

主論文の要旨

Establishment of mouse model of *MYH9* disorders: Heterozygous R702C mutation provokes macrothrombocytopenia with leukocyte inclusion bodies, renal glomerulosclerosis and hearing disability

*MYH9*異常症モデルマウスの確立：R702C変異はマウスにおいて顆粒球封入体を伴う巨大血小板減少、腎糸球体硬化症、感音性難聴を引き起こす

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：松下 正教授)

鈴木 伸明

【はじめに】

MYH9 異常症は Nonmuscle myosin heavy chain IIA(myosinIIA)をコードする *MYH9* に変異を持つことにより生じる疾患群として知られている。myosinIIA 蛋白はアミノ末端領域の頭部とカルボキシル末端領域の尾部に分けられる。頭部は分子の運動や酵素活性を発現させるための役割を担っており、アクチンの結合部位とアデノシン 5'-三リン酸(ATP)水解活性を持ち、2種類の myosin 軽鎖が2分子ずつ結合する。尾部はらせん構造をとり、重合してミオシンフィラメントを形成する。

頭部の変異では Alport 様症状の合併頻度が高いことが知られており、特に R702 の変異症例では他の変異に比較して、重度な巨大血小板減少症と進行性の腎炎を発症することが特徴である。

MYH9 異常症の病態解明のため、今まで複数グループによりモデルマウスの作成が試みられてきた。*Myh9* ノックアウトマウスにおいてはヘテロマウスでは表現型を発現せず、ホモマウスは胎生初期に死亡することが確認された。その後、血小板特異的に *MYH9* をノックアウトすることにより、ホモマウスは巨大血小板減少を呈することが確認された。このマウスでは血小板機能にも異常があることが認められたが、ヒト *MYH9* 異常症においてはミスセンス変異による症例がほとんどを占めており、これらの症例ではおそらくは残存する正常 myosinIIA により、血小板機能が維持されているため、このマウスは *MYH9* 異常症の血小板を正確に再現しているとはいえなかった。Johnstone らは腎臓ポドサイトの *MYH9* を特異的にノックアウトすることにより、*MYH9* 腎症を再現することが試みたが、腎症は確認されなかった。Zhang らは D1424N、E1841K、R702C のノックインマウスを作製し、これらが巨大血小板減少、およびアルブミン尿を伴う腎症を呈することを報告したが、R702C 変異に関しては古典的 *MYH9* ローカスの組み替えではなく、ヒト *MYH9* cDNA カセットの挿入であり、GFP を付帯させているためか、ヒト *MYH9* 異常症から予想される臨床症状よりも表現型の発現は軽度であった(R702C-GFP ヘテロマウス)。

我々は Zhang らとは異なるターゲティングベクター方式を用いて R702C ノックインマウスを作製し、表現型の解析を行った。

【方法】

R702C ノックインマウスの作製(図 1)

ターゲティングベクターを作製後、マウス ES 細胞に導入し、この ES 細胞を C57BL/6j マウスの blast-cyst に移植した。これにて得られたキメラマウスを C57BL/6j マウスとの交配によりヘテロマウスを作製し、そのヘテロマウスと全身性に Cre-リコンビナーゼを発現する CAG-Cre マウスと交配させる。Cre-リコンビナーゼが発現することにより、Neomycin 耐性遺伝子を含む loxP 配列に挟まれた遺伝子領域が除去され、組み込まれた R702C 変異が発現する。この R702C +/-マウスは C57BL/6j マウスと交配を繰り返し、遺伝的に均一化した上で実験に用いた。ホモマウスは原因は不明であるが、胎生致死であったためヘテロマウス(R702C +/-マウス)を使用して実験を行った。

【結果】

血小板の形態と分化 (図 2)(図 3)

R702C +/-マウスでは C57BL/6j マウス(野生型マウス)と比較して、著明な血小板数の減少とサイズの巨大化を認めた(図 2AB)。原因追及のため、胎児(E13.5)の肝細胞をトロンボポエチンの存在下で培養する実験系により血小板胞体突起形成を観察した所、R702C +/-マウスにおいては野生型マウスと比較して胞体突起が太く短くなっており、一方、血小板の元となる胞体は大きく、数が少ないことが確認された(図 3E-H)。血小板機能に関しては出血時間と血餅退縮能を行った。出血時間においてはおおむね野生型と同等の出血時間を示した(図 2C)。血小板退縮能においては野生型マウスとの明らかな違いは認められなかった(図 2D)。骨髄細胞中の巨核球についても検討を行ったが、R702C +/-マウスと野生型マウスとの間にその形態において大きな違いを認めなかった(図 3A-D)。

白血球封入体 (図 2E-H)

ヒト *MYH9* 異常症では顆粒球に myosinIIA の異常集積がみられ、これは *MYH9*mRNA/リボソーム/myosinIIA 蛋白の複合体であることが知られている。

この白血球封入体の検討を R702C +/-マウスにて行ったところ、May-Giemsa 染色では白血球封入体を確認することが出来なかったが(図 2E-F)、myosinIIA の免疫染色を行ったところ、myosinIIA が細顆粒状に存在することが確認された(図 2G-H)。これはヒトの R702C 変異を有する症例と同様の発現様式である。

腎症状 (図 4)

生後 5 週より 5 週間ごとに尿中アルブミン量を測定したところ、進行性のアルブミン尿を呈することが確認された(図 4A-B)。生後 20 週齢のマウスの腎臓を病理学的に検討したところ、光顕所見において糸球体硬化像が確認され(図 4C-G)、電顕所見においてはポドサイトの足突起の消失が確認された(図 4H-I)。この糸球体硬化像はヒト症例や既報のトランスジェニックマウスと比較しても非常に高度であった。

難聴 (図 5)

生後 20 週齢にて聴性脳幹反応を測定したところ、約半数のマウスで高度な感音性難聴が確認された(図 5)。しかし、内耳細胞の光顕、電顕所見においては明らかな異常は見られなかった。

白内障

R702C +/-マウスでは白内障の有意な合併は見られなかった。

【考察】

今回我々が作製した R702C +/-マウスは既報の R702C-GFP ヘテロマウスと比較して、巨大血小板減少や、腎障害の程度が非常に高度であった。この違いはノックイン様式の違いから生じてきていると考えられる。ヒト症例においては R702 変異の症例は他の変異と比較して、巨大血小板減少、腎症状いずれも強い臨床症状を示すことが報告されている。我々のマウスと既報の D1424N、E1841K マウスを比較すると、その傾向はマ

ウスにおいても成立していると考えられた。

巨大血小板減少症を来す機序であるが、myosinIIA は血小板産生において血小板が十分に成熟してから巨核球から放出させる調節因子であるが、R702C +/-マウスの胎児肝を用いた実験結果からドミナントネガティブに働く異常 myosinIIA のため、血小板放出の調節機構がうまく働かず、十分成熟する前に血小板が放出されてしまい、巨大血小板減少症につながることを考えられた。

血小板機能が保たれていることに関しては、ヒト *MYH9* 異常症において巨核球から血小板には異常 myosinIIA は移行しないことが報告されており、おそらく R702C +/-マウスにおいても異常 myosinIIA は血小板に移行せず、血小板に存在する正常 myosinIIA により血小板機能は保持されると考えられた。

R702C +/-マウスの腎病理所見においては著しい糸球体硬化像が見られた。前述した Johnstone らの報告と合わせて考えると、腎症は myosinIIA の量的欠乏によってではなく、ドミナントネガティブに働く異常 myosinIIA によって発症することが考えられた。また R702C +/-マウスの腎病理所見はヒト症例以上に強い糸球体硬化像を示したが、この差は種差による物であると考えられた。

【結論】

MYH9 異常症のモデルマウス作製においてノックイン様式が異なることにより、その表現型が異なって現れることが示された。この R702C +/-マウスにより R702C 変異はヒトだけではなく、マウスにおいても他の変異遺伝子より強い巨大血小板減少と腎障害を引き起こすことが示された。