

遺伝子改変非ヒト霊長類を用いたトランスサイレチン型心アミロイドーシスの疾患機序の解明

依馬正次

滋賀医科大学 動物生命科学研究センター 幹細胞・ヒト疾患モデル研究分野

【研究の背景】

アミロイドタンパク質が心臓に蓄積する心アミロイドーシスは若年者にも発症し、急激に心機能が低下して死に至る極めて難治性の高い予後不良の心疾患である。心アミロイドーシス動物モデルとしてマウスでの開発が進められているが、ヒトとマウスでは心臓血行動態が大きく異なり、その結果をヒトに応用するのは困難な場合が多い。

【目 的】

本研究では、遺伝子改変技術を活用して心アミロイドーシスを発症する遺伝子改変カニクイザルを作製することで、その病態を非ヒト霊長類モデルで再現し、病態発症機序を明らかにすることを目的とする。

【方 法】

変異型トランスサイレチンの中でも凝集性が高いV30M変異に主に着目する。これまでに申請者が作製したトランスジェニックカニクイザルの作出方法と同様に、まず、心臓特異的に変異型トランスサイレチンが高発現するよう、 α -MyHC (Myosin heavy chain (Myh6)) プロモーター下流にこの目的遺伝子をクローニングした高タイターのレンチウイルスを作製する。次に変異型トランスサイレチンを発現するレンチウイルスを感染させた受精卵を仮親カニクイザル子宮に移植し、妊娠させて産子を得る。なお、使用するレンチウイルスには、変異型トランスサイレチンと共に GFP の発現が導入されており、変異型トランスサイレチンの発現レベルを解析できるようになっている。心機能については心エコー、心臓 MRI を利用して経時的に追跡し、血液サンプルで心不全マーカーを測定して心不全の程度を評価する。経時的にカニクイザルを安楽死させた後、心臓を摘出して網羅的な遺伝子発現解析を行い、心アミロイドーシスの発症により有意に発現変化する遺伝子を突き止める。特に炎症マーカー、酸化マーカーの発現変動には留意し、発現亢進が見られた場合、それぞれ抗炎症薬や抗酸化薬を心アミロイドーシスカニクイザルに投与し、改善するかどうか次のステップとして評価する。その機能解析により心アミロイドーシスの本質的な病態を解明する。この解析結果を新たな治療開発に応用する。

【結 果】

これまでに V30M 変異型トランスサイレチンを心筋特異的に発現させるため、 α -MyHC プロモーター下流に cDNA を連結したレンチウイルスを構築し、トランスジェニックサルの作製に必要な高タイターウイルス粒子の作製を試みた。しかし、インサート長が 8kb と長かったため、高タイターのウイルスを調製することができなかった。そこで、トランスポゾン型のベクターに α -MyHC プロモーターおよび cDNA を組み込んだベクターを構築し、トランスポザーゼ mRNA によりゲノムへ組み込む手法に切り換えた。これまでに世界中で作製されてきた全てのトランスジェニック霊長類は、ウイルスベクターを用いて作製されてきたため、先ず構築したトランスポゾンベクターが実際にゲノムに組み込まれ、外来遺伝子を発現させられるかどうかマウスで検討した。具体的にはマウス受精卵にトランスポザーゼ mRNA およびトランスポゾンベクターを注入してから、胎生期および生後の外来遺伝子の発現を検討したところ、100%の個体で心臓の心筋細胞に強く発現していることを確認した。そこで、こ

のトランスポゾンベクターをカニクイザル受精卵に注入し、仮親カニクイザルに移植したところ、1頭の妊娠個体を得ることができたため、今後解析を進める予定である。

【考 察】

これまでに用いられてきたレンチウイルスベクターによるトランスジェニック霊長類を作製する方法が使えなかったものの、トランスポゾンベクターを用いた新しいトランスジェニック霊長類を開発する方法を確立しつつある。トランスポゾンベクターは100kbを超える長大なインサート DNA でも搭載可能とされていることから、ヒト疾患モデル作製に威力を発揮することが期待される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

げっ歯類では再現できない循環器疾患が多く指摘されていることから、非ヒト霊長類を用いた遺伝子改変モデル動物の開発が期待されている。トランスサイレチン型心アミロイドーシスを再現するげっ歯類モデルや根治治療法はこれまでのところ存在しないため、カニクイザルモデルを用いることで、疾患発症機序の解明や新しい治療法の開発に繋がる可能性がある。

トランスサイレチン型心アミロイドーシスの治療には現在トランスサイレチンに対する siRNA 製剤であるオンパットロの使用が始まっているものの治療効果は限定的であり、心不全の発症機序の解明および根治治療法の開発が待たれている。カニクイザルは前臨床試験に頻用される動物であるため、モデルカニクイザルを用いた疾患研究の流れから円滑に治療候補薬の前臨床試験に繋がることを期待される。