

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860855

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュを用いたペルオキシソーム病発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)Understanding the pathology of peroxisomal diseases

研究代表者

高島 茂雄(Takashima, Shigeo)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教

研究者番号：50537610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ペルオキシソーム形成異常症は主に新生児で発症する遺伝性の難病である。本疾患で見られる脳や肝臓での異常が引き起こされる過程を理解し有効な治療方法に繋げるために、疾患モデルとなるゼブラフィッシュを用いて研究を行った。病因となるPEX2遺伝子をゼブラフィッシュに於いて遺伝子編集技術により変異させて変異型が異なる2系統の疾患モデルフィッシュを作成した。強変異型では1-2ヶ月程度で死亡するのに対し弱変異型では約8ヶ月まで生存後死亡した。これは重症型、軽症型患者の病態を再現している。また肝臓の変質や遊泳能力の低下が顕著であり、極長鎖脂肪酸等の代謝異常が確認された。今後さらなる病態解明を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：Peroxisomal biogenesis disorder (PBD) is a congenital metabolic disease mainly appear in newborns and infants. A fish disease model was established using the zebrafish and analyzed in this work. Disease-related PEX2 gene was mutated in zebrafish using a genome editing technique and two disease model fish lines were recovered, each of them possesses a strong mutation or a weak mutation of PEX2 gene. The fish with the strong mutation died in 1-2 months after birth while with the weak mutation survived around 8 months old and then died, recapitulating human patients who have a strong or a weak mutation. A deformation of the liver was found in the disease-model fish and a swimming defect was also manifested. Metabolic abnormality was also found such as an abnormally higher amount of tissue very-long chain fatty acids that is also remarkable in the human patients of this disease. With this model fish, a further analysis will be performed for understanding the detailed pathology of PBD.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：ペルオキシソーム形成異常症 疾患モデル動物 PEX遺伝子 先天性代謝異常症 極長鎖脂肪酸 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

(1) ペルオキシソーム形成異常症は PEX 遺伝子群の変異によって引き起こされる遺伝性の疾患であり、細胞内小器官であるペルオキシソームの形成不全によって様々な物質の代謝が滞る先天性代謝異常症である。本疾患は組織・器官の発生が進む胎児期に影響が現れ始めるために患者の多くは新生児である。症状が現れる臓器は多岐にわたり、特に脳や肝臓、腎臓、骨形成等に重篤な発生の学的・組織学的異常が生じる。

(2) 通常ペルオキシソームでは極長鎖脂肪酸、フィタン酸等の脂肪酸種の分解や、プラズマローゲン、胆汁酸、ドコサヘキサエン酸 (DHA) の合成が行われている。さらに一部のアミノ酸の分解や活性酸素種の除去もペルオキシソーム内で行われる。ペルオキシソーム形成異常症ではこれらの物質の代謝が滞り組織や血液中で異常に蓄積したり、欠乏したりする。それらの異常代謝産物が本疾患の病態発症につながっていると考えられているが直接的な関連性は殆どわかっていない。また前述のように胎児期において組織・器官の発生異常が生じるために詳細な病態発症過程も不明である。

2. 研究の目的

上記のようにペルオキシソーム形成異常症は原因となる遺伝子変異が明らかである一方で、病態発症に関する知見は乏しい。本研究では未だに明らかになっていない本疾患の病態発症過程の詳細と発生の学的・組織学的異常の直接的な原因となる代謝産物を明らかにするためにゼブラフィッシュを研究材料として用い、疾患モデルフィッシュの作成とその表現型解析を行うことで本疾患の病態発症に関する理解を深め、将来の治療につなげることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 本研究で用いたゼブラフィッシュは遺伝学的・発生の学的研究に多用される小型の硬骨魚類である。本生物種はヒトと共通の基本的な体構造を備えており、更にヒトとの遺伝子の保存性も高いことから組織や器官発生を含めたヒトの体構造形成における遺伝子機能を理解する上でのモデル動物として有用である。さらに本種の卵は透明で、産卵された後体外で発生が進行するので組織・器官形成の過程を顕微鏡下で観察することができるため、発生の学的研究に適している。

(2) ペルオキシソーム形成異常症のモデルとするために PEX 遺伝子機能を人為的に損なわせたゼブラフィッシュ個体を用いて研究を行った。まずモルフォリノオリゴを利用した遺伝子機能阻害法を用いた。しかしモルフ

オリノオリゴを用いた阻害法では予想される遺伝子阻害効果が得られない一方で、非特異的な発生異常が誘導されたために方法の変更を行った。変更後の方法として遺伝子編集技術を採用した。TALEN と呼ばれる遺伝子編集技術を用いることでゼブラフィッシュの PEX2 遺伝子に欠失変異を導入した。PEX2 遺伝子はヒト患者で本疾患の原因となることが明らかとなっている遺伝子の 1 つである。

(3) 作成した疾患モデルフィッシュについて表現型の解析を行った。さらにペルオキシソームの形成異常に伴う代謝異常を明らかにするために液体クロマトグラフィー 質量分析装置 (LC-MS) を用いて極長鎖脂肪酸・フィタン酸の量を測定し、未変異の野生型個体と比較した。

(4) 疾患モデルフィッシュで増加することが予想される代謝産物である極長鎖脂肪酸とフィタン酸等について LC-MS における測定法の開発を行った。解析に適した組織の破壊方法や代謝産物の抽出方法の検討、LC-MS で使用する移動相や質量分析装置測定パラメーターの条件検討をおこなって上記代謝産物の測定方法を確立した。

4. 研究成果

(1) ペルオキシソーム形成異常症のモデルフィッシュを作成するためにモルフォリノオリゴを使用してペルオキシソーム形成に関与する PEX 遺伝子群の機能阻害実験を行った。PEX2、PEX16 の 2 つの遺伝子配列に基づいて設計したモルフォリノオリゴをゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクション法により導入することで、上記遺伝子の機能阻害を試みた。モルフォリノオリゴは対象遺伝子の mRNA と結合することで翻訳を妨げタンパク質合成を阻害する。モルフォリノオリゴを導入した受精卵では全体的な発生遅延や胚の矮小化等の変化が起こったが、これらはモルフォリノオリゴの非特異的な影響だと考えられた。また LC-MS による代謝産物の測定においても明らかな極長鎖脂肪酸、フィタン酸の蓄積は起こっておらず、PEX 遺伝子が阻害された結果生じると予想された変化は見られなかった。これらの結果からモルフォリノオリゴを利用した機能阻害実験では効果的に疾患モデルフィッシュを作成できないと結論し、用いる方法の再検討を行った。

(2) ペルオキシソーム形成異常症疾患モデルフィッシュを作成するための代替法としてゲノム編集技術を用いて PEX2 遺伝子に変異を導入した。ゼブラフィッシュ PEX2 遺伝子の DNA 配列の一部を認識し切断する人工ヌクレアーゼ TALEN を作成し、mRNA に転写したものをゼブラフィッシュ受精卵にマイクロ

インジェクション法により導入した。同受精卵を成魚になるまで飼育し、次世代を採取、変異が導入された個体を DNA 配列解析により同定し、系統化した。本法では切断部位の DNA が数塩基程度欠失することで遺伝子変異が導入される。結果として欠失塩基数の違いで変異のパターンが異なる 2 つの変異系統を確立した。

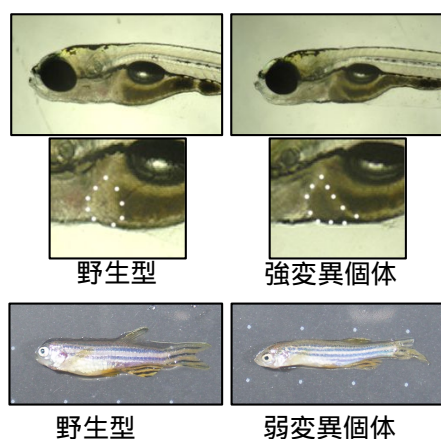


図 1. 疾患モデルフィッシュの表現型。上 2 段は強変異個体と野生型個体の比較。白点線内は肝臓。下段は弱変異個体と野生型との比較。

(3) 得られた 2 系統の疾患モデルフィッシュに関して表現型の解析を行った。解析の結果 2 系統はそれぞれ強変異型、弱変異型であり、異常の程度に明らかな差があることが判明した。強変異型は産卵後 10 日程度で通常は透明な発達中の肝臓細胞に褐色の濁りが生じることで野生型と区別が可能であり (図 1 参照) 更にそれらの個体は生後 1 - 2 ヶ月程度で全て死亡し成魚まで成長する個体は皆無だった。死亡前には遊泳能力が急激に低下することから神経系または筋肉に異常が生じていると考えられた。死亡前の個体から脂肪酸を抽出し LC-MS による解析を行ったところ極長鎖脂肪酸とフィタン酸の増加が確認された (図 2 参照)。

(4) 一方で弱変異型個体は正常に発生が進行し、成魚にまで成長する。数ヶ月間は全く形態的異常や行動異常は見られなかったが生後 8 - 9 ヶ月あたりで遊泳能力の低下が始まりその後死亡することが判明した。一部の個体では遊泳能力の低下に伴う衰弱がみられた (図 1 参照)。生後 1 ヶ月程度の弱変異型個体において代謝産物を測定した場合には明らかな異常は検出されなかったが、遊泳能力が低下した個体の代謝産物の測定では極長鎖脂肪酸、フィタン酸の顕著な増加が検出された。疾患モデルフィッシュで明らかになった表現型はヒトのペルオキシソーム形成異常症患者で見られる症状と同等であり、さらに強変異型、弱変異型の表現型の違いは重

症型、軽症型患者の症状の違いに相当すると考えられた。

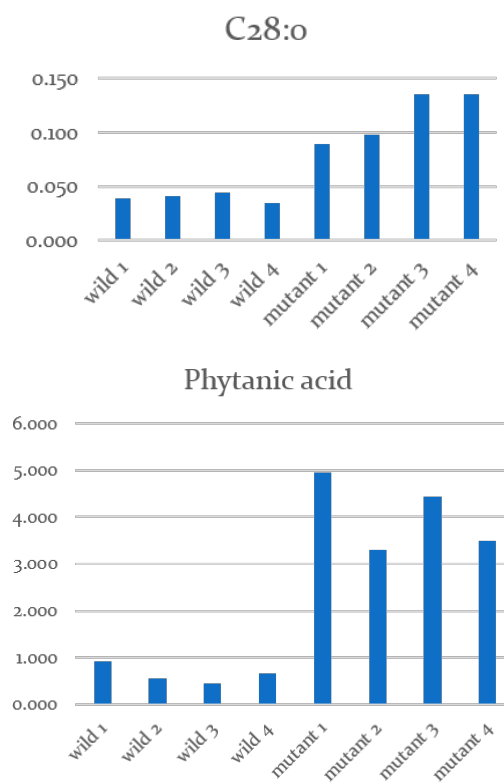


図 2. 強変異個体 (mutant 1~4) と野生型個体 (wild 1~4) における極長鎖脂肪酸 (C28:0) とフィタン酸 (Phytanic acid) 量の比較。

(5) 上記の実験と平行して、ペルオキシソーム形成異常症患者で異常が見られる代謝産物の測定方法を確立し、疾患モデルフィッシュにおける代謝産物の測定を行った。本研究では LC-MS を使用した。従来脂肪酸はガスクロマトグラフィー-質量分析計 (GC-MS) を用いた測定法が主流であったが、本疾患患者で蓄積が見られる極長鎖脂肪酸は GC-MS での検出感度があまり良くないという問題点があった。LC-MS を使用した脂肪酸の測定方法の検討では当初 GC-MS 測定時のように脂肪酸をメチルエステル化していたが、これを行わず脂質から分離した脂肪酸をそのまま測定することで感度の改善が得られた。さらに代謝産物の抽出方法等の検討を行い、感度良くゼブラフィッシュの組織から極長鎖脂肪酸、フィタン酸等の代謝産物を測定する方法を確立することができた。次にその方法を用いて強変異型、弱変異型両方の疾患モデルフィッシュの代謝産物測定を行った。その結果上述のようにいずれの代謝産物も疾患モデルフィッシュにおいて顕著な蓄積がみられた (図 2 参照)。

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 4 件)

ペルオキシソーム形成異常症モデルゼブラフィッシュの表現型解析. 高島茂雄、豊吉佳代子、本田綾子、大場亜希子、下澤伸行. 第 57 回日本先天代謝異常学会総会・第 13 回アジア先天代謝異常症シンポジウム. 2015 年 11 月 12 日~14 日. 大阪国際会議場(大阪)

LC/MS を用いたペルオキシソーム病関連因子の解析. 高島茂雄、伊藤貴洋、吉田敏、下澤伸行. 第 57 回日本先天代謝異常学会総会・第 13 回アジア先天代謝異常症シンポジウム. 2015 年 11 月 12 日~14 日. 大阪国際会議場(大阪)

Analysis of pathology of peroxisomal biogenesis disorder. 高島茂雄、豊吉佳代子、伊藤貴洋、梶原尚美、大場亜希子、本田綾子、吉田敏、下澤伸行. 第 56 回日本先天代謝異常学会・The 12th Annual Symposium of the Asian Society for Inherited Metabolic Diseases. 2014 年 11 月 13 日~15 日. 江陽グランドホテル(仙台)

Zebrafish as a model system to understand the pathology of peroxisomal diseases. 高島茂雄、豊吉佳代子、下澤伸行. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD)/The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). 2013 年 11 月 27 日~29 日. 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(千葉)

〔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

<http://stakashimaj.blogspot.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高島 茂雄 (TAKASHIMA, Shigeo)
岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教

研究者番号：50537610