

総説

遺伝子ノックイン法により作製したハンチントン病 モデルマウスの特徴

澤田 浩秀

Characterization of Huntington's Disease Model Mice Generated by Gene Targeted Knock-in Method

Hirohide SAWADA

SUMMARY

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder caused by the expansion of CAG repeats in exon 1 of the HD gene. Thus HD patients have the expanded polyglutamine tracts in the N-terminal fragment of huntingtin. To clarify the molecular mechanisms of the HD pathology, a knock-in mouse was generated by replacing exon 1 of the mouse HD gene with exon 1 containing expanded 77 CAG repeats of the human HD gene. Chimeric protein composed of human mutated exon 1 and mouse huntingtin were expressed in brain and peripheral tissues. Neuropathological features in elderly heterozygous knock-in mice, aggregates of N-terminal fragments of huntingtin were specifically formed in nuclei and neuropils in the striatal neurons, and in neuropils in their projection regions. These mutant mice demonstrated abnormal aggressive behavior. In elderly homozygous knock-in mice, heavy deposits of intranuclear and neuropil aggregates were detected, and characteristic large perikaryal aggregates were also found. However, cell death was not observed in these mutant mice. These huntingtin knock-in mice might be useful to provide an effective therapeutic approach against HD.

キーワード：ハンチントン病、ノックインマウス、ハンチンチン凝集体、ポリグルタミン、線条体

はじめに

ハンチントン病 (HD) は常染色体優性遺伝方式をとる進行性の神経変性疾患であり、精神障害、知能異常、不随意運動などの症状を呈する。HD

は通常中年期に発症し、発症から約20年すると死に至る例が多い。HDの原因遺伝子 (HD遺伝子) は、1993年に連鎖解析により4p16.3の遺伝子座にあることが判明し、その遺伝子の5'領域のエクソン1に存在するCAGリピートが異常に伸長

していることが発見された¹⁾。そのためHD患者では、それから翻訳される蛋白質であるハンチンチンのN末端に存在するポリグルタミン鎖も異常に長くなっている。

HD患者はその世代を経るに従ってCAGリピートが徐々に長くなる現象が認められる。このCAGリピートの長さと言症年齢との間には逆相関の関係が認められるため (anticipation)、患者の孫の世代になればなるほど発症年齢が早くなる²⁾。また、CAGリピートの長さが長いほど、重篤な症状を呈することが知られている^{3), 4)}。神経病理学的には、HDは線条体の神経細胞が選択的に変性、脱落し、そこにグリア細胞が増生する特徴をもつ。病初期には、神経変性は主として線条体に起こるが、病期が進行すると大脳皮質その他の領域にも及ぶ。さらに、線条体などの神経細胞の核および軸索、樹状突起を含む細胞内に、ハンチンチンN末端部分を含んだ凝集体が沈着するという特徴もっている。これらの所見はHD患者剖検脳において認められた^{5), 6)}。

従来行われてきた剖検脳のみによる解析では、HDの発症メカニズムを解明することは大変困難であった。その発症機構や治療法開発について研究する目的で、多くの研究グループによってHDモデルマウスが作られた。マウス受精卵に導入遺伝子を直接注入して作るトランスジェニックマウスをツールとするグループ⁷⁾⁻¹¹⁾と、ES細胞内での遺伝子相同組換えを利用し、そのES細胞を受精卵に注入することによってノックインマウスを作製したグループ¹²⁾⁻¹⁴⁾とが存在する。筆者らは後者の1グループとして、ヒトHD患者由来の伸長されたCAGリピートを含んだHD遺伝子の一部分を、マウスHD遺伝子の相同領域と置換させることにより、ノックインマウスの作製を行った¹⁵⁾。このマウスは、ヒトハンチンチン蛋白質が発現するので、ヒトハンチンチンノックインマウスと呼んだ。

本総説は、筆者のグループで作製したハンチン

チンノックインマウスで観察された神経病理学的所見と行動異常に関する表現型を中心にまとめた。ノックインマウス作製に関しては文献15に、マウスの神経病理および行動などの表現型に関する内容は文献16に詳細に記述されている。このマウスでは、ヒトHDと共通する特徴的な病理学的所見である神経細胞内凝集体が観察された。これが神経変性や細胞死とどのように関わるのか、神経細胞にどのような影響を与えるのかなどについて、他のグループで作製されたHDモデルマウスによる成績と比較するとともに、その意義について考察した。

I. ハンチンチンノックインマウスの作製

ある特定遺伝子に点突然変異、欠失、挿入などの修飾が加えられた個体を発生させる遺伝子ノックイン法を利用して、HDモデルマウスの作製を行った。相同組換えの原理により、HD患者由来の伸長された80CAGリピートを含むヒト遺伝子をマウスに導入することにより、マウス内在性HD遺伝子のエクソン1が伸長CAGリピートを含むヒトHD遺伝子のエクソン1と置換された (図1)。以下に、実際に行ったノックインマウス作製方法とその結果について述べる。

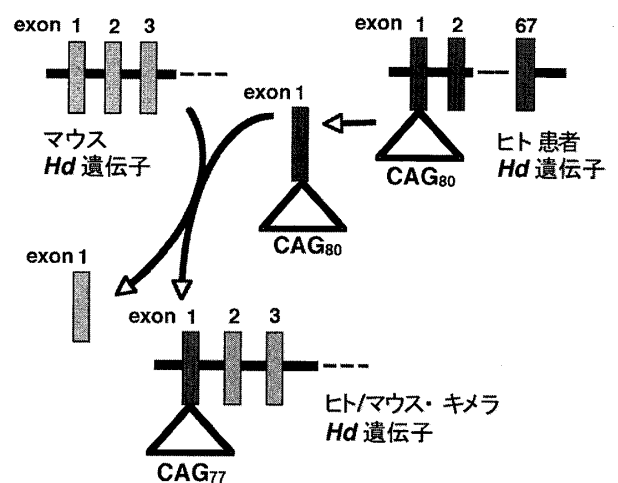


図1 ハンチンチンノックインマウスの作製ストラテジ
80CAGリピートを持ったヒトHD患者由来のHD遺伝子エクソン1を含む部分をES細胞に導入し、マウス内在性HD遺伝子のエクソン1と置換された細胞を選択したところ、最終的にマウスでは77CAGリピートを持ったヒト/マウス・キメラ遺伝子が発現した。

相同組換え用DNAとして、80CAGリピートを含んだヒトHD遺伝子のエクソン1の部分、マウスHD遺伝子のエクソン1の位置に挿入、置換を行い、さらにネオマイシン耐性遺伝子を組込むことによって作製した。この組換え用DNAをエレクトロポレーションによってES細胞に導入し、またES細胞の培養液にネオマイシンを加え生き残ったES細胞のクローンを選別し、さらにサザン・ブロット法を用いて特異的に組換えされたES細胞クローンを厳選したところ、18クローンの組換えES細胞を得ることができた。

これらの選別されたES細胞を、C57BL/6Jマウスの3.5日受精卵(胚盤胞)に注入し、さらに受精卵を偽妊娠雌ICRマウスの子宮に移植することにより、キメラマウスを得ることができた(図2)。

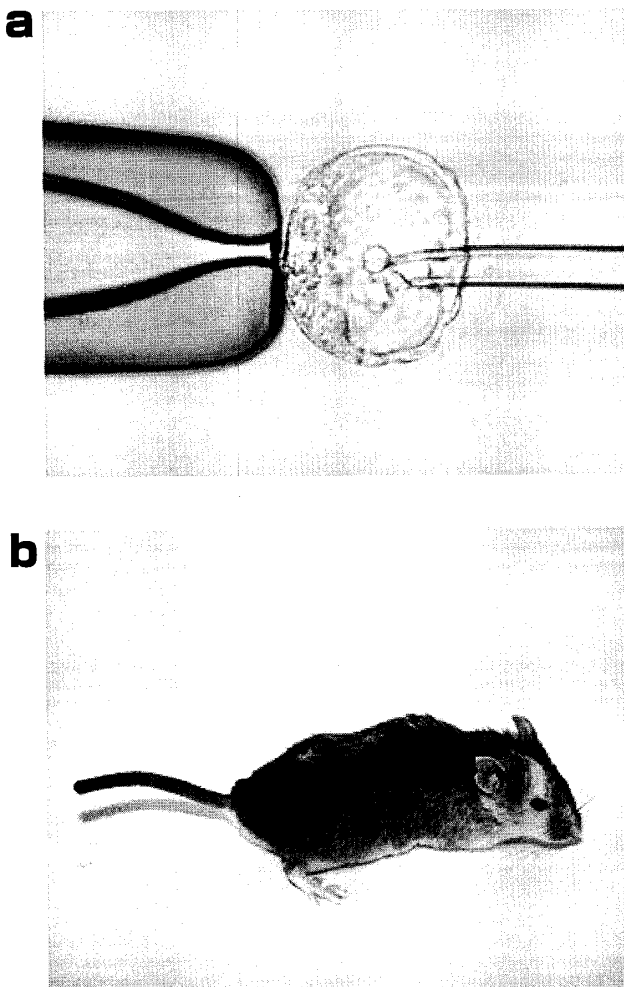


図2 ノックインマウスの作製

- ES細胞をC57BL/6Jマウス受精卵(胚盤胞)へ注入
- 受精卵を偽妊娠雌マウスに移植して得られたキメラマウス

実験に用いるためのマウスを選別するために、すべてのキメラマウスをC57BL/6Jマウスと交配させた。遺伝子が子孫に伝わった(germline transmission)系統は、18クローンのES細胞由来のもののうち1つのクローン(77CAGリピート)のみであった。キメラマウスをC57BL/6Jマウスと交配させて、ヘテロ接合体(Hht-Q79/+)マウスが得られ、さらにヘテロ接合体マウス同士の交配によってホモ接合体(Hht-Q79/Q79)マウスを得ることができた。

II. ノックインマウスにおける変異ハンチンチン蛋白質の発現

ノックインマウスにおいて変異ハンチンチン蛋白質が発現したか否かを調べるために、各遺伝子型のマウスの尾およびHht-Q79/+マウスの各臓器の抽出物を用いてウェスタン・ブロット法によって確認した。蛋白質の検出には、ハンチンチンの181-810アミノ酸を認識する抗体(MAB2166)を用いた。20週齢および100週齢の正常マウスでは、約350kDaのハンチンチン蛋白質のバンドが確認され、同じ週齢のHht-Q79/+マウスでは、そのバンドに加え少し分子量の大きい変異ハンチンチンと考えられるもう1本のバンドが確認された。Hht-Q79/Q79マウスでは変異蛋白質のみが検出された(図3a)。また、Hht-Q79/+マウスの各臓器におけるハンチンチンの発現について確認したところ、脳、肺、心臓、肝臓などでそれぞれ正常ハンチンチンと変異ハンチンチン蛋白質が検出された(図3b)。ヒト由来の伸長CAGリピートを含んだHD遺伝子をマウスに導入することにより、伸長ポリグルタミン鎖由来の変異ハンチンチン蛋白質がマウスにも発現されたことになる。

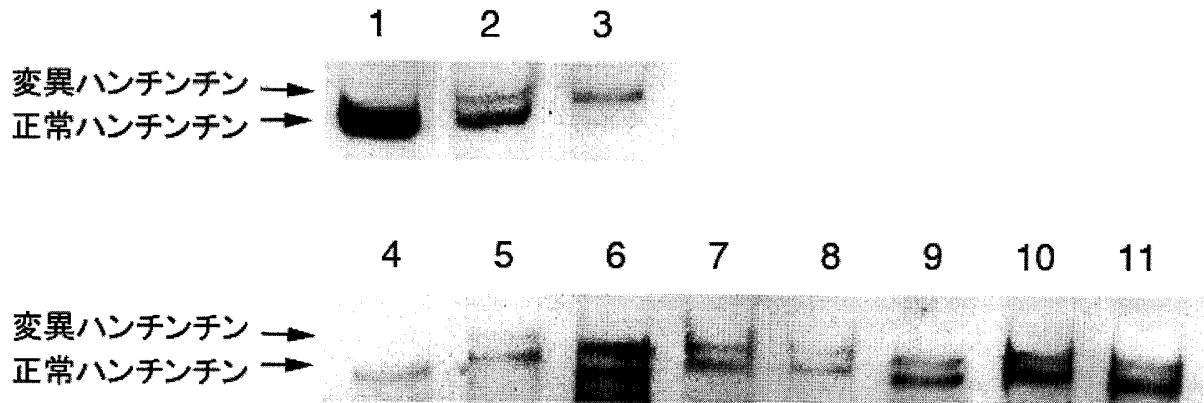


図3 ハンチンチンノックインマウスにおける変異ハンチンチンの発現

ウェスタン・ブロット法により、正常マウスでは約350kDaの正常ハンチンチン蛋白質のバンドが1本確認され (lane1)、Hht-Q79/+マウスでは正常および変異ハンチンチンの2本のバンドが (lane2)、さらにHht-Q79/Q79マウスでは変異ハンチンチンのみが検出された (lane3)。また、相同組換えされたES細胞 (lane4)、Hht-Q79/+マウスの脳 (lane5)、肺 (lane6)、心臓 (lane7)、肝臓 (lane8)、脾臓 (lane9)、腎臓 (lane10)、および精巢 (lane11) でそれぞれ正常および変異ハンチンチン蛋白質が確認された。

Ⅲ. ハンチンチンノックインマウスの特徴的な神経細胞内の凝集体形成

1. ノックインマウスの線条体神経細胞にハンチンチンN末端由来の凝集体が形成される

ハンチンチンノックインマウスの脳に、ヒト患者でみられるような異常が認められるか否かを調べるために、マウスの脳を肉眼的に観察するとともに、HE染色、クリューバー・バレラ染色、各種の抗体を用いた免疫染色による組織学的観察を行った。100週齢までのHht-Q79/+マウス、Hht-Q79/Q79マウスの脳を観察したところ、特に肉

眼的に見た異常と、HE染色、クリューバー・バレラ染色で観察した限り異常は認められなかった。正常マウスの脳を、ハンチンチンN末端の17アミノ酸を認識するN-18抗体を用いた免疫染色を行ったところ、線条体では細胞質内の特に核周辺部が弱く染まり、正常ハンチンチンの分布と一致した所見が認められた^{17),18)}(図4a)。しかし、Hht-Q79/+マウスの脳を本抗体で染めたところ、60週齢以降のマウスにおいては、線条体神経細胞の核内が全体的に染まり、核内およびneuropil (灰白質における神経細胞体以外の軸索、樹上突起など)に凝集体が沈着しているのが観察された(図4b,

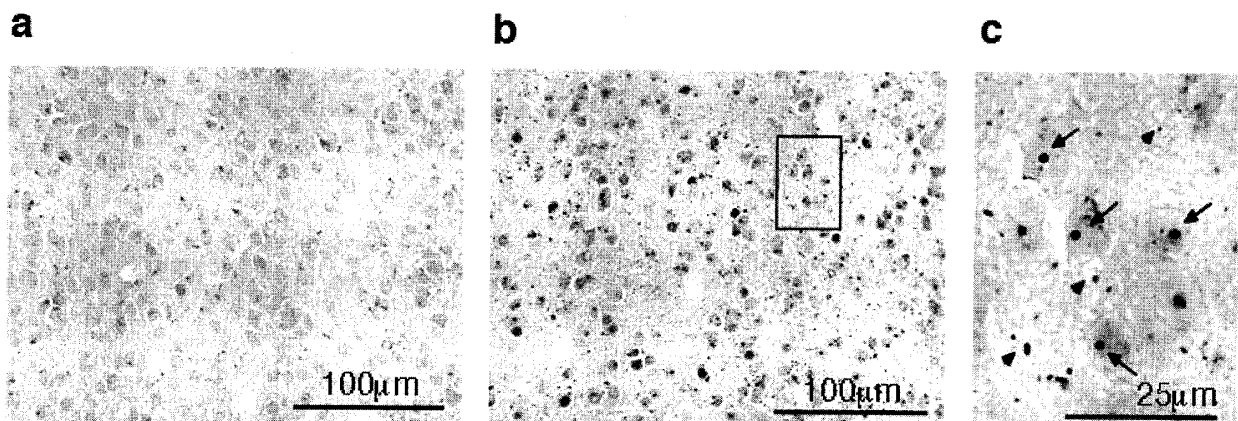


図4 ハンチンチンノックインマウスの線条体神経細胞に形成された凝集体

ハンチンチンN末端の17アミノ酸を認識するN-18抗体を用いて染色した、100週齢の正常マウス (a) と Hht-Q79/+ マウス (b, c) の線条体 (側坐核) の組織像を示す。(c) は (b) の拡大像を示す (矢印は核内凝集体、矢頭はneuropil凝集体)。

c)。Hht-Q79/+マウスにおけるそれらの陽性所見は、いわゆる線条体（側坐核、狭義の線条体、および嗅結節）のみに観察された。しかし、ハンチンチンMAB2166抗体で線条体などを染色しても、これらの凝集体は染まらなかったため、ハンチンチンのN末端のみが凝集に関与していることが推察された。他方、Hht-Q79/+マウスの脳では、線条体以外の大脳皮質、海馬、扁桃核、小脳、橋、延髄などの領域では凝集体は観察されなかった。ヘテロ接合体HDノックインマウスでは、神経細胞内凝集体が線条体特異的に形成されていた。

2. ハンチンチン凝集体の週齢依存的増加と凝集体形成細胞の特異性

ハンチンチン神経細胞核内またはneuropil凝集体の形成に関して、60週齢から100週齢までのマウスについて観察したところ、週齢に依存している線条体におけるハンチンチン凝集体は増加

していた（図5 a-c）。Hht-Q79/+マウスの線条体各領域における核内凝集体について、週齢による変動について図6に示した。つまり、60週齢では少量の凝集体が形成されるのに対して、80週齢から100週齢にかけ急速に多くの凝集体が形成された。いわゆる線条体の中でも、特に側坐核において凝集体の形成された細胞が顕著に増加していた¹⁶⁾。また、これらの神経細胞が投射し別のニューロンにシナプスを形成する領域、つまり線条体に対する淡蒼球、黒質網様部、側坐核に対する腹側淡蒼球について観察したところ、Hht-Q79/+マウスではこれらの領域のneuropilにN-18抗体または伸長ポリグルタミンを特異的に認識する1C2抗体に染まる凝集体が観察され、凝集体は週齢に依存して増加していた（図5 d-f）。HDは進行性の疾患であり、このノックインマウスにおいても加齢に伴う病変の進行が観察されたことになる。

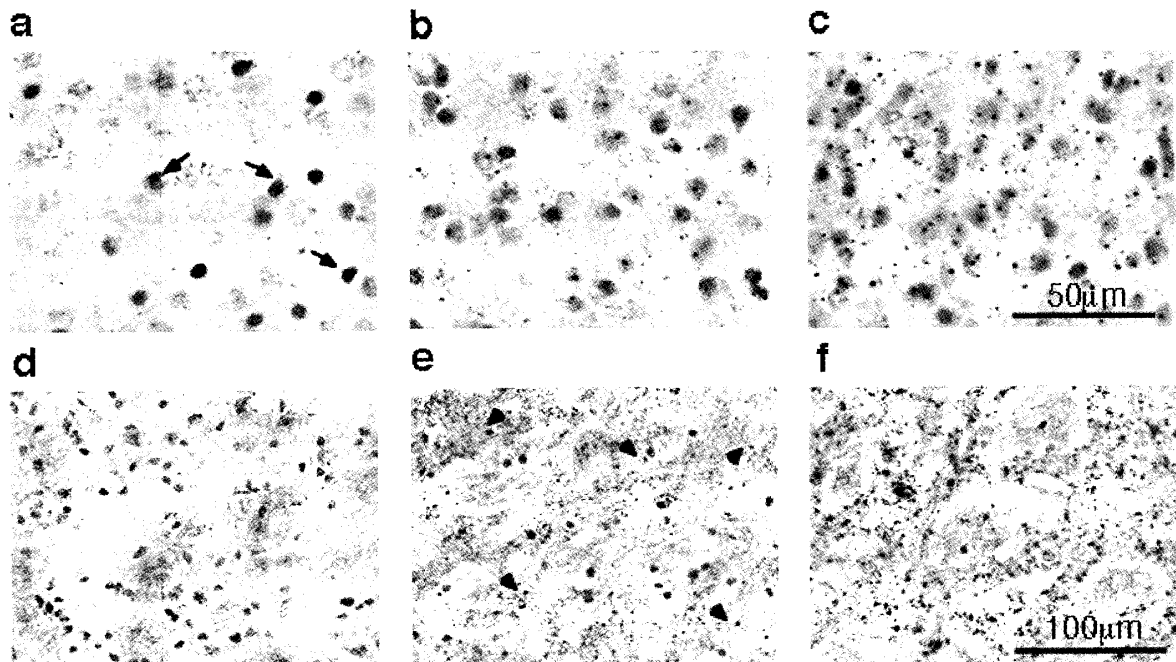


図5 ハンチンチン凝集体は週齢に依存して増加

Hht-Q79/+マウスのそれぞれ60週齢(a)、80週齢(b)、100週齢(c)における線条体(側坐核)のN-18抗体染色像と、80週齢(e)、100週齢(f)における淡蒼球の伸長ポリグルタミン(1C2)抗体を用いた染色像を示す。対照として100週齢正常マウス(d)における淡蒼球の1C2抗体染色像を示す。

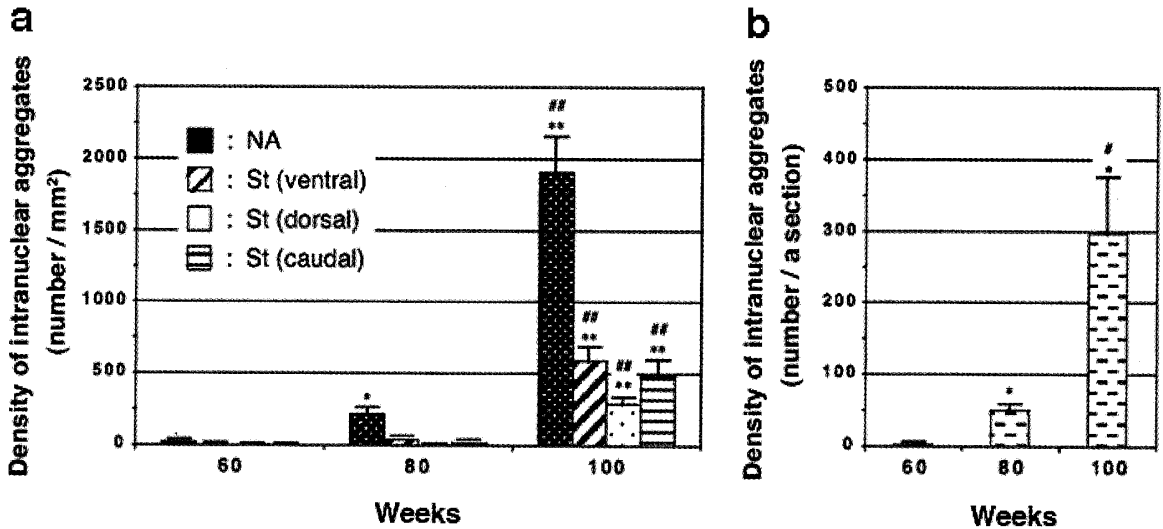


図6 線条体内における核内凝集体形成細胞の週齢による変動

60週齢、80週齢、100週齢のそれぞれHht-Q79/+マウスの線条体（側坐核、線条体、嗅結節）における核内凝集体形成細胞数を示す。側坐核、線条体については面積当たりの凝集体形成細胞数（a）を、嗅結節については切片毎の平均の凝集体形成細胞数（b）を計測した。

NA：側坐核、St(ventral)：腹側線条体、St(dorsal)：背側線条体、St(caudal)：尾状側線条体。* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ （対60週齢Hht-Q79/+マウス）。# $p < 0.05$ ；## $p < 0.01$ （対80週齢Hht-Q79/+マウス）。

3. ホモハンチンチンノックインマウスは顕著な凝集体の沈着と特徴的な細胞質内凝集体の沈着が観察される

変異ハンチンチンの発現がいつそう増えていたら、このノックインマウスはどのような脳病理像を呈するであろうか。そのことについて、ホモ接合体マウスであるHht-Q79/Q79マウスにおける

ハンチンチン凝集体の分布、特徴について、同週齢のヘテロ接合体マウスと比較し、観察した。このマウスでは、Hht-Q79/+マウスと比較して線条体神経細胞に形成された凝集体がより顕著に増えていたことと、神経細胞質内の核周囲部に特徴的な大型の凝集体も観察された（図7）。100週齢のHht-Q79/Q79マウスをHht-Q79/+マウスと比

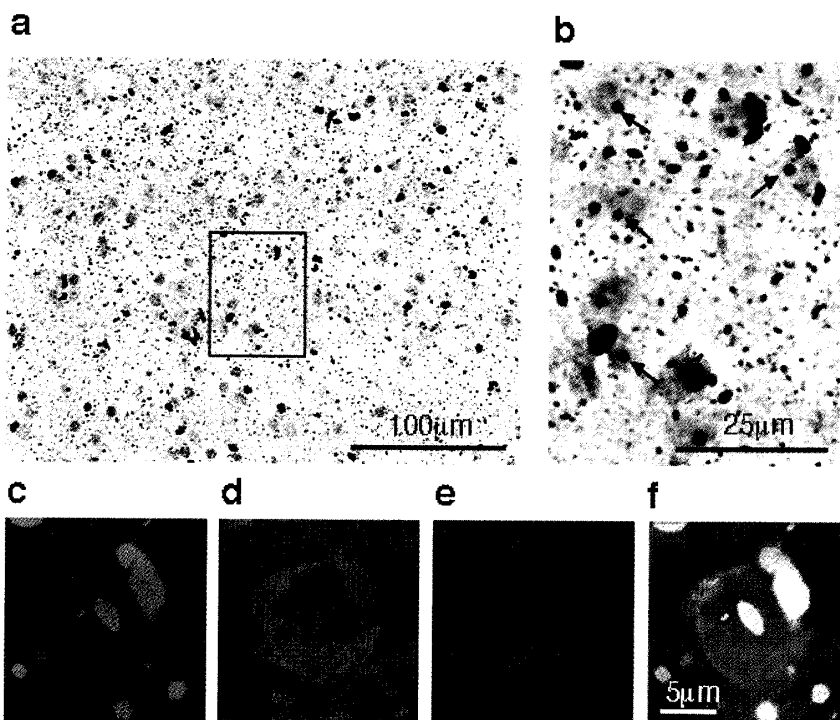


図7 ホモハンチンチンノックインマウスにおける特徴的な細胞質内大型凝集体の形成

N-18抗体を用いて染色した、100週齢のHht-Q79/Q79マウスの線条体（側坐核）の組織像を示す（a, b）。(b)は(a)の拡大像を示す（黒矢印は核内凝集体、白矢印は細胞質内凝集体、白矢頭はneuropil凝集体）。二重染色による線条体神経細胞と凝集体との関係（c-f）について、それぞれ、N-18抗体（c）、細胞質（DARPP-32抗体、d）、核（TO-PRO-3、e）染色と、これらの合成像（f）を図に示す。

較すると、側坐核、線条体、嗅結節におけるハンチンチン凝集体は顕著に増え、Hht-Q79/+マウスでは確認されなかった細胞質内凝集体が多数認められた¹⁶⁾。さらに、Hht-Q79/+マウスと比較して、凝集体の形成はいわゆる線条体以外にも、中隔、大脳皮質、小脳顆粒層にも認められた(表1)。

	Hht-Q79/+ (100週) (n=3)		Hht-Q79/Q79 (100週) (n=2)	
	核内凝集体	細胞質内凝集体	核内凝集体	細胞質内凝集体
嗅結節	297 ± 132	—	411 ± 69	231 ± 123
側坐核	1900 ± 450	—	1957 ± 123	1131 ± 355
線条体 (腹側)	588 ± 168	—	958 ± 117	466 ± 126
線条体 (背側)	288 ± 66	—	909 ± 27	137 ± 67
線条体 (尾状側)	494 ± 160	—	978 ± 70	303 ± 85
中隔	—	—	619 ± 209	129 ± 33
大脳皮質	—	—	±a	—
小脳 (顆粒層)	—	—	874 ± 147	—

表1 100週齢のHht-Q79/+マウスおよびHht-Q79/Q79マウスの脳内各領域における核内凝集体および細胞質内凝集体形成細胞数

5-20切片中の単位面積当たりの核内および細胞質内の凝集体形成細胞数を計測 (number / mm²)。嗅結節は5-6切片中の平均凝集体形成細胞数を計測 (number / section)。a: 核内凝集体形成細胞数は 7-8切片当たり1個

4. ノックインマウスは神経変性および細胞死が認められない

100週齢までのHht-Q79/+マウスおよびHht-Q79/Q79マウスの線条体を中心に、神経細胞の減少、脱落および変性が認められるか否かについてHE染色、クリューバー・バレラ染色などで観察したところ、これらの明らかな所見は観察されなかった。また、in situアポトーシスキットやsingle-stranded DNA (ssDNA) 抗体染色による標本を用いて細胞死について観察を行ったところ、陽性所見は得られなかった。さらに、神経変性によるグリア細胞増生反応を見るため抗glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体染色を用いてアストロサイトの定量化を行ったところ、ノックインマウスにおける明らかなアストロサイトの増加は認められなかった。

本ノックインマウスは神経細胞内に顕著な凝集体が認められるにもかかわらず、細胞変性や細胞

死の所見は認められないことから、HDにおける初期症例のモデルとも考えられる。ヒト剖検脳における報告では、線条体などを中心として核内あるいはneuropil凝集体は観察されているが、ヒト症例では線条体よりも大脳皮質において多くの凝集体が認められ、むしろ線条体では神経細胞死が多く認められた⁶⁾。その点では、ヒト病態との差異を認めざるを得なかった。

IV. ハンチンチンノックインマウスの異常な攻撃性

60-70週齢の Hht-Q79/+ マウスの運動異常、情動異常について、正常マウスとの比較による解析を行った。マウスの自発運動量については、動物用運動自動解析装置を利用して解析した。具体的には、マウスをケージごと本装置上に静置し、30分間の(水平方向の)運動回数、(垂直方向の)立ち上がり回数の測定を行った。両者の計測は3回の異なった日時に行い、慣れるに従って運動量は減少傾向にあったが、Hht-Q79/+ マウスと正常マウスにおける差は認められなかった(図8)。

攻撃性の検定として、resident-intruder 試験を行った¹²⁾。あらかじめ 60-70週齢の雄マウスを試験1ヶ月前から1匹飼いにさせ、検定(resident)用として準備した。試験当日には、12週齢の C57BL/6J 雄マウスを侵入(intruder)用とし、resident マウスのケージに10匹を同時に侵入させた。Resident マウスは intruder マウスに対して攻撃行動を行ったため、6分間におけるマウスの攻撃回数と、intruder マウスに対して最初に攻撃行動をとるまでの時間を計測した。Hht-Q79/+ マウスは正常マウスと比較し、攻撃回数が多いことが観察され、また intruder マウスに攻撃を加えるまでの時間は有意に短かった(図9)。

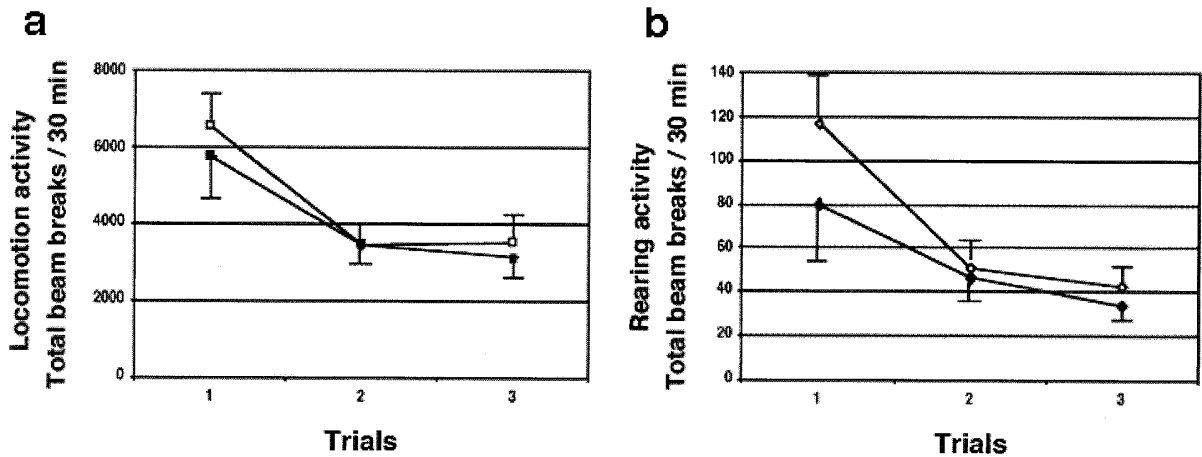


図8 ハンチンチンノックインマウスの運動障害は認められない
60-70週齢のマウスの自発運動量の測定として、30分間の運動回数（水平方向、a）と立ち上がり回数（垂直方向、b）を行った。白：正常マウス、黒：Hht-Q79/+マウス。

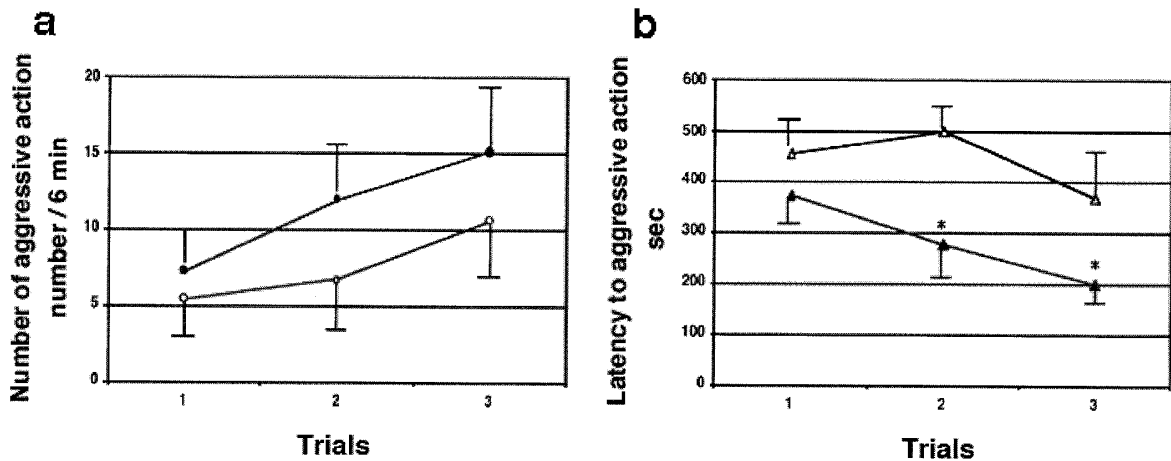


図9 ハンチンチンノックインマウスは攻撃性が亢進
60-70週齢のマウスの攻撃性について、resident-intruder試験による、一定時間における侵入マウスへの攻撃回数 (a) と、侵入マウスに対して最初に攻撃を加えるまでの時間の測定 (b) を行った。白：正常マウス、黒：Hht-Q79/+ マウス。* $p < 0.05$ (対正常マウス)。

前項で記述したように、本ハンチンチンノックインマウスはハンチンチン凝集体が側坐核に多く認められた。この事実は、攻撃性の亢進が認められたことと関係が深いと考えられる。側坐核は情動あるいは報酬行動に関する中枢であり、それに対する線条体は運動調節に大きく関わるといった局在的な機能が存在するからである。他の HD ノックインマウスの研究において、表現型として攻撃性の亢進のみ認められた報告もある¹²⁾。つまり、側坐核において核内などに凝集体が形成されたことにより、その細胞において機能障害が起きている可能性が考えられる。

V. 他のハンチントン病モデルマウスとの比較

HDモデルマウスとして、多くの種類のトランスジェニックマウスあるいはノックインマウスが作製された。前者の方法では、導入遺伝子がマウス内在性遺伝子の何れの場所に組込まれるかは不明であり、挿入された位置によっては導入遺伝子から転写、翻訳されるべき蛋白質が発現しない場合や、あるいは挿入部の内在遺伝子の発現が抑制されると、期待すべき表現型を示さない場合も考えられる。それに比較して後者では、マウス内在遺伝子の特定の位置に導入遺伝子が組込まれるた

めに、前者のような不利益が発生することなく、ヒト遺伝病の理想的なモデルとして考えられる。しかし、実際のHDモデルマウスでは、トランスジェニックマウスでは顕著なHDとしての表現型が観察される報告が多いのに対して⁷⁾⁻¹¹⁾、ノックインマウスではHDとしての表現型に乏しい報告が多い¹²⁾⁻¹⁴⁾。例えば、トランスジェニックマウスモデルとして研究報告の多いR6/2 HDマウスでは、約6週齢から凝集体の形成が線条体以外にも大脳皮質、小脳など広範囲に認められ、顕著な運動障害も観察されている^{7),19)}。しかもこのマウスは150CAGリピートを有するため、早期に発症し症状も重篤である。また、伸長したCAGリピートを含むHD遺伝子全体をcDNAとしてあるいはyeast artificial chromosome (YAC) に挿入して作られたトランスジェニックマウスは、運動障害を伴い、線条体などに凝集体が形成されるとともに、明らかな神経細胞死が認められた^{8),10)}。これらのマウスと比較して、ノックインマウスでは運動障害は認められても軽度で、凝集体の形成は線条体が中心であり、神経細胞死の認められないものが多い¹²⁾⁻¹⁴⁾。本ノックインマウスで観察された所見は、攻撃性亢進の表現型と細胞死を伴わない神経病理学的変化を呈し、ヒトHD患者の病態像と比較して軽度である。しかし、遺伝子の構築はヒトHD患者に最も類似している特徴がある。

VI. 神経細胞内凝集体の形成が神経細胞に及ぼす影響

HDにおける神経細胞の凝集体形成と細胞死との関係について多くの議論が掲げられている。HDはハンチンチン蛋白質におけるポリグルタミン鎖の伸長によって、蛋白質構築が変化し、ポリグルタミンどうしが重合しやすくなり凝集を起こすと考えられている。週齢に依存して凝集体形成細胞が増加するのは、加齢による蛋白質分解および分子シャペロン機能低下も考えられが、詳細は不明である。ポリグルタミンの凝集によって、転写因

子も一緒に凝集に巻き込まれることにより、核内凝集体の形成された神経細胞において転写障害による機能の障害が起こることが実際に報告された²⁰⁾⁻²²⁾。本ノックインマウスにおいても、線条体などの核内凝集体に転写因子であるCREB-binding protein (CBP) が巻き込まれていたことを、この因子に対する抗体とハンチンチン抗体との免疫二重染色によって確認している¹⁶⁾。また、細胞レベルの実験で、伸長CAGリピートを含んだ遺伝子を導入した細胞に、神経栄養因子を加えた場合と加えなかった場合を比較すると、栄養因子を加えると死細胞の割合は減ったものの、逆に核内凝集体を形成した細胞は増えていた²³⁾。さらに、コンディショナルトランスジェニックマウスを使ったグループでは、テトラサイクリン誘導体によりハンチンチンの伸長ポリグルタミンの発現を自由にonまたはoffできるシステムを利用し、この発現をonにするとマウスの線条体の萎縮、凝集体形成、運動異常を認めたが、驚くことに、発現をoffにすることによってこれらの所見は可逆的に消失し正常のマウスに戻っていた²⁴⁾。これらの事実より、核内などに形成される凝集体は必ずしも細胞死に関わるとは限らず、機能障害と関係が深いことが推察される。

ま と め

HD患者由来の伸長CAGリピートを含むヒトHD遺伝子をマウスに導入することにより、マウスHD遺伝子のエクソン1を含む相同領域が置換され、ヒトハンチンチンノックインマウスを作製することができた。このマウスは、ハンチンチンN末端においてポリグルタミン鎖の長くなった変異ハンチンチン蛋白質が全身に発現された。マウスの老齢化に伴い、60週齢以降のマウスの側坐核、線条体、嗅結節においてハンチンチンN末端におけるポリグルタミンの凝集体が、それらの神経細胞の核内およびneuropil、さらにはそれらが投射する領域のneuropilに形成され、週齢に依存して増え

ていた。本ノックインマウスにおける明らかな神経細胞変性および細胞死は観察されなかった。また、Hht-Q79/+マウスでは運動異常、運動量の変化等は認められなかったものの、攻撃性の亢進が認められた。これらの結果は、他のHD研究グループ、特にノックイン法によって作製されたモデルマウスにおいても観察された所見でもある¹²⁾⁻¹⁴⁾。しかし、本ノックインマウスの特徴として、(1)ハンチンチン凝集体が側坐核の神経細胞に顕著であったこと、(2)ホモ接合体マウスでは神経細胞の核内およびneuropil凝集体以外にも細胞質内に特徴的な大型の凝集体が形成されたことである。

本ノックインマウスで認められたこれらの所見をヒトHD患者の病態と比較すると、本マウスはHDにおける初期病態モデルと考えられ、またHDの発症メカニズムを研究するためには最適なモデル動物とも考えられる。さらに、本ノックインマウスはHDに対する新たな治療法開発へのツールとしても役立つと期待される。

付記および謝辞

本総説は、藤田保健衛生大学・総合医科学研究所ならびに疾患モデル教育研究センターで行われた研究についてまとめたものである。本論文に関する研究でご指導ならびにご協力いただいた藤田保健衛生大学総合医科学研究所・永津俊治名誉教授をはじめ、同衛生学部・山田晃司講師、同疾患モデルセンター・西井一宏助教、カルナバイオサイエンス(株)・石黒啓司研究部長には深く感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971-983.
- 2) Duyao, M., Ambrose, C., Myers, R., Novelletto, A., Persichetti, F., Frontali, M., Folstein, S., Ross, C., Franz, M., Abbott, J. et al., 1993. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's Disease. *Nat. Genet.* 4, 387-392.
- 3) Snell, R.G., MacMillan, J.C., Cheadle, J.P., Fenton, I., Lazarou, L.P., Davis, P., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., Harper, P.S., Shaw, D.J., 1993. Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotype variation in Huntington's Disease. *Nat. Genet.* 4, 393-397.
- 4) Andrew, S.E., Goldberg, Y.P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M.A. et al., The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's Disease. *Nat. Genet.* 4, 398-403.
- 5) DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., Aronin, N., 1997. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990-1993.
- 6) Gutekunst, C.A., Li, S.H., Yi, H., Mulroy, J.S., Kuemmerle, S., Jones, R., Rye, D., Ferrante, R.J., Hersch, S.M., Li, X.J., 1999. Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J. Neurosci.* 19, 2522-2534.
- 7) Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trottier, Y., Lehrach, H., Davies, S.W., Bates, G.P., 1996.

- Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87, 493-506.
- 8) Reddy, P.H., Williams, M., Charles, V., Garrett, L., Pike-Buchanan, L., Whetsell, W.O., Miller, G., Tagle, D.A., 1998. Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. *Nat. Genet.* 20, 198-202.
- 9) Schilling, G., Becher, M.W., Sharp, A. H., Jinnah, H.A., Duan, K., Kotzuk, J.A., Slunt, H.H., Ratovitski, T., Cooper, J.K., Jenkins, N.A. et al., 1999. Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum. Mol. Genet.* 8, 397-407.
- 10) Hodgson, J.G., Agopyan, N., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., LePiane, F., Singaraja, R., Smith, D.J., Bissada, N., McCutcheon, K., Nasir, J. et al., 1999. A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* 23, 181-192.
- 11) Laforet, G.A., Sapp, E., Chase, K., McIntyre, C., Boyce, F.M., Campbell, M., Cadigan, B.A., Warzecki, L., Tagle, D.A., Reddy, P.H. et al., 2001. Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 21, 9112-9123.
- 12) Shelbourne, P.F., Killeen, N., Hevner, R.F., Johnston, H.M., Tecott, L., Lewandoski, M., Ennis, M., Ramirez, L., Li, Z., Iannicola, C. et al., 1999. A huntington's disease CAG expansion at the murine *Hdh* locus is unstable and associated with behavioural abnormalities in mice. *Hum. Mol. Genet.* 8, 763-774.
- 13) Wheeler, V.C., White, J.K., Gutekunst, C.A., Vrbanc, V., Weaver, M., Li, X.J., Li, S.H., Yi, H., Vonsattel, J.P., Gusella, et al., 2000. Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny neurons in *Hdh*^{Q92} and *Hdh*^{Q111} knock-in mice. *Hum. Mol. Genet.* 9, 503-513.
- 14) Lin, C.H., Tallaksen-Greene, S., Chien, W.M., Cearley, J.A., Jackson, W.S., Crouse, A.B., Ren, S., Li, X.J., Albin, R.L., Detloff, P.J., 2001. Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 10, 137-144.
- 15) Ishiguro, H., Yamada, K., Sawada, H., Nishii, K., Ichino, N., Sawada, M., Kurosawa, Y., Matsushita, N., Kobayashi, K., Goto, J. et al., 2001. Age-dependent and tissue-specific CAG repeat instability occurs in mouse knock-in for a mutant Huntington's disease gene. *J. Neurosci. Res.* 65, 289-297.
- 16) Sawada, H., Ishiguro, H., Nishii, K., Yamada, K., Tsuchida, K., Takahashi, H., Goto, J., Kanazawa, I., Nagatsu, T., 2007. Characterization of neuron-specific huntingtin aggregates in human huntingtin knock-in mice. *Neurosci. Res.* 57, 559-573.
- 17) DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C.,

- Martin, E., Vonsattel, J.P., Carraway, R., Reeves, S.A. et al., 1995. Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 14, 1075-1081.
- 18) Sharp, A.H., Love, S.J., Schilling, G., Li, S.H., Li, X.J., Bao, J., Wagster, M.V., Kotzuk, J.A., Steiner, J.P., Lo, A. et al., 1995. Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron* 14, 1065-1074.
- 19) Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., Bates, G.P., 1997. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90, 537-548.
- 20) Shimohata, T., Nakajima, T., Yamada, M., Uchida, C., Onodera, O., Naruse, S., Kimura, T., Koide, R., Nozaki, K., Sano, Y. et al., 2000. Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nat. Genet.* 26, 29-36.
- 21) Nucifora, F.C. Jr., Sasaki, M., Peters, M.F., Huang, H., Cooper, J.K., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S., Troncoso, J., Dawson, V.L. et al., 2001. Interference by huntingtin and atrophin-1 with CBP-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 291, 2423-2428.
- 22) Dunah, A.W., Jeong, H., Griffin, A., Kim, Y.M., Standaert, D.G., Hersch, S.M., Mouradian, M.M., Young, A.B., Tanese, N., Krainc, D., 2002. Sp 1 and TAFII 130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* 296, 2238-2243.
- 23) Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., Greenberg, M.E., 1998. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95, 55-66.
- 24) Yamamoto, A., Lucas, J.J., Hen, R., 2000. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101, 57-66.