

は説明出来ない点が多い。我々は脳室周囲に存在する神経系前駆細胞に着目し、それらが虚血性病変化を有する超未熟児の脳において傷害されているのではないかと仮説を立てた。本研究はこの仮説を組織学的に実証することを目的とする。

B. 研究方法

PVL において神経発生が障害されているかどうかを検証するため、剖検によって得られたヒト PVL 症例及び正常対照例の脳標本を用い、脳室周囲および脳室下領域の神経幹細胞を特異的蛋白に対する抗体を用いて、免疫組織科学的に検討する。41 例の在胎 28 週未満の超未熟児 PVL 症例、40 例の正常対照例をもちいた組織学的解析を行った。脳室周囲や脳室下領域の神経幹細胞障害の有無や程度、広がりについて幹細胞マーカー Musashi1 や Nestin に対する抗体を用いた免疫組織学的手法を用いて詳細な検討を行った。また、神経幹細胞の障害を生ずるメカニズムを明らかにするため、TUNEL 法や Caspase 3 などのアポトーシス関連分子の免疫組織学的検討を行った。また PVL の病態に神経幹細胞の障害が関与しているかどうかを調べるため、羊の PVL 動物モデルを用いて脳室周囲及び脳室下領域を中心に神経幹細胞の障害の有無や形態の変化な

どを、A と同様に免疫組織学的に検討した。

C. 研究結果

(a) ヒト超未熟児の剖検脳を用いた解析 41 例の在胎 28 週未満の超未熟児 PVL 症例、40 例の正常対照例をもちいた組織学的解析を行った。PVL 症例は急性期（生後 0－6 日後死亡）21 例、亜急性期（生後 9－66 日後死亡）10 例、および慢性期（生後 4 ヶ月－6 年後死亡）11 例であった。通常の HE 染色に加え、Musashi1、GFAP、Nestin、TUNEL、Caspase3 の免疫染色等を行った。大脳白質病変は古典的な Cyst 形成を伴う壊死病変は 4 症例のみにみられ、むしろ大脳白質全体に広範性に見られる病変が特徴的であった。脳室周囲領域では脳室内出血の有無にかかわらず、全例で中等度から重度の組織傷害が認められた。この領域では Musashi1 および Nestin 陽性の神経前駆細胞が減少または消失していた。正常対照脳での脳室周囲領域の観察では、超未熟児が生まれる 3 週から 27 週でも Musashi1 および Nestin 陽性の神経前駆細胞が豊富に認められ、これらの細胞が大脳白質の虚血病変に伴って傷害されている事が分かった。急性期剖検脳における TUNEL および Caspase3 免疫染色による解析では、これら脳室周囲領域の神経

前駆細胞が陽性となり、アポトーシスによる細胞死が誘発されていることが示された。

(b) 羊 PVL モデルの脳検体を用いた解析 羊 PVL モデルは主任研究者が在籍する研究部で以前作製されたものを用いた。7例の PVL モデルと5例の正常対照を用いて、脳室周囲領域の変化を観察した。HE 染色では深部白質病変直下の脳室周囲領域の細胞の減少と形態の変化が見られた。Musashi1 および Nestin 免疫染色では神経前駆細胞の染色性が減少しており、TUNEL 陽性細胞が同領域に増加しており、基本的にヒトと同様の所見が観察された。

D. 考察

超未熟児に高頻度におこり、かつ臨床的に最も重要な脳障害は脳室周囲の脳白質病変である。近年の研究により、この白質病変は特に超未熟児に於いて、古典的な Cyst 形成を伴わない広範性病変の形で、これまで考えられていたよりもずっと高頻度に存在することが明らかになった。また疫学的に超未熟児の神経学的後遺症として、高次脳機能障害が高頻度におこることが明らかになり、さらにこれらの症例では生後の脳皮質が十分に発達せず、体積が少ないことが明らかになってきた。しかしながらこれらの所見を有機的に結び

つけるメカニズムは不明である。我々が見出した脳室周囲領域の神経前駆細胞の傷害は、生後の脳皮質の発達障害とそれに伴う高次脳機能障害を説明し得る新たな病態モデルとして重要と思われる。

E. 結論

脳室周囲の脳白質病変を伴う超未熟児の剖検脳の観察により、脳室周囲領域の神経前駆細胞が高頻度に傷害されていることが明らかになった。この時期の神経前駆細胞の傷害は、その後の白質、灰白質の発育全般に影響を及ぼすことが考えられる。今後、脳白質や脳皮質に於ける神経細胞の移動や成熟の異常についても検索することにより、その超未熟児の神経学的後遺症としての高次脳機能障害の病態への関与を明らかにしていきたい。

F. 研究発表

(1) 論文発表

原著

1. Deguchi K, Takashima S, Armstrong DL, Inoue K. Brains of extremely premature infants with white matter injury also exhibit altered neural progenitor cells and cortical development. In preparation

(2) 学会発表

1. K. Deguchi, S. Takashima, D. Armstrong, K. Inoue. Impaired neural

progenitor cells in extremely preterm infants may affect cortical development and function. May 2006. 16th Meeting of the European Neurological Society, Lausanne, Switzerland.

2. K. Deguchi, S. Takashima, D.L. Armstrong, K. Inoue. Neural progenitor cells are impaired in extremely preterm

infants with ischemic brain injuries. August 2006. 16th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Banff, Canada.

G. 知的財産権の出願・登録状況
無し

資料 1

平成 1 8 年度 第一回班会議資料

厚生労働科学研究費補助金

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』

平成18年度 研究報告班会議プログラム

日時：平成19年3月15日（木） 17－19時

場所：帝国ホテル内 小会議室

参加者

主任研究者	国立精神神経センター 神経研究所	井上 健
分担研究者	東京医科歯科大学	赤澤智宏
	神奈川県こども医療センター	小坂 仁
	出口小児科	出口貴美子

連絡先：〒187-8502

東京都小平市小川東町4-1-1

国立精神・神経センター 神経研究所

疾病研究第二部 井上 健

電話：(042) 346-1713

プログラム

17:00 開会の挨拶 井上 健

17:10 研究総括 井上 健

分担研究発表

17:20 井上 健
ER ストレス仮説に基づく中枢性髄鞘形成不全の治療モデル
ーCurcumin 経口投与による治療効果の検討ー

17:40 赤澤智宏
Sox10 のユビキチン化と SUMO1 化を介した翻訳後修飾による機能調節

18:00 小坂 仁
小児期の大脳白質病変の病態解明に関する研究

18:20 出口貴美子
超早産児における神経幹細胞傷害と脳室周囲白質軟化症

18:40 ディスカッション

19:00 閉会

抄録

分担研究 井上 健

ER ストレス仮説に基づく中枢性髄鞘形成不全の治療モデル

—Curcumin 経口投与による治療効果の検討—

余 荔華、岩下晴美、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

目的—小児期の代表的な遺伝性髄鞘形成不全疾患であるペリツェウス・メルツバッハ病 (PMD) の病態解析に基づく治療法の開発を目的とする。

方法—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引き起こして ER 内に留保され、その結果 ER ストレス反応を誘導し、細胞死へと誘導する。

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、その有効性についての検討を自然発症型疾患モデルマウス Msd を用いて行う。さらにその作用機序に関する細胞内分子動態の解明を培養細胞系を用いて行う。

結果と考察—これまでに Msd マウスへの経口薬物投与系を確立した。生後 3 日目より小動物用ミルクに溶解したクルクミン 180mg/Kg を一日一回のピペッティングによる投与を行っている。個体の平均寿命はクルクミン非投与群で 29.5 ± 7.53 (n=16) に対し、投与群で 34.9 ± 5.88 (n=18) と有意 ($p=0.027$) な延長を見ている。今後、生化学および神経病理学的な検索をすすめていく予定であるが、今回の報告ではその方法やプロセスについて、討論を行いたい。

分担研究 赤澤智宏

Sox10 のユビキチン化と SUMO1 化を介した 翻訳後修飾による機能調節

赤澤智宏^{1、2}、中村泰子²、井上 健³、高坂新一²

1 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科分子生命情報解析学分野

2 国立精神・神経センター神経研究所 代謝研究部

3 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第二部

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。私たちは 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、Sox10 の転写活性を負に制御していることがわかった。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。

今後その発現系の確立によって広く白質形成過程における機能的役割が明らかになることが期待される。

小児期の脳白質病変の病態解明に関する研究

神奈川県立こども医療センター 小坂 仁

①あらたな PLP 変異の同定；国内で唯一、高度先進医療として先天性白質形成不全症の遺伝子診断実施を行い、PLP 機能異常による Pelizaeus-Merzbacher Disease (PMD) の遺伝子型・臨床型の対応を更に明らかにした

(1) DM 20 ではスプライスされる領域の 2 塩基欠失；通常より 30 アミノ酸短い異常 PLP が産生されるが、DM 20 の産生には影響は与えないと考えられる。実際に正常な DM 20 の mRNA が末梢白血球からの RT-PCR で確認された。通常の PMD より遙かに軽症で“後年発症の精神運動発達遅滞、痙性下肢麻痺”という表現形であった。

(2) イントロン変異による潜在的スプライシング領域の活性化；イントロンエクソン境界の 9 塩基上流の t→g 変異を認めた。末梢白血球からの RT-PCR よりエクソン 4 の開始が 116 塩基上流にずれ、異常な短い PLP が産生されていることを見いだした。

②新しい白質変性症の遺伝子単離

PLP の重複、プロモータ領域を含む全塩基配列を解析しても先天性白質形成不全症の 4 割程度は原因が見つからない。我々は少なくともあと 2 つは PMD の表現形をもたらす原因遺伝子があると考えている。白質の病態を考える上でもこれらの遺伝子単離が重要であると考えている。PLP はミエリンの蛋白の半分以上を占める主要な構成蛋白であることから、他の原因遺伝子もプロテオミクスの手法で確認できる蛋白であるとの仮定に基づき、下記の戦略を立案した。

(1) 脳で発現している蛋白質の網羅的解析

マウス脳で発現している蛋白質はおおよそ、8000 前後と考えられている。それらすべての蛋白質のヒトにおける染色体上の位置情報のデータベースを作成した。

(2) X 染色体上の白質形成不全原因遺伝子の単離

我々はすでに X 染色体上 PLP とは別の白質形成不全をおこす遺伝子があることを報告したが、およその染色体上の位置が明らかになっている。そこで上記データベースより、この部位に存在する全遺伝子（およそ 20）の遺伝子について、PLP 異常が見つからない患者につき順次塩基配列決定を行っている。現在 3 つの遺伝子が終了した。

(3) 劣性遺伝をとる白質形成不全原因遺伝子の単離

4 世代前の血族結婚により、常染色体劣性遺伝形式をとると思われる女性例がある。この家系につき全染色体につき多型解析を行い(homozygosity mapping) homozygous な領域を特定する予定である（横浜市大、環境遺伝学松本教授との共同研究。次にこれらの領域に存在する遺伝子につき今回得られたデータベースを下に患者での塩基配列決定を行う。

③細胞レベルでの PMD 病態の解明

PMD の表現形について null, duplication の患者については何らかの gain of toxic function がその原因として明らかにされてきたが、nonsense 変異については DM 20 が形質膜に到達するかどうかを重症度を規定するとされており、統一的な理解が困難であった。我々は nonsense 変異の重症度は、蛋白分解系への負荷の強さにより決まるのではないかとこの予備実験の結果を得ており、更にこの検討を進めた。

今回は軽症変異として *rsh* (I186T), W152L, 重症変異として W152R, *msd* (A242V) 変異を取りあげた。まずこれら蛋白の局在に関して、従来からいわれていたようにすべてが小胞体に局在するわけではなく W152L のように小胞体外に局在する変異があることを本年発表したが (Neuroscience 2006)、同様の傾向を W152R も示し、小胞体外特に核膜に存在していることを EGFP, FLAG のタグと PLP との融合蛋白で示した。実際に小胞体に局在する異常蛋白; *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 wt-PLP, W162L では認めなかった。またこれらの異常 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。またこらら 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、必ずしも小胞体のみならずライソゾームにも存在することを示した。また 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 GFAP 系ではカルパイン分解系の関与が強いことがわかった。以上より nonsense 変異は少なくとも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。今後は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検討すると共にこれらの阻害薬を治療薬の候補として検討していく必要があると思われる。

超早産児における神経幹細胞傷害と脳室周囲白質軟化症

出口貴美子^{1、2、4}、高嶋幸男³、Dawna L. Armstrong²、井上 健⁴

1 出口小児科、2 ベイラー医科大学、テキサス小児病院、小児神経科、病理

3 柳川療育センター、国際医療福祉大学大学院

4 国立精神神経センター、神経研究所、疾病研究第2部

背景：1) 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。2) PVL の傷害時期は、神経細胞およびグリア細胞の前駆細胞 (neural progenitors) の豊富な時期に一致する。3) PVL の脳のダメージは、修正 1 才半頃の MRI にて、白質の髄鞘化の遅延のみならず、脳室壁の不整、白質および灰白質の容量減少として認められる。

目的：上記より我々は、PVL の VZ/SVZ に焦点を当て神経病理学的検討を行ない、PVL の神経後遺症との因果関係を探る事を目的とした。

症例および方法：テキサス小児病院における超早産児の PVL 剖検脳 44 例 (年齢：在胎 23 週から 6 歳) およびコントロール脳 40 例 (在胎 10 週から 6 歳) 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。Neural progenitors 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 neural progenitors の傷害について検討した。さらに羊の PVL モデル脳 7 例およびコントロール脳 6 例を用いて、同様の方法で、ヒトでの所見と比較した。

結果：1) 組織所見：PVL 全例で、VZ/SVZ における壊死および VZ の欠損が認められた。羊でも、VZ/SVZ の壊死が同様に認められた。2) 免疫組織所見：コントロール脳では、Musashi1 や Nestin 陽性の neural progenitors が、VZ/SVZ に豊富であった。しかし、PVL でのこれらの染色性は、全例で減弱していた。3) ヒトおよび羊両者の PVL 例で、TUNEL および Caspase3 染色の陽性細胞が、VZ に優位に認められた。

考察：VZ/SVZ に neural progenitors が豊富であるこの時期に虚血や IVH などが生じた場合、これらの細胞は細胞死を起こしやすく、その結果による neural progenitors の絶対数の減少は、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問題の要因となっていると思われた。

スライド資料（抜粋）

1. 井上 健

小児期の大脳白質病変の病態解明に関する研究

研究チーム

井上 健
国立精神神経センター

周産期虚血性白質病変

ミエリン形成不全疾患

超早産児脳の
経時的検査

PCWHの病態
SOX10遺伝子

PMDの病態
PLP1 遺伝子

出口寛美子
ベイラー医科大学
国立精神神経センター

赤澤智宏
国立精神神経センター

小坂 仁
神奈川県立こども医療センター

小児期の大脳白質病変の病態解明に関する研究

高次脳機能障害

脳発達形成期の大脳白質病変の病態の解明

周産期の虚血性脳傷害の主体は
大脳白質病変である

白質病変の主要な標的は
オリゴデンドロサイト

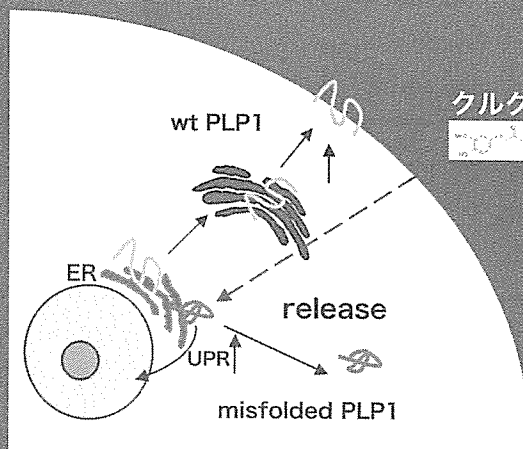
超早産児の虚血性脳白質病変の
病態研究

遺伝性ミエリン形成不全症の
分子病態研究

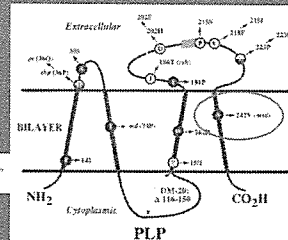
脳の保護や再生を目指した治療法開発のための基盤的な知見の集積

クルクミンを用いたPelizaeus-Merzbacher病(PMD)に対する化学シャペロン療法

折畳み異常をきたした変異体PLP1はERに蓄積し、ストレス反応(unfolded protein response: UPR)を誘導する



クルクミン



ERに蓄積した変異体PLP1



PLP1変異体マウス msd

Summary

Progress

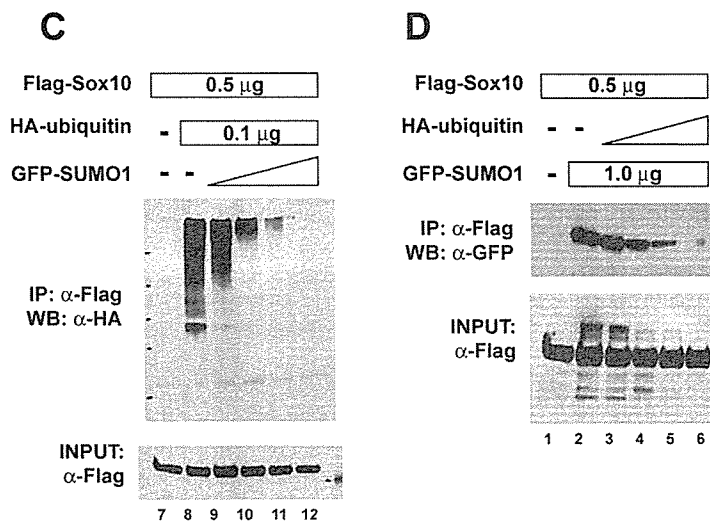
1. *Msd* mouse maintenance
2. Oral administration of curcumin
3. Extended life span

Problems

1. Transfection assays in cell culture system
2. Neuropathology
3. Biological basis for the effect of curcumin

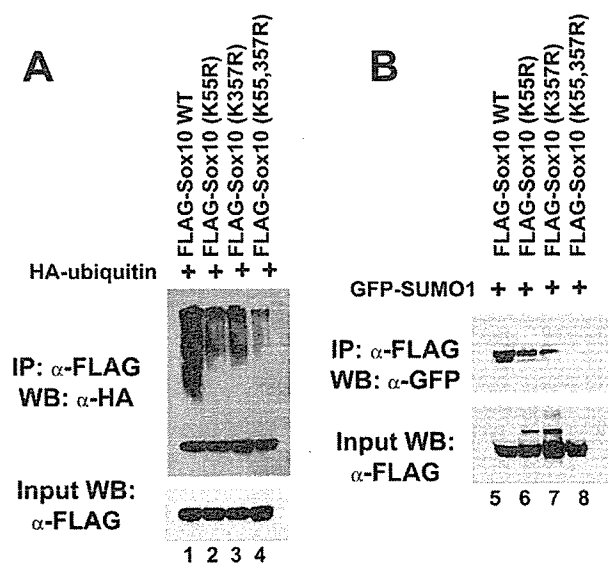
2. 赤澤智宏

SOX10はユビキチン化、SUMO化の修飾を受ける

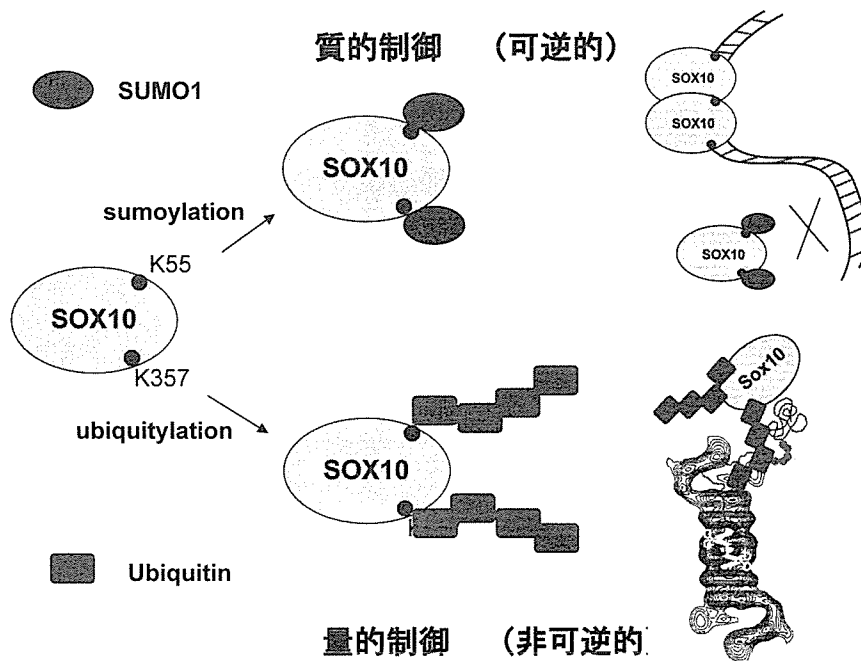
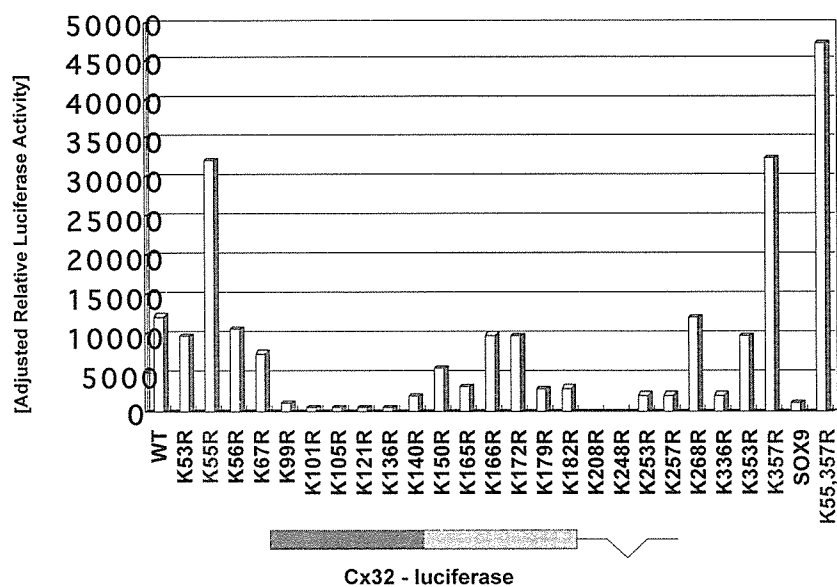


→ 共通のリジン残基 (K) を競合的 (competitive) に修飾する

SOX10の55番目、357番目のリジン残基を改変すると翻訳後修飾をエスケープする

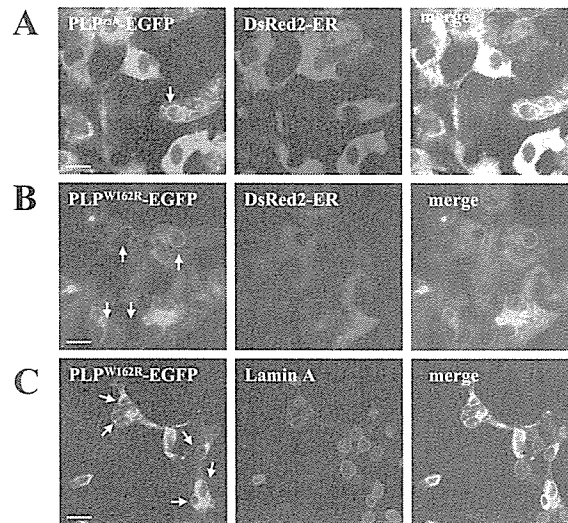


SOX10の55番目、357番目のリジン残基を改変すると
Connexin32プロモーターの転写をpositiveに制御する



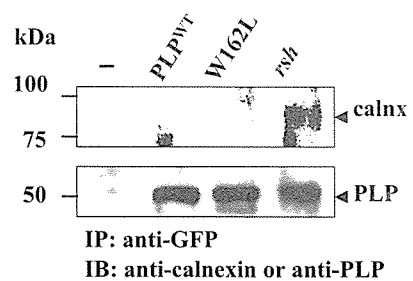
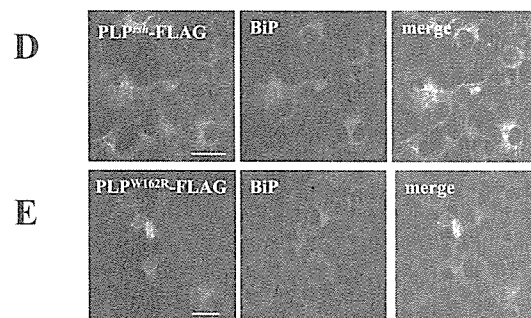
3. 小坂 仁

KCMC

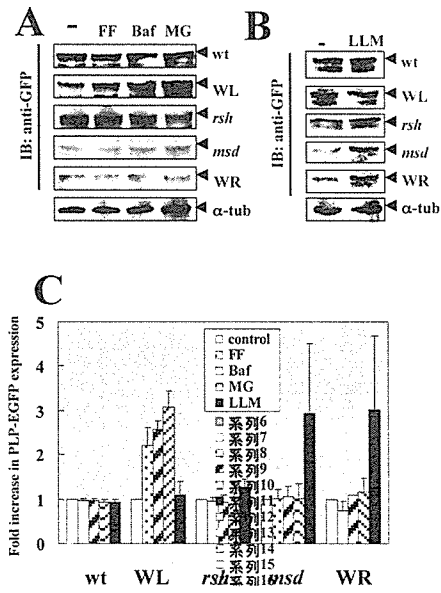
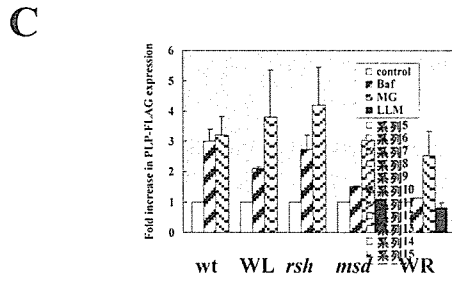
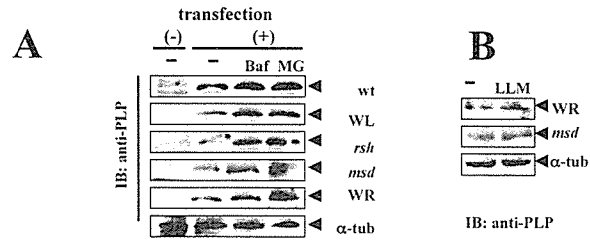


2007.03.18 11:19:14 (A)

KCMC

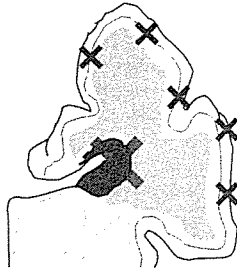


2007.03.18 11:19:14 (A)



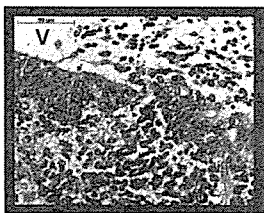
4. 出口貴美子

超早産児脳障害の病態解析



- 大脳白質病変が広範に広がり、組織反応が未熟
- 急性期の大脳皮質に微細な細胞傷害
- 脳室周囲の神経およびグリアの前駆細胞傷害

生後の大脳の発達過程に影響を及ぼす？



H&E 在胎26週、5日生存例

学童期に明らかとなる知的障害や学習障害などの高次脳機能障害の原因ではないか？

超早産児剖検脳の生存期間を追った系統的な解析

Materials & Methods

Human brain

40 Control brains	10GW - 21 Y
45 EPI brains with PVWI	23GW -27GW at birth, aged 23GW-6Y

Immunohistochemistry & Immunofluorescence

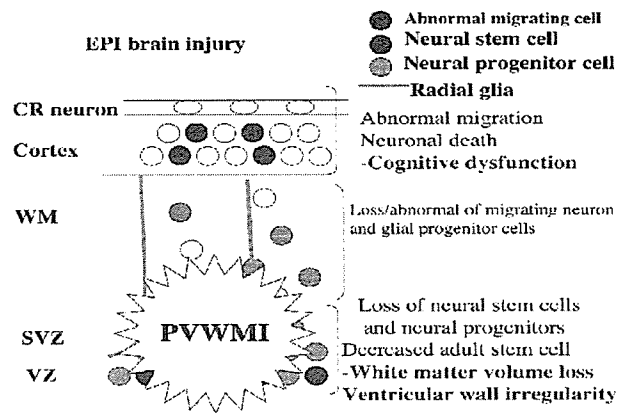
Antibodies:

Musashi1	neuronal and glial stem cell marker
Nestin	neuronal and glial stem cell marker
GFAP	astrocyte marker

TUNEL & Caspase3	apoptosis
Calbindin	layer II specific marker

Results

A schematic model for brain damages in EPI with PVWMI



Conclusions

1. Increased cell death markers, TUNEL and Caspase3 and decreased progenitor cell markers, Musashi1 and Nestin in the VZ and SVZ of EPIs with PVWI identified a previously unrecognized injury to this critical region of neurogenesis and gliogenesis.
2. It is possible that this injury in EPIs with white matter lesions who survive will produce an irregular ventricular outline, decrease the population of migrating neural progenitors, reduce brain volume and abnormal cortical layering may affect cortical function such as cognitive dysfunction, mental retardation and epilepsy.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Inoue K</u>	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.	Stankiewicz P, Lupski JR,	Genomic Disorder: The Genomic Basis of Disease	Humana Press	Totowa	2006	263-272