

モヤモヤ病主要下流因子 PTTG1 遺伝子破壊マウス作成による モヤモヤ病モデルマウス構築と血管閉塞との関わり合いの解析

土生敏行

武庫川女子大学生活環境学部 食物栄養学科生化学

【研究の背景】

モヤモヤ病は脳内頸動脈での血管閉塞に伴う血管病である。我々の研究グループは家族性モヤモヤ病感受性遺伝子として RNF213 を同定し、その R4810K バリエントがモヤモヤ病の発病と深い関係を持つことを明らかにしてきた。申請者の研究により、その R4810K を持つ、患者由来の iPS 細胞を作成し、発現解析を網羅的に行った結果、多くの細胞分裂期関連因子の発現低下及び上昇が観察された。これと相まって、R4810K バリエントを持つ細胞では、細胞分裂期の異常を観察でき、染色体異常も観察された。これらのことより、RNF213 は細胞分裂時に重要な因子の発現を左右する、シグナル伝達因子であると我々は想定している。また RNF213 欠失マウスでは、モヤモヤ病を含めた脳血管等の血管以上を観察できず、病態解析にはそのモデルマウス作成が重要であると考えられている。

【目 的】

本申請研究では、分子病態解明に向け、家族性モヤモヤ病感受性遺伝子 RNF213 の主要下流因子 PTTG1 遺伝子に注目し、モヤモヤ病個体モデルを構築することを第一の目的とした。このマウスにおいて血管平滑筋細胞と血管内皮細胞の相互作用及びバランスに着目し、PTTG1 遺伝子の血管維持形成における役割を明らかにすることを第二の目標とした。モデルマウスの構築によりモヤモヤ病のシグナル伝達経路解明を目指し、治療へ向けた基礎研究を行っていく。

【方 法】

【PTTG 遺伝子の血管形成及び維持における機能の解析】

PTTG 遺伝子破壊マウスは既に報告が複数のグループによりなされている。これらの解析では、PTTG 遺伝子は生存には必須ではないこと以外においては統一的な見解がなされていない。また他の臓器、組織にくらべ血管内皮細胞での発現が高くなっている。本申請研究では CRISPR 遺伝子改変システムを用いて PTTG 破壊マウスを作成する(9 か月)。ヒトと同様にマウスにおいても PTTG 遺伝子がモヤモヤ病感受性遺伝子 RNF213 の主要下流因子であるかを確認し、PTTG 遺伝子破壊マウスにおける血管閉塞や血管形成及び維持の状態を MRI により調査する。

血管内皮細胞の機能低下と血管平滑筋細胞の異常増殖が血管閉塞において報告されている。つまり両細胞のバランスの維持が血管病抑圧に必要であると考えられる。本申請研究で作成した PTTG1 遺伝子破壊マウスにおいて、これらの細胞のバランス変化に着目し、脳を含む全身で血管切片を経時的に作成し血管閉塞との関連性を明らかにしていく(3 か月)。

【血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の相互作用解析】

血管内皮細胞及び平滑筋細胞を生体維持したままでの観察を導入するため、血管内皮細胞特異的発現 Tie2-GFP (Jackson 研究所) 及び血管平滑筋細胞特異的 SM22a-RFP を発現するトランスジェニックマウスと交配し、細胞の相互作用、閉塞の経時的評価系を構築する予備的な研究を行っていきたい。

【結 果】

[PTTG 遺伝子の血管形成及び維持における機能の解析]

細胞を用いた系で CRISPR/Cas システムに用いる gRNA の標的配列の選別を行い、最も効率よく遺伝子編集できる gRNA を選択できた。この gRNA 及び Cas9 タンパク質をマウス受精卵に導入し、遺伝子編集マウスの作成を行った。初めに行った実験に用いた gRNA での遺伝子編集では、マウスの発生が起らず、マウス個体を得ることができなかった。再度 gRNA の選別を行い、効率の順で 2 番目、3 番目の gRNA 標的配列を選別し、同様の実験を行った。その結果、モザイクではあるが 4 匹の PTTG 遺伝子破壊ヘテロマウスの作成に成功した。これらを野生型と交配し、PTTG ヘテロ欠失マウスを得ることに成功した。さらにヘテロマウス間での交配によりホモ欠失マウスの取得を行ったところ、メンデルの法則に従わずホモマウスが生まれることが明らかとなり、胎生致死ではないが、発生の段階での PTTG タンパク質を要求する種々のステージの存在が示唆された。産まれてきたマウスは系統を繁殖に使用するため解析が不可能であったが、胎児観察を行い血管の形成との関連性を現在解析中である。この初期のデータより、PTTG 欠失マウスでは、血管形成には問題ないようであるが、肺や目での毛細血管のネットワーク形成がうまくいっていないことを得ることができた。

[血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の相互作用解析]

血管内皮細胞特異的発現 Tie2-GFP 及び血管平滑筋細胞特異的 SM22a-RFP を発現するトランスジェニックマウスと交配し両蛍光タンパク質を発現するマウス個体をゲノム DNA を解析し取得した。この個体の動脈部位を解剖して取得後、固定し GFP と RFP の蛍光を顕微鏡観察した。その結果、平滑筋特異的な RFP の発現は確認できたが、内皮特異的 GFP の発現は微弱で同時に観察することが不可能であった。そのためさらに別の個体を確認し、検討中である。

【考 察】

本実験より PTTG 欠失はマウスの発生段階に必要な因子であり、以前に報告されたような分裂期に関わる因子で染色体の不安定性の結果、致死になるような結果は得ることはできなかった。その反面、胎生致死ではないが、種々の発達のステージでの胎児の死滅や生後のマウスの発達異常を観察された。その結果より、毛細血管のネットワーク形成に問題があるようだとの初期のデータを得ることに成功した。これは、モヤモヤ病の脳内頸動脈閉塞とは異なるが、血管の維持の低下を意味し、モヤモヤ病の初期症状を意味するのではないと考えている。また PTTG が RNF213 の下流因子であることを個体レベルで証明するきっかけになると考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究では、確実なデータを出すに至ってはいるが、本助成による研究によりモヤモヤ病のモデル動物作成の一步を踏み出せたのではないかと考えられる。PTTG がモヤモヤ病のモデルとして機能すれば、モヤモヤ病の初期症状の解明また発病前診断など臨床の現場に貢献できるものと考えられる。

【参考・引用文献】

PTP1B controls non-mitochondrial oxygen consumption by regulating RNF213 to promote tumour survival during hypoxia. Robert S. Banh, Caterina Iorio, Richard Marcotte, Yang Xu, Dan Cojocari, Anas Abdel Rahman, Judy Pawling, Wei Zhang, Ankit Sinha, Christopher M. Rose, Marta Isasa, Shuang Zhang, Ronald Wu, Carl Virtanen, Toshiaki Hitomi, Toshiyuki Habu, Sachdev S. Sidhu, Akio Koizumi, Sarah E. Wilkins, Thomas Kislinger, Steven P. Gygi, Christopher J. Schofield, James W. Dennis, Bradley G. Wouters and Benjamin G. Neel *Nature Cell Bio.* 2016 Jul;18(7):803-13