

分子発生的手法による摂食障害マウスの病態解析

京都府立医科大学大学院 神経発生生物学

野村 真

1. はじめに

拒食症及び過食症を含む摂食障害は、極端な食事制限や過度の摂食を繰り返すことにより、生命の危機に至る重篤な精神疾患の一つである。摂食障害は環境と遺伝的背景との複合的要素によって引き起こされると予測されるが、疾患に至る分子機構はほとんど解明されていない。摂食行動は視床下部の摂食中枢によって制御されており、多種類のホルモン分泌が適切な摂食行動に不可欠である。従って、視床下部神経核の発生と機能的成熟機構を明らかにすることは、摂食障害を引き起こす遺伝学的背景と治療法の確立に大きく貢献することが期待される。

著者はこれまでカロリンスカ研究所・分子医学部門の研究グループと共に、摂食障害を示す突然変異マウス *anx* の表現型解析を行ってきた。*anx* ホモ接合マウスは母乳摂取行動を示さないため、著しい体重低下によって生後数週間で死亡する。詳細な形態学的解析から、視床下部の摂食中枢神経核の変性と脱落が認められている。さらに、染色体マッピングの結果から、ミトコンドリア呼吸酵素シャペロンである *Ndufaf1* が原因候補遺伝子として同定された。そこで本研究では、この *anx* マウスを摂食障害病態モデルとして着目し、胎児遺伝子操作技術を用いて *Ndufaf1* の視床下部摂食中枢の発生と機能的成熟に果たす役割を明らかにすることで、摂食障害の分子遺伝学的理解を目指すことを目的とした。

2. 方法

【*Ndufaf1* 強制発現及び機能阻害による視床下部摂食中枢の発生過程の解析】

Ndufaf1 の発現コンストラクションを、胎児期の *anx* マウスの視床下部原基に電気穿孔法で導入する。同時に、*Ndufaf1* 特異的 shRNA コンストラクションを作製し、電気穿孔法によって野生型視床下部原基に導入する。遺伝子導入後、誘導物質 *Cumate* を母親マウスに投与することで、発生および発達期の時期特異的な *Ndufaf1* の過剰発現及び機能阻害が可能となる。さらにこれらの遺伝子導入マウスを出産させ、生後の視床下部摂食中枢の発生と機能的成熟を形態学的に解析する。特に、*anx* マウスにおいて顕著な神経変性が確認されている視床下部弓状核に着目し、摂食行動の制御に不可欠な *NPY/AGRP* 陽性ニューロン、および *POMC/CART* 陽性ニューロンの生存と成熟過程を免疫組織化学的手法によって解析する。さらに、遺伝子導入マウスの摂食行動・体重・生存率の変化をコントロールマウスと比較し、*Ndufaf1* の強制発現によって *anx* マウスの摂食障害が救済されるか、あるいは *Ndufaf1* の機能阻害によって野生型マウスが *anx* マウスと同様の表現型を示すかを検討する。

3. 結果

3-1 子宮内胎児操作による視床下部原基への遺伝子導入の確立

マウス胎児期の視床下部は間脳胞の最も腹側に位置し、かつ脳室空間が非常に狭いために DNA を注入して電気穿孔を行うのが困難である。そこで、視床下部への効率的な遺伝子導入条件を確立するため、胎生 11~14 日までの胎児を対象として、視床下部原基に電気穿孔が可能で、かつ胚操作後最も生存率の高い発生ステージを検討した。その結果、1) 胎生 12 日目の胚の脳室空間が比較的広く DNA 溶液が最も視床下部に注入しやすいこと、2) 間脳から DNA を注入するよりも、終脳半球から DNA を多量に注入し、視床下部に拡散させた方が胚の生存率が高いことを見いだした。また胎生 12 日目は、摂食中枢の 1 つである弓状核の神経細胞が発生するステージ

とも一致している。従って、今後この発生ステージを対象として外来遺伝子をマウスに導入することで、視床下部への効率的な遺伝子導入が可能になると期待される。

3-2 表現型救済用の発現ベクターの構築

当初使用を計画していた *ndufaf1* の発現ベクターのタンパク質発現が確認できなかったため、新たに哺乳類細胞発現ベクターを構築した。*Ndufaf1* タンパク質と *flag* ペプチドあるいは *GFP* を融合させたタンパク質を発現できるベクターを構築した結果、培養細胞およびウェスタンブロットによるタンパク質の発現を確認することができた。

3-3 shRNA を用いた *ndufaf1* の機能阻害実験

ndufaf1 に対する特異的な shRNA による *in vivo* 機能阻害実験を試みた。胎生 12 日目のマウス大脳皮質に対し、4 種類の shRNA コンストラクションと、2 種のコントロールベクター（空ベクターおよびスクランブル shRNA ベクター）を導入し、神経細胞の生存や分化、移動過程を解析した。その結果、2 種の shRNA コンストラクションにおいて、トランスフェクションされた細胞の細胞数の低下、また突起進展の異常が観察された。これらの shRNA ベクターを導入した HEK 細胞を調整し、共同研究先のカロリンスカ研究所に送付したところ、少なくとも 1 つの shRNA ベクターが内在性の *ndufaf1* の発現を低下させることが確認された。今後、このベクターを用いて視床下部原基での *ndufaf1* の機能阻害実験を行い、*anx/anx* マウスと同様な表現型が得られるかを検討する。

4. 考察

摂食行動の異常の中でも体重の増加による肥満 (Obesity) の分子機構は、レプチンなどの内分泌ペプチドホルモンの遺伝子欠損マウスおよびトランスジェニックマウスの解析によって飛躍的に理解が進んでいる。一方、体重減少を引き起こす神経性無食欲症（いわゆる拒食症: Anorexia Nervosa）は、先進国において主要な神経・精神疾患の一つであるにも関わらず、その発症に至る分子メカニズムはほとんど解明されていない。研究の進展が遅れている最大の原因は、疾患のモデル動物がほとんど存在せず、遺伝学的・生化学的な解析を行うことが困難であることが挙げられる。例えば、摂食をコントロールするホルモンである *AGRP* や *NPY* を胎児期から欠損したノックアウトマウスは摂食行動に異常を示さない。この事実は、摂食行動が多種類のホルモンのバランスによって補償されていることを示唆している。従って、摂食行動制御ホルモンの複合的異常による病態モデルマウスの解析が本疾患の分子理解に不可欠である。

Anx/anx ホモ接合マウスは出生直後より摂食量の著しい低下を示し、生後 3 週間前後で死亡する。原因候補遺伝子としてミトコンドリアシャペロンが挙っており、この遺伝子の機能低下が本突然変異マウスの表現型の主たる原因であることを証明するのが本研究の目的である。ヒトにおける摂食障害の病態モデルとしては、*anx/anx* マウスは必ずしもすべての条件に合致しているわけではない。しかしながら、視床下部の機能低下と病態との関係、あるいは摂食障害を引き起こす潜在的な遺伝的背景を理解する上で本マウスは有用な情報を提供すると期待される。

Anx/anx マウスの表現型救済には幾つかのアプローチが考えられる。本研究テーマで取り組んだ電気穿孔法による遺伝子導入は簡便であるが、数の少ないホモ接合変異マウスをターゲットにすることを考えると、必ずしも効率的では無い。そこで、より効率的なアデノウイルスを用いた遺伝子導入、あるいはトランスジェニックマウスによる表現型救済実験が考慮される。前者については既にウイルス実験のための申請準備に取りかかっており、来年度には実験が開始できると期待される。

最後に、大震災直後にスウェーデンより帰国し、一から研究をスタートせざるを得ない状況であった中、本共同研究の継続を後押しして頂いたアステラス病態代謝研究会の助成に心から感謝申し上げたい。