

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19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20(2008)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. 遺伝性白質変性症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19年度第2回班会議資料	23
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
V. 研究成果の刊行物・別刷	43

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）  
総括研究報告書

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 ベイ  
ラー医科大学 小児神経  
科 研究員

不全症候群と早産児の虚血性脳白質傷害という原因の異なる二つ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。

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

## 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) *PLP1* 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、*PLP1* 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 *PLP1* 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。昨年度は、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、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。そこで本年度は *SOX10* の翻訳後修飾が個体レベルで

どのような役割を担っているのかを明らかにするために、モデルマウスの作成を試みた。またこれまで行ってきた、患者に見出された *SOX10* 変異の試験管内での病態解析をさらに進めた。

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を用いて、生後の生存期間を追って、脳室周囲の神経幹細胞の傷害による病変の広がり の程度を評価した。また、長期生存例の大脳白質および皮質における生後の大脳発達の程度を神経細胞の分化・移動に焦点を当てて、観察した。

## 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と疾患モデルマウスを用いた解析を行った。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、培養細胞系の実験に関してはテクニカルに解決しなければならぬ問題が明確になったので、これに取り組んだ。一方、動物モデルへのクルクミン投与による治療実験では、寿命の延長や大脳白質での細胞死の減少など、一定の治療効果を示唆する所見が得られつつある。

また、これ以外に、PLP 重複例の治療薬スクリーニング系の開発研究を開始した。ラット C6 グリオーマから内因性のプロテオリピド蛋白(plp)遺伝子発現を RT-PCR 法により測定する系を確立した。この系を用いて、食品ライブラリーを用いた内因性plp発現を低下させる食品のスクリーニングを行う予定である。さらに、先天性白質形成不全症の新規遺伝子単離のための研究も行われている。PLP1 遺伝子の異常が否定されたPMD様の先天性白質形成不全症の家系に対し、SNP array によるマッピングを行い、先天性白質形成不全症の新規遺伝子の候補領域を全染色体上に複数同定した。得られた結果を、新たに作成したヒト脳発現データベースに照らし合わせることで、候補遺伝子数を約 300 まで絞り込んだ。

SOX10 の発現調節機構として、昨年度ユビキチンと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が、本年度はこれらの *in vitro* での解析で得られた機構が *in vivo* でどのような効果を示すのかを調べるために、BAC トランスジェニックマウスを用いて、*in vitro* の系で用いた様々な SOX10 発現コンストラクトをマウス個体で発現させる実験系の構築を進めた。

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た。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証明し、これを報告した。この報告により、PCWH を取り巻く分子病態に関する基盤的な仮説が出そろった。

早産児の虚血性大脳白質傷害の解析については、引き続き超早産児の 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。昨年度、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結果、大脳白質病変をもつ超早産児全例に脳室周囲領域における神経前駆細胞の傷害を見出した。本年度は、神経前駆細胞の傷害の程度が症例ごとに異なることに注目し、生後の生存期間と病変の広がりとの関連性について検討した。また、神経前駆細胞の傷害が生後の大脳発達に及ぼす影響を調べるために、MAP2 などの成熟神経細胞のマーカーや calbindin などの大脳層構造特異的マーカーを用いた検索を行い、異常所見を見出した。

#### 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と期待される。

二年目となる本年度は、昨年度に引き続き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

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昨年を引き続き行った。また、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、新たな機能獲得型の分子機構を見出した。

**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の開発を目指す。

**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Cos7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。昨年度まではPLP1発現系にEGFPまたはFLAGのタグをつけた発現ベクターを用いたが、これらのタグが細胞内での局在の安定化作用等により、野生型のそれを反映しない事が分かったので、タグを除去した発現ベクターを新たに構築し、発現蛋白の検出には抗PLP1抗体を用いる実験系に変更した。しかし、タグのないPLP1はこれらの細胞内では非常に不安定である事が分かり、現在、検出のための条件検討を続けている。

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治療効果の検定



を行った。体重などの一般現症では投与群と非投与群の間に優位な差は見られなかった。しかし寿命に関しては、通常4週間ほどで死亡する非投与群に比べ、投与群では約5日間延長し、これは統計学的に有意であった ( $p < 0.05$ )。一方、行動・運動機能等を評価では、明らかな症状の改善を検出することは出来なかった。現在、免疫組織化学的手法や電子顕微鏡による超微細形態学的解析等を用いて、ミエリン形成の程度や、細胞死の減少の有無や程度について検証を行っている。これまで、TUNEL法を用いた解析で大脳白質におけるアポトーシスによる細胞死が、クルクミン投与により減少していることを示す所見を得ており、さらに検討を続けている。

**(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** 昨年度に引き続き、SOX10 の延長型変異について細胞培養系(in vitro)での解析を行った。そしてこれが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、ルシフェレース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 $\alpha$ -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。WRドメインを欠落させた延長クローンではこれらの効果は見られず、WRドメインの毒性機能が病態の主要なメカニズムを担っているものと考えられた。

#### 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、昨年度に引き続き、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。今後、さらにクルクミンの臨床応用を目指して、その薬理作用に関しての解析を行っていく必要があると思われた。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。今後は、BAC トランスジェニックマウスの技術を用いて、PCWH の病態について in vivo での解析を進めていく予定である。

#### F. 研究発表

##### (1) 論文発表

原著

1. Takano K, Nakagawa E, Inoue K, Kamada F, Kure S, Goto Y-I. A loss-of-function mutation in the FTSJ1 gene causes nonsyndromic X-linked mental retardation in a Japanese family. *Am J Med Genet B* 2007 in press
2. Inoue K, Ohyama T, Sakuragi Y, Yamamoto R, Inoue NA, Yu L-H, Goto YI, Wegner M, Lupski JR. Translation of SOX10 3' untranslated region causes a complex severe neurocristopathy by generation of a deleterious functional domain. *Hum Mol Genet.* 2007;16:3037-46. (corresponding author)

##### (2) 学会発表

シンポジウム

1. 井上 健. Nonsense mediated mRNA decay as a modifier of neurological disease traits and phenotypes. 2007年9月11日. Neuro2007. 横浜

国際学会

1. K. Inoue, T. Ohyama, Y. Sakuragi, L-H Yu, R. Yamamoto, Y. Goto, M. Wegner, J.R. Lupski. Translation of SOX10 3' untranslated region causes a complex severe neurocristopathy by generation of a deleterious functional domain. Oct 25, 2007. 57<sup>th</sup> Annual meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, CA.

国内学会

1. 井上 健、余 荔華、出口貴美子、岩下晴美、山本良子、Barbara Antalfy、小坂 仁、伊藤雅之、後藤雄一 Pelizaeus-Merzbacher病の病態に基づく治療法開発の試み 第52回日本人類遺伝学会 2007年9月13日 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

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

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 東京医科歯科大学大学院 保健衛生学研究科

**研究要旨** SOX10 は発生初期の神経堤細胞が発現する転写因子で、中枢神経の白質形成、末梢神経のシュワン細胞の発生・分化に重要な役割を果たしている。小児期の脳白質病変における遺伝的内因性要因を解明するために、①SOX10 の生化学・分子生物学的解析を行った。②SOX10 BAC トランスジェニックマウスを作成した。その結果、SOX10 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がわかった。*in vitro* mutagenesis で標的リジン残基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 を発現させた SOX10 BAC トランスジェニックマウスは胎生致死となり、翻訳後修飾による負の制御が *in vivo* でも必須であることが示された。PCWH の疾患変異を導入した BAC トランスジェニックマウスの作成に成功し、表現系の解析に着手した。

**A 研究目的**

小児期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障害に加えて、大脳皮質病変に付随した二次的な障害が混在していると考えられている。したがって、治療方法・予防方法の確立を前提とした病態の正確な理解が必須である。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、大脳白質病変の分子病態からの理解、変異 SOX10 を遺伝子組換えで導入したトランスジェニックマウスを作成し、治療法開発に向けたモデル動物作成を行う。

**B 研究方法**

マウス SOX10 のプロモーター領域は、翻訳領域エクソンを挟んで、5'側、3'側、それぞれ約 50kbp、合計 100kbp と長大であることが報告されている。このように長いプロモーター領域を持つ遺伝子産物に関しては、従来のプラスミドベクターを用いたトランスジェニックマウス作成はきわめて困難である。そこで、本研究においては、インサートサイズが 200kbp 以上含まれているマウス SOX10 の BAC クローンを用いて、大腸菌内相同組換え法を応用した BAC トランスジェニックマウス作成法を採用した。発現ユニットとして作成したのは、次の3つである。①蛍光蛋白 VENUS を BAC

内の SOX10 翻訳開始点に挿入したものの。②昨年、本研究班で報告した活性型 SOX10 を VENUS の下流に in frame に結合したもの。③我が国で井上らによって報告されたヒト SOX10 の PCWH 病遺伝子変異 (SOX10 の翻訳終始コドンに欠如したために 82 アミノ酸ほど non coding 領域が過剰に翻訳された変異) を VENUS の下流に in frame に結合したもの。はじめにこれらの発現ユニットをプラスミドベクターにサブクローンし、上記 BAC DNA をトランスフォームした大腸菌内で相同組換えを誘導した。完成した組換え BAC クローンは、インサート内の SOX10 翻訳領域が、上記発現ユニットによって置換され、相同組換えが機能していることを確認した。得られた組換え BAC DNA からインサートを切り出して、C57B3 系マウス受精卵の核内にマイクロインジェクションし、偽妊娠仮腹マウスの子宮内に移植した。

トランスジェニックマウスの同定には、胎児羊膜、生体の尾端それぞれからゲノム DNA を抽出し、発現ユニット特異的な配列である VENUS の断片を PCR 法で増幅することで確認した。

発現ユニットには蛍光蛋白 VENUS が入っていることから、SOX10 の発現を蛍光実体顕微鏡で観察した。

本分担研究計画は国立精神・神経センター組換え DNA 委員会、東京医科歯科大学組換え DNA 委員会による審査を受け了承された。動物実験の作成を実施した国立精神・神経センターの実験動物倫理委員会の承認のもとに

行った。

### C 研究結果

SOX10 のアミノ酸配列中に、ユビキチン化、SUMO 化の修飾標的となるリジン (K) 残基は 21 個存在する。in vitro mutagenesis によって、K55、K357 が修飾を受けることが明らかになった。この 2 つの K をアルギニン (R) に置換した KR ミュータントは、活性型 SOX10 として機能することを証明した。

BAC トランスジェニック法を用いて作成した組換え動物体は、それぞれの発現ユニットについて少なくとも 5 腹のマウスを用いて 2 シリーズずつ作成を試みた。その結果、①VENUS 単独、③ヒト SOX10 の遺伝子変異を導入した、二つの発現ユニットに関して、F0 が誕生した。現在、順次交配を進めてライン化を行っている。しかし、②活性型 SOX10(KR) に関しては、胎生致死であることが判明した。

### 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 の発現は発生初期の神経堤細胞に始まり、発生・移動・分化の経過を通じて発現が持続する。中枢神経系ではオリゴデンドロサイトの分化・機能維持に関わっている。SOX10 は、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おり、高次神経機能の維持にも関与することが示唆されている。これらの多様な機能の基盤となる発現調節に関しては、SOX10が長大なプロモーター領域を持っていることから、個体レベルでの解析が困難であった。本年度の研究成果として、200kbpに及ぶマウスSOX10 BAC クローンを用いることによって、長大なプロモーター領域を包含するトランスジェニックマウスの作成に成功した。蛍光蛋白VENUSの発現マウスは、個体レベルでのSOX10の発現を蛍光実体顕微鏡下で容易に可視化することができる。従来、SOX10の発現を解析する組換え動物として、lacZをSOX10遺伝子にノックインしたマウスが報告されている。しかし、この場合はヘテロ接合体でもSOX10のhaploinsufficiencyによってSOX10疾患マウスである*Dom*と全く同じフェノタイプとなってしまうため、正常発生での発現解析には適していない。本研究のBACトランスジェニックマウスは、ゲノム上に組み込まれる発現ユニットのコピー数が限られているため、VENUSの毒性も低く、発生の過程を通じてSOX10の発現を詳細に解析することが可能となる。更に、VENUSの蛍光強度はEGFPの5倍から10倍といわれており、コピー数が少ないことを補うに十分な蛍光強度を有する個体が得られている。この組換え動物を用いて、SOX10の発現を更に詳細な解析する計画である。

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。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。実際、本研究で報告した活性型SOX10 (KR) 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る。BACトランスジェニックマウスの樹立の過程で明らかになったように、活性型SOX10 (KR) マウスは胎生初期に致死となることから、*in vivo*においてもユビキチン化、SUMO化修飾が極めて重要であることが確かめられた。

本年度の研究成果でもっとも注目される点は、BACトランスジェニックマウスの中で、ヒトSOX10遺伝子変異を発現ユニットとして組み込んだ動物が誕生したことである。この遺伝子変異は、井上らが確立した新しい疾患概念であるPCWHを表現系とする。すなわち、内外で初めてPCWHの疾患モデル動物の作成に成功したことになる。このマウスの詳細な解析によって、PCWHの病態が動物レベルで可能となる。本モデル動物の解析を通じて、まだ全く治療方法のないPCWHに対する機能温存療法や根本的治療法の確立に発展的につながることを期待される。

## 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. 赤澤智宏、高坂新一. 末梢神経の再生におけるソニックヘッジホッグの役割. **BRAIN and NERVE**、第 59 巻、1341-1346、2007.

3. Kim, B. Y. and Akazawa, C. Endosomal trafficking of EGFR regulated by hVps18 via interaction of MVB sorting machinery.

**Biochem. Biophys. Res. Comm.** *in press*.

4. Liang, C. Lee, J. S., Inn, K. S., Gack, M. U., Li, O., Robert, E. A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., and Jung, J. A. Beclin1-binding UVRAG targets the HOPS complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. **Nature Cell Biol.** *in revision*.

5. Akazawa, C., Nakamura, Y., Maeno, H., Wada, K. and Kohsaka, S. Distribution of the Serum inducible kinase (Snk) mRNA in the rat nervous system; its up-regulation in lateral and basolateral amygdala after cued fear conditioning. **J. Comp. Neurol.** *in revision*.

## 2. 学会発表

1. 赤澤智宏、中村泰子、前野浩志、

和田圭司、高坂新一. 恐怖条件付けによって扁桃体で発現上昇するポロキナーゼ Snk の脳内発現. 第 30 回日本神経科学大会、第 50 回日本神経化学会大会、第 17 回日本神経回路学界大会合同大会. 平成 19 年 9 月 11 日、横浜.

2. 赤澤智宏、橋本学、高坂新一. ソニックヘッジホッグによる神経栄養因子を介した神経再生. 精神・神経疾患委託費「中枢神経系の温存的神経再生療法の確立に関する開発的研究」班会議. 平成 19 年 12 月 3 日、大阪.

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；先天性白質形成不全症の治療に向け下記の研究を展開した。①髄鞘化不全マウス(*msd*)に対する治療薬での効果評価方法の確立；光学顕微鏡的観察（HE 染色, KW 染色, epon 包埋超薄切後トレイジブルー染色）による方法では、髄鞘形成不全を定量的に評価することができなかった。電顕的観察では *msd* に認めた髄鞘化不全の評価に適しており、部位としては均一に髄鞘を認める視神経が優れていた。定量的な画像解析では *msd* マウスでは髄鞘形成不全に加え軸索変性が有ることが明らかになった。治療薬クルクミンは視神経に認めた髄鞘化不全と軸索変性を代償する効果が有る可能性が示唆された。②PLP 重複治療薬スクリーニング系の開発：患者数として最も多い PLP 重複患者の治療薬開発のため、ラット C6 グリオーマから内因性のプロテオリピド蛋白(plp)遺伝子発現を RT-PCR 法により測定する系を確立した。食品ライブラリーを用いて内因性 plp 発現を低下させる食品のスクリーニングを開始した。③先天性白質形成不全症の新規遺伝子単離；SNP array により先天性白質形成不全症の新規遺伝子領域を全染色体上に複数同定した。新たに作成したヒト脳発現データベースとあわせ候補遺伝子数を約 300 まで絞り込んだ。

A；研究目的

末梢ミエリンの遺伝性形成不全は、シャルコーマリーツース病と呼ばれ、主として成人で発症し、その罹患臓器である末梢神経を生検で得ることが容易である。今までに 20 を超える遺伝子が単離され、一部の疾患では臨床治験が開始されている。一方我々の取り組んできた中枢ミエリンの遺伝性形成

不全は 通常重度の発達遅滞と運動障害を来し原因不明の脳性麻痺として診断未定の患者に多く、遺伝子はわずかに 3 つしか明らかにされていない (PLP, GJA12, DRCTNNB1A)。2004 年より、高度先進医療として先天性白質形成不全症の患者に対し proteolipid protein; PLP の遺伝子診断を行ってきた。それらの患者を大

別すると、①アミノ酸変異を持つ群(およそ 20%) ②遺伝子重複を持つ群(30%) ③遺伝子異常が見つからない群(50%)に大別される。それぞれの群に対しての個別治療を目指し、下記の研究を展開した。

### (1) 髄鞘化不全マウス(*msd*)に対する治療薬での効果評価方法の確立。

治療薬の開発のためには、安定したモデル動物での薬効評価方法を確立する必要がある。本年度は、*plp-A242V*変異を有する *msd* マウスを用い、このマウスの病理を光顕的・病理的観察を行い、週令、部位、観察方法の項目について髄鞘化とその病理を検討した。また治療薬の候補であるクルクミン投与による変化の検出を試みた。

### (2) PLP 重複治療薬スクリーニング系の確立とそれを用いたスクリーニング

今までに我々は、アミノ酸変異による Pelizaeus-Merzbacher Disease, 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を示した。又アミノ酸変異による高次構造の変化を細胞内局在の変化に還元したスクリーニング系を開発し、それにより治療薬スクリーニングを行ってきたが、患者数として最

も多い、遺伝子重複の治療に関しては、発現量増多による”Gain of Toxicity”を薬物ターゲットとするよりは、重複している遺伝子は正常であることから直接的に PLP 発現を抑制する方法に取り組んだ。ラット C6 グリオーマでは Northern-blotting にて内因性の *plp* 発現を認められることが報告され、いままでその発現量を上昇させる薬物の研究が行われてきているが、PMD の治療には内因性の *plp* 発現量を負に調節する薬物が治療薬の候補になる。小児において、新規化合物から新規薬物を開発することは、臨床治験上も困難であることから、スクリーニング対象としては食品化合物ついですでに市販されている薬物を対象とする。

### (3) 先天性白質形成不全症の新規遺伝子単離

国内外のミエリン形成不全症の解析により PLP の変異を見いだした患者は、100 家系以上の解析中約半数であり、残りの 5 割はその分子基盤が未確定である。遺伝学的な解析により少なくともあと 2 つは PMD の表現形をもたらす原因遺伝子があると考えられる (Osaka H., Inoue, K et al. *Ann Neurol*, 1999, 45, 59-64.)。世界的にも PLP に連鎖しない中枢ミエリン形成不全症の大家系の報告はなく、散発例がほとんどであり、通常の連鎖解析



のみで原因遺伝子単離に至るのは困難である。我々が解析した症例の中に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 (Nedu A., et al., *Brain Develop*, 1996)。この患者では PLP, GJA 12, DRCTNNB1A, MBP の変異は認めていない。共同研究者横浜市大松本教授とこの家系の多型解析を行い、罹患者でホモの SNP が連続し、非罹患者と明らかにハプロタイプが異なる領域を特定し、候補遺伝子領域を狭小化する。

(Homozygosity mapping)

## B, 研究方法

(1) *msd* (plp-A242V 変異を有する) マウス 1, 2, 3, 4 週齢の中枢神経系を、Hematoxylin and eosin, HE 染色、Kluver-Barrera's, KW 染色および Epon 包埋 semithin Toluidine-blue 染色後光学顕微鏡的観察を行う。また各週令・各部位での電子顕微鏡的に観察を行い、また得られた画像から、髄鞘化を定量的に評価し、薬物効果に適した評価方法を確立する。

(2) ラット C6 グリオーマでは内因性の plp 発現が有ることが知られている。定量的スクリーニングを行うため RT-PCR 法を用いて、ラット plp 発現を検出する。次に細胞濃度、血清組成

などを最適化し治療薬検出に適した系を作成し、スクリーニングを開始する。

(3) 連鎖解析のみで遺伝子同定まで到達することは困難であるので、プロテオミクス解析からの情報を統合する戦略を立てた。マウス脳を用いた網羅的プロテオミクス解析により全遺伝子中で中枢神経に発現している遺伝子は、およそ、8000 前後と考えられている。まず我々はそれらすべての蛋白質の対応するヒトでの染色体上の位置を調べ機能等の情報をリンクさせデータベース化し、ヒト全遺伝子のうち脳で発現している蛋白質のデータベース化を行った。現在までに先天性白質形成不全症の原因遺伝子として見いだされた PLP, GJA 12, DRCTNNB1A. はいずれもこのデータベース上に認められ、この方法の有用性が示唆された。血族結婚による女性のミエリン形成不全症例の罹患者家族より血液を採取し、EB ウイルスにより不死化したのち DNA を抽出し Affymetrix 10K SNP array を用いてこの家系の多型解析を行い、候補領域に存在するデータベース上の遺伝子を候補遺伝子とする。

## C, D 研究結果および考察

### (1) マウス評価系の確立

HE, KW 染色; 3 週齢 WT にて大脳白質に髄鞘が確認できる。*msd* では大脳白質にはまったく髄鞘はみられない。

3週齢 WT にて、大脳白質の他に内包・淡蒼球内部に髄鞘化された神経線維がみいだされる。4週齢WTにて、大脳白質・内包・海馬采・乳頭体視床路に髄鞘がみられる。*msd*では、白質には髄鞘が見られず、淡蒼球や視床内部に有髄線維が少数みとめられる。髄鞘化は認められない。

Epon 包埋 semithin Toluidine-blue stain; 1週齢および2週齢の脊髄白質に WT では多数、*msd*に少数の有髄線維を認める。4週齢視神経では、WTでは正常と考えられる多数の髄鞘線維がみられ、*msd*では少数の有髄線維が認められた。

これらの光顕的観察では、*msd* マウスとクルクミン治療後のマウスでは髄鞘化形成に差異は認められなかった。

電顕的観察；髄鞘化形成を観察したところ、脊髄・大脳白質・脳梁と比較して、視神経において1視野におけるaxon-myelin 構造の数が均一であり、髄鞘化の定量に適していると考えられた。4週令のマウスの視神経像を取り込み、NIH Image-Jにて軸索、髄鞘部分を抽出。WT, *msd*, *msd*+クルクミンのそれぞれ1例について10枚の電顕画像を解析し、全視野の軸索、髄鞘の面積を定量した。その結果 *msd* の病態として髄鞘化形成不全に加えて軸索の障害が示唆された。またクルクミン投与はこの病理を改善する効果が示

唆された。

(2) 重複治療薬スクリーニング  
C6 グリオーマを用いた内因性の plp 発現を定量的RT-PCR法を用いて検出。実験系の最適化を終了化し、日本水産株式会社中央研究所 健康基盤研究室 竹尾 仁良博士より貸与を受けた食物ライブラリーをもちいてスクリーニングを開始した。

(3) 新規遺伝子単離  
患者においてホモの SNP が連続し、非罹患者と明らかにハプロタイプが異なる領域を全染色体上に13箇所特定した。今回作成した中枢神経発現遺伝子データベースではその領域におよそ300前後の遺伝子が存在しており、そのいずれかがこの家系の疾患遺伝子である可能性が高い。

(この研究は神奈川県立こども医療センター神経内科山下純正博士、同遺伝科黒澤健司博士、横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学松本直通博士、国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第二部井上 健博士との共同研究により行われた。)

G. 研究発表

論文発表

1) Osaka H, Ogiwara I, Mazaki E, Okamura N, Yamashita S, Iai M, et al. Patients with a sodium channel

alpha 1 gene mutation show wide phenotypic variation. *Epilepsy Res* 2007; 75: 46-51.

2) Setsuie R, Wang YL, Mochizuki H, Osaka H, Hayakawa H, Ichihara N, et al. Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem Int* 2007; 50: 119-29.

3) Tohyama J, Akasaka N, Osaka H, Maegaki Y, Kato M, Saito N, et al. Early onset West syndrome with cerebral hypomyelination and reduced cerebral white matter. *Brain Dev* 2007. Dec 5; [Epub ahead of print]

学会発表

1) 10<sup>th</sup> Annual Meeting of the Infantile Seizure Society;  
INTERNATIONAL SYMPOSIUM  
ON BIOLOGY OF SEIZURE  
SUSCEPTIBILITY Hitoshi  
OSAKA et al

Distinct clinical course of SMEI with SCN 2A mutation-Comparison with SCN 1A mutations et al. April 7 2007, Tokyo

2) 49 回日本小児神経学会総会  
Pelizaeus-Merzbacher 病の病態解析  
小坂仁ら

5月5-7日2007, 大阪

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、昨年度に引き続き 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、さらに神経前駆細胞の障害が生後の大脳の発達に及ぼす形態的な変化について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。昨年度行った神経幹細胞のマーカー Musashi1、Nestin を用いた VZ/SVZ の免疫組織学的検討の結果得られた VZ/SVZ の組織傷害の病変の広がり、死亡までの期間との相関について検討した。また、二年以上の長期生存例 2 例に関して、大脳白質と皮質について成熟神経細胞のマーカーである HuB、MAP2、NeuN や大脳皮質 II 層特異的マーカー calbindin を用いた免疫組織化学的解析を行った。その結果、VZ/SVZ の組織傷害は生存期間が長期化するに従い、より広範化する事が分かった。また長期生存例の大脳白質には異所性の神経細胞が多数存在すること、これらの症例では大脳症構造の微小な異常が見られることが明らかになった。これらの所見は、超未熟児の神経前駆細胞の傷害に対する治療的介入は、なるべく早期に行う方が望ましいと思われた。また、白質病変を伴う超未熟児では、生後の神経発生の異常が起こる可能性があることが示唆された。

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