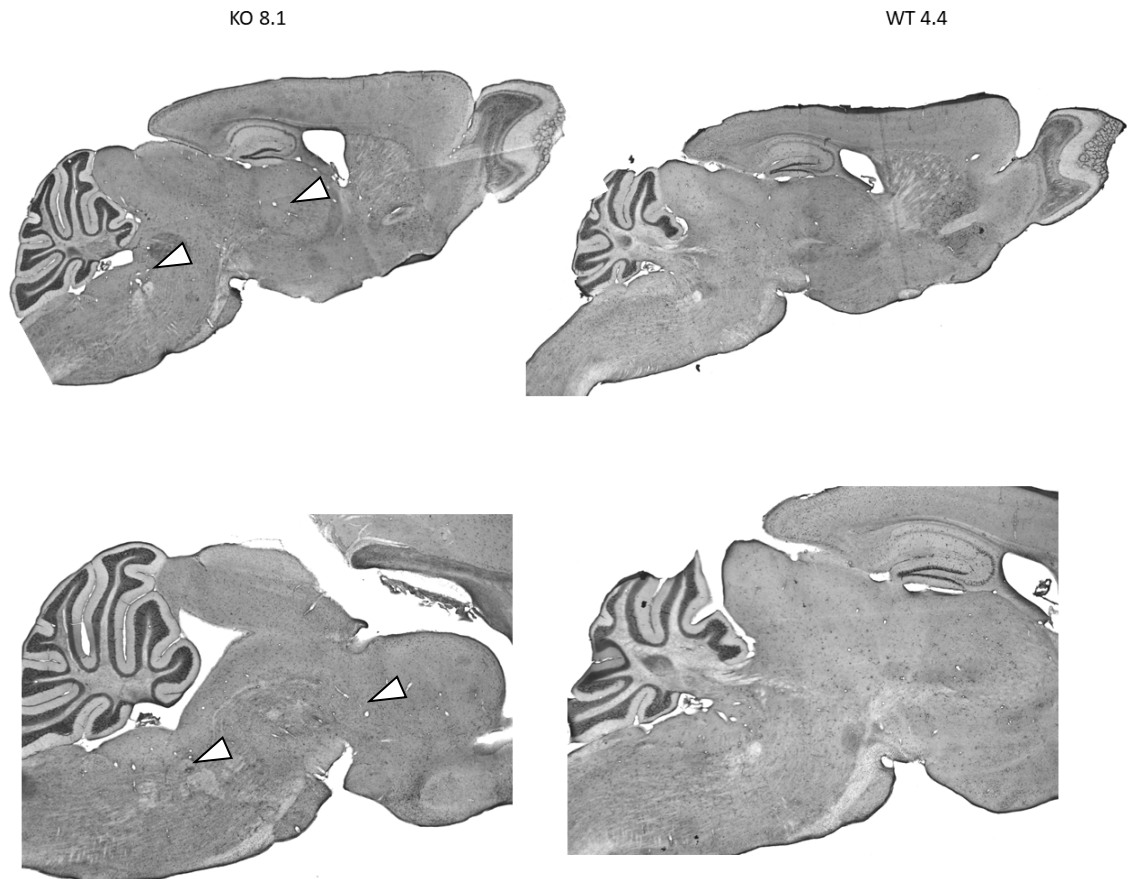


平成30年度 ほくぎん若手研究者助成金 研究実績報告書

氏名	所属・職名	助成金額
西園 啓文	研究推進機構研究推進総合支援センター・助教	900,000 円
研究課題名	ヒト先天性大脳白質形成不全症に關与する Glra4 遺伝子のノックアウトマウスを用いた病態発生機序研究	
研究の概要	<p>先天性大脳白質形成不全症(指定難病 139)の一つである Pelizaeus-Merzbacher 病(PMD)は、中枢神経系におけるミエリン形成の異常により発症する遺伝性疾患で、眼振と頭部の振戦、けいれんや麻痺などの神経症状を特徴とし、多くの場合、乳児期あるいは幼児期に死亡する。現在までのところ根治治療法がなく難治性疾患に指定されており、日本での患者数は 100 人から 200 人程度と推定されている。原因としては、大部分の患者においてミエリン形成に關与するプロテオリピドプロテイン 1(PLP1)遺伝子の異常が報告されているが、PLP1 遺伝子の異常が見つからない患者(non PLP1-related PMD)も存在し、PLP1 遺伝子以外の原因遺伝子の存在が示唆されている。</p> <p>最近になって、ヒトでは偽遺伝子と考えられていたグリシンレセプター <math>\alpha</math> サブユニット(Glra4)遺伝子が、PMD 病に關与されていることが示唆され(Muncke N et al, J Med Genet 2004)、2016 年には実際に Glra4 遺伝子が原因となっているヒトの臨床例も報告された(Labonne JD et al, BMC Neurol 2016)。マウスにおいても、Glra4 が大脳白質や菱脳で発現することがすでにわかっているが(Lein ES et al, Nature 2007)、その解析や遺伝子改変マウスの報告はこれまでのところない。そこで本研究では、グリシンレセプター <math>\alpha</math> (Glra4) 遺伝子を欠損したノックアウトマウスを使い、発生期・発達期における大脳白質の解剖学的変化の解析、振戦やけいれんなどの行動実験を行うことで、病態の発生期機序を解明することを目的として、研究を行った。</p>	
研究の成果	<p>本研究ではコンディショナルノックアウトマウスを含めた様々なタイプの Glra4 遺伝子改変マウスを作製するために、ゲノム編集技術の効率化の検討から実施した。具体的には、体外受精などにより大量に調整した凍結受精卵を用い、ゲノム編集を行うことで目的とする遺伝子改変マウスを大量に作製することができないかと考えて検討を行った。しかし、単純に凍結受精卵を使ってゲノム編集を実施すると、受精卵が死滅することがわかった。この対策として、ウシ胎児血清(FBS)を凍結保存前に受精卵に曝露することで、細胞膜を一時的に固くし、その後に凍結保存することで、ゲノム編集後の受精卵生存率が格段に向上することを見出した。この方法を使い、単純ノックアウトマウス、コンディショナルノックアウトマウス、外来遺伝子を導入したトランスジェニックマウス、蛍光タンパク質(EGFP)をレポーター遺伝子として使用したレポータートランスジェニックマウス、遺伝子の点変異を導入したノックインマウスの作製を試み、レポータートランスジェニックマウスを除くタイプの遺伝子改変マウスを作製することに成功し、これを Journal of Neuroscience Method 誌に発表した(Mohamed D et al, 2019)。なお、この発表については”This work was supported by Hokugin Research Grant (Japan).”としてほくぎん若手研究助成の名前を謝辞に記載している。</p> <p>次に、作製した Glra4 遺伝子改変マウスの脳について、PMD 病と同じ症状が出ているのかを検討するために HE 染色にてノックアウトマウスと野生型マウスの比較を行った。</p>	

下図は Glra4 ノックアウトマウス(左)と野生型マウス(右)の脳の HE 染色像である。

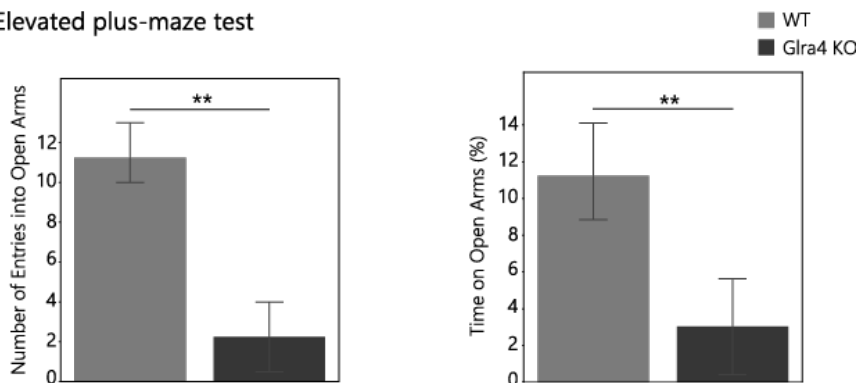


## 研究の成果

このように予想していた脱髄の表現形は見られなかったものの、矢印で示すような細胞の脱落がノックアウトマウスで顕著に増大していることがわかった。しかも、この脱落が見られるのは、Glra4 が発現していると思われる運動三叉神経核および顔面核近傍であることから、ノックアウトマウスで何かしらの異常が起こっていることが推測される。

このことから、ノックアウトマウスと野生型マウスで行動に差異があるのではないかと考え、行動科学実験を実施したところ、下記の図のようにノックアウトマウスでは不安行動が増大していることが分かった。

### 1. Elevated plus-maze test



これらの表現形は、研究概要の欄で述べた Labonne JD らが報告しているヒト臨床例に非常によく類似しており、今回作製した Glra4 ノックアウトマウスが PLP1 非依存的 PMD 様病態モデル動物として利用できることを示している。今後ともこの研究を継続する予定である。

<p>研究成果発表状況</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Darwish M, <u>Nishizono H</u>, Uosaki H, Sawada H, Sadahiro T, Ieda M, Takao K, “Rapid and high-efficient generation of mutant mice using freeze-thawed embryos of the C57BL/6J strain”, <i>J Neurosci Methods</i>. 2019 Apr 1;317:149–156. doi: 10.1016/j.jneumeth.2019.01.010. Epub 2019 Jan 23.</li> <li>2. “CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集による遺伝子改変マウス作製を 効率的かつ簡便に行う方法を開発”, <a href="https://www.u-toyama.ac.jp/outline/publicity/pdf/2018/20190227.pdf">https://www.u-toyama.ac.jp/outline/publicity/pdf/2018/20190227.pdf</a>, 平成 31 年 2 月 27 日 富山大学プレスリリース</li> <li>3. Mohamed Darwish, 宇野恭介, 遠藤高帆, 高雄啓三, <u>西園啓文</u>, “Generation of Glycine Receptor Alpha 4 knockout Mice Using High-efficient Modified CRISPR-Cas9 Protocol”, 平成 28 年度新学術領域研究 学術研究支援基盤形成先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会, 滋賀</li> <li>4. <u>西園啓文</u>, “分子探索支援により明らかになったグリシンレセプター <math>\alpha 4</math> サブユニットの卵子および脳での機能”, 文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成先端モデル動物支援プラットフォーム・若手支援技術講習会, 茅野</li> <li>5. <u>西園啓文</u>, ベストポスター賞, 文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成先端モデル動物支援プラットフォーム・若手支援技術講習会, 茅野</li> <li>6. Darwish M, Uno K, Takao K, <u>Nishizono H</u>, “Generation of glycine receptor alpha 4 knockout mice using high-efficient modified CRISPR-Cas9 protocol”, <i>Neuroscience</i> 2018 , November 3–7, San Diego, CA, USA.</li> <li>7. <u>西園啓文</u>, Mohamed Darwish, 澤田瞳子, 宇野恭介, 遠藤高帆, 新田淳美, 高雄啓三, “Generation and Characterization of Glycine Receptor Alpha 4 Knockout Mice”, 第 41 回日本神経科学大会, 神戸</li> </ol>													
<p>経費の執行状況</p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">区分</th> <th style="text-align: center;">執行額(円)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>消耗品費</td> <td style="text-align: right;">750,374</td> </tr> <tr> <td>外注費</td> <td style="text-align: right;">115,666</td> </tr> <tr> <td>旅費</td> <td style="text-align: right;">33,960</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: right;">計 900,000</td> </tr> </tbody> </table>	区分	執行額(円)	消耗品費	750,374	外注費	115,666	旅費	33,960		計 900,000	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">備考</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>マウス, プラスチック製品, DNA オリゴ DNA シークエンス, 英文校正 日本神経科学大会(神戸市)</td> </tr> </tbody> </table>	備考	マウス, プラスチック製品, DNA オリゴ DNA シークエンス, 英文校正 日本神経科学大会(神戸市)
区分	執行額(円)													
消耗品費	750,374													
外注費	115,666													
旅費	33,960													
	計 900,000													
備考														
マウス, プラスチック製品, DNA オリゴ DNA シークエンス, 英文校正 日本神経科学大会(神戸市)														