

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

昨年度は、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例の正常対照例の剖検脳を対象に、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した。本年度は、脳室周囲および脳室下領域の病変の広がりや出生後の生存期間、すなわち病巣形成後の経過時間との間の関連性について検討した。また、神経幹細胞の傷害が出生後の大脳の発達に影響を及ぼす可能性について、長期生存例2例について、大脳白質および皮質について、postmitotic な神経細胞のマーカーである HuB、MAP2、NeuN や成熟した脳での第II層のマーカーである Calbindin などを持ちいた組織学的解

析を行った。

C. 研究結果

(a) ヒト超未熟児の剖検脳を用いた解析 昨年度に引き続き、41例の在胎28週未満の超未熟児 PVL 症例、40例の正常対照例を持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。HE染色に加え、Musashi1、Nestin の免疫染色等を結果を踏まえ、これを focal、widespread、complete の3段階にクラス分けし、急性期、亜急性期、慢性期についてそれぞれの分布を検討した。その結果、急性期の症例では病変は focal に組織障害が顕著な部位と比較的保持されている部位が混在している症例が多かったが、亜急性期、慢性期になるに従い、病変は wide spread から complete へとより広い範囲での障害が顕著になる傾向があった。このことより、超未熟児の神経幹細胞障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。

生後2年以上の長期生存例を対象にした解析では、大脳白質における HuB、MAP2、NeuN などの postmitotic な神経細胞のマーカーによる免疫組織学的解析にて、これらのマーカーいずれに対しても陽性の異所性神経細胞が著

明に増加していることが明らかになった。また、大脳皮質では通常2歳以上では第II層に局限する calbindin 陽性細胞が、第V層にも数多く見られたことより、大脳層構造の構築の遅延等の障害が起こっていることが示唆された。

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大脳白質病変である。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大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病態メカニズムは依然、不明である。我々は昨年度の本研究成果として、大脳白質病変を伴う超未熟児の剖検脳では、脳室周囲領域の神経前駆細胞の傷害が高頻度に見出された。本年度は、さらにその病変の広がりが、経過を応ごとに広範囲になる可能性を示唆する所見を得た。これは、早期の治療的介入がその後の尊敬学的後遺症を軽減させる可能性

があることを示唆する所見である。また、長期生存例での大脳白質での異所性神経細胞の存在はこれらの患者におけるてんかんの原因との関連として興味深いのみならず、神経幹細胞障害による神経発生の障害の一所見としての可能性があり、興味深い。同時に、大脳皮質の微小な層構造以上も同じ神経発生の障害ないしは遅滞として捉えられる。これらの所見は、超未熟児の広範な大脳白質病変に伴う神経幹細胞の傷害により、その後の神経発生に障害を来し、これが後の高次脳機能障害を来すという我々の作業仮説に矛盾しないものである。これは、生後の大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

脳室周囲の大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に伴い、その後の白質、灰白質の発育全般に影響を及ぼすこと示唆する所見を得た。今後、神経幹細胞の低酸素低栄養状態における脆弱性の病態について、神経幹細胞培養等の病態モデルを構築し、治療的な介入を目指した、病態解析モデルを構築していきたい。

F. 研究発表

- (1) 論文発表

原著

1. Deguchi K, Clewing JM, Elizondo LI, Hirano R, Huang C, Choi K, Sloan EA, Lücke T, Marwedel KM, Powell RD, SantaCruz K, Willaime-Morawek S, Inoue K, Lou S, Northrop JL, Kanemura Y, van der Kooy D, Okano H, Armstrong DL, Boerkoel CF. Neurological phenotype of Schimke immuno-osseous dysplasia and neurodevelopmental expression of SMARCA1. In revision.
2. Hirano R, Interthal H, Huang C, Nakamura T, Deguchi K, Choi K, Bhattacharjee MB, Arimura K, Umehara F, Izumo S, Northrop JL, Salih MAM, Inoue K, Armstrong DL, Champoux JJ, Takashima H, Boerkoel CF. Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy: consequence of a Tdp1 recessive neomorphic mutation? *EMBO J*.

2007;26:4732-43.

3. 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

シンポジウム

1. Deguchi K. Extremely preterm infants with white matter injury: impaired neural progenitor cells and cortical development. 35th Japanese Fetal and Neonatal Neurological Conference (Osaka, Tokyo)

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

資料 1

平成 1 9 年度 第 2 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

『小児期の脳白質病変の病態解明に関する研究』

平成19年度 研究報告会議

日時：平成20年1月17日（木）16-18時

場所：帝国ホテル内 小会議室

東京都千代田区内幸町1-1-1 03-3504-1111

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

16:00 開会の挨拶 井上 健

16:10 研究総括 井上 健

分担研究発表

16:20 出口貴美子

16:40 小坂 仁

17:00 赤澤智宏

17:20 井上 健

17:40 ディスカッション

17:00 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—

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しての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。運動機能の明らかな改善は見られていない。病理学的解析にて、大脳白質の TUNEL 陽性細胞の減少を認め、オリゴデンドロサイトのアポトーシスからの保護作用が示唆された。今後、視神経の超微帯観察などにより、髄鞘化の評価を行っていく予定である。

本研究は、国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第二部 余荔華、岩下晴美、山本良子、井上直子博士および本研究班員 小坂 仁博士、出口貴美子博士らの協力により行われた。

分担研究 赤澤智宏

BAC を用いた Sox10 トランスジェニックマウスの作成

—病態モデル動物マウスの作成と解析—

赤澤智宏

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

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。昨年、本班会議で Sox10 がユビキチンと 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。ユビキチン化と SUMO 化の共通標的となる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（ドミナントポジティブ Sox10）。

今年度は 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かを明らかにし、病態と相関を明らかにする。そのために、モデル動物マウスの作成を試みた。Sox10 のプロモーター領域は従来の研究から数 10kbp に及ぶことが報告され、コンベンショナルなトランスジェニックマウスの作成では Sox10 の内在性の発現を再現することは難しい。そこで、マウス Sox10 のプロモーター領域近傍 200kbp の BAC ベクターにドミナントポジティブ Sox10 を組み込み、BAC トランスジェニックマウスを作成した。その結果、ドミナントポジティブ Sox10 は、in vivo で機能的分子として働き、その結果、胎生致死となることが明らかになった。今後、疾患特異的変異を BAC ベクターに導入することによって、先天性白質形成不全のモデル動物マウスを作成し、治療法・予防法の確立につながる基盤研究とする。

本研究の進行に当たって、国立精神・神経センター神経研究所 高坂新一先生、診断研究部 井上高良先生、井上由紀子先生、疾病研究第二部 井上 健先生にご協力いただきました。

先天性大脳白質形成不全症の診断・治療

小坂 仁、山下純正、黒澤健司、松本直通、井上 健

神奈川県立こども医療センター神経内科、遺伝科
横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学
国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第二部

緒言；

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 遺伝子診断を行ってきた。それらの患者は①アミノ酸変異を持つ群②遺伝子重複を持つ群③遺伝子異常が見つからない群に大別される。それぞれに対して今年度は下記の研究を展開した。

- ① 髄鞘化不全マウスに対する治療薬での効果評価方法の確立
- ② スクリーニング系の開発とそれによる PLP 重複治療薬スクリーニング
- ③ 新規遺伝子単離による診断率の向上

方法；

- ① *msd* (A242V)変異を有するマウスの 1, 2, 3, 4 週齢の中枢神経系を、光学顕微鏡、電子顕微鏡的に観察して、薬物効果に適した評価方法を確立する、
- ② 内因性の PLP を発現している細胞株を選択し、内因性の PLP の遺伝子発現量を簡便に測定する系を開発し、それをを用いて PLP 発現を負に制御する薬物を見いだす。
- ③ 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家系の全染色体につき多型解析を行い(homozygosity mapping) 原因遺伝子領域を狭める。

結果および考察；

- ① 光学顕微鏡的な観察 (HE 染色, KW 染色, epon 包埋超薄切後トレイジンプルー染色)による方法では、髄鞘形成不全を定性的に評価する方法としては適していない。電顕による観察は *msd* に認めた髄鞘化不全の評価に適しており、この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。今後個体数を増やすとともに、ミエリンの人工的な崩壊を防ぐ標本作製により厳密な評価系を確立したい、
- ② ラット C6 グリオーマから内因性の PLP 発現を RT-PCR 法により測定する系を確立した。
現在、スクリーニングのための最適な条件を検討している。今後日本水産研究所から貸与され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行う。
- ③ SNP array により homozygous な領域を全染色体上に複数同定した。昨年作成したヒト脳発現データベース上ではこの領域に存在する遺伝子数は約 300 であり、さらに別の方法で候補遺伝子を絞り込む必要がある。

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。本年度は大脳白質および大脳皮質における神経細胞の分化遊走の異常について検討した。

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 41 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。このうち長期生存例 11 症例について、大脳白質および皮質の神経細胞の分化遊走の異常の有無を検討した。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。また、post-mitotic neuronal marker として NeuN、MAP2、HuB、大脳層構造特異マーカーとして calbindin を用いて組織学的検討を行なった。

結果：1) 正常コントロールでは大脳白質に神経細胞はほとんど認めないが、PVL 症例では大脳白質に NeuN、MAP2、HuB 陽性の神経細胞の増加を見た。2) 大脳皮質では、通常 II 層に限局される calbindin 陽性細胞が PVL 症例では第 V 層にも数多く確認された。

考察：昨年我々は、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 neural progenitors の絶対数の減少を引き起こすことを報告した。本年度は、これに伴い長期生存症例で大脳白質および皮質の神経細胞の分化遊走の遅滞を示唆する異常所見を見出した。これは超早産児における神経幹細胞の障害が、生後の大脳の発育全般に影響を及ぼす可能性が高いという我々の仮説を支持するものである。

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

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

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
経時的検索

PCWHの病態
SOX10遺伝子

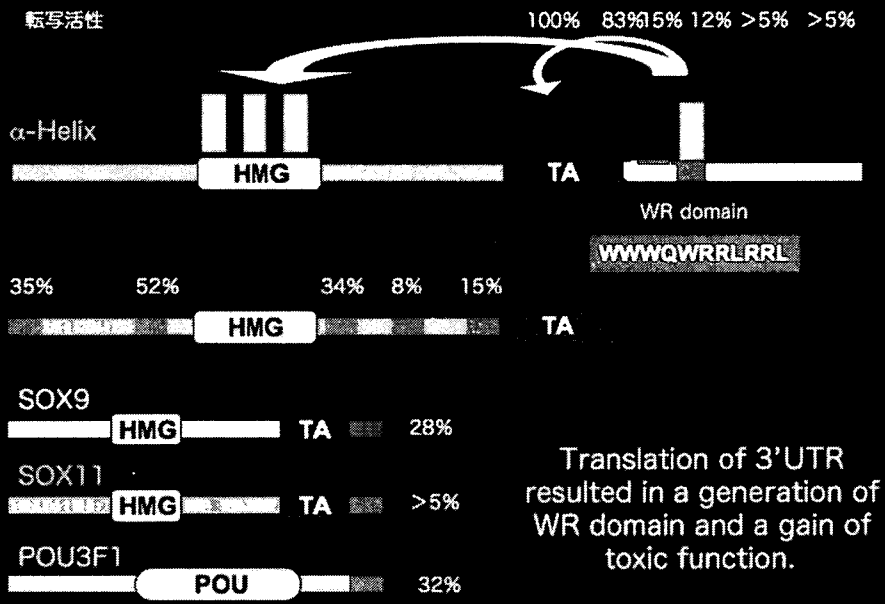
PMDの病態
PLP1遺伝子

出口貴美子
ベイラー医科大学
国立精神・神経センター

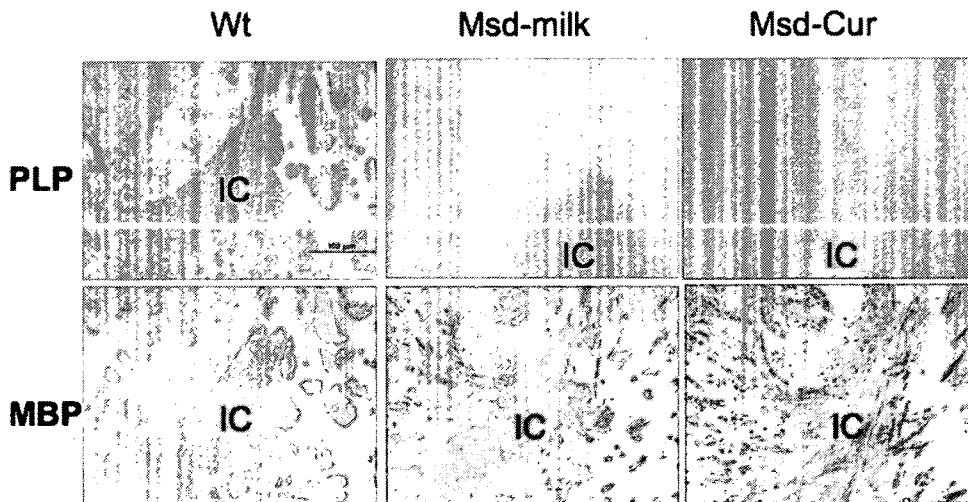
赤澤智宏
東京医科歯科大学

小坂 仁
神奈川県立こども医療センター

SOX10のextension変異によるPCWHの病態



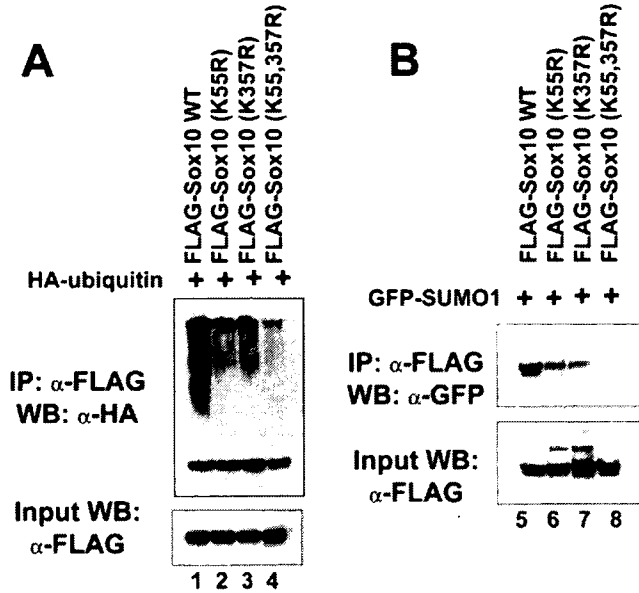
Neuropathological examinations



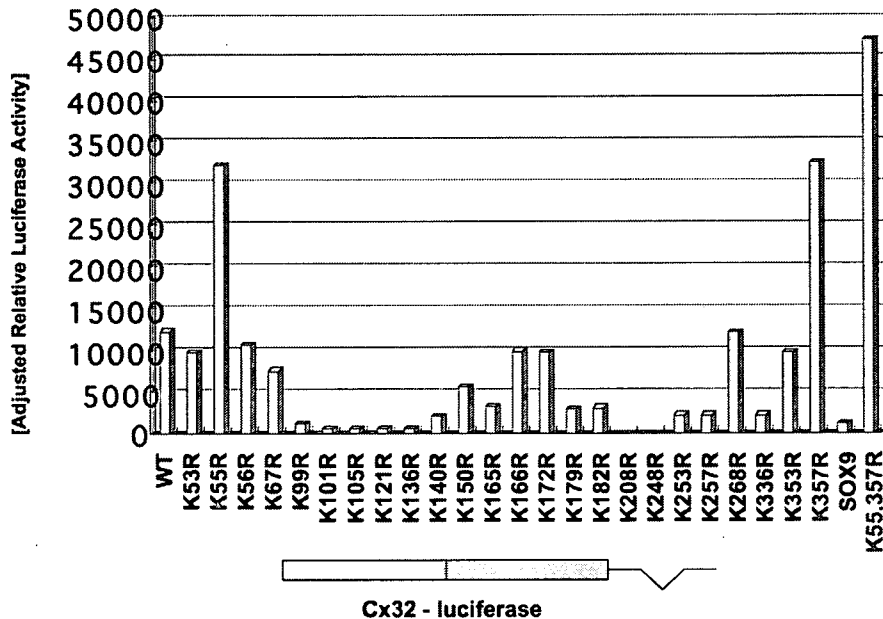
no apparent difference at glance

2. 赤澤智宏

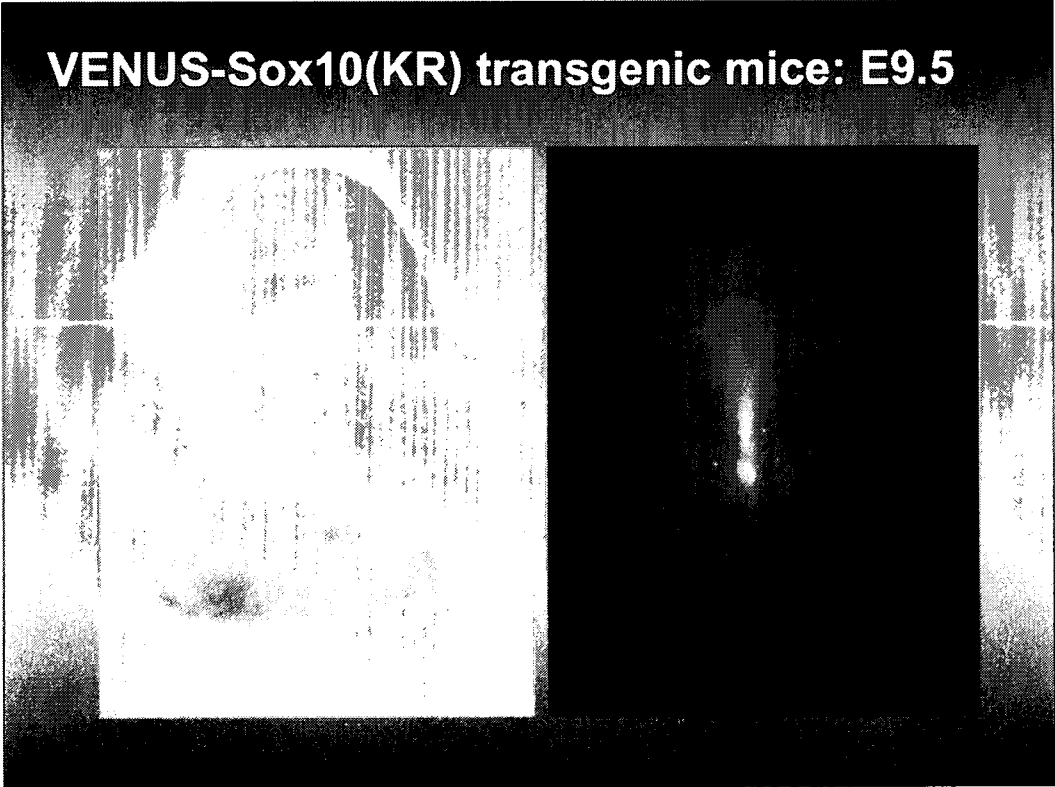
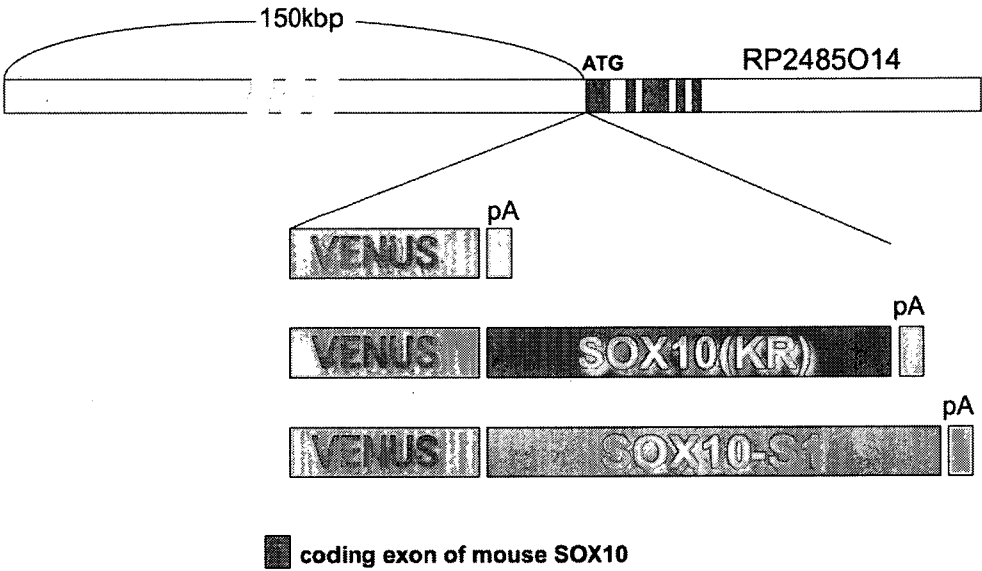
SOX10の55番目、357番目のアミノ酸をKからRに置換したKR mutantは翻訳後修飾を受けない



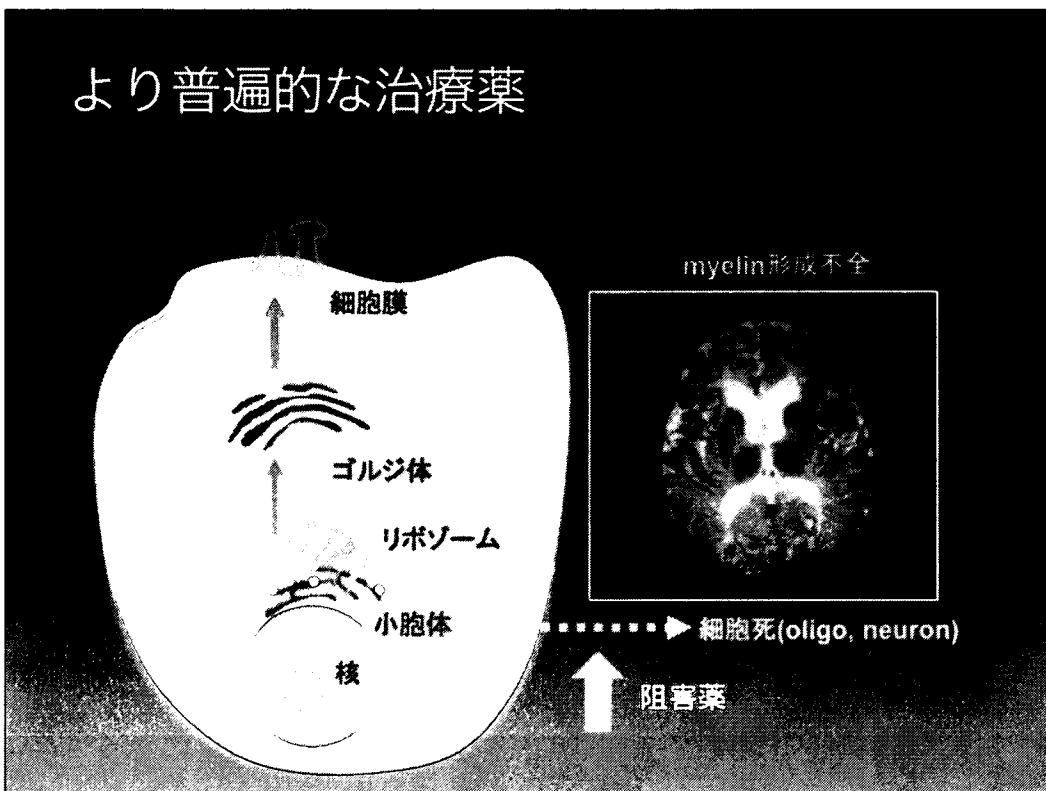
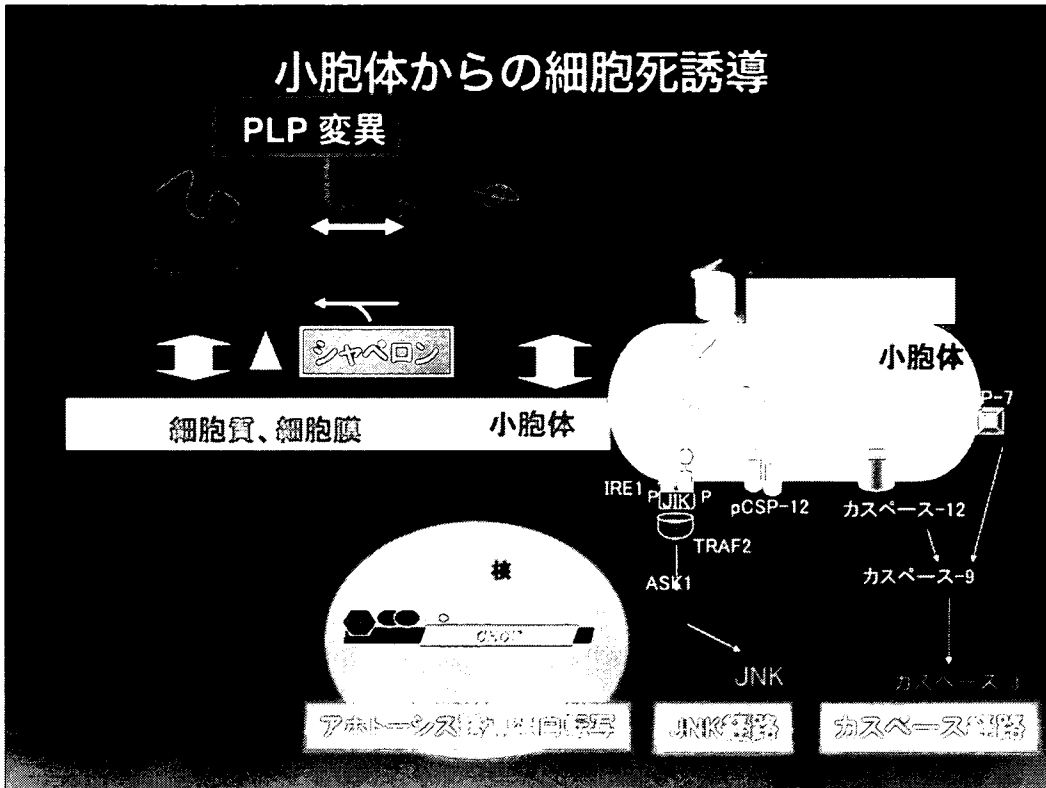
SOX10のKR mutantはConnexin32プロモーター活性を増強する



Construction of BAC vector

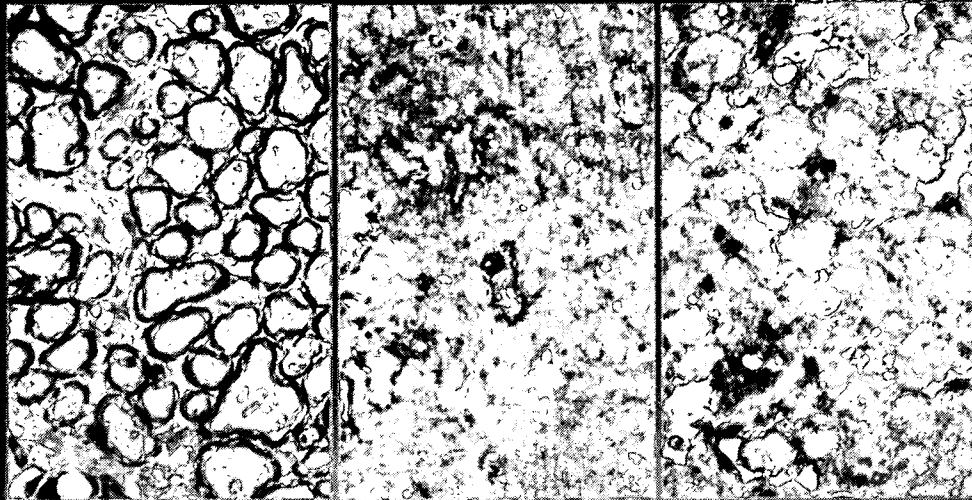


3. 小坂 仁



電顕による髄鞘化不全の評価

4w, optic nerve

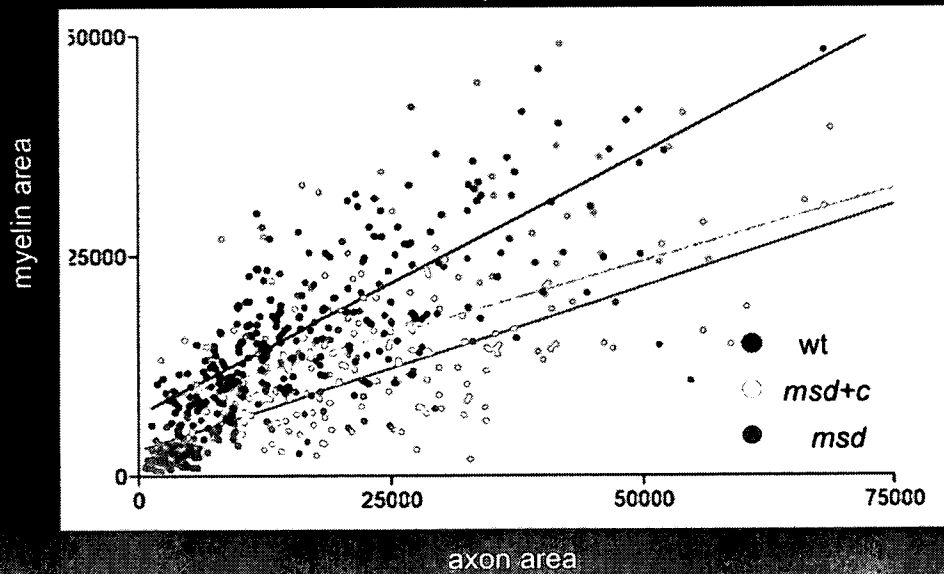


wt


msd

Msd+c

Myelin(Y)/Axon(X)の断面積 4w, optic nerve




4. 出口貴美子



What are the problems associated with periventricular white matter injury (PVWI) in extremely preterm infants (EPIs) ?


cognitive and behavioral impairments in surviving EPIs (72%)



Not CP! (only 4% had CP)

Marlow, et al. New Eng J Med 2005

MRI



- Diffuse white matter injury and reduction of white matter volume
- Ventricular wall irregularity
- Growth retardation of the cortical grey matter

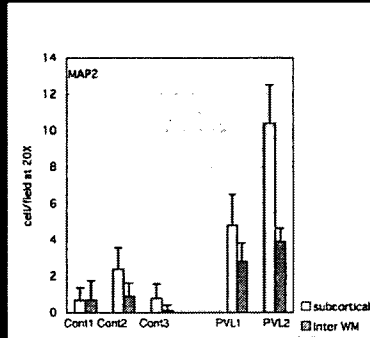
26GW at birth, 1y8mo of age

Interruption of neurogenesis and gliogenesis in EPI with PVWI

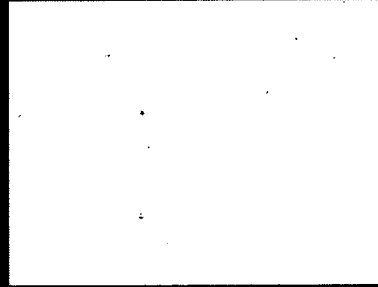
1. Increased number of NeuN, Map2 and HuB positive neurons in White Matter
2. Calbindin positive ectopic neurons in Cortex

Abnormal neural migration ?
Abnormal differentiation?

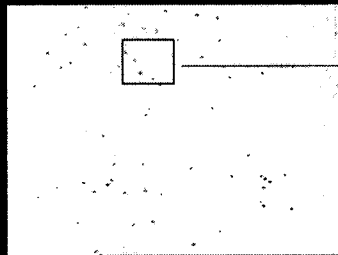
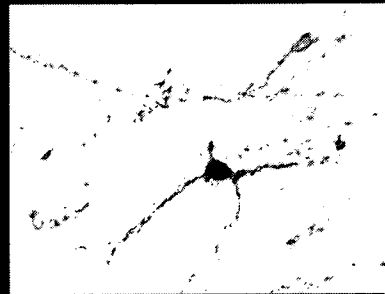
MAP2



4Y normal brain, Inter WM



24GW survived 6Y, Inter WM

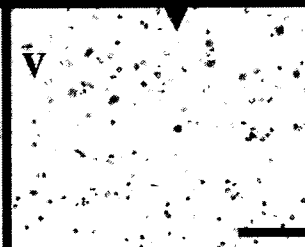


Cortical impairment in EPI with PVWI

1Y, Control



23GW+21M, PVWI



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
井上 健	ゲノミクス・機能的ゲノミクス・エピジェネティクス—精神遅滞との関連	モイラスミス (著) 後藤雄一 (監訳)	精神遅滞と発達の遅れ	診断と治療社	東京	2007	142-159
Shiga K, Inoue K, Lupski JR.	Mendelian, Non-mendelian, multigenetic inheritance and complex traits	Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, Nestler EJ	The Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease 4th edition	Butter Heinemann	Philadelphia PA	2007	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inoue K, Ohshima 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.	<i>Hum Mol Genet.</i>	16	3037-46	2007

Takano K, Nakagawa E, <u>Inoue K</u> , 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.	<i>Am J Med Genet B</i>			in press
Liang, C. Lee, J. S., Inn, K. S., Gack, M. U., Li, O., Robert, E. A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., <u>Akazawa, C.</u> , Jung, J. A.	Beclin1-binding UVRAG targets the HOPS complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking.	<i>Nature Cell Biol</i>	350	691-697	in revision
Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., <u>Akazawa, C.</u> , and Kohsaka, S.	Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis.	GLIA	55	604-616	2007
Kim, B. Y. and <u>Akazawa, C.</u>	Endosomal trafficking of EGFR regulated by hVps18 via interaction of MVB sorting machinery	Biochem. Biophys. Res. Comm.			in press
<u>Akazawa, C.</u> , 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