

総括研究報告書

課題番号：13—公—3

課題名：先天性代謝異常による臓器障害発症機構の基盤的研究

主任研究者 辻本豪三（京都大学大学院薬学研究科）

（研究成果の要約）

先天性代謝異常症はその原因遺伝子が同定され、出生全診断、新生児診断が確立され、その治療が可能となってきたものの、個体における臓器障害の分子病態機構が不明なものが多く、治療が確立されていない場合が多い。本研究ではこのような先天性代謝異常による臓器障害発症機構の分子病態を明らかにすると共に科学的根拠ある治療確立のため、各種疾患動物モデル(ノックアウトマウス)や腎障害モデル動物をゲノムスケールで解析した。特に、高チロシン血症、魚鱗癬、腎炎などの疾患において疾患・治療関連遺伝子群の同定、さらには病態パスウェイ解析に成功した。これらのゲノム情報は患者病態解析及び治療の向上に資する。

1. 研究目的

小児期に発症する臓器障害には先天性代謝異常によるものが多く含まれ、その原因の解明及び発症機序の解明は、治療のために重要である。本研究は、各種先天性代謝疾患モデル動物を臓器障害の解明のモデルとして、DNAチップ等のゲノム機能科学的手法により解析を行うことにより、臓器障害発症メカニズムの解明を遺伝子発現解析を基にゲノムスケールで行い、患者の病態解析及び治療の向上を目的とする。

2. 研究組織

分担研究者	所属施設
辻本豪三	京都大学大学院薬学研究科
岩尾 洋	大阪市立大学大学院医学研究科
遠藤文夫	熊本大学医学部小児科学
辻 彰	金沢大学薬学部
田中利男	三重大学医学部薬理学
山西清文	兵庫医科大学皮膚科
岡野善行	大阪市立大学大学院医学研究科 発達小児医学
桑野博行	群馬大学医学部外科学第一講座
梨井 康	国立成育医療研究センター 研究所・移植・外科研究部

3. 研究成果

1) 班長の辻本は各班員の作成、特性解析を行っている疾患動物モデル解析用の標準化cDNAライブラリーを各種臓器より作成するとともに、更にそのライブラリーをマイクロアレイ化したチップを作成し、一部共同でDNAマイクロアレイ解析を行った。また、一

部の研究者とはジーンチップによるDNAチップ解析を行った。各分担研究員は変異動物モデルおよび疾患・病態モデル動物の作成および樹立に成功し、それらのモデル動物の基礎的解析を各班員と共同で行った。

2) 遠藤はヒト疾患高チロシン血症のモデルマウスを用い、マウスの病態発症時における病態変化を辻本と共同でジーンチップを用いて解析を行い、アポトーシス関連遺伝子群、アミノ酸代謝遺伝子群、糖代謝遺伝子群に特徴的な発現の変化を同定した。細胞治療においては唾液腺由来幹細胞をモデルマウス門脈内に投与し、その後モデルマウスに肝障害を生じせしめたところ、酵素異常を有する細胞がアポトーシスに陥って細胞数が減少するが、移植した幹細胞由来の成熟肝細胞が増殖し、移植した細胞はアルブミン、1アンチトリプシン産生することも確認した。

3) 山西は先天性皮膚形成障害である常染色体劣性遺伝性魚鱗癬の発症機構解明に向けて、その原因遺伝子であるトランスグルタミナーゼ1(TGM1)遺伝子のノックアウトマウス(TGM1 KO)をモデルとして、障害された皮膚で発現する遺伝子の発現プロフィールを班長辻本とDNAマイクロアレイを用いて解析した。その結果、対照の2倍以上変動する遺伝子として、38遺伝子の発現増加と、236遺伝子の発現減少が明らかになった。発現量の増大がみられた遺伝子について、定量的RT-PCRを実施し、脳皮膚特異的セリンプロテアーゼなどの高発現が確認され、これら複数の遺伝子の発現異常が魚鱗癬の形成に

関わる事を明かとした。

- 4) 辻は先天性全身性カルニチン欠乏症のモデルマウス (JVS) における心肥大に着目し、OCTN2 およびそのホモログである OCTN1 および OCTN3 の心臓における生理的役割を調査した。免疫化学的手法により、OCTN1 は心臓の冠血管内皮細胞に、OCTN2 は心筋細胞の特に心筋細胞間の介在版に発現が認められた。心臓組織におけるカルニチン取り込みは担体介在輸送であり、主に OCTN2 を介したものであると考えられた。j v s マウスでは OCTN2 の輸送機能の変異によりカルニチン輸送活性が消失し、心臓でのカルニチン低下が起こり、その結果として心肥大等の種々病変が生じたものと考えられる。
- 5) 岡野は、高インスリン血症の発症機構のメカニズムを解明する目的で、glutamate dehydrogenase (GDH) の異常に注目して解析した。GDH は膵細胞での高インスリン血症、肝細胞での高アンモニア血症を発症させると考えられている。GDH 遺伝子の変異は膵細胞での高 GDH 活性とその制御機構の崩壊を来し、低グルコース濃度領域でのインスリン過剰分泌を来していた。そして、GDH 異常によるインスリンの過剰分泌は K_{ATP} チャンネルによる機構だけでなく、非選択性陽イオンチャンネルの活性化による細胞膜の過剰な脱分極が関与していることを明らかにした。高インスリン血症の発症機構はこれまでに推論されていた K_{ATP} チャンネルのみが関与するインスリン過剰分泌でないことを明らかにした。
- 6) 岩尾は、腎炎のなかで最も頻度の高い IgA 腎症の発症機序に關与する遺伝子を明らかにするため、ラットに抗 Thy-1 抗体を静脈内投与して IgA 腎症モデルを作製した。経時的に糸球体から抽出した RNA を、班長辻本と遺伝子ライブラリー-DNA チップを用いて解析を行った。クラスタ解析により、様々な遺伝子の変動パターンが明らかとなり、既知の遺伝子も含めて 97 遺伝子が有意な変化を認めた。その変動パターンは、Thy-1 抗体投与早期にのみ増加する遺伝子、修復過程で増加する遺伝子、また発現が減少する遺伝子など、5 ないし 6 グループに分類できた。腎炎初期に關与している遺伝子群中でケモカインが重要な役割を担っている可能性が示唆された。
- 7) 田中は発生初期の代謝異常と出生後の臓器障害の連続的な生体解析による因果関

係や、ゲノムスケールでの発症機構を解析する目的でゼブラフィッシュを最適なモデル動物として選択し、DNA チップ等のゲノムテクノロジーにより胎生期代謝異常による出生後臓器障害発症のゲノム機構を解析した。ゼブラフィッシュ DNA チップの作成を完了し、その性能の検討を行った。次にサリドマイドによるゼブラフィッシュ初期胚の発生・発育段階における形態異常及び遺伝子発現プロファイル解析を行った。サリドマイドをゼブラフィッシュ初期胚に暴露した結果、特定の濃度下にて発生段階の遅延を認め、受精後 2 日目より心奇形、心拍数低下など循環器系の異常・運動機能障害などが認められた。この発生段階の遅延及び循環器系の異常は酸化剤であるメルカプトエタノールによりうち消された。また DNA チップを用いて、サリドマイド暴露群とコントロール群の遺伝子発現プロファイルを比較したところ、約 16000 遺伝子のうち遺伝子発現が上昇したものは 136 遺伝子、低下したものは 84 遺伝子認められ、酸化ストレス・筋・結合組織、代謝、血管新生に關与する幅広い遺伝子群が抽出された。発生段階における医薬品による臓器障害のゲノム機構解析に、ゼブラフィッシュ初期胚は非常に簡便でありまたかつ迅速に行えるスクリーニング研究法と考えられた。

- 8) 桑野は、ラット胆管結紮モデルにおける肝内門脈域の毛細胆管増生を伴う線維化に対して、迷走神経や mast cell の関与を検討した。結果、胆道閉鎖肝門空腸吻合術後患児の一部では肝垂区域別の胆汁ドレナージ不良や肝内門脈域の炎症・線維化による胆汁ドレナージ不良が生じている可能性があり、これらの変化をベースに肝機能障害が進展することが推測された。さらに胆汁鬱滞によって惹起される肝内門脈域における変化は迷走神経や mast cell の作用により修飾されていると思われる。今後これら病態をふまえた手術法の改良と術後薬物治療の開発が胆道閉鎖症治療成績の改善につながると考えられる。
- 9) 梨井は、リソゾーム蓄積症の解明のために神経幹細胞を MPSVII のマウスモデルに対し、マウスの新生児期に正常胎児脳から分離した神経幹細胞を移植することにより、脳の病理所見を改善させるに足る酵素量を維持でき、生化学的・組織学的改善、聴性脳幹反応検査および海馬機能の評価の改善を明ら

かにした。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究では直接ヒト検体解析を行う場合には各研究機関での倫理委員会に申請を行った。実験動物の場合は、組換えDNA実験、並びに動物実験を必要とするが、それぞれ厚生労働省、文部科学省並びに各研究機関の取り扱い規定に準拠し、各機関の組換えDNA実験安全委員会、動物実験委員会の承認を得た。また、実験動物の人的、倫理的扱いに最大限配慮した。

5. 研究業績

(辻本)

1) Ishiwata H, Katsuma S, Kizaki K, Patel O-V, Nakano H, Takahashi T, Imai K, Hirasawa A, Shiojima S, Ikawa H, Suzuki Y, Tsujimoto G, Izaike Y, Todoroki J, Hashizume K.:

Characterization of gene expression profiles in early bovine pregnancy using a custom cDNA microarray. *Mol. Reprod. Dev.* 65: 9-18, 2003.

2) Nakamura T, Shiojima S, Hirai Y, Iwama T, Tsuruzoe N, Hirasawa A, Katsuma S, Tsujimoto G : Temporal gene expression changes of adipogenesis in human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303: 306-312, 2003.

3) Chalothorn D, McCune DF, Edelmann SE, Tobita K, Keller BB, Lasley RD, Perez DM, Tanoue A, Tsujimoto G, Post GR, Piascik MT.: Differential cardiovascular regulatory activities of the alpha1B- and alpha1D-adrenoceptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305: 1045-1053, 2003.

4) Fukuhara Y, Hirasawa A, Li X-K, Funeshima N, Kawasaki M, Katsuma S, Shiojima S, Yamada M, Okuyama T, Suzuki S, Tsujimoto G.: Gene expression profiles in the regenerating rat liver after partial hepatectomy.

J. Hepatology. 38: 784-792, 2003.

5) Hasida R, Ogawa K, Miyagawa M, Sugita Y, Takahashi E, Nagatu T, Katunuma T, Akasawa A, Tsujimoto G, Matsumoto K, Saito H.: Analysis of gene expression in peripheral blood eosinophils from patients with atopic dermatitis by differential display. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 131: 26-33, 2003.

6) Harasawa I, Honda K, Tanoue A, Shinoura H, Ishida Y, Okamura H, Murao M, Tsujimoto G, Higa K, Kamiya H, Takano Y.: Responses to

noxious stimuli in mice lacking α 1d-adrenergic receptors.

Neuro Report. 14: 1857-1860, 2003.

7) Oshikawa S, Tanoue A, Koshimizu T-A, Kitagawa Y, and Tsujimoto G.

Vasopressin stimulates insulin release from islet cells through V1b receptors: A combined pharmacological/knockout approach.

Mol. Pharmacol. 65: 623-629, 2004.

8) Herath CB, Shiojima S, Ishiwata H, Katsuma S, Kadowaki T, Ushizawa K, Imai K, Takahashi T, Hirasawa A, Tsujimoto G, Hashizume K.

Pregnancy-associated changes in genome-wide gene expression profiles in the liver of cow throughout pregnancy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 666-680, 2004.

(遠藤)

1) Endo F, Tanaka Y., Tanoue A., Tsujimoto G., and Nkamura K.

J Nutrition 133 2063S-2067S

Animal models for tyrosinemias reveal pathophysiologies of tyrosinemias.2003

2) K Okumura, F Endo et al. *Hepatology.* 38 105-113 Salivary Gland Progenitor Cells Induced by Duct Ligation Differentiate into Hepatic and Pancreatic Lineages.2003

3) Nakamura K, Endo F et al. *J Human Genetics* 48:380-384 Complete absence of bile and pancreatic ducts in a newborn: a new entity of congenital anomaly in hepato-pancreatic development.2003

4) Hisatomi Y., Endo F., et al. *Hepatology* 39: 667-675 Flow cytometric Isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages.2004

(辻)

1) Inano A, Sai Y, Nikaido H, Hashimoto N, Asano M, Tsuji A.

Biopharm Drug Dispos. 24(8):357-365 (2003). Acetyl-L-carnitine permeability across the blood-brain barrier and involvement of carnitine transporter OCTN2. John Wiley & Sons Inc.

2) Tamai I, Nakanishi T, Kobayashi D, China K, Kosugi Y, Nezu J, Sai Y, Tsuji A. *Mol Pharm.* 1(1): 57-66 (2004) Involvement of OCTN1 (SLC22A4) in pH-dependent transport of

organic cations. John Wiley & Sons Inc.

- 2) Inano A, Sai Y, Kato Y, Tamai I, Ishiguro M, Tsuji A. Drug Metabol Pharmacokinet., in press Functional regions of organic cation/carnitine transporter OCTN2

(SLC22A5): Roles in carnitine recognition. Japanese Society for the Study of Xenobiotics

4) 辻 彰

DDS, 18(2), 83 (2003).

パスポート・ケートウェイ蛋白質の分子認識・輸送, 日本 DDS 学会

(岩尾)

- 1) 泉 康雄、岩尾 洋

ゲノム医学 第12号 89-93

ゲノム創薬と薬物作用ゲノミクス 2003

メディカルレビュー社

- 2) 岩尾 洋、三浦克之、金 勝慶、

寒川慶一: The GINSENG REVIEW No.29 34-37 薬

用人蔘の標的分子の探索 2001

薬用人蔘研究会

(田中)

- 1) H. Amano, K Maruyama, Michiko Naka, and T Tanaka: Target validation in hypoxia-induced vascular remodeling using transcriptome/ metabolome analysis. The Pharmacogenomics J, 3(3):183-8 2003

- 2) 田中利男:薬理ゲノミクス/ケモゲノミクスと創薬ターゲットバリデーション

生体の科学 54(5), (財)金原一郎記念医学医療振興財団/医学書院 368~374 2003

- 3) 田中利男、天野誉: 血管リモデリングの創薬ターゲットバリデーション戦略 Bio バイオベンチャー Vol.3 No.5 羊土社 54~56 2003

- 4) 田中利男 :トランスクリプトーム/メタボローム解析とゲノム創薬科学. Cancer Frontier2003 Vol.5 医薬ジャーナル社 24~31 2003

(桑野)

- 1) Takahashi A, Masuda N, Suzuki M, Shimura T, Nomoto K, Suzuki N, Asao T, Tsuchida Y, Kuwano H: Evidence for segmental bile drainaze by hepatic portoenterostomy for biliary atresia: Cholangiographic, hepatic venographic, and histological evaluation of the liver taken at liver transplantation. J Pediatr Surg 39:1-5, 2004

(梨井)

- 1) Y. Kamata, A.Tanabe , A. Kanaji, M. Kosuga, Y. Fukuhara, X-K. Li, S. Suzuki, M. Yamada, N. Azuma, T. Okuyama. Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharidosis VII. Gene Ther 10(5): 406-14, 2003.

- 2) Kanaji M, Kosuga, X-K. Li, Y. Fukuhara, A. Tanabe, Y. Kamata, N. Azuma, M. Yamada, T. Sakamaki, Y. Toyama, T. Okuyama. Improvement of skeletal lesions in mice with mucopolysaccharidosis type vii by neonatal adenoviral gene transfer. Mol Ther 8(5):718-25, 2003.

- 3) 小林庸次、奥山虎之
特集編集「先天代謝異常症」病理と臨床 2003; 22: 1-102 2003

- 4) 小林庸次、奥山虎之
先天性代謝異常症の新規治療法開発と病理 病理と臨床 2003; 22: 24-30 2004

- 5) 小林庸次、奥山虎之
出生前における遺伝性疾患の遺伝子診断 (解説/特集). 医学のあゆみ 2003; 204: 987-990 2003