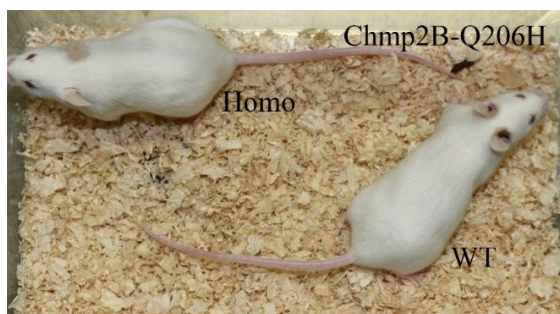


図 3. *Chmp2B*-Q206H KI マウス

Chmp2B-Q206H KI マウスの表現型は正常であったが、同腹子に体が小さい表現型を示す個体が得られた。この異常個体は遺伝子に異常がないことからオフターゲット効果により生まれた新しい変異マウスである可能性が考えられた。原因遺伝子については現在解析中で

ある。

(3) *Chmp2B*-D148Y KI マウス

coding DNA の 442 番目の塩基 G を T に置換させる 130bp の ssODN を相同組換えさせるような KI マウスを作製した (p.D148Y)。ホモ個体は正常に生まれ、同腹正常と体重および外見上違いがなかった。

(4) *Chmp2A* KO マウス

Chmp2A のエクソン 2 に対するガイド RNA を用いて作製した単純ノックアウトマウスである。coding DNA の 81 番目の塩基 A が欠損した変異 (c.81delA) が得られ、アミノ酸の 28 番目以降にフレームシフトが起こり、そこから 9 番目に終始コドンができる変異であった (p.Glu28fs)。ICR および B6 系どちらの遺伝子背景においてもホモ個体の新生児は得られず、KO ホモ個体は胎性致死であった。

(5) *Chmp2A*-L173P KI マウス

coding DNA の 519 番目の塩基 T を C に置換させる 130bp の ssODN を相同組換えさせるような KI マウスを作製した (p.L173P)。これにより、自然発症により見つかった変異マウスと同様の遺伝子変異を持った個体を作製した。

ホモ個体は生後 2 週頃より正常個体に比べて明らかに体重が軽かった (図 4 および 5)。

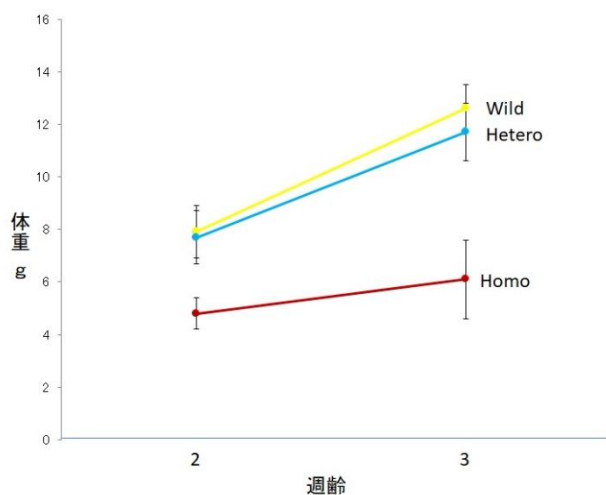


図 4. *Chmp2A*-L173P KI マウスオスの体重

2 週齢頃から後肢を引きずるような表現型を示した (図 5 および 6)。ホモ個体の平均寿命は 22.6 日 ± 13.5 日であり、1 ヶ月以内に死亡することが明らかとなった。

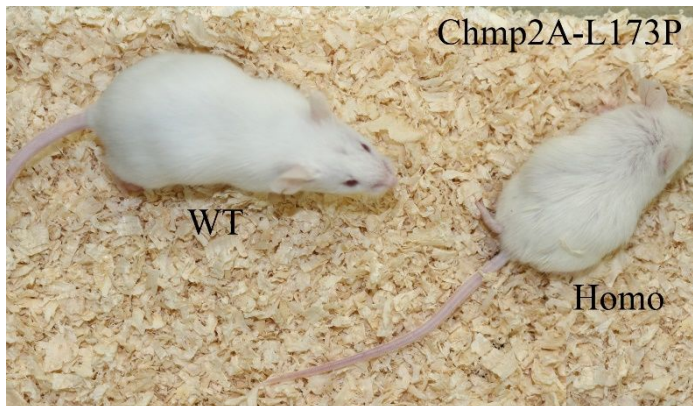


図 5. *Chmp2A*-L173P KI マウス

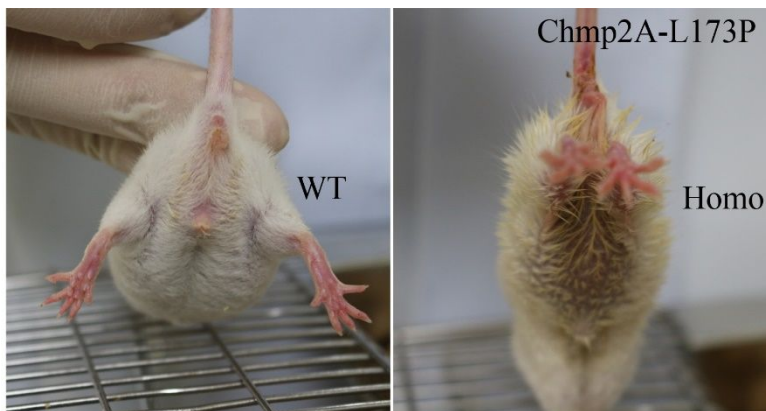


図 6. *Chmp2A*-L173P KI マウスの後肢

(6) *Chmp2A*-floxed mouse

Chmp2A 遺伝子のエクソン 2 を前後にガイド RNA を設計して loxP 配列を KI したマウスを作製した (図 7)。このマウスは 2 段階の *i*-GONAD により作製したため、作製に時間を要してしまい、組織特異的な Cre マウスとの交配を行うことが実験期間内にできなかった。

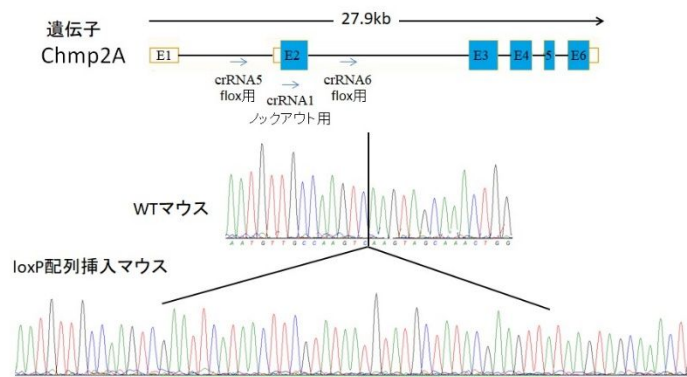


図 7. *Chmp2A*-floxed の遺伝子配列

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Ohtsuka M *, Sato M, Miura H, Takabayashi S, Matsuyama M, Koyano T, Arifin N, Nakamura S, Wada K., Gurumurthy C B. *i-GONAD*: a robust method for *in situ* germline genome engineering using CRISPR nucleases. *Genome Biology*. 19: 25, 2018.

〔学会発表〕(計1件)

高林 秀次、青島 拓也、椋嶋克哉、佐藤 正宏、大塚 正人
i-GONAD 法を用いた遺伝子改変マウスにおける系統差。第 65 回日本実験動物学会総会
2018年5月

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：青戸 一司

ローマ字氏名：(AOTO, kazuto)