

HtrA1/HtrA3 ダブル KO あるいは HtrA1/Terc ダブル KO は ヒトの CARASIL のモデル動物になりうるか？

[1] 組織

代表者：岡 千緒

(奈良先端科学技術大学院大学)

対応者：福本 学

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：Md Zobaer Hasan

(奈良先端科学技術大学院大学)

研究費：物件費42万3千円，旅費17万7千円

[2] 研究経過

<本研究の目的・概要>

分泌型セリンプロテアーゼをコードする HtrA1 遺伝子の変異によりその機能が低下または消失すると、ヒトの常染色体劣性遺伝性脳動脈症である CARASIL が引き起こされる。CARASIL の主な病態は10代後半から発症する①脳小動脈血管の異常による脳の虚血性変化と白質脳症②脱毛③変形性脊椎症である。しかし、我々が作成した HtrA1 ノックアウト(KO)マウスは、高齢マウスにおいて脊椎の変形性関節炎の症状を示す(図.1) 以外にヒトの CARASIL の症状を示さない。この理由として①HtrA1 以外に2つ存在する他のファミリー遺伝子により機能が相補されている。②マウスはヒトに比べてテロメアが長いこと、加齢に伴う異常が表現形として現れにくい。という2つが考えられる。①について検討するため我々は、HtrA1 と発現パターンが類似している HtrA3 遺伝子の KO マウスを作成した。

本研究においてはまず、(1) HtrA1/HtrA3 ダブルKOマウスがCARASILの症状を示すかどうかを解析する。次に、(2) テロメアの維持に必須なテロメラーゼの構成要素であるtelomerase RNA component (Terc)のKOマウスとの交配によりHtrA1/Terc DKOマウスを作成し同様の解析を行い、これらふたつのダブルノックアウトマウスが、ヒトのCARASILのモデルマウスになりうるかどうかを検討する。これにより、脳梗塞、脱毛、変形脊椎症といった加齢に伴い罹患者の増加する疾患の分子レベルでの病理理解の促進を目的として共同研究を行う。

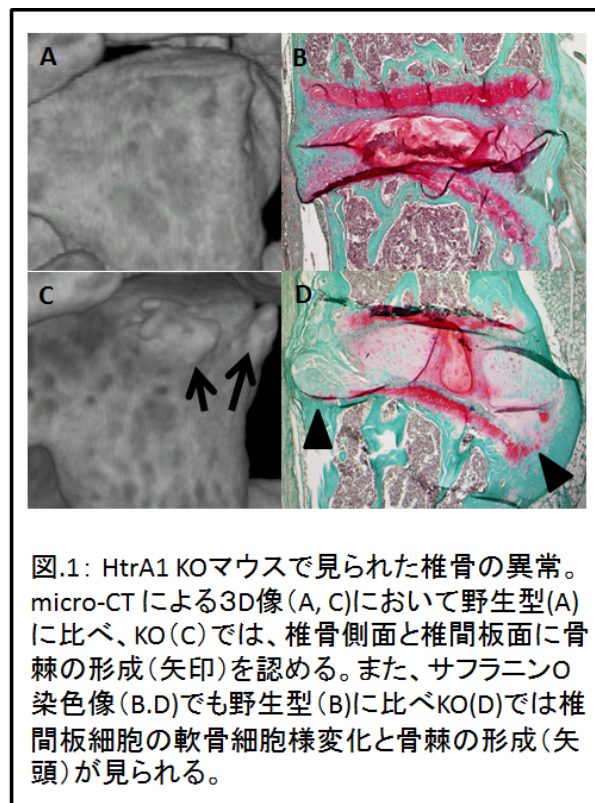


図.1: HtrA1 KOマウスで見られた椎骨の異常。micro-CTによる3D像(A, C)において野生型(A)に比べ、KO(C)では、椎骨側面と椎間板面に骨棘の形成(矢印)を認める。また、サフランO染色像(B, D)でも野生型(B)に比べKO(D)では椎間板細胞の軟骨細胞様変化と骨棘の形成(矢頭)が見られる。

<研究打ち合わせ等の開催状況>

7月15日に加齢研セミナーを行い研究経過の報告を、7月16日には加齢医学研究所対応者である福本学教授とその後の研究の打ち合わせを行った。8月7～10日には研究分担者の Hasan が加齢医学研究所内で実験を行った。11月27日～29日にシンポジウムの参加と合わせて、それまでの研究結果報告と打ち合わせを加齢研にて行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

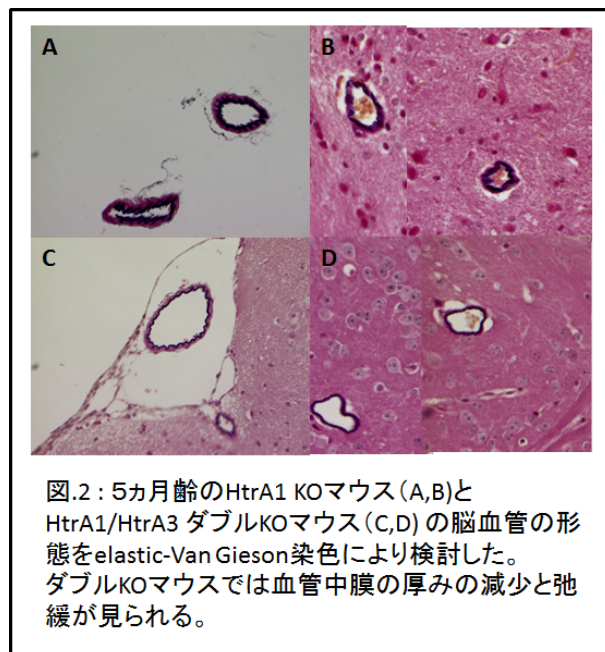
本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、HtrA1/HtrA3 ダブル KO マウスがメンデルの遺伝法則に従って生まれるかどうかを検討した。HtrA1 ヘテロ KO マウスと HtrA3 ヘテロ KO マウス同士の交配によりメンデルの遺伝法則に従った匹数(41 匹中 5 匹)の HtrA1/HtrA3 ダブル KO マウスが得られることが判った。

第2に、HtrA1/HtrA3 ダブル KO マウスが、ヒトのCARASILと同様の表現形を示すかどうかを検討した。HtrA1 KO/ HtrA3 ヘテロ KO マウス同士の交配により同腹の HtrA1 KO/ HtrA3 WT マウスと HtrA1 KO/ HtrA3 KO マウスを得た。これらのマウスの脳組織と脊椎組織からパラフィン切片を作成し、脳組織については、HE 染色、elastic-Van Gieson 染色、ミエリン染色により検討した。また、脊椎組織においては、HE 染色、サフラニンO 染色、トルイジンブルー染色により検討した。

その結果、5か月齢の HtrA1 /HtrA3 ダブル KO マウスは、HtrA1 KO/ HtrA3 WT マウスに比べて脳底部および硬膜下の血管において中膜の厚みの減少と血管の弛緩が見られた。また、脳組織内に見られる微小血管においても中膜の消失と弛緩が見られた(図.2)。脱ミエリンについてはこの週令では有意な差は見られなかった。

脊椎組織においては、65週令の HtrA1 /HtrA3 ダブル KO マウスにおいても HtrA1 KO マウスと同様の椎間板の異常が見られ、椎間板の細胞が軟骨細胞様に変化し骨棘の形成により椎間板ヘルニアの症状を呈していることがわかった (図.1) この、椎間板細胞の軟骨細胞様変化は必ずしも椎間板組織の破壊を伴っていないため、椎間板組織の破壊による二次的な変化ではなく、HtrA 遺伝子の欠損による直接的な影響である可能性が考えられた。脱毛については、これまでの観察では明らかな異常を認めていない。



以上の結果より、HtrA1/HtrA3 ダブル KO マウスはヒトのCARASILの症状のうち脳血管の異常と変形性脊椎症の表現形を再現できる可能性が示唆さ

れた。本年度解析できたマウス数は限られており、今後は、解析個体数を増やすと同時に、定量的な計測や、免疫染色等により本当にCARASILと同様の病態が再現されているかどうかを確認していく必要がある。

(3-2) 波及効果と発展性など

CARASIL 自体は大変まれな疾患であるが、CARASILに見られる脳血管の異常と虚血性変化は非遺伝性の脳血管障害に類似した病理像を示すため、そのモデルマウスが得られることは、脳血管障害の病態を理解するうえで大変意義深く、病態に即した治療薬の開発等大きな波及効果が期待できる。また、マウスの行動解析によりヒトの認知症に類似した症状がみられる可能性も高く、脳血管性認知症のモデルマウスへと発展することも期待できる。

[4] 成果資料

一部の成果については論文投稿準備中である。