

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590361

研究課題名（和文）ダブルヒト化マウスによる家族性アミロイドポリニューロパチーの病
因・病態解析研究課題名（英文）Analysis pathologic processes of FAP development using double
humanized mice

研究代表者

李 正花（リ チュンホア）

熊本大学・生命資源研究・支援センター・特定事業研究員

研究者番号：80398239

研究成果の概要（和文）：マウス Rbp4 遺伝子を完全破壊し、ヒト RBP4 遺伝子で置換したマウスの作製に成功した。このマウスを、すでに作製済みの Ttr 遺伝子のヒト化マウスと交配し、Ttr 及び Rbp4 遺伝子がともにヒト化されたマウスを作製した。このダブルヒト化マウスを用いて、分子生物学的・生化学的解析を行い、予想通りの結果が得られた。家族性アミロイドポリニューロパチーの最適なマウスモデルとして、アミロイド沈着の解析や治療実験への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We successfully produced Rbp4 deficient mice, followed by the establishment of humanized RBP4 mice (Rbp4^{hRBP4}). These mice were mated with Ttr^{hTTR} mice to produce double humanized mice at both Ttr and Rbp4 loci. We obtained expected results from double humanized mice by molecular and biochemical analyses. These mice as optimum mouse model for familial amyloidotic polyneuropathy will be useful to analyze mechanisms for amyloid deposition and to devise a new way of treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

優性遺伝病である家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)は、1983年にヒトトランスサイレチン(TTR)遺伝子変異に基づくアミノ酸置換によって引き起こされることが明らかとなった。有効な治療法として肝臓移植以外になく、アミロイド沈着に関与する要因の解析を通して、誰でもが受けることのでき

る新たな治療法の開発が緊喫の課題である。申請者らの研究室において7系統のトランスジェニック(Tg)マウスモデルが作製され研究が続けられてきたが、マウスTTR遺伝子が残存しているため、マウスとヒトのTTR間でヘテロ4量体を形成し、これが安定であるためアミロイド沈着が起こりにくいことが指摘されている。そこで、申請者らはマウスTtr遺伝子を完全破壊し、ヒトTTR遺伝子で

置換したマウスを作製した。しかし、

- (1) マウスとヒトの両方の TTR 遺伝子を持つヘテロマウス ($Ttr^{+/hVal130}$) とヒト TTR のみを持つヒトホモマウス ($Ttr^{hNa130/hVal130}$) を比較すると、肝臓でのヒト TTR の mRNA 及びタンパクの発現量は、予想通り $Ttr^{hVal130/hVal130}$ は $Ttr^{+/hVal130}$ の 2 倍であるが、血清中の TTR 量は $Ttr^{hNa130/hVal130}$ は $Ttr^{+/hVal130}$ に比し 40% 程度であること、
- (2) その理由は、ヒト TTR ホモ 4 量体はヒト/マウス TTR ヘテロ 4 量体よりも不安定なためであること、
- (3) さらにその不安定な理由はヒト TTR ホモ 4 量体は、肝臓内で RBP4 と結合できないためであること、を明らかにした (Zhao et al. Genes Cell in press)。

従って、マウス Ttr 及び $Rbp4$ 遺伝子がともにヒト化されたマウスモデルが、最適であることと考えられた。

2. 研究の目的

- (1) マウス RBP の完全破壊マウスの作製
- (2) ヒト RBP 遺伝子で置換したマウスの作製 (Rbp^{hRBP})
- (3) Rbp^{hRBP} とすでに作製済みの $Ttr^{hVal130}$ および Ttr^{hMet30} とを交配し、TTR 遺伝子及び RBP 遺伝子がともにヒト化されたマウス ($Rbp^{hRBP}; Ttr^{hV30}$ 及び $Rbp^{hRBP}; Ttr^{hMet30}$) の作製
- (4) 上記のマウスを用いての分子生物学的・生化学的解析 (例: mRNA 及びタンパクレベルでの発現パターンや発現量の解析)
- (5) $Rbp^{hRBP}; Ttr^{hV30}$ 及び $Rbp^{hRBP}; Ttr^{hMet30}$ でのアミロイド沈着の解析
- (6) 4 量体を安定させると考えられている 3 価クロミウムや抗酸化剤投与による治療実験である。

しかし、後半の(5)-(6)実験は、時間も経費もかかることから、次期の基盤研究で実施予定である。

3. 研究の方法

- (1) $Rbp4$ ターゲティング ベクターの作製

ターゲティング ベクターの構造としては、 $Rbp4$ 遺伝子の第 2 エクソンにある ATG の直前で破壊するようデザインする。具体的な構造は下記のとおりである。

[MC1-DT-A-polyA]-[5' homologous region of mouse $Rbp4$ gene (3kb)]-[lox71]-[PGK-Neo]-[loxP]-[polyA]-[3' homologous region of mouse $Rbp4$ gene (6kb)]

- (2) Targeted allele を持つ ES clone の単離

上記のターゲティング ベクターを TT2 ES 細胞に電気穿孔法にて導入し、ネオ耐性クローンを選別する。targeting vector がランダムに挿入したクローンを除去するため、neo probe を用いてサザンブロット解析を行い、予想サイズのシングルバンドのみが検出できるクローンを選別する。

- (3) ヒト RBP4 置換ベクターの作製

ヒト RBP4 置換ベクターの具体的な構造は下記のとおりである。

loxKMR3]-[humanRBP4 cDNA]-[pA]-[Frt]-[PGK-puro]-[Frt]-[loxP]

- (4) 置換アレルを持つ ES clone の単離

上記の置換ベクターを CAG-Cre 発現ベクターとともに、targeted ES cell に導入する。lox71 と loxKMR3 および loxP と loxP 間で組換えが起こるので、targeted allele 内の [PGK-Neo] が [human RBP4 cDNA]-[pA]-[Frt]-[PGK-puro]-[Frt] で置換され、置換アレルができる。

- (5) マウス Rbp 遺伝子破壊マウス (Rbp^{tm87}) の作製と解析

Targeted ES clone を用いて、凝集法によりキメラマウスを作製する。得られたキメラマウスを交配し、マウス $Rbp4$ 遺伝子ノックアウトマウス (Rbp^{tm87}) を樹立する。まず、完全欠失となっているかどうかを、ノザンブロット法およびウエスタンブロット法で確認する。

- (6) ヒト RBP 遺伝子で置換したマウス (Rbp^{hRBP}) の作製と解析

Replaced ES clone を用いて、凝集法によりキメラマウスを作製する。得られたキメラマウスを交配し、マウス Rbp 遺伝子をヒト RBP 遺伝子で置換したマウス (Rbp^{hRBP}) を作製する。まず、ヒト RBP 遺伝子の発現パターンをノザンブロット法およびウエスタンブロット法で解析する。さらに、血中の TTR, T4, T3, retinol への影響を解析する。

- (7) RBP 遺伝子座及び TTR 遺伝子座がヒト遺伝子で置換されたマウス ($Rbp^{hRBP}; Ttr^{hV30}$) の

作製と解析

Rbp^{hRBP} マウスと Ttr^{hV30} マウスとを交配し、Rbp^{hRBP};Ttr^{hV30} 樹立する。まず、ヒト RBP 遺伝子とヒト TTR 遺伝子の発現パターンをノザンブロット法およびウエスタンブロット法で解析する。次に、肝臓及び血清中のマウス TTR をウエスタンブロット法で解析する。さらに、血中の TTR, T4, T3, retinol への影響を解析する。

4. 研究成果

マウス Rbp4 遺伝子を完全破壊し、ヒト RBP4 遺伝子で置換したマウスの作製に成功した。このマウスを、すでに作製済みの Ttr 遺伝子のヒト化マウスと交配し、Ttr 及び Rbp4 遺伝子がともにヒト化されたマウスを作製した。このダブルヒト化マウスを用いて、分子生物学的・生化学的解析を行い、予想とおりの結果が得られた。2 つの遺伝子をともにヒト化することで理想的なマウスモデルが可能であることを世界で始めて明らかにした。これまで Ttr^{hTTRMet30} と同程度の血清 TTR レベル (2-3mg/dl) を持つ他のトランスジェニックマウス [Tg(0.6-hTTRMet30)] においてアミロイド沈着を観察している (Transgenic Res. 6: 261-269, 1997) ことから、TTR 遺伝子及び RBP 遺伝子をともにヒト化したマウスにおいてもアミロイド沈着が十分期待できる。したがって、これらのマウスを用いて CHF5074 や抗酸化剤による治療実験を行えると期待される。効果が確認されれば、グルタチオン等の抗酸化剤はすでにヒトで用いられているところから、その波及効果は大きいと考えられる。

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 Zhenghua Li, Gang Zhao, Jingling Shen, Kimi Araki, Kyoko Haruna, Seiya Inoue, Jun Wang, Ken-ichi Yamamura. Enhanced expression of human cDNA by phosphoglycerate kinase promoter-puromycin cassette in the mouse transthyretin locus, Transgenic Research, 査読有, Vol. 20, 2011, 191-200 <http://dx.doi.org/10.1007/s11248-010-9389-2>
- ② Tatsufumi Murakami, Yutaka Ohsawa, Li Zhenghua, Ken-ichi Yamamura, Yoshihide Sunada, The transthyretin gene is

expressed in Schwann cells of peripheral nerves, Brain research, 査読有, Vol. 1248, 2010, 222-225 <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.017>

[学会発表] (計 4 件)

- ① 李 正花、荒木喜美、作村由美、山村研二、(可変型相同組換え法による Ttr および Rbp 遺伝子座のダブルヒト化マウスの作製)、34 回日本分子生物学会年会、2011. 12. 13、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② Zhenghua Li, Kimi Araki, Ken-ichi Yamamura. (Production of optimum humanized mouse model for familial amyloidotic polyneuropathy). Mouse genetics 2011, 2011. 6. 23、ワシントン D.C. (米国)
- ③ 李 正花、荒木喜美、作村由美、山村研二、(ヒト化マウスによる最適 FAP モデルの作製)、33 回日本分子生物学会年会、2010. 12. 10、神戸国際展示場 (兵庫県)
- ④ Zhenghua Li, Kimi Araki, Ken-ichi Yamamura. (Production of optimum humanized mouse model for familial amyloidotic polyneuropathy). The 4th AFLAS Congress Meeting 5th AMMRA Meeting & 11th CSLAS Annual Meeting, 2010. 11. 10、台北 (台湾)

[その他]

ホームページ等

<http://irda.kuma-u.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 正花 (LI ZHENGHUA)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・
特定事業研究員

研究者番号：80398239

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

山村 研一 (YAMAMURA KENICHI)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・
教授

研究者番号：90115197

(4) 研究協力者
なし
研究者番号：