

学 位 論 文 題 名

The development of animal models for Hirschsprung disease carrying mutations of the endothelin receptor type B gene

(エンドセリンレセプタータイプB遺伝子に変異を有するヒルシュスプルング病モデル動物の開発)

学位論文内容の要旨

・ 神経堤細胞の遊走及び増殖異常により先天性巨大結腸症 (Hirschsprung disease、HSCR) が発症することが知られている。Aganglionosis (AG) ラットは国内で発見されたHSCRモデル動物で、頭部に一部有色部位を残す白色被毛と腸管神経節欠損による巨大小腸及び結腸症を呈し、生後3週齢までに全例死亡する。原因はエンドセリンレセプタータイプB (*Ednrb*) 遺伝子のsplice donor siteを含む301 bpの欠失変異 (*Ednrb^{s/}*) による発現低下異常である。AGラットはクローズドコロニーのため遺伝学的解析には不向きであった。そこで第一章ではまずAganglionosisラットの近交系化を行い、AGH (AG Hokkaido)-*Ednrb^{s/}*を樹立した。また、同じくクローズドコロニーであった*Ednrb^{s/}*変異を有するLong-Evans系ラットの近交系化も行い、LEH (Long-Evans Hokkaido)-*Ednrb^{s/}*を樹立した。更にAGラットより*Ednrb^{s/}*遺伝子座をF344ラットに導入したコンジェニック系

F344-*Ednrb*^{s/}も樹立した。これら3系統を用い巨大結腸症と難聴に対する遺伝学的背景の影響を調べた。3系統のラットは腸管神経節欠損程度に違いが見られた。AGH-*Ednrb*^{s/}が最も重症で、F344-*Ednrb*^{s/}は約60%のラットが症状を示さず最も軽症であった。この結果より、遺伝学的背景によっては*Ednrb*遺伝子変異のみでは腸管神経節の欠損を起こさないことが示唆された。更に、聴性脳幹反応により聴力を計測した結果、3系統全てにおいて同程度の先天性難聴であることが判明した。これらの結果から*Ednrb*^{s/}変異ラットにおいて、腸管神経節と内耳の形成には異なる背景遺伝子が作用していることが示唆された。第二章では、AGHとF344系統において巨大結腸症の重症度の系統差があることから、修飾遺伝子を同定するため、両系統ラットのF2ホモ個体を作成し、神経節の欠損程度を量的形質として quantitative trait locus (QTL)解析を行った。QTL解析の結果、第2染色体上のマイクロサテライトマーカー*D2Mit5*の近傍に有意なQTLが検出された。この付近には同じくHSCRの原因遺伝子の一つである glial cell line-derived neurotrophic factor (*GDNF*) 遺伝子座が存在していることから、*GDNF*との関係が示唆された。第三章では同じく*Ednrb*遺伝子変異を有するJF1マウスのHSCRモデル動物としての有用性の検討を行った。日本産愛玩マウスから近交系化された

JF1/Msマウスは同じく *Ednrb* 遺伝子に変異（第1イントロンへのレトロポゾンの挿入変異、*Ednrb^Δ*）を有し、*Ednrb* の発現量が低下することによって piebald 被毛を呈するものの腸管神経節の異常はないとされていた。しかし、JF1の腸管神経節を acetylcholinesterase (AChE) ホールマウント染色によって調べたところ、大腸で神経線維の密度が有意に低いことが明らかになった。更に、NADPHジアホラーゼホールマウント染色にて神経細胞体の数(密度)を調べたところ、JF1大腸の近位端と遠位端でコントロールマウスよりも有意に減少していることが明らかとなった。これらの結果から、JF1マウスでは *Ednrb* 遺伝子の発現量の低下により腸管神経節細胞の発達障害が起きていることが示唆され、JF1マウスもまたHSCRの動物モデルとして有用であることが示唆された。以上の結果から本研究で樹立した3系統の *Ednrb^Δ* 変異ラット及びJF1マウスはHSCRに対して新しい知見を提供できる新規有用動物モデルとして期待される。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	安居院	高 志
副 査	教 授	昆	泰 寛
副 査	教 授	木 村	和 弘
副 査	准教授	佐々木	宣 哉

学 位 論 文 題 名

The development of animal models for Hirschsprung disease carrying mutations of the endothelin receptor type B gene

(エンドセリンレセプタータイプB遺伝子に変異を有するヒルシュスプルング病モデル動物の開発)

神経堤細胞の遊走及び増殖異常により先天性巨大結腸症 (Hirschsprung disease, HSCR) が発症することが知られている。Aganglionosis (AG) ラットは国内で発見された HSCR モデル動物で、頭部に一部有色部位を残す白色被毛と腸管神経節欠損による巨大小腸及び結腸症を呈し、生後 3 週齢までに全例死亡する。原因はエンドセリンレセプタータイプ B (*Ednrb*) 遺伝子の欠失変異 (*Ednrb^{sl}*) による発現低下異常である。AG ラットはクローズドコロニーのため遺伝学的解析には不向きであった。そこで申請者はまず AG ラットの近交系化を行い、AGH (AG Hokkaido)-*Ednrb^{sl}* を樹立した。また、同じくクローズドコロニーで *Ednrb^{sl}* 変異を有する Long-Evans 系ラットの近交系化も行い、LEH (Long-Evans Hokkaido)-*Ednrb^{sl}* を樹立した。更に AG ラットより *Ednrb^{sl}* 遺伝子座を F344 ラットに導入したコンジェニック系 F344-*Ednrb^{sl}* も樹立した。これら 3 系統を用い巨大結腸症と難聴に対する遺伝学的背景の影響を調べた。3 系統のラットは腸管神経節欠損程度に違いが見られた。AGH-*Ednrb^{sl}* が最も重症で、続いて LEH-*Ednrb^{sl}*、そして F344-*Ednrb^{sl}* が最も軽症であった。この結果より、遺伝学的背景によっては *Ednrb* 遺伝子変異のみでは腸管神経節の欠損を起こさないことが示唆された。更に、聴性脳幹反応により聴力を計測した結果、3 系統全てにおいて同程度の先天性難聴であることが判明した。これらの結果から *Ednrb^{sl}* 変異ラットにおいて、腸管神経節と内耳の形成には異なる背景遺伝子が作用していることが示唆された。

次に申請者は、AGH と F344 系統において巨大結腸症の重症度に系統差があることから、その修飾遺伝子を同定するため、両系統ラットの F2 個体を作出し、神経節の欠損程度を量的形質として quantitative trait locus (QTL) 解析を行った。QTL 解析の結果、第 2 染色体上のマイクロサテライトマーカー *D2Mit5* の近傍に有意な QTL が検出された。この付近には同じく HSCR の原因遺伝子の一つである glial cell line-derived neurotrophic factor (*Gdnf*) 遺伝子座が存在していることから、*Gdnf* との関係が示唆された。

更に申請者は同じく *Ednrb* 遺伝子変異を有する JF1 マウスの HSCR モデル動物としての

有用性の検討を行った。日本産愛玩マウスから近交系化された JF1/Ms マウスは同じく *Ednrb* 遺伝子に変異を有し、*Ednrb* の発現量が低下することによって piebald 被毛を呈するものの腸管神経節の異常はないとされていた。しかし、JF1 の腸管神経節をアセチルコリンエステラーゼホールマウント染色によって調べたところ、大腸で神経線維の密度が有意に低いことが明らかになった。更に、NADPH ジアホラーゼホールマウント染色にて神経細胞体の数(密度)を調べたところ、JF1 大腸の近位端と遠位端でコントロールマウスに比べ有意に減少していることが明らかとなった。これらの結果から、JF1 マウスでは *Ednrb* 遺伝子の発現量の低下により腸管神経節細胞の発達障害が起きていることが示唆され、JF1 マウスもまた HSCR の動物モデルとして有用であることが示唆された。以上の結果から本研究で樹立した 3 系統の *Ednrb*^{sl} 変異ラット及び JF1 マウスは HSCR に対して新しい知見を提供できる新規有用動物モデルであることが提起された。

以上一連の研究成果は獣医学の分野において新しい知見を与えるものと判断された。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者、党 瑞華氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。