

## 疾患モデル動物の開発と応用 -糖原病Ⅱ型ウズラをめぐって-

菊池建機

国立精神・神経センター神経研究所

### 1. はじめに

疾患モデル動物は医学・生物学の研究素材として役立つのみならず、その研究成果を通して人類の健康・福祉の増進に大きく貢献している。ヒトの種々の難病の病因解明や治療法を見いだすためには、ヒト自身を直接実験対象としたり、身体の一部より必要な実験材料を採ること等には自ずと限界があり、その方法によっては人道的、社会的影響から大きな制約を受けねばならない。疾患モデル動物は、こうしたヒトで直接行なえない研究を可能としたり、疾患動物を通して病気の原因を明らかにしたり、治療の前臨床実験を可能にしてくれる。

### 2. 疾患モデル動物-病因モデルと病態モデル-

疾患モデル動物によりヒトの病気を研究する場合、生体機能を研究する際にその系を全体モデルか、部分モデルか、に分類したのと同じ分け方を当てはめることができる<sup>1)</sup>。1つは、動物に起こっている疾患の直接の原因が、ヒトの病気の原因と同じ場合であり、もう1つは、その原因は異なっているが、発症のプロセスや臨床、病理所見、または外部環境や内部環境に対する反応が類似している場合である。前者は病気の原因が同じなので病因モデル(疾患モデルとする場合もある)、後者は、疾患全体の症状が類似する病態モデルとして分類できる。

ヒトの場合も動物の場合も、遺伝性の疾患は、遺伝的基盤に立って発症し、その原因は遺伝子の異常にある。現在研究に用いられている疾患モデル動物は突然変異体(ミュータント)として偶然発見されたものが多く、遺伝的支配下に発症する個体を継代繁殖し、必要に応じて実験素材として使っている。突然変異体として発見された自然発症の疾患動物は、発見当初は、その病態が種々の角度から検査され、ヒトの種々の疾患にみられる病態との比較が行なわれる。従って、大部分の疾患動物は、はじめは病態モデルとしてデビューし、遺伝病であることが明らかとなっても、その病気の原因や、該当するヒトの病気等は不明のままに利用され始める場合が多い。その後、異常蛋白質の発見や、遺伝子解析により、遺

伝子レベルでの真の病気の原因がヒトのものと同じであることが明らかとなった時、この疾患動物はヒトの病因モデルとしてさらに高い評価を受けることとなる。

疾患モデル動物はヒトを対象とし得ない研究を可能とする一方、新薬開発や臨床実験へ踏み切るに際しての毒性試験や治療実験を行なう上で有用である。ラットやマウスにみられる、最近の疾患モデル動物の急激な需要の伸びは、主にこの方面の研究に使われているためである。以下に論ずる糖原病Ⅱ型ウズラ(AMDウズラ)は、18年前に発見されてからこれまで系統純化が行なわれてきたが<sup>2)3)4)5)</sup>、最近我々の研究グループが分子レベルの解析を行ない、本ミュータントがヒトの糖原病Ⅱ型と遺伝子レベルでも同一であることを明らかにした<sup>6)</sup>。現在ウイルスベクターを介する遺伝子治療が試みられているが、ここではヒト型遺伝子組換え合成酵素(rGAA)を直接ウズラに投与する酵素補充療法について紹介する<sup>7)</sup>。

### 3. 糖原病Ⅱ型(Pompe病)とその動物モデル

糖原病はグリコーゲンの合成、分解に関する代謝経路の酵素の先天的な障害により、肝臓や他の諸臓器、組織にグリコーゲンが蓄積し、それによってさまざまな病態を呈する遺伝性疾患である。欠損する酵素の種類や、グリコーゲンの蓄積する部位によっていくつかの病型に分類される。Ⅱ型はPompe病ともいわれ、acid- $\alpha$ -glucosidase(GAA)または酸性マルターゼともいう酵素の欠損症である。分解されないグリコーゲンは細胞内のリソソームに蓄積される。臨床経過から、乳児期早期に発症して心不全で死亡する乳児型と、乳幼児期に筋緊張低下で発症して徐々に進行する小児型、および成人に発症して筋力低下を示す成人型に分類される。乳児型では酵素が全く合成されず、早く病気が進行するが、小児型や成人型では酵素の残余活性がみられ、進行は緩徐である。

ヒトの糖原病Ⅱ型のモデル動物として、牛、綿羊、犬、ウズラ等が知られている。これらの疾患動

物はウズラ以外は大型でライフスパンも長いため系統の維持までに至らず、すでに絶えてしまっているものもある。ごく最近GAA遺伝子を欠失したKnock-out mouseが報告されたが、軽度のグリコーゲン蓄積が心臓、骨格筋でみられるだけで、臨床症状が容易には把握できず、マウスの本酵素を介する糖代謝がヒトとは異なることが指摘されている<sup>8)</sup>。一方、ウズラの糖原病モデルは胸筋、心筋と肝臓に顕著なグリコーゲン蓄積を認め、さらに翼の挙上不能や仰向けの位置から起き上がれなくなる等の明瞭な臨床症状を伴う点で遺伝子変異マウスの場合と異なっている。ヒトの糖原病Ⅱ型は心筋や肝臓に加えて、骨格筋も障害される点で他の代謝性蓄積病とは異なっている。ウズラの本疾患モデルは、浅胸筋が骨格筋の中では最も早く、最も重度に侵される。3週齢以降の浅胸筋線維の細胞質にはグリコーゲンの蓄積がみられるようになり、8週齢に達すると細胞質に拡散しているグリコーゲンは大型のPAS陽性顆粒(Glycogenosome)となる。また、筋線維内のリソソームの活性化がみられ、大小のautophagosomeが細胞内小器官を取り込んで、光顕所見では空胞として観察される(図1)。その後、病勢進展に伴い、筋組織は脂肪組織に置き変わる。これら一連の病理学的変化はヒトのそれと極めて類似している。さらに、ウズラは小型(100-130gm)で、個体を多数、簡単に揃えられる利点があり、疾患モデル動物として有利な点が多い。残された問題はこのモデル動物の遺伝子変異がヒトの糖原病Ⅱ型と相同であるかどうかであった。

#### 4. ウズラのacid- $\alpha$ -glucosidase (GAA) cDNAのクローニングと糖原病Ⅱ型ウズラの遺伝子解析

ウズラの糖原病(AMD)の原因遺伝子を分子レベルで解析するため、まず、正常なウズラのacid- $\alpha$ -glucosidase (GAA) cDNAを単離した<sup>6)</sup>。現在まで報告のあるヒト、マウス、テトラヒメナのアミノ酸配列のalignmentを揃え、保存性の高い活性中心部分のdegenerate primerを合成した。そのdegenerate primerを用いて、40日齢のウズラのcDNAを鋳型としたRT-PCR法によりウズラのこの部位のcDNAを増幅した。この部位に対するPCR産物をprobeとして、40日齢のウズラの肝臓cDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果3,569bpのインサート長を持つpQAM8を単離した。本cDNAクローンはメチオニンから最終コドンまでに、932アミノ酸残基からなるオープンリーディングフレームを有していた。また、メチオニンよりも上流にはインフレームのストップコドンが存在することから、本cDNAクローンがウズラGAAの完全長に対応するcDNAクローンと考えられた。また、糖鎖の結合の可能性のあるアスパラギン残基が9カ所存在していた。

単離されたGAAcDNAから推定されるアミノ酸配列とヒト、マウスGAAのアミノ酸配列のalignmentをそろえてみると、今回単離したウズラのGAAアミノ酸配列が哺乳類のGAAに対し、全体で約52%のホモロジーを有していた。また、知られている活性中心付近のアミノ酸残基はヒト、マウス、ウズラ間で高く保存されていることが示された。3種類の酵素のア

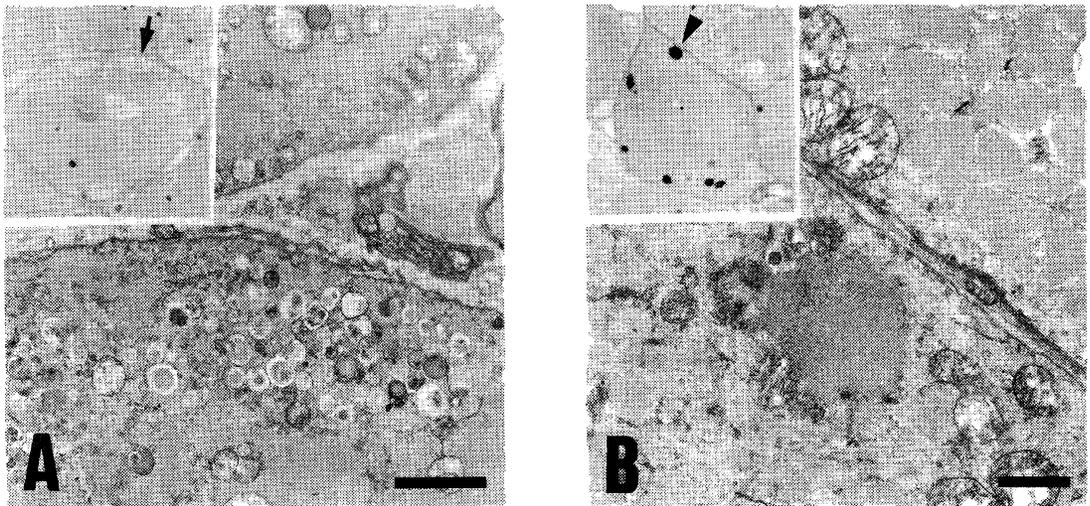


図1 8週齢の糖原病Ⅱ型ウズラ浅胸筋線維の微細構造的変化

エボン厚切切片をPAS染色すると筋線維内に大小の空胞(Aの挿入図矢印)とグリコーゲン塊(Glycogenosome)(Bの挿入図矢頭)が観察できる。電顕観察では空胞は大型のautophagosomeで、内部には多数の不定形膜様構造物を含んでいる(A)。グリコーゲン塊は電子密度の高いグリコーゲン粒子の集合の場合と、電子密度が低く、明るいものがある(B)。スケール=1 $\mu$ m

ミノ酸でN末端の相同性の低いのが特徴であるが、このことは、ヒトにおいて、N末端が何か所か酵素消化的にprocessingされることが知られており、ウズラにおいてもN末端は成熟蛋白に含まれない可能性を示している。

クローニングしたGAAcDNAに、ウズラのGAA活性が実際にあるかどうかを確認した。pQAM8の推定コード領域を真核細胞の発現ベクターであるpCDNA3に組み込み、pETAM8を作製した。本発現プラスミドをCOS細胞または糖原病ウズラの9日目胚由来の線維芽細胞にLipofectAmine reagentを用いてtransfectionした。90時間後に細胞を集めて、細胞のホモジェネートを得た。その一部を4-MUを基質として、GAA活性を測定した。その結果、ベクターのみのMock transfectionでは7.26nmolが得られたのに対して、pETAM8を用いた場合には210nmolと約28倍の活性の上昇を見た。また、本ウズラGAAはpH4.3と6.5の酸性と中性での活性を比較したところ、酸性領域に対して中性では活性が1/20になることを確認した。これらの結果は、今回単離した、pQAMT8がウズラのGAAをコードしていることを示している。

GAAcDNAをプローブとしてNorthern blot解析を行ったところ、正常においては、先ほどのcDNAの全長に対応する約3.6kbのシングルバンドを得たが、糖原病ウズラ由来の各臓器は、殆どシグナルが観察されなかった(図2)。このことは、ウズラの糖原病

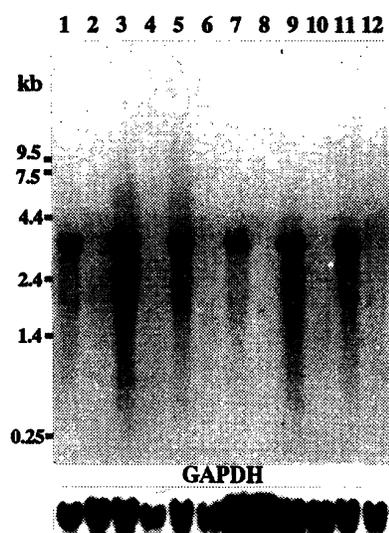


図2 正常および糖原病ウズラの諸日齢および諸臓器におけるNorthern blot解析  
正常ウズラは奇数、糖原病ウズラは偶数レーンにシグナルを示す。レーン1と2；一日齢肝臓、レーン3と4；84日齢肝臓、レーン5と6；35日齢心臓、レーン7と8；35日齢浅胸筋、レーン9と10；84日齢内転筋、レーン11と12；35日齢脳。糖原病ウズラのどの臓器を、どの日齢から採取してblottingしてもmRNAのシグナルは得られない。

の理由がGAA mRNAの転写活性の減少または消失によることを示唆している。また、この減少の理由が、mRNAの安定性に影響を与える変異のためであるのか、またはプロモーターの変異のため、であるのかは現在不明である。さらに単離したGAAcDNAをプローブとして、正常および糖原病ウズラのgenomic DNAをいくつかの制限酵素で消化したものに対して、Genomic Southern Blottingを行なった。しかし、正常および糖原病ウズラのゲノム間でも目だつた変異は現在のところ見出されていない。

## 5. 酵素補充療法

ヒトの糖原病Ⅱ型はGAAの異常低値により肝臓、心臓、骨格筋に大量のグリコーゲンが蓄積し、細胞内のリソソームがそれらを分解できず、ついには細胞死にいたる諸臓器不全を示す糖代謝病である。正常細胞では粗面小胞体で合成された前駆体蛋白はGolgi体で糖鎖の付加を含むprocessingを受け、リソソームへ成熟したGAA分子を送る。ここで、一部のGAA前駆体は成熟せずに細胞外へ出、血流によって全身を循環する。酵素が必要となった細胞は、自分で合成した酵素で間に合わない場合は血中から再び細胞表面の受容体を介してGAA前駆体を取り込み、processingの後にリソソームでグリコーゲンの分解に再利用する<sup>9)</sup>。酵素補充療法の原理は、血中にある酵素を再利用する仕組みが細胞に備わっていることを利用して、体外から酵素を投与してやるものである。従って、細胞内の酵素が不足しないように定期的に体外から補充する必要があるため、酵素補充療法といわれている。糖尿病の患者がインシュリンを定期的に注射するのと同じである。これまでの成功例としては脂質蓄積症として知られるゴーシェ病があげられる。リソソーム酵素の一つである $\beta$ -glucosidaseが欠損すると、グルコセレブロシドが肝臓や脾臓の網内系細胞に多量に蓄積するため、肝脾腫が顕著となる。 $\beta$ -glucosidaseを投与された患者の肝臓や脾臓の腫れは著しく目立たなくなり、殆ど正常のからだに戻ることが報告されている<sup>10)</sup>。

最近になって、培養下でCHO細胞に組換えDNA技術により、ヒト型GAAを大量に合成する系が確立した<sup>9)</sup>。この合成酵素を使って補充療法を試みるに際し、ウズラの細胞には酵素を取り込む「受容体」が細胞表面に存在するか、また、一度取り込まれた酵素は実際にGolgi体でprocessingを受け、リソソームでグリコーゲンを分解する能力があるか、をウズラの9日目胚由来の初代培養線維芽細胞と筋芽細胞を使って検討した。GAAは糖鎖のmannose-6-phosphate (m-6-p)を介して受容体と結合するが、用いたウズラのいずれの細胞も細胞表面にこの受容体を有し、ヒト型酵素を取り込むことが判明した<sup>11)</sup>。また、一度細胞内にGAAが取り込まれるとGolgi体の

近傍に集まり、以降7日間にわたって細胞内のグリコーゲンを分解し続けた。個体レベルのGAAの投与実験はいくつかの投与量で、2-3日間隔で、また7回から16回投与を実施している。ウズラはヒト型の異種蛋白を連続投与されても、いわゆるアナフィラキシー反応による死亡例はみられず、若齢ウズラほど血中の抗体産生能が低いことなどから、異種蛋白による個体レベルの治療実験に適している動物と思われる<sup>11)</sup>。つい最近の個体レベルの一連の実験結果から、外部より投与されたGAAにより、肝臓と心臓のグリコーゲンの蓄積は速やかに消失し、胸筋線維のグリコーゲン顆粒の減少に伴い、筋病変も著しく改善されることが明かとなった<sup>7)</sup>。

## 6. おわりに

遺伝性の疾患モデル動物の一例として、糖原病Ⅱ型ウズラを応用した最近の研究成果を紹介した。遺伝子改変技術により、遺伝子異常を伴う疾患モデルマウスやラットを作製できるこの頃なのに、なぜウズラなのか、と思われる方も多いと思います。しかし、疾患モデル動物という場合は、動物の種を問わず、病気を発症している個体が重要である、という点を思いだして下さい。そして、前述したように、ヒトの遺伝病と遺伝子異常が同じ場合は、どのような動物でも疾患モデルとして大きな価値を持つことになります。すなわち、遺伝子異常がヒトの遺伝病と同じでも、動物で表現型としての症状がみられなかったり、ヒトの疾患と違う症状を示す場合は、疾患モデル動物として適しているとは言えないわけです。この分野の研究は、広く医学、生物学にまたがる技術革新が必要とされ、ヒト疾患の発症機序、その治療法の開発および新薬開発等の研究に果たす役割は大きいといえます。

## 7. 文 献

- 1) 菊池建機. 疾患モデル動物-その医学・生物学への応用-日本薬剤師学会雑誌, 42, 633-642, 1990.
- 2) Murakami H., Takagi A., Nonaka S., Ishiura S. and Sugita H. Glycogenosis II in Japanese quails. *Exp. Anim. (Tokyo)*. 29, 475-485, 1980.
- 3) Usuki F., Ishiura S. and Sugita H. Developmental study of  $\alpha$ -glucosidase in Japanese with acid maltase deficiency. *Muscle Nerve*. 9, 537-543, 1986.
- 4) Higuchi I., Nonaka I., Usuki F., Ishiura S. and Sugita H. Acid maltase deficiency in the Japanese quail: early morphological event in skeletal muscle. *Acta Neuropathol.* 73, 32-37, 1987.
- 5) Miyagawa Tomita S., Morishima M., Nakazawa M., Mizutani M. and Kikuchi T. Pathological study of Japanese quail embryo with acid  $\alpha$  glucosidase deficiency during early development. *Acta Neuropathol.* 92, 249-254, 1996.
- 6) Kunita R., Nakabayashi O., Wu J.-Y., Hagiwara Y., Mizutani M., Pennybacker M. F., Chen Y.-T. and Kikuchi T. Molecular cloning of acid  $\alpha$ -glucosidase cDNAs of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and the lack of its mRNA in acid maltase deficient quails. *Biochem. Biophys. Acta.* 1362, 269-278, 1997.
- 7) Kikuchi T., Yang H. W., Pennybacker M., Ichihara N., Mizutani M., Van Hove J. L. K. and Chen Y.-T. Clinical and metabolic correction of Pompe disease by enzyme therapy in acid maltase-deficient quail. *J. Clin. Invest.* 101, 827-833, 1998.
- 8) Bijvoet A. G. A., van de Kamp E. H. M., Kroos M. A., Ding J.-H., Yang B. Z., Visser P., Bakker C. E., Verbeet M. P., Oostraal B. A., Rouser A. J. J. and van der Ploeg A. T. Generalized glycogen storage and cardiomegaly in a knockout mouse model of Pompe disease. *Hum. Mol. Genet.* 7, 53-62, 1998.
- 9) Van Hove J. L. K., Yang H. W., Wu J.-Y., Brady R. O. and Chen Y.-T. High level production of recombinant human lysosomal acid  $\alpha$ -glucosidase in Chinese hamster ovary cells which targets to heart muscle and corrects glycogen accumulation in fibroblasts from patients with Pompe disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 65-70, 1996.
- 10) Barton N. W., Furbish F. S., Murray G. J., Garfield M. and Brady R. O. Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 1913-1916, 1990.
- 11) Yang H. W., Mizutani M., Hagiwara Y., Kikuchi T., Van Hove J. L. K. and Chen Y.-T. Recombinant human acid  $\alpha$ -glucosidase corrects acid  $\alpha$  glucosidase deficient human fibroblasts, quail fibroblasts and quail myoblasts. *Pediatric Res.* 43, 374-380, 1998.