

## 研究テーマ

### 造血異常を同時にきたす神経軸索変性症の病態形成機構の理解と治療戦略の構築

#### 1. はじめに

われわれは、ENU点突然変異導入法により樹立されたマウス系統中に、歩行傷害、下肢麻痺をおこし、16週齢前後で死に至るマウスが生まれる系統を発見した。産仔の発病率の解析から、本病態は常染色体劣勢遺伝の形式で遺伝することが明らかになった。連鎖解析およびシーケンス解析により、本病態を示すマウスは*Pla2g6*遺伝子の1117番目のgがaに変わっており、GlyがArgになる変異をホモで有していたことから、原因遺伝子が*Pla2g6*であることを明らかにした。病理学的解析では、延髄薄束核にスフェロイドの形成がみられ、ニューロン死が生じていた。筋生検標本ではGroup atrophyがみられ、神経原筋萎縮が生じていることが示唆された。これらの所見は、ヒト疾患である乳児性神経軸索変性症(Infantile neuro axonal dystrophy; INAD)と酷似していた。それらが明らかとなるのほぼ同時期に、ヒトINADの原因遺伝子が*PLA2G6*の点変異によることがオレゴン大のHeyflicらにより明らかにされた。これらのことから、われわれが樹立したマウス系統はINADモデルマウスとして、その治療戦略を立てる上で非常に有用であると考えられた。

興味深いことに、われわれが樹立したINADモデルマウスは、造血異常も同時に呈していた。具体的には、胸腺皮質の萎縮、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の激減、NKT細胞割合の増加などである。INADマウスの病態形成に、造血系細胞の関与がある可能性を考え研究を行った。

また、*Pla2g6*はホスホリパーゼの一種である*iPLA2β*をコードする遺伝子であるが、この*Pla2g6*ノックアウトマウスは発病まで1年以上を要するという点でこそわれわれの樹立したINADマウスとは異なっているものの、同様の症状を呈することから、INADマウスにおける*iPLA2β*の生理活性の変化が病態形成に寄与している可能性が考えられた。変異型*iPLA2β*の生理活性を明らかにすることは治療戦略を構築する上でも重要な情報となることから、われわれは分子生物学的手法を用いて変異型*iPLA2β*たんぱく質を作製し、その酵素活性についても検討を加えた。

#### 2. 方法

これらの造血異常が、造血細胞自体に由来するのか、環境に由来するのかを明らかにするため、野生型マウスにINADマウス(ホモ変異マウス)の骨髄を移植するという系、およびINADマウスの胎仔胸腺を野生型マウスの腎被膜下に移植するという系で造血細胞および関連組織の解析を行った。

また、*Pla2g6*はホスホリパーゼの一種である*iPLA2β*をコードする遺伝子であるが、野生型、変異型、酵素活性ドメインを欠損する*iPLA2β*の各たんぱく質を作製し、変異*Pla2g6*から作られる*iPLA2β*のリパーゼ活性について検討した。

### (1) 骨髄移植

*Pla2g6*ホモ変異マウスの骨髄細胞を致死量放射線照射し骨髄破壊を行った同系の野生型マウスに移植し、2ヶ月以上経過し、造血が定常状態となったのちに胸腺、脾臓における造血の状態をフローサイトメトリーで解析した。

### (2) 胎仔胸腺組織培養および腎被膜下移植による生体内

ヘテロマウス同士の交配により14日齢の胎仔を取得し、ジェノタイプリングにより*Pla2g6*ホモ変異マウス胎仔を確定した。*Pla2g6*ホモ変異マウス胎仔胸腺を摘出し、同系野生型マウスの腎被膜下に移植し、胸腺環境の成熟を誘導した。移植後2ヶ月以上の期間をおき、腎被膜下から移植した胸腺を摘出し、移植胸腺内におけるT細胞分化についてフローサイトメトリーで検討した。

### (3) 変異型iPLA2βのリパーゼ活性の検討

分子生物学的手法により、野生型、変異型(G373R)、酵素活性ドメイン欠損型(Δ463-467)の組換えiPLA2βたんぱく質を作製し、リパーゼアッセイによりそれらの酵素活性を測定した。

## 3. 結果

*Pla2g6*ホモ変異マウスでは、胸腺、脾臓においてNKT細胞割合が増加するという表現型、胸腺内CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞が激減するという表現型がみられる。そこで、それらの異常が造血細胞自体の異常によるものかを骨髄移植の系で検討したところ、*Pla2g6*ホモ変異マウスの骨髄を移植した場合と野生型マウス骨髄を移植した場合との比較で大きな違いはみられなかった。この結果から、胸腺、脾臓内のNKT細胞割合の増加および胸腺内CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の激減は、*Pla2g6*に変異をもつ造血細胞自体に起因するものではないことが明らかになった。

NKT細胞の増加、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の激減が胸腺環境の異常に起因する可能性を考え、*Pla2g6*ホモ変異マウス胎仔胸腺を野生型マウスに移植し成長させた後、*Pla2g6*ホモ変異マウス胸腺におけるT細胞分化を検討した。移植後2ヶ月を経過した*Pla2g6*ホモ変異マウス胎仔胸腺の解析では、NKT細胞割合、CD<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞は野生型マウス胎仔胸腺を移植した場合とほぼ同程度であった。よって、*Pla2g6*ホモ変異マウスにおけるNKT細胞の増加、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の激減は*Pla2g6*に変異をもつ胸腺環境に起因するものではないことが明らかになった。

これらの結果から、*Pla2g6*ホモ変異マウスでみられる造血異常は、造血細胞自体および胸腺環境によるものではないことが明らかになった。

野生型、変異型、酵素活性ドメイン欠損型のiPLA2βの組換えたんぱく質を作製し、そのリパーゼ活性について検討したところ、野生型ではリパーゼ活性が検出されたのに対し、変異型では酵素活性ドメイン欠損型と同様にリパーゼ活性が検出されなかった。

この結果から、*Pla2g6*ホモ変異マウスでは、iPLA2βリパーゼ活性が全く発揮されていないことが明らかになった。

#### 4. まとめ

ENU点突然変異導入法により樹立したINADモデルマウスの造血異常について、この異常が造血細胞自体によるものなのか、造血環境によるものなのかを明らかにするために骨髄移植および胎仔胸腺の腎被膜下移植の手法を用いて解析した。どちらの系の解析においても、NKT細胞率の増加、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の激減という表現型はみられなかった。これらの結果から、*Pla2g6*ホモ変異マウスでみられる種々の造血異常は、造血細胞、造血環境のどちらに起因するものでないことが示され、それらの異常はINADマウス病態における二次的要因に起因するものである可能性が示唆された。一方で、INAD病態形成に関与している可能性は否定しきれず、今後とも注意深く解析を続けていく必要がある。

iPLA2βの酵素活性に関する解析では、変異型iPLA2βにはリパーゼ活性がほとんどないことが明らかになった。iPLA2β欠損マウスにおいて、発症時期こそ異なるもののINADモデルマウスと同様の症状がみられることから、INAD病態形成においてリパーゼ活性の欠損が寄与している可能性が考えられた。よって、INADの治療法の一つとして、iPLA2βの酵素補充療法が効果を挙げる可能性が考えられた。

#### 5. 発表論文

**“Establishment of an improved mouse model for infantile neuroaxonal dystrophy that shows early disease onset and bears a point mutation in *Pla2g6*”**

**Wada H**, Yasuda T, Miura I, Watabe K, Sawa C, Kamijuku H, Kojo S, Taniguchi M, Nishino I, Wakana S, Yoshida H, Seino K.

Am J Pathol. 2009 Dec;175(6):2257–63. Epub 2009 Nov 5.