

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390117

研究課題名 (和文)

Ca 非依存性 PLA2 による新しい免疫制御メカニズムと神経変性疾患への関与

研究課題名 (英文) A novel immune regulation mechanism by Ca-independent PLA2 and its contribution to neurodegenerative diseases

研究代表者

清野 研一郎 (SEINO KEN-ICHIRO)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：20312845

研究成果の概要 (和文)：本研究では我々が世界で初めて樹立した Ca 非依存性 PLA2 ベータ (iPLA2 $\beta$ 、Pla2g6) に点突然変異を持つマウスライン (Pla2g6-inad) に関して解析を行った。その結果、このマウスは生後数週間で下肢を主体とする麻痺を呈し、ヒト乳児型神経軸索ジストロフィーのモデルマウスである事が判明した。このマウスは NKT 細胞ポピュレーションの増加等免疫異常も呈する事が分かった。今後、同疾患のメカニズム解明、治療法の開発に活かすことができる。

研究成果の概要 (英文)：We have investigated the mutant mice bearing a point mutation in Ca-independent PLA2 (iPLA2 $\beta$ 、Pla2g6). They showed a progressive paralysis in their lower limbs since several weeks after the birth. The mutant mice were realized as model mice of human infantile neuroaxonal dystrophy. The mice also showed some immune abnormality such as increase of NKT cell population. We can use the mutant mice for further investigating the disease mechanism and developing new therapeutic strategies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患モデル動物、NKT 細胞、INAD

## 1. 研究開始当初の背景

我々はそれ以前の所属研究機関である理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センターで ENU プロジェクトにより NKT 細胞が増加するマウスを得ていた。

このマウスは生後数週間で進行性の麻痺を呈し、歩行できなくなり 16 週目までにほぼ全例が死亡するというものであった。その原因遺伝子は特定できていなかった。そこで全ゲノム解析により原

因遺伝子をまず特定し、次にその遺伝子産物の機能を特定する事が求められた。ミュータントマウスの神経病理学的解析では脳幹から脊髄にかけて著明なスフェロイドの形成が見られ、神経軸索ジストロフィー (neuroaxonal dystrophy-NAD) の所見であった。この頃原因遺伝子の探索を終了し、Ca 非依存性 Phospholipase A2 (iPLA2・) 遺伝子内に Gly→Arg のアミノ酸置換を生じる点変異が存在することを発見した。ヒトにおける iPLA2・ と NAD の関連については、2006 年、Oregon Health & Science University の Hayflick らが neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) を伴う NAD の原因として iPLA2・ の変異を初めて報告しており (Nat Genet 38:752, 2006)、我々のマウスはこのモデルマウスということができた。

## 2. 研究の目的

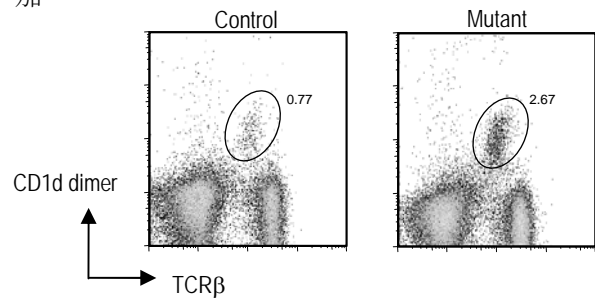
本研究では、iPLA2・ の異常が NKT 細胞数の変化をもたらすことを足がかりに、同分子がどのようなメカニズムで免疫細胞の数や機能を調節しているのか明らかにする。同時に iPLA2・ の異常による神経細胞変性のメカニズムを解明する。これらの基盤的解析として、変異型 iPLA2・ タンパク質の酵素活性、相互結合能、特異的結合分子など生化学的特徴を解明する。さらに、ヒト NAD 患者において NKT 細胞免疫系の異常が存在するかどうか明らかにする。

## 3. 研究の方法

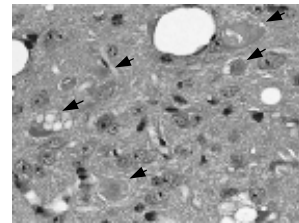
- ① 変異型 iPLA2・ タンパク質の生化学的解析：iPLA2・ は N 末側に 8 個のアンキリンリピートを持ち、その C 末側に酵素活性が存在する。iPLA2・ はアンキリンリピートの相互作用によってオリゴマーを形成し酵素活性を呈すると考えられている (J. Biol. Chem. 272: 8567, 1997)。我々のミュータントマウスではアンキリンリピート内に点変異が存在するが、これが酵素活性に及ぼす影響、免疫細胞や神経細胞に対する作用などは不明である。これらを解決するべく生化学的解析を行う。

- ② iPLA2・ による NKT 細胞分化制御の解析：iPLA2・ ミュータントマウス、iPLA2・ KO マウス (J. Biol. Chem. 281: 20958, 2006)、野生型マウス間で各種臓器における NKT 細胞数の変化を経時的に観察する。特に胸腺においては CD44、CD25、NK1.1 などの発現から活性化の程度を検討する。  
(下図：FACS データ)

ミュータントマウスにおける NKT 細胞の増加



- ③ iPLA2・ による神経変性のメカニズム解析：iPLA2・ ミュータントマウス神経組織における iPLA2・ の発現、細胞内局在、オルガネラや軸索の形態について病理組織学的解析を行う。



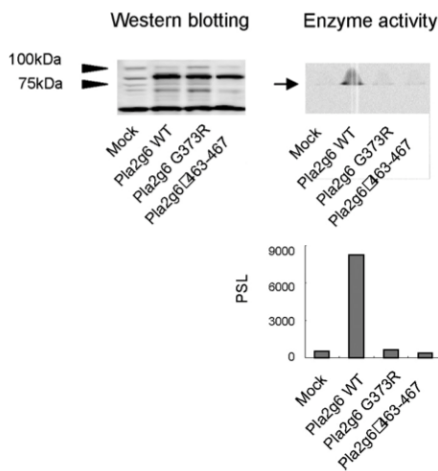
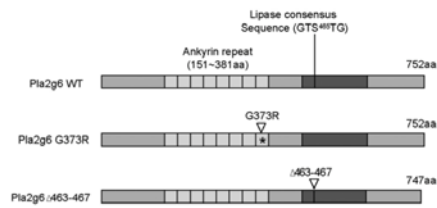
ミュータントマウスで見られるスフェロイド形成 (延髄薄束核)

- ④ 脂質組成の解析と特異的脂質の同定：iPLA2・ ミュータントマウス、iPLA2・ KO マウス (J. Biol. Chem. 281: 20958, 2006)、野生型マウス間で各種臓器 (特に胸腺及び脳神経) の脂質画分を HPLC/質量分析、lipidomics の手法により詳細に調べ特異的に発現している脂質を同定する。

## 4. 研究成果

- ① 変異型 iPLA2・ タンパク質の生化学的

解析：我々は iPLA2・タンパク質の正常型と点突然変異型を作製した。また、ミュータントマウス内での発現を・・・レベル及びタンパク質レベルで調べた。その結果、これらの分子はともに病気を発症しても発現している事が判明した。そこでリコンビナントタンパク質を用いて、これらの分子の脂質分解機能について解析を行った。その結果、点突然変異を持つタンパク質 (Pla2g6 Δ463-467) はその脂質分解機能を失っている事が判明した。



- ② iPLA2・による NKT 細胞分化制御の解析：このマウスで見られる免疫異常は2次的である可能性が示唆された。
- ③ iPLA2・による神経変性のメカニズム解析：上記の通り、この酵素の点突然変異型は機能を欠損している事が示唆された。そのため、神経細胞軸索の輸送異常、細胞膜の恒常性変性等が起きている事が示唆されたが、その詳細は更なる解析が必要である。
- ④ 脂質組成の解析と特異的脂質の同定：iPLA2・ミュータントマウス、iPLA2・KOマウス、野生型マウス間で

各種臓器（特に胸腺及び脳神経）の脂質画分をHPLC/質量分析手法により解析した。しかし、このmethodologyではそれぞれのマウス間で脂質画分に差を認めなかった。

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1件)

1. Wada H, Yasuda T, Miura I, Watabe K, Sawa C, Kamijuku H, Kojo S, Taniguchi M, Nishino I, Wakana S, Yoshida H, and Seino K. Establishment of an improved mouse model for infantile neuroaxonal dystrophy bearing a point mutation in *Pla2g6* which shows early disease onset. Am J Pathol 175: 2257-63, 2009. 査読あり

[学会発表] (計1件)

1. Wada H, Yasuda T, Sawa C, Kamijuku H, Watabe K, Yoshida H, and Seino K. Establishment of a mouse mutant bearing a point mutation in *Pla2g6* which show early onset of neuroaxonal dystrophy. Phospholipase A<sub>2</sub> and Lipid Mediators PLM2009, 25 May 2009.

[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：  
出願番号：  
出願日：  
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

清野 研一郎 (SEINO KEN-ICHIRO)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授  
研究者番号：20312845

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

和田はるか (WADA HARUKA)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教  
研究者番号：70392181

香城諭 (KOJO SATOSHI)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教  
研究者番号：70360542