

実験動物の進歩 3

乳児型神経軸索ジストロフィーモデルマウス

A new mouse model for infantile neuroaxonal dystrophy

まつ しま よし ぶみ
松 島 芳 文
Yoshibumi MATSUSHIMA

はじめに

自然発症疾患モデルは、マウスを用いた実験をしていて、しばしば偶然と幸運によって見つかる。ヒトでは生活習慣病といわれる、癌、高血圧症、高脂血症や糖尿病など患者数の多い疾患のモデルがよく見つかるかという、その頻度は決して高くない。これらの疾患には、ほとんどの場合、複数の遺伝子とさらに種々の環境因子が複雑に関与しているからである。すなわち、動物実験には通常、遺伝的に均一になっている近交系マウスがよく使用され、温湿度、飼料および微生物環境なども良好な状態に保たれているので、新規の生活習慣病モデルが見つかる可能性は少ない。

一方、極めて稀な遺伝疾患のモデルがひょんな事から見つかることがある。この場合は単一遺伝子の突然変異が原因で、優性遺伝病であれば直ちにその個体に発現し、劣性遺伝病であっても、兄妹交配あるいは戻し交配実験は日常よく行われるので、その子孫はホモ個体になる確立が高くなり、突然変異が疾患として発見される。

例えば前回、本シリーズ¹⁾で紹介したワールデンブルグ症候群4型という稀な疾患のモデルとなったWS4マウス²⁾は、日本産野生由来マウスMSMに自然発症したヒト円錐角膜様疾患³⁾の原因遺伝子の染色体マッピングのために、BALB/cマウスと交配実験をしていて、コートカラーの変異個体に気付いたことにより発見された。

今回は、さらに稀な疾患である乳児型神経軸索ジストロフィーのモデルマウス⁴⁾が発見されたので、発見の経緯と原因遺伝子の探索について紹介する。

I. 乳児型神経軸索ジストロフィー

乳児型神経軸索ジストロフィー (infantile neuroaxonal dystrophy: INAD) は1952年にSeitelbergerが、Hallervorden-Spat病と類似しているが異なる新しい疾患、として報告した常染色体性劣性遺伝形式を示す神経変性疾患であり、Seitelberger病ともいわれる⁵⁾。生後1～3歳までに発症し、これまでにヨーロッパ諸国、イスラエル、アメリカおよび日本から合わせて100例以上の報告がある。この数値は、専門医であっても生涯のうちに1例を経験するか否か、といった極めて稀な疾患であることを表している。

臨床像は歩行困難、精神運動発達遅延、痴呆などであり、神経学的には筋緊張低下、自律神経失調、錐体路症状の出現、痙攣性四肢麻痺、変性性脳症などが認められ、病理学的には類球体 (spheroid body) の出現を特徴とする軸索ジストロフィーの病態を示す^{6～9)}。

治療は対症的に行うが、発症から5～10年ぐらいで死亡する。したがって両親、ことに母親の心理的ケアが必要である。症例数が少なく、今日まで生化学的、分子遺伝学的にも不明な点が多い。したがって原因遺伝子も不明である。また、モデル動物の報告も皆無であった。

II. コンジェニックマウス

日本産野生由来マウスの中に、自然発症の高脂血症マウスSHLを発見し¹⁰⁾、高脂血症の原因がアポリポrotein E (アポE) の欠損であることを明らか

にしたことは、本シリーズでも紹介した¹¹⁾。その際、既存の高脂血症マウスとして、LDL受容体ノックアウト (KO) マウスとアポE ノックアウト (KO) マウスが報告されていたが、アポE KO マウスとの交配実験が大きな決め手となった。つまり、高脂血症の原因がわからなかった SHL マウスとアポE KO マウスとの相補性テストで得られた F1 マウスのすべての個体が高脂血症を呈したので、双方のアポE の変異遺伝子が F1 でホモ接合体になった結果であると推定できた。

アポE KO マウスは、1992 年に 2 つのグループから同時に報告され、そのうちの Pirrahita ら¹²⁾ の作出したアポE KO マウスが、米国のジャクソン研究所に導入されていて入手可能であった。ジャクソンのカタログには C57BL/6-*Apoe*^{tm1Unc} と記載されていた。これは、C57BL/6 マウスのアポE 遺伝子がノースカロライナ大学において、ターゲティングにより作成されたミュータントの 1 番という意味である。しかし、驚いたことに到着したマウスを見るとコートカラーは C57BL/6 の黒色ではなく、薄紫色で目はピンクであった。これは、KO マウスの作成に用いた ES 細胞が 129 マウス由来であり、129 マウスの薄紫色のコートカラー (pink-eyed chinchilla) 遺伝子が混在していたためと推定された。

通常、129 マウス由来 ES 細胞を用いた遺伝子ターゲティングによって得られた変異遺伝子は C57BL/6 に導入されることが多い。変異遺伝子の C57BL/6 への導入後は、さらに C57BL/6 への戻し交配を 12 回以上繰り返すことにより、遺伝的背景がほとんど C57BL/6 になったマウスが得られる。これをコンジュニックマウスと呼ぶ。

コンジュニックマウスの完成には少なくとも 12 回の戻し交配が必要であり、大変な労力と年月を必要とする。よく調べたところ、このアポE KO マウスはノースカロライナ大学で 6 回まで戻し交配した時点で、ジャクソン研究所に導入されたことが判った。6 回の戻し交配では 98.4% が C57BL/6 由来の遺伝子に置き換わる計算である。98.4% という数字はほとんど C57BL/6 であると思いがちであるが、129 マウスの遺伝子が 1.6% も混在していることになる。ちなみに、12 回の戻し交配では 99.98% が C57BL/6 由来の遺伝子に置き換わり、これ以降を完全コンジュニックと呼ぶ。目的の遺伝子がノックインあるいは

ノックアウトされていれば、早く実験に使用したいのは分からないでもないが、過去に、129 マウスの残存遺伝子の影響をターゲティングした遺伝子の効果と意思、トップジャーナルに投稿、掲載されたものの、あとで誤りに気づき論文を取り下げた例もある。

筆者は、SHL マウスが日本産野生マウス KOR の中に見つかったことから、*Apoe* 変異遺伝子を遺伝的背景の異なる 4 系統のラブラトリーマウス、C57BL/6、BALB/c、C3H/He および DBA/2 に導入したコンジュニックマウス¹³⁾の作出を開始していた。

将来、自然発症による *Apoe* 変異遺伝子を導入した C57BL/6 コンジュニックマウスが完成した時に、遺伝子工学によって作出された C57BL/6 アポE KO マウスと血清脂質、動脈硬化の進展度など、表現型を比較検討するためにも、この「未完成」アポE KO マウスを完全コンジュニック化しておくことが重要であると考え、C57BL/6 への戻し交配を開始した。

Ⅲ. 歩行異常マウスの発見と疾患モデルの樹立

歩行異常マウスは、このアポE KO マウスの完全コンジュニック化の過程で、偶然に発見された。生後 3 週齢ころの 5 匹のマウスのなかに、後躯の著しい削瘦と歩行異常を示す個体の存在に気付いた (写真 1)。これは、アポE 欠損による高脂血症とは関係のない、何か他の遺伝性の疾患ではないだろうかと思った。

家系図に示すように、変異マウスの同腹に外見上正常な雌雄が 2 匹ずついたので、2 つの兄妹ペアを作り、子供ができるのを待った (図 1)。この変異個体は、4 週齢前後で死亡したが、幸い、一方のペアから得られた仔に同様な変異個体が認められたので、本変異の遺伝性を確信し、新しい疾患モデルの樹立と原因遺伝子の解明を目標にして研究を開始した。

変異個体は常染色体性劣性に遺伝することがわかったので、モデル系の維持は、図 1 のように変異個体の同腹兄妹で雌雄のペアをつくり、変異個体の出現を待った。初産で変異個体の認められなかったペアは、雄を交換して次産に期待した。このような危うい方法でも、変異個体の同腹正常個体は、理論的にその 2/3 がヘテロ個体なので、変異マウスの維持はさほど困難ではなかった。

変異個体の判定は、尾部を持って吊り下げるこ

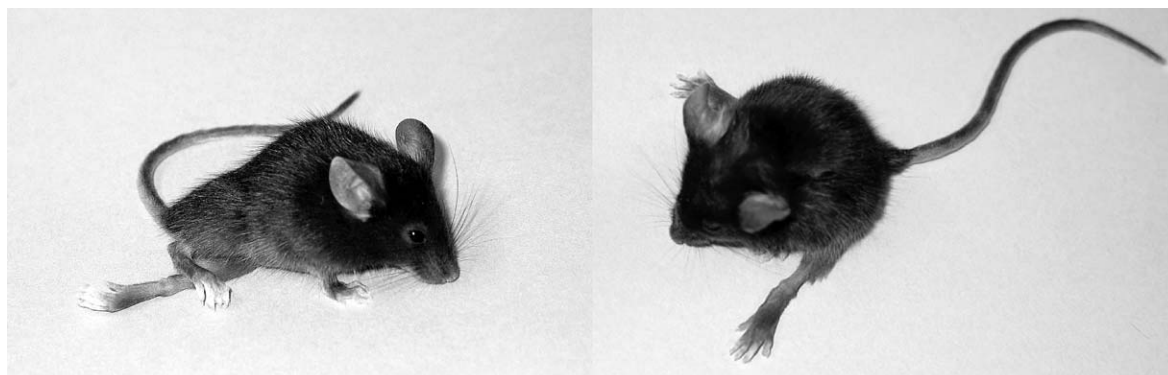


写真1 C57BL/6 アポE ノックアウトマウスの完全コンジェニック化の途上で発見された変異マウス（4週齢）

（左）後躯の著しい削瘦により、後肢を引きずる。（右）後肢を上げた特異な姿勢をする。

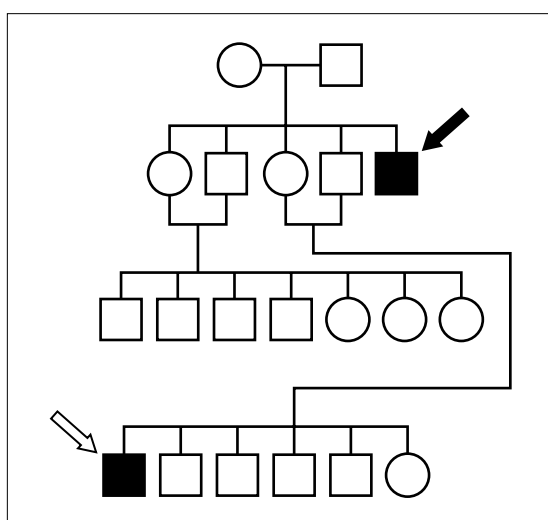


図1 変異マウス発見の家系図

1999年5月15日に変異マウスを発見（黒矢印）。
同年7月18日に同様の変異マウス発見（白矢印）。



写真2 変異マウスの診断は、尾を持って吊り下げることも可能である

変異マウス（左）は後肢の開脚角度が小さいのに対して、同腹正常マウス（右）は力強く上げてあばれる。

により、容易に診断された（写真2）。また、削瘦の始まる前の2週齢時でも、尾部をピンセットでつまむことにより、正常マウスは痛みを感じて鳴くものに対して、変異マウスは無痛覚らしく、鳴かないことでも早期に判定可能であった。

なお、高脂血症の原因であるアポE変異遺伝子は、結果的に、変異マウスの原因遺伝子と連鎖していなかったため、変異マウスを維持する交配の過程でアポE変異遺伝子は失われ、高脂血症は認められなくなった。

Ⅳ. 病理学的検索と診断

病理解析は、生後6～7週齢変異マウスと同腹正

常マウスを用いた。左心室よりZanboni固定液で還流固定し、脳、脊髄および筋を採取して、常法通りパラフィン包埋した。5～6ミクロンの切片を作製し、H-E、K-B、BodianおよびPAS染色を施し、光学顕微鏡標本とした。

当初、歩行異常の様子から筋ジストロフィーを疑ったが、筋ジストロフィーマウスの特徴である筋組織の壊死、再生反応は認められず、以下に示すように、本変異マウスの主病変は軸索のジストロフィーであることが分かった。

肉眼的には側脳室や第三脳室の拡大が認められ、大脳皮質の菲薄化が見られた⁴⁾（写真3）。顕微鏡所見では中枢神経系の大脳から脊髄まで広範囲に変性軸索が認められた。変性軸索は、大脳の脳梁と皮質に

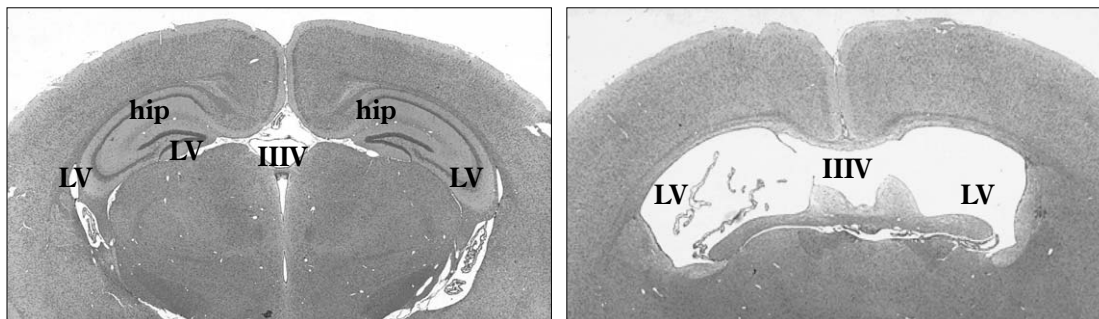


写真3 変異マウス（右）では側脳室や第三脳室の拡大が認められ、
大脳皮質の菲薄化がみられた。同腹正常マウス（左）

IIIIV：第三脳室、LV：側脳室、hip：海馬

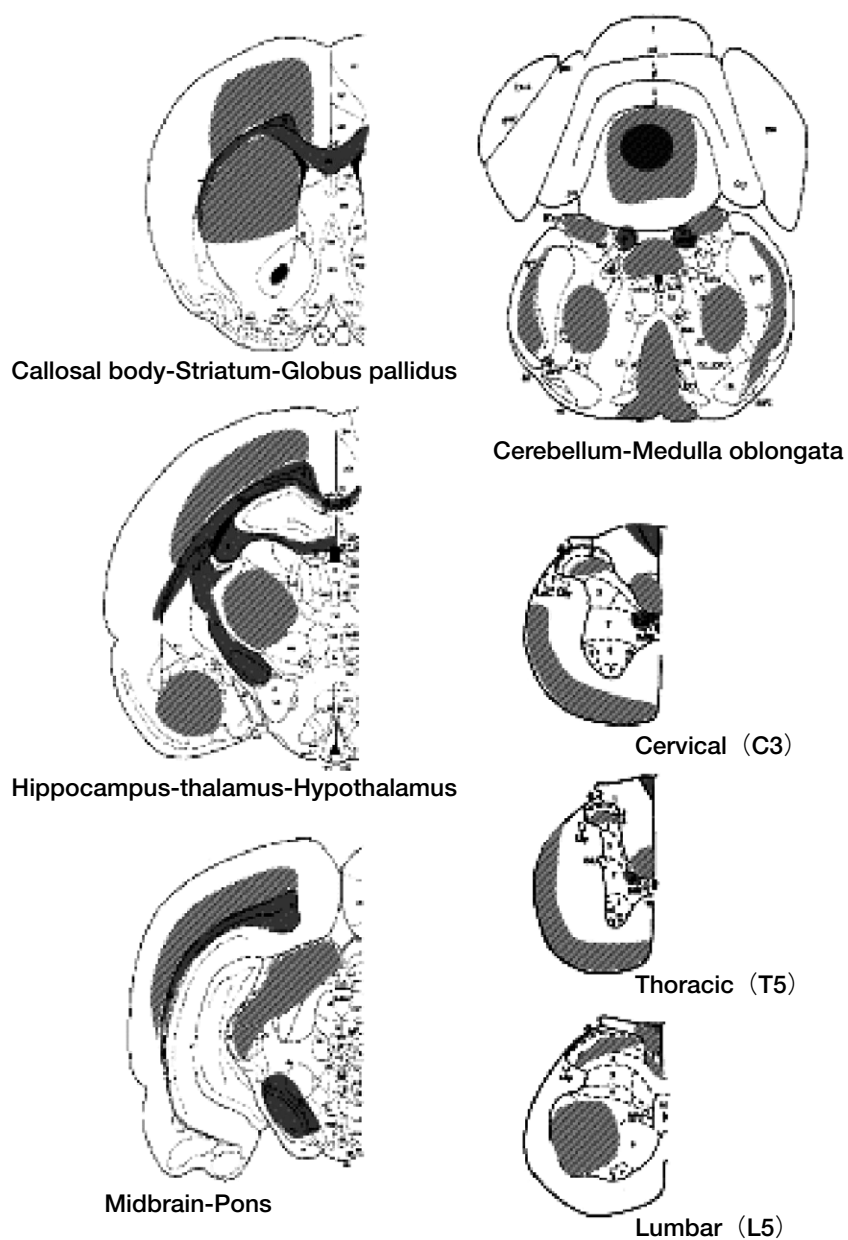


図2 中枢神経系における変性軸索の分布

変性軸索は中枢神経系の大脳から脊髄まで広範囲に認められ、
エオジン強陽性であり、しばしば大型の類球体（spheroid body）を形成した。

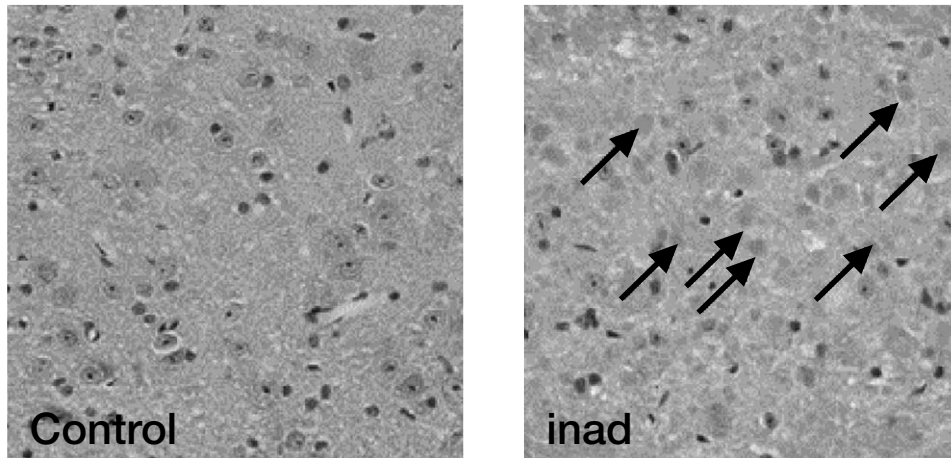


写真4 変異マウス(右)の脊髄薄束核に多数の類球体が認められる(一部を矢印で示した)。(左)同腹正常マウスの薄束核。

および、その他視床、海馬回、線条体にも認められた。また、中脳蓋や黒質の神経細胞周辺には小型の類球体が密に集まり、小脳では小脳核細胞周辺にも多数の類球体を認めた⁴⁾(図2)。変性軸索の終末は、しばしばエオジン強陽性で大型の類球体を持ち、延髄の後索(薄束核、楔状束核)で顕著であったが、脊髄の薄束にも認められた⁴⁾(写真4)。

変性所見は脳の脳梁と皮質、視床、海馬回、線条体にも広がっており、これらの病理所見と、前述の発症時期および臨床像から、本変異マウスは神経変性疾患である乳児型神経軸索ジストロフィー(INAD)の新規疾患モデルマウスであることが強く示唆され、infantile neuroaxonal dystrophy (*inad*) マウスと命名した⁴⁾。

V. 原因遺伝子 *inad* の染色体マッピング

原因遺伝子の染色体マッピングは、*inad* マウスの遺伝背景である C57BL/6 と遺伝的距離が大きい日本産野生由来マウス KOR をカウンターパートとして交配した。カウンターパートに KOR を用いることによって、BALB/c、C3H/He などのいわゆるラボラトリーマウスを用いるより、目印となる DNA のマイクロサテライトマーカーの数が格段に多くなり、マッピングが有利になる。

しかし、交配実験は、変異個体が雌雄ともに繁殖週齢前に死亡するので使用できない。そこで、変異個体を産んだ母マウスはヘテロ個体であるから、その雌と KOR 雄とを交配して多数の F1 を得た。したがっ

て、得られた F1 の 1/2 はヘテロ個体であるから、次に F1 の雌雄ペアをたくさん作り、初産仔にホモ個体の得られたペアのみを残し、連続して 4~5 産させて得られた F2 のホモ個体、計 107 匹とその同腹正常個体 259 匹、合計 366 匹について、腎臓から DNA を調整し、マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析により原因遺伝子の染色体マッピングを行った。

F2 個体とマイクロサテライトマーカーの連鎖解析により得られた地図から、原因遺伝子 *inad* はマウス第 1 染色体の *D1Mit84* から *D1Mit25* の間に存在することがわかった⁴⁾(図3)。また、原因遺伝子

	A	B	C	D	E	F
<i>D1Mit8</i>	■	■	■	■	■	■
<i>D1Mit9</i>	■	■	■	■	■	■
<i>D1Mit10</i>	■	■	■	■	■	■
<i>D1Mit84</i>	■	■	□	■	■	■
<i>D1Mit45</i>	■	■	■	■	■	■
<i>D1Mit25</i>	■	■	■	□	■	■
<i>D1Mit85</i>	■	■	■	□	■	■
<i>D1Mit12</i>	■	■	■	□	□	■
<i>D1Mit217</i>	■	■	■	□	□	■
number of F ₂	4	3	1	1	3	95

図3 マイクロサテライトマーカーによる連鎖地図

連鎖解析の結果から責任遺伝子はマウス第 1 染色体の *D1Mit84* から *D1Mit25* の間に存在することがわかった。■は C57BL/6 由来遺伝子型、□は KOR 由来遺伝子型およびヘテロ遺伝子型を示す。

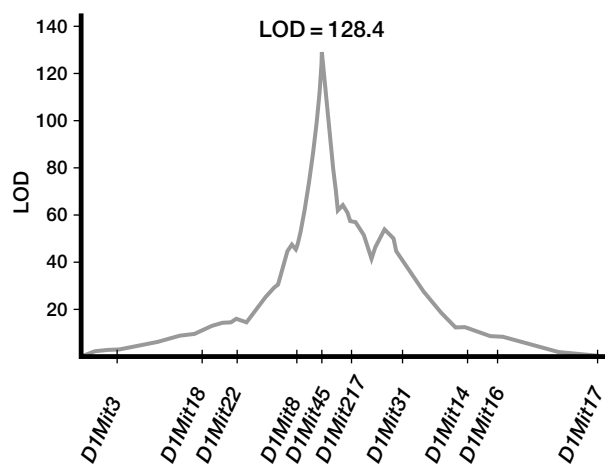


図4 多因子連鎖解析

原因遺伝子の染色体上の位置を推定する LOD スコアは 128.4 と極めて高値であり、原因遺伝子がマウス第 1 染色体の *D1Mit45* の近傍に存在する単一遺伝子であることを示唆している。

の染色体上の位置を推定する LOD スコアは 128.4 と極めて高値であり、原因遺伝子 *inad* がマウス第 1 染色体の *D1Mit45* の近傍に存在する単一遺伝子であることが強く示唆された⁴⁾(図 4)。

なお、この部位はヒトとマウスとのシンテニーから、ヒト第 2 染色体の 2q36-q37 に相当することが判った。しかし、現在までにこの領域に既知の神経疾患関連の原因遺伝子は見あたらず、*inad* が新規遺伝子である可能性が高いことが示唆された。

おわりに

アポ E KO マウスを完全コンジェニックにすることを目的に、戻し交配実験を開始し、その過程において歩行異常マウスを見つけた。この変異マウスは、病理学的、遺伝学的検索の結果、大変稀な疾患である乳児型神経軸索ジストロフィーの新しい疾患モデルとなることを明らかにし、同時に原因遺伝子 *inad* をマウス第 1 染色体上にマッピングしたので、その成績を *Mammalian Genome* 誌に報告した⁴⁾。

よく突然変異モデルは、自然からの贈り物と云われるが、その *inad* マウスの写真が *Mammalian Genome* 誌の表紙に採用され(写真 5)⁴⁾、これは *inad* マウスからの贈り物であろうと素直に喜んだ。

その後、著者らは染色体マッピングの精度を上げ、ついにポジショナルクローニングに成功した。現在、兄弟例で発症した 2 例の DNA サンプルを分与して

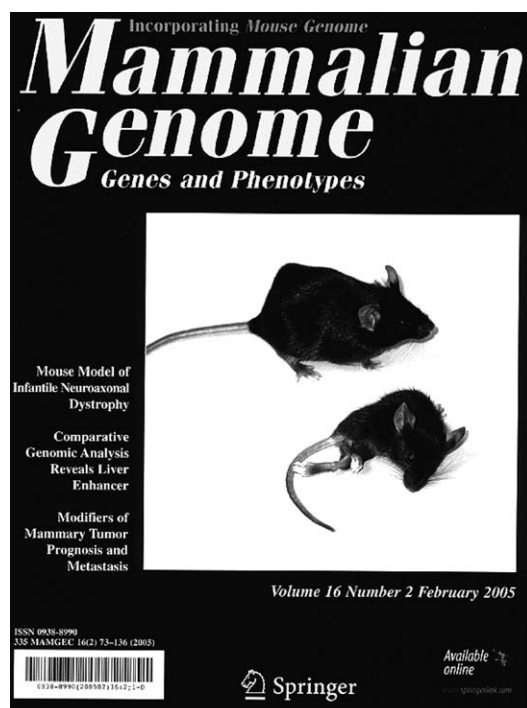


写真 5 *Mammalian Genome* の表紙に採用された *inad* マウス

(下) 8 週齢 *inad* マウス、(上) 同腹正常マウス。

頂き、ヒトにおいても当該遺伝子に変異が認められるか否かを確認中である。稀な疾患だけに、DNA サンプルの入手は極めて困難であるが、多方面に問い合わせている。

INAD は、本人はもとより家族にとっても、悲嘆な疾患である。そんな中、つい先日サンプル分与の連絡があったケースも兄弟例である。今後、ヒトのサンプルでの解析が進み、近い将来に INAD の原因遺伝子が明らかになれば、本疾患の病態解明と遺伝子診断、遺伝子治療等への道が大きく拓かれる。少なくとも出生前診断によって兄弟例は防げるのではないだろうか。

乳児型神経軸索ジストロフィーはマウスにおいてさえ悲惨である。離乳時に後躯から急激な痩せが始まり、下半身を引きずりながらケージ内を移動する様子は大変痛ましい。少しでも長生きできるように、固形飼料のペレットを細かく砕いて直接床に置き、給水瓶も飲みやすいように低い位置にしてやる。それでも日に日に痩せ衰え、最長でも 9 週齢で死に至る。当初は表紙への採用を喜んで額に飾った *inad* マウスの姿が、研究の進展を見守ってくれる遺影のように見えてきた(写真 5)。

inad マウスは、世界で唯一の INAD のモデルであ

る。埼玉がんセンターからの分与も可能であるが、国内はもとより国外への分与を容易にするため、理化学研究所つくば理研バイオリソースセンター¹⁴⁾にマウスを寄託した。リソースセンターでは、生体でマウスを維持、分与するとともに、貴重なモデル系統を絶やさないために凍結受精卵でも保存されていて安心である。

inad マウスを用いた研究成果が、INAD の患者さんとその家族への最高の贈り物となることを切に願うものである。

追記：最近、Morgan ら¹⁵⁾ は、パキスタン、ペドウィン族の INAD を高頻度に発症する大家系の調査から、鉄沈着を伴う神経変性疾患である INAD に関連する遺伝子座を第 22 染色体の 22q12-q13 にマッピングし、*PLA2G6* (calcium-independent group VI phospholipase A2) が、INAD の原因遺伝子であると報告した。著者らが *inad* マウスで特定した原因遺伝子の変異が、INAD と診断された患者で確認できれば、*PLA2G6* とは異なる 2 つ目の原因遺伝子の発見となり、遺伝子診断の精度向上および治療方法開発に有用な情報を提供できる。

文 献

- 1) Matsushima Y, Shinkai Y, Kobayashi Y, Sakamoto M, Kunieda T, Tachibana M.: A mouse model of Waardenburg syndrome type 4 with a new spontaneous mutation of the endothelin-B receptor gene. *Mamm Genome* **13** : 30-35, 2002.
- 2) 松島芳文：実験動物の進歩 2 日本産野生由来マウスに発見した新しい疾患モデル動物モダンメディア **52** : 177-184, 2006.
- 3) Tachibana M, Okamoto M, Sakamoto M, Matsushima Y.: Hereditary keratoconus-like keratopathy in Japanese wild mice mapped to mouse Chromosome 13. *Mamm Genome* **13** : 692-695, 2002.
- 4) Matsushima Y, Kikuchi T, Kikuchi S, Ichihara N, Ishikawa A, Ishijima Y, Tachibana M.: A new mouse model for infantile neuroaxonal dystrophy, *inad* mouse, maps to mouse chromosome 1. *Mamm Genome* **16** : 73-78, 2005.
- 5) Seitelberger F.: Eine unbekannte Form von infantiler lipodispeicherspeicher Krankheit des Gehirns. In *Proceedings of First International Neurological Congress of Neuropathology* (Rome, 1952) Vol. 3. *Turin Rosenberg and Sellier*. pp323-333, 1952.
- 6) 伊藤正利：目で見える遺伝病 Infantile neuroaxonal dystrophy. 薬の知識 **41** No.4 : 18-19, 1990.
- 7) Gordon N.: Infantile neuroaxonal dystrophy (Seitelberger's disease). *Developmental Med Child Neurol.* **44** : 849-851, 2002.
- 8) Aicardi J, Castelein P.: Infantile neuroaxonal dystrophy. *Brain* **102** : 727-748, 1979.
- 9) Cowen D, Olmstead E V.: Infantile neuroaxonal dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol.* **22** : 175-236, 1963.
- 10) Matsushima Y, Hayashi S, Tachibana M.: Spontaneously hyperlipidemic (SHL) mice : Japanese wild mice with apolipoprotein E deficiency. *Mamm Genome* **10** : 352-357, 1999.
- 11) 松島芳文：実験動物の進歩 1 日本産野生由来マウスに発見した新しい疾患モデル動物. モダンメディア **52** : 43-49, 2006.
- 12) Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N.: Related Articles, Links Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89** : 4471-4475, 1992.
- 13) Matsushima Y, Sakurai T, Ohoka A, Ohnuki T, Tada N, Asoh Y, Tachibana M.: Four strains of spontaneously hyperlipidemic (SHL) mice : phenotypic distinctions determined by genetic backgrounds. *J Atheroscler Thromb.* **8** : 71-79, 2001.
- 14) <http://www.brc.riken.jp/>
- 15) Morgan NV, Westaway SK, Morton JE, Gregory A, Gissen P, Sonek S, Cangul H, Coryell J, Canham N, Nardocci N, Zorzi G, Pasha S, Rodriguez D, Desguerre I, Mubaidin A, Bertini E, Trembath RC, Simonati A, Schanen C, Johnson CA, Levinson B, Woods CG, Wilmot B, Kramer P, Gitschier J, Maher ER, Hayflick SJ.: *PLA2G6*, encoding a phospholipase A2, is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron. *Nat Genet.* **38** : 752-754, 2006.