

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

小児期の大脳白質病変の病態解明に関する研究

(H18-こころ-一般-015)

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井 上 健

国立精神・神経センター 神経研究所

平成19(2007)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
小児期の脳白質病変の病態解明に関する研究-----	1
井上 健	
II. 分担研究報告	
1. 遺伝性中枢性髄鞘形成不全疾患の病態解明と治療法開発に関する研究	5
井上 健	
2. 遺伝性髄鞘形成不全における転写因子 SOX10 の翻訳後修飾の解析	9
赤澤智宏	
3. 小児期の遺伝性脳白質変性疾患の病態解明に関する研究	13
小坂 仁	
4. 超早産児脳虚血性脳障害の病態解明に関する研究	19
出口貴美子	
III. (資料) 平成18年度第1回班会議資料	23
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	40
V. 研究成果の刊行物・別刷	45

小児期の脳白質病変の病態解明に関する研究

主任研究者 井上 健 国立精神・神経センター 神経研究所疾病研究第二部

研究要旨

小児期の脳白質病変について、遺伝的内因性要因と虚血性外因性要因の二つの側面から病態を解明する。遺伝性髄鞘形成不全疾患と早産児の深部白質の虚血病変の二つに焦点を絞り、細胞生物学、分子生物学および神経病理学的手法を用いて多面的に脳白質病変をとらえ、その病因・病態機序に即した治療法の開発を目指した基礎研究を行う。

研究組織

主任研究者

井上 健 国立精神・神経センター
神経研究所 疾病研究第
二部 室長

分担研究者

赤澤智宏 東京医科歯科大学 保健
衛生学科 助教授
小坂 仁 神奈川県立こども医療セ
ンター 神経内科 医長
出口貴美子 出口小児科 院長

の脳白質病変を伴う疾患群を対象とする。その理由として

（１）遺伝性髄鞘形成不全の病態の理解はオリゴデンドロサイトを標的とした白質保護による治療法の開発に重要である。

（２）周産期の虚血性白質病変による高次脳機能障害の病態の理解と予防や治療法の開発が急務である。

本研究はこれら２つのアプローチから得られる結果を統合的に解析し、脳白質病変に起因しておこる高次脳機能障害の機序を解明し、小児期の脳白質病変の病態に基づく治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

1. 遺伝性髄鞘形成不全症候群については、オリゴデンドロサイトによる

A. 研究目的

当該研究は脳白質病変の病態を解明し、治療法の開発を目指した基礎研究である。小児期の遺伝性髄鞘形成不全症候群と早産児の虚血性大脳白質傷害という原因の異なる二つ

髄鞘形成において重要な働きをする2つの疾患関連遺伝子 PLP 1 と SOX10 を対象に、細胞生物学および分子生物学的手法を用いて解析を行う。

(a) PLP 1 解析は小坂との共同研究によりすすめる。PMD 患者のおよそ3割程度に見いだされるアミノ酸置換型の変異は、非常に臨床型のばらつきが多いことが知られている。その分子病態については、PLP 1 蛋白の変異による何らかの gain of toxic function がメカニズムとして考えられており、とくに小胞体に異常蛋白が蓄積することによるストレス応答が病態に関与すると考えられているが、依然不明な点が多い。そこで我々は PLP 1 変異による PMD の重症度を規定する因子を探り、白質変性症の病態理解を深めるとともに、治療の介入点を探索した。

(b) SOX10 解析は赤澤との共同研究によりすすめる。髄鞘形成に重要な働きをする転写因子 SOX10 の発現調節機構の一つとして翻訳後修飾に注目した。本年度は遺伝性白質変性症患者に見いだされた SOX10 変異とユビキチン化と SUMO 化を介した病態との関連について主に試験管内での分子遺伝学的解析を行った。

2. 早産児の虚血性大脳白質傷害の解析は出口との共同研究によりすすめ

る。本年度はヒト超早産児剖検脳および羊脳虚血モデルを用いて、急性期に脳室周囲の神経前駆細胞に傷害がおこる機序を解明した。

C. 研究結果

PLP1 の変異蛋白の小胞体への蓄積と小胞体ストレス誘導という病態に対して、これを解除するための分子シャペロン療法の候補としてクルクミンに注目し、その有効性についての検討を行った。本年度は培養細胞での解析に加え、疾患モデルマウスを用いた解析も行った。結果の詳細に関しては分担研究報告書に記載されている通り、クルクミンの PLP1 の変異蛋白の小胞体への蓄積と小胞体ストレス誘導という病態に対しての治療効果に関連すると思われる所見が得られつつある。

また様々な PLP 1 のアミノ酸変異体を作製し、強制発現系を用いて細胞内での挙動を観察し、臨床的重症度を規定する因子を検討した。その結果すべての PLP 1 蛋白はいったん小胞体を通過するがその後、主としてライソゾームや核膜に輸送される変異体と、小胞体にとどまる変異体があることが明らかになった。しかしながら細胞内輸送・局在部位と臨床的重症度の明らかな相関はみられなかった。今回の系では変異の種類

により異なる代謝経路をとっており PLP1 の蛋白分解は、ユビキチン化を受けプロテオゾーム系で処理される以外に、ライソゾームあるいはカルパイン系で分解を受けていることが示唆された。また蛋白分解を強く受ける変異蛋白質ほど重症の表現系を呈することが明らかとなった。

SOX10 の発現調節機構として、とくにユビキチンと SUMO1 が SOX10 の翻訳後修飾を介して、その発現量の調節を行っていることを見出した。これらの修飾は共通のリジン残基を介して競合的に制御していることがわかった。これらの結果よりユビキチン化による非可逆的な量的制御と SUMO 化による質的制御が複合的に関与していることが明らかになった。

また主任研究者らは以前、SOX10 遺伝子の異常が遺伝性髄鞘形成不全を伴う複合型神経堤症候群 PCWH の原因となることを見出したが、どのようなメカニズムで SOX10 の変異がこの疾患を引き起こすのかを明らかにするために SOX10 変異の機能解析を進め、これまでにわかっている優性阻害作用に加え、毒性機能獲得も PCWH の発症に関わっていることを示唆する結果を得た。今後はこの毒性機能獲得と翻訳後修飾の関連を明らかにしていく予定である。

早産児の虚血性大脳白質傷害の解

析については、超早産児の PVL 剖検脳 41 例およびコントロール脳 40 例を用いた神経病理学的解析を行った。脳室周囲領域に存在する神経前駆細胞に注目して、組織所見の検討を行ない、さらに神経幹細胞のマーカーを用いた免疫組織学的検討を行なった。また細胞死に関して TUNEL、Caspase3 を用いて、脳室周囲領域における神経前駆細胞の傷害について検討した。さらに動物モデルとして羊の PVL モデル脳を用いて、ヒトでの所見と比較した。その結果、PVL 全例に脳室周囲領域の組織傷害を認め、同時に神経幹細胞のマーカーの染色性が減弱し、さらに TUNEL および Caspase3 染色の陽性細胞が増加しており、これらの所見より超早産児の虚血性脳障害では脳室周囲領域に存在する神経前駆細胞が傷害されることが示された。

D. 結論

すべての大脳白質病変に共通した病態は脱髄、すなわち髄鞘の消失である。遺伝性髄鞘形成不全は稀な疾患群であるが、遺伝子異常と疾患との因果関係が明確であるため、その病態の解析により髄鞘が破綻したためにおこる大脳白質病変の病態が明らかになることが期待される。一方、すべての年齢層で最も頻度の高い白質病変は虚血性病変である。早産児

に合併する虚血性深部白質病変は後に学習認知障害を高率に引き起こすことが知られている。当該研究では早産児脳の神経病理学的解析により、発達早期の深部白質虚血性病変が後の大脳皮質の発達に及ぼす影響を探ることにより、白質病変と高次脳機能障害との病態の関連性を明らかにすることができるかと期待される。

初年度はそれぞれの課題についてほぼ当初の計画通りに研究成果を得た。来年度以降も大脳白質病変の病態により迫る知見を得る事が期待される。長期的にはこれらの研究成果から、小児期の疾患のみならず成人や老年期における大脳白質病変の病態の理解に大きく貢献することが予想され、白質病変の予防や治療の開発に向けた基礎研究として、国民の健康維持に資するものと思われ、厚生科学的見地から重要性および緊急性が高いと考えられる。

E. 健康危険情報

特記事項無し

F. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項無し

遺伝性白質変性症の病態解明と治療法開発に関する研究

主任研究者 井上 健 国立精神・神経センター 神経研究所疾病研究第二部

研究要旨

遺伝性髄鞘形成不全症候群について、オリゴデンドロサイトによる髄鞘形成において重要な働きをする2つの疾患関連遺伝子 PLP1 と SOX10 を対象に、細胞生物学および分子遺伝学的手法を用いて解析を行った。PLP1 の変異蛋白の小胞体への蓄積と小胞体ストレス誘導という病態に対して、これを解除するための分子シャペロン療法の候補としてクルクミンに注目し、その有効性についての検討を行った。遺伝性白質変性症 PCWH 患者に見いだされた SOX10 変異がミエリン形成および維持の障害をおこす病態を分子レベルで解析した。

A. 研究目的

遺伝性髄鞘形成不全の病態の理解はオリゴデンドロサイトを標的とした白質保護による治療法の開発に重要である。本研究では大脳白質病変の病態を解明し、治療法の開発を目指すため、主に小児期の遺伝性髄鞘形成不全症候群を対象として研究を行い、大脳白質病変に起因して起こる高次脳機能障害の機序を解明し、小児期の大脳白質病変の病態に基づく治療法を開発を目指す。

B. 研究方法

1.オリゴデンドロサイトによる髄鞘形成において重要な働きをする2つ

の疾患関連遺伝子 PLP1 と SOX10 を対象に、細胞生物学および分子生物学的手法を用いて解析を行う。

(a) 遺伝性白質形成不全ペリツェウス・メルツバッハ病 (PMD) の小胞体 (ER) ストレス性細胞死によるオリゴデンドロサイト傷害モデルに対する分子シャペロン治療の有効性の検討 PMD の原因遺伝子 PLP1 内のアミノ酸置換を含む変異蛋白は折畳み異常を起こし ER 内に蓄積し、その結果 ER ストレス反応を誘導し、細胞死へと至る。我々は、ER 内 Ca ATPase 阻害作用を持つウコンからの天然抽出物クルクミンに注目し、

これが変異蛋白の ER 外への放出を誘導し、変異蛋白の機能獲得型の細胞毒性を軽減させる分子シャペロン治療として有効ではないかと仮説を立てた。PLP1 の変異蛋白の小胞体への蓄積と小胞体ストレス誘導という病態に対して、これを解除するための分子シャペロン療法の候補としてクルクミンに注目し、その有効性についての検討を行った。

(b) 大脳白質変性症を引き起こす SOX10 遺伝子変異の病態解明に関する研究 SOX10 は中枢神経系のミエリンの発達形成に重要な役割を担っている転写因子である。我々は、ヒト SOX10 遺伝子の変異は、大脳白質変性症を含む複合型神経堤症候群 PCWH を引き起こすことを見いだした。SOX10 はその下流遺伝子群の転写調節を担う重要な転写因子であることが知られてきており、その障害は遺伝性白質変性症をはじめとする様々な小児期の大脳白質病変の病態に関与していると思われる。我々は、SOX10 遺伝子異常の分子病態の解析により、PCWH のミエリン形成および維持の障害における病態を明らかにし、オリゴデンドロサイトの再生治療法の開発などに関わる基盤となる知見を得ることを目指している。我々は、PCWH を引き起こす SOX10 の変異メカニズムは優性阻害ないし

は機能獲得であることが仮説を立てた。本研究では SOX10 野生体および PCWH に伴う変異体を細胞培養系(in vitro)に導入し、優性阻害ないしは機能獲得変異の分子病態を明らかにした。

C. 研究結果

(a) 遺伝性白質形成不全 PMD の ER ストレス性細胞死によるオリゴデンドロサイト傷害モデルに対する分子シャペロン治療の有効性の検討 HeLa 細胞およびマウスのグリア初代培養細胞での PLP1 変異蛋白発現系にクルクミンを投与し、細胞内病態変化に対するクルクミンの効果を、変異蛋白の局在や ER ストレス誘導分子の発現変化などに注目して検討した。この結果、蛋白レベルで ER ストレス関連因子の発現の減少をみた。一方で、予想された変異蛋白の細胞内局在の変化を明確に観察できず、これは来年度再検討する予定である。さらに生体治療モデルとして、自然発生 PLP1 変異マウス msd を用いてクルクミンの経口投与によるミエリンの再生や症状の軽減化の有無や程度について、実験系を確立し、一部組織学的および行動学的に解析している。まだ予備実験段階であるが、通常1ヶ月以内に死亡する変異個体の寿命がやや延長する治療効果を見いだしつつある。

(b) 大脳白質変性症を引き起こす SOX10 遺伝子変異の病態解明に関する研究 本年度は特に SOX10 の延長型変異について細胞培養系(in vitro)での解析を行い、これが gain-of-function となる分子機構について明らかにした。PCWH 患者に見出された 82 残基の延長となる変異をヒト SOX10cDNA に導入し、ルシフェーゼレポート解析にて転写活性の低下をみた。優性阻害作用は認められず、機能獲得変異であることが示唆された。この延長部分のうち Try と Arg に富む小領域 (WR ドメイン) がこの延長型変異の機能的なコアドメインをなす事がわかった。この WR ドメインは α -Helix 型の二次構造をとり、HMG ドメインに働きかけて、毒性機能を獲得するのではないかと考えられた。

D. 考察

(a) アミノ酸置換による折畳み異常をきたした変異 PLP1 蛋白の ER 内異常蓄積と、その結果引き起こされた ER ストレス反応という PMD の病態に対して、分子シャペロン療法の候補としてクルクミンに注目し、その有効性についての検討を行った。

(b) 我々が見出した大脳白質変性症を伴う複合型神経堤症候群 PCWH 患者に見出された SOX10 遺伝子変異について分子病態の解析を行った。

E. 結論

我々はオリゴデンドロサイトを標的とした白質保護による治療法の開発を目指した研究として、小児期の遺伝性髄鞘形成不全症候群を対象として研究を行っている。本年度は変異 PLP1 蛋白の ER 内異常蓄積と、その結果引き起こされた ER ストレス反応という PMD の病態に対して、分子シャペロン療法の候補としてクルクミンによる治療の有効性に関して一定の知見を得ることができた。また、新たな複合型神経堤症候群 PCWH 患者に見出された SOX10 遺伝子変異について分子病態の解析を行い、その SOX10 変異がミエリン形成不全を引き起こすメカニズムを明らかにした。

F. 研究発表

(1) 論文発表

原著

1. Lee JA, Madrid RE, Sperle K, Ritterson CM, Hobson GM, Garbern J, Lupski JR, Inoue K. Spastic paraplegia type 2 associated with axonal neuropathy and apparent *PLP1* position effect. *Ann Neurol.* 2006;59(2):398-403.
2. Lee JA, Inoue K, Cheung SW, Shaw CA, Stankiewicz P, Lupski JR. Role of genomic architecture in *PLP1* duplication causing

Pelizaeus-Merzbacher disease.
Hum Mol Genet. 2006;
15(14):2250-65

総説

1. Inoue K. Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2: mechanistic similarities with and differences from Charcot-Marie-Tooth disease type 1A/hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. In Stankiewicz P, Lupski JR, eds. *Genomic Disorder: The Genomic Basis of Disease*. Humana Press. Totowa, NJ. 2006;263-272

(2) 学会発表

1. K. Inoue, M. Khajavi, T. Ohyama, C. Akazawa, J.R. Lupski. PCWH—molecular mechanisms for SOX10 mutations. May 2006. 16th Meeting of the European Neurological Society, Lausanne, Switzerland. (Oral presentation)

2. K. Inoue, M. Khajavi, C. Akazawa, K. Deguchi, J.R. Lupski. Molecular mechanisms underlying human *SOX10* mutations causing distinct neurocristopathies. August 2006. 16th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Banff, Canada.

3. K. Takano, E. Nakagawa, K. Inoue, F. Kamada, S. Kure, Y. Goto. A loss-of-function mutation in the *FTSJ1* gene

causes non-syndromic mental retardation in a Japanese family. October 2006. 56th annual meeting of the American Society of Human Genetics, New Orleans, LA.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働省科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

遺伝性髄鞘形成不全における転写因子 SOX10 の翻訳後修飾の解析

分担研究者 赤澤智宏 国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部

研究要旨

小児期の脳白質病変における遺伝的内因性要因を明らかにするために、SOX10 の細胞内における機能的修飾を生化学・分子生物学的に解析を行った。SOX10 は発生初期の神経堤細胞が発現する転写因子で、末梢神経のシュワン細胞の発生、中枢神経系の白質形成に重要な役割を果たしている。SOX10 の細胞内発現調節を解析する過程で、ユビキチンと SUMO1 による翻訳後修飾を受けていることを見出した。これらの修飾は、共通のリジン残基をユビキチン化と SUMO 化の間で競合的に取り合っており、SOX10 の転写活性を負に制御していることを明らかにした。すなわち、ユビキチン化は非可逆的に SOX10 の量的制御を担い、SUMO 化は SOX10 の質的制御を行っていると考えられる。*in vitro* mutagenesis でリジンをアルギニンに改変した SOX10 は、wild type と比べて細胞内寿命が延長し、転写活性が上昇した（活性型 SOX10）。活性型 SOX10 は、転写活性を失うことなく、ユビキチン・プロテアソーム系での分解に耐性をしめす。従来報告されているヒト Sox10 の遺伝子変異はすべて転写活性を下げるミュータントであり、翻訳後修飾を利用した活性型 SOX10 の機能解析はきわめて注目される結果である。

A 研究目的

脳白質病変にもとづく高次脳機能障害は、白質病変による直接的な因果関係による障害に加えて、脳皮質病変に付随した二次的な障害も示唆され、厚生労働科学的見地から病態の正確な理解と、白質病変の治

療方法・予防方法の確立が急務の課題である。本分担研究は遺伝性白質形成異常における責任遺伝子の一つとして知られている SOX10 の機能を明らかにし、脳白質病変の分子病態からの理解、更にオリゴデンドロサイトを標的とした脳白質病変の

治療法確立を目指す。

B 研究方法

SOX10 の転写活性は、Connexin32 プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み合わせたレポーターアッセイを指標とした。SOX10 の翻訳後修飾の中でユビキチン化、SUMO 化について注目し、修飾される標的リジン残基を同定するために SOX10 アミノ酸のリジン残基をアルギニンに置換した KR ミュータントを作製した。SOX10 の細胞内局在の解析には PML(pro-myelocytic leukemia)蛋白との共存について解析した。本年度の研究過程においては実験動物を用いた解析は行わなかった。本分担研究は国立精神・神経センター組換え DNA 委員会による審査を受け了承された。

C 研究結果

S^{35} メチオニンでラベルした SOX10 の細胞内代謝は、半減期が 30 分と短寿命であり細胞内で速やかに分解されることがわかった。その分解系に関する解析で、SOX10 はユビキチン修飾を受け、プロテアソームで分解されることが明らかになった。更に、SOX10 は SUMO 化による修飾を受けることも明らかになった。すなわち、SOX10 は細胞内においてユビキチン化と SUMO 化によって競合的に修飾されていることが示された。

in vitro mutagenesis で SOX10 アミノ酸のリジン残基 (K) を順次アルギニン残基 (R) に置換した KR ミュータントを作製し、修飾を受けるリジン残基を同定した。その結果、55 番目と 357 番目のリジン残基がユビキチン化・SUMO 化を受けることがわかった。実際、55 番目、357 番目の両方のリジン残基をアルギニンに置換した K55,357R というミュータントでは、ユビキチン化も SUMO 化も観察されなくなることがわかった。

SOX10 の転写活性をすべての KR ミュータントについて Connexin32 プロモーターを用いて解析した。その結果、ユビキチン化・SUMO 化修飾される 55 番目と 357 番目のリジン残基を置換したミュータントで転写活性が有意に上昇した。

更に細胞内局在について 55 番目と 357 番目のリジン残基をアルギニンに置換したミュータントでは PML 蛋白との共存が観察されなかった。

D 考察

近年、大脳白質形成不全の中でも、遺伝性髄鞘形成不全の責任遺伝子の解析が精力的に進み、SOX10、PLP1 などの分子変異が病態と深く関わっていることが報告されている。転写因子 SOX10 は、特にオリゴデンドロサイトの発生・分化・移動に関わっているそのプロモーター領域のメチ

ル化を介して SOX10 遺伝子の転写が調節され、その転写レベルと統合失調症との関係が報告されている。また、SOX10 mRNA の細胞内での安定性が重要な役割を果たしていることが主任研究者 井上らによって報告されている。本分担研究においては、SOX10 の蛋白質の機能が翻訳後修飾によっても調節を受けていることを明らかにした。

糖鎖修飾、リン酸化、ユビキチン化、SUMO 化などの翻訳後修飾は、生体内の蛋白質の機能を直接制御する調節機構である。近年、その制御機構の破綻が様々な疾患において重要な役割を果たしていることが明らかになっている。SOX10 におけるユビキチン化と SUMO 化の競合的修飾は、ユビキチン化が量的制御を負に調節し、SUMO 化が転写活性を負に制御するメカニズムとして働いている。蛋白質としての SOX10 機能調節が、常に負の方向に向いていることは興味深い。本研究によって樹立した K55,357R の SOX10 は、これらの翻訳後修飾をエスケープする活性型変異体であり、機能喪失による SOX10 の変異を補填する分子候補としてきわめて注目される。

G 研究発表

1. 論文発表

1. Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura,

Y., Akazawa, C., and Kohsaka, S. Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *GLIA* 55, 604-616, 2007.

2. Kim, B. Y., Sahara, Y., Yamamoto, A., Kominami, E., Kohsaka, S., and Akazawa, C. The interaction of mammalian Class C Vps with nSec-1/Munc18-a and syntaxin 1A regulates presynaptic release. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 350, 691-697, 2006.

3. Yogosawa, S., Kawasaki, M., Wakatsuki, S., Kominami, E., Shiba, Y., Nakayama, K., Kohsaka, S. and Akazawa, C. Monoubiquitylation of GGA3 by hVPS18 regulates its ubiquitin-binding ability. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 350, 82-90, 2006 (cover article).

2. 学会発表

Hoshi, M., Akazawa, C. and Kohsaka, S. The reduction of the enteric neural crest cells in the nerve growth factor receptor, p75, knockout mice. 15th International Society of Developmental Biologists Congress. Sydney, Australia, July 7, 2006.

2. 赤澤智宏、佐々木洋、星雅人、中村泰子、高坂新一 顔面神経損傷に

よって発現誘導される新規の 4 回膜
貫通型蛋白の生化学的解析 第 29 回
日本神経科学大会、2006 年 7 月 20
日、京都

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学 研究事業）

分担研究報告書

小児期の遺伝性大脳白質変性疾患の病態解明に関する研究

分担研究者 小坂 仁

神奈川県立こども医療センター

研究要旨 ; Pelizaeus-Merzbacher Disease ; PMD は proteolipid protein; PLP の遺伝子重複やアミノ酸変異により発症する遺伝性大脳白質変性疾患であり小児期の大脳白質病変として代表的な疾患である。今年度はこのうちアミノ酸変異に基づく PMD の病態解析のとして、PLP 正常型およびアミノ酸変異体の細胞内での挙動を観察し、臨床的重症度を規定する因子を検討した。その結果すべての PLP はいったん小胞体を通過するがその後、主としてライソゾームや核膜に輸送される変異体と、小胞体にとどまる変異体があることが明らかになった。しかしながら細胞内輸送・局在部位と臨床的重症度の相関はみられなかった。今回の系では変異の種類により異なる代謝経路をとっており PLP の蛋白分解は、ユビキチン化を受けプロテオソーム系で処理される以外に、ライソゾームあるいはカルパイン系で分解を受けていることが示された。また蛋白分解を強く受ける変異蛋白質ほど重症の表現系を呈することが明らかとなった。

以上より、PMD の病態として PLP 蛋白質の高次構造の変化による生体内品質管理機構・分解系への負荷が重症度を規定している可能性がある。またライソゾーム、あるいはカルパイン系からの細胞死の経路を更に検討する必要があると示され、同時に小胞体ストレスに働く薬剤のみならずライソゾームやカルパインの阻害薬も治療薬の候補となる可能性が示された。

A ; 研究目的

Pelizaeus-Merzbacher Disease ; PMD は小児期の遺伝性大脳白質病変を来す代表的な疾患である。10 年来にわたる我々の解析の結果では、およそ半数の患者で proteolipid protein; PLP の重複を認め、3割程

度でアミノ酸変異を見いだしている。前者は比較的均一な重症度を示すのに対し、後者は生後早期に死亡する重症例から、中学・高校で発症する軽症例まで非常に臨床型のばらつきが多いことがわかっている。PMD の病態について、PLP の変異による何

らかの gain of toxic function がその原因として考えられており、とくに小胞体に異常蛋白が蓄積することによるストレス応答が病態に関与すると考えられているが、不明な点が多い。今回我々は PLP 変異による PMD の重症度を規定する因子を探り、白質変性症の病態理解を深めるとともに、治療の介入点を探索した。

B, 研究方法

軽症な表現型を来す PLP 変異として *rsh* (I186T), W152L, 重症変異として W152R, *msd* (A242V) 変異を有する PLP 遺伝子を作成した。FLAG タグ、あるいは EGFP のタグの上流にこれら変異型および正常型 PLP 遺伝子をクローニングしたプラスミドを作成し、COS 細胞に一過性および安定発現し、経時的に細胞内局在を共焦点顕微鏡下に観察した。またそれぞれの遺伝子の転写量を定量的 PCR 法にて測定し、ウエスタンブロッティングにより蛋白量を半定量した。またそれぞれの変異 PLP の小胞体シャペロンとの免疫沈降実験を行い、小胞体への局在を生化学的に検証するとともに、各種インヒビターを用いた場合の蛋白存在量の上昇率を定量することにより、これら蛋白の分解がライソゾーム（阻害薬；Z-phe-phe-fluoromethyl ketone, bafilomycin A₁）、プロテオゾーム（阻

害薬；MG132, lactacystin）カルパイン（阻害薬；Ac-Leu-Leu-methioninal）のいずれで起きているのか検証した。またとくにプロテオゾーム分解に、特徴的なユビキチン化を確かめるためにユビキチン遺伝子のプラスミドと共発現し免疫沈降法を行い、ユビキチン化の有無を確かめた。

C, 研究結果

(1) 変異蛋白の局在

従来すべての PLP 変異蛋白は小胞体に局在すると報告されていたが、今回の条件下では、経時的に観察するとすべての変異体が小胞体に局在するわけではなかった。一過性発現後 12 時間程度では、正常および異常 PLP の多くは小胞体に分布するが、PLP-W152L および PLP-W152R は明らかに小胞体外に局在していた。これらの変異体は lamin と共発現しており、一部が核膜に存在していることを示した (Neuroscience 2006)。小胞体に局在する異常蛋白；PLP-*rsh* は小胞体シャペロンのカルネキシンと共沈していたが PLP-wt, PLP-W162L および W152R では認めず、小胞体での品質管理機構は通過していることが示唆された。また異常 PLP の安定発現細胞を樹立したが、正常 PLP がライソゾームと思わ

れる顆粒、膜、突起様構造まで分布するのに対し異常蛋白はいずれも核周囲の分布を示し PLP 変異によりトラフィック異常を起こしていることを示した。またこれら PLP 蛋白の局在を小胞体の蛍光色素、ライソゾームの蛍光色素を用い living cell でその局在を観察し、また二重染色により小胞体のマーカーである BiP と共局在を確かめた。その結果、小胞体通過後①ライソゾームに主として局在する変異体；W152L および W152R 変異②小胞体に局在する蛋白；*rsh* (I186T), *msd* (A242V)変異③形質膜まで到達する蛋白；正常型の3種類に分けられたが、これらは重症度の違いを説明しなかった。

(2) 蛋白質発現および分解系

EGFP, FLAG いずれのタグにおいても軽症変異に比べ、重症変異は蛋白分解の亢進が示唆された。蛋白分解がどのように行われているのか、ライソゾーム、プロテオゾーム、カルパイン阻害薬を用いそれぞれの関与を調べたところ、低発現の FLAG 系では重症変異ではプロテオゾーム系の分解が主体であることがわかった。一方高発現系の EGFP 発現系ではカルパイン分解系の関与が強いことがわかった。

D ; 考察

以上より nonsense 変異は今回の系

を用いた細胞レベルの実験では、小胞体のみならずライソゾーム、カルパインにより分解を受けており、これら蛋白分解系への負荷の強さが重症度を規定している可能性が示された。ライソゾームあるいはカルパインからの細胞死のシグナル伝達について近年注目されており、今後この疾患をモデルとして検討する必要がある。従来より注目されてきた小胞体ストレスのみならずライソゾームあるいはカルパインからの細胞死経路も PMD をはじめとした白質病変治療薬の介入点の候補として検討していく必要があると思われる。

G. 研究発表

論文発表

1. Koizume, S., Takizawa, S., Fujita, K., Aida, N., Yamashita, S., Miyagi, Y., and Osaka, H. (2006). Aberrant trafficking of a proteolipid protein in a mild Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neuroscience* 141, 1861-1869.
2. Sato, A., Arimura, Y., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, K., Wada, E., Suzuki, Y., Osaka, H., Setsuie, R., Sakurai, M., *et al.* (2006). Parkin potentiates ATP-induced currents due to activation of P2X receptors in

- PC12 cells. *J Cell Physiol.*
3. Setsuie, R., Wang, Y. L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y. J., *et al.* (2006). Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem Int.*
 4. Sun, Y. J., Nishikawa, K., Yuda, H., Wang, Y. L., Osaka, H., Fukazawa, N., Naito, A., Kudo, Y., Wada, K., and Aoki, S. (2006). Solo/Trio8, a membrane-associated short isoform of Trio, modulates endosome dynamics and neurite elongation. *Mol Cell Biol* 26, 6923-6935.
 5. Wang, Y. L., Liu, W., Sun, Y. J., Kwon, J., Setsuie, R., Osaka, H., Noda, M., Aoki, S., Yoshikawa, Y., and Wada, K. (2006). Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 arrests spermatogenesis in transgenic mice. *Mol Reprod Dev* 73, 40-49.
 6. Takahashi, Y., Matsuda, K., Kubota Y, Shimomura J, Yamasaki, E, Kudo, T, Fukushima K, Osaka H, Akasaka N, Imamura A, Yamada, S, Kondo, N, Fujiwara, T(2006) Vaccination and infection as causative factors in Japanese patients with Rasmussen syndrome: Molecular mimicry and HLA class I *Clinical & Developmental Immunology*, 13: 381-387
 7. Shiro Koizume, Jun-ichi Nagai, Yohei Miyagi and Hitoshi Osaka
Varied missense mutations or expression condition modulates trafficking and quality control of proteolipid proteins, *submitted*

学会発表

1. 第 20 回国際生化学・分子生物学会議/第 11 回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議第 79 回日本生化学会大会、第 29 回日本分子生物学会年会
2006 年 6 月 18 日(日) ~ 6 月 23 日(金)国立京都国際会館、京都宝ヶ池
Aberrant trafficking of a mutated proteolipid protein in a mild

Pelizaeus-Merzbacher disease
SHIRO KOIZUME^{1,2,3}, Shuichi
Takizawa^{2,3}, Sumimasa Yamashita²,
Yohei Miyagi¹, Hitoshi Osaka^{2,3}
Kanagawa Cancer Ctr. Res. Inst.
Mol. Pathol. & Genet. Div.,
²Kanagawa Children's Med. Ctr.
Div. Neurol., ³PRESTO, JST

2. 第14回信州小児神経研究会

2006年5月13日 松本

特別講演；白質形成不全症の臨床・
病態解析・治療薬開発 小坂 仁

厚生労働省科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

超早産児脳虚血性脳障害の病態解明に関する研究

分担研究者 出口貴美子 出口小児科、ベイラー医科大学小児神経科

研究要旨

超早産児における脳室周囲白質軟化症（PVL）を含む虚血性脳障害の神経後遺症は、運動発達障害より高次脳機能障害の頻度が高い事が注目されているが、その原因は明らかではない。我々は、PVLの脳室周囲および脳室下領域（VZ/SVZ）に存在する神経前駆細胞に焦点を当て神経病理学的検討を行ない、その障害とPVLの神経後遺症との因果関係を探る事を目的とした。超早産児のPVL剖検脳41例およびコントロール脳40例を用いた。VZ/SVZの組織所見の検討を行ない、さらに免疫組織学的検討を行なった。神経幹細胞のマーカーとしてMusashi1、Nestinを用い、また細胞死に関してTUNEL、Caspase3を用いて、VZ/SVZにおける神経前駆細胞の傷害について検討した。さらに羊のPVLモデルを用いて、ヒトでの所見と比較した。その結果、PVL全例にVZ/SVZ組織傷害を認め、同時に神経幹細胞のマーカーの染色性が減弱していた。またTUNELおよびCaspase3染色の陽性細胞が増加していた。VZ/SVZに存在する神経前駆細胞の減少は、その後の脳の白質、および灰白質の発育全般に影響を及ぼす可能性が高く、これまでの白質の病巣を中心とした解釈では解決できない高次脳機能傷害の要因となる可能性があると思われた。

A. 研究目的

小児期の深部白質病変は主に未熟児の虚血性病変として生ずることが知られている。周産期医療の発展とともに、より小さい超早産児の生存率が向上してきたが、一方、その虚

血性脳障害の後遺症は、これまで主に問題になっていた運動発達障害よりむしろ高次脳機能障害の頻度が高い事が注目されている。この原因として、これまでの国内外で主に研究されてきた虚血性の白質壊死だけで