

2008330/4A

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

(H18-こころ一般-015)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 井 上 健

国立精神・神経センター 神経研究所

平成21(2009)年 3月

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

(H18-こころ一般-015)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 井 上 健

国立精神・神経センター 神経研究所

平成21(2009)年 3月

## 目 次

I. 総括研究報告	
小児期の大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	6
井上 健	
2. 遺伝性髄鞘形成不全における転写因子 SOX10 分子メカニズムの解析	14
赤澤智宏	
3. 小児期白質形成不全症の診断・治療法の確立	18
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	23
出口貴美子	
III. (資料) 平成20年度班会議資料	28
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	43
V. 研究成果の刊行物・別刷	46

## 小児期の大脳白質病変の病態解明に関する研究

研究代表者 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

小児期の大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大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

##### 研究代表者

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

##### 研究分担者

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 国立  
精神・神経センター 神  
経研究所 研究生

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の大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、大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、小児期の大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

当該研究は大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ため、これを治療の介入点として、小胞体ストレスを病態機序とする幾つかの遺伝性疾患での治療モデルが提唱されているクルクミンを用いて、PMD の点変異モデルマウス MSD に対して治療実験を行い、その効果と分子薬理動態を解明する。

また、新たに点変異より患者数の多い *PLP1* 遺伝子重複に対する治療薬候補の同定を目指し、ラット C6 細胞の内在性 *PLP1* の発現量を変化させる化合物のスクリーニングを行った。この結果、幾つかの化合物を抽出し、これを正常マウスに投与し、生体内で *PLP1* 発現の変化を観察した。

(b) *SOX10* 解析は赤澤との共同研究によりすすめる。昨年度は、*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。本年度は、PCWH の生体内での病態を明らかにするために、BAC トランスジェニックを用いた PCWH のマウスモデルの作成を試み、得られたマウスの解析を中心に研究を行った。内在性 *SOX10* の転写調節領域および蛋白コード領域を含む全長 220Kb の BAC クローンに対して、DNA 組換えにより蛍光蛋白ビーナス cDNA や変異体 *SOX10* を組み込んだものをマウスに導入し、トランスジェニックマウスを得た。

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。昨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。本年度は、剖検脳の数が少ない長期生存例を新たに2症例得ることが出来たので、この解析を行った。さらに我々の仮説を実証するためのモデルとして、BrdU

標識後の妊娠マウスの子宮動脈結紮による一時的な低酸素虚血負荷を加えた胎仔あるいは新生仔脳の解析を行う実験系の確立を行った。

### 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。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た。これに加えて、投与による髄鞘化の改善を様々な方法を用いて検討したが、結論としてクルクミン投与による明らかな改善効果は見られなかった。従って、クルクミンは細胞死の抑制効果を有するが、再髄鞘化の促進効果見られない事が分かった。一方、培養細胞での分子薬理効果の解析を昨年から引き続き行った。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、依然、培養細胞系の実験に関しては外来性の遺伝子導入が困難であることが明快になったので、現在オリゴデンドロサイトの一次培養系を確立し、その評価を行っている。

昨年度小坂らは、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い、複数の化合物が PLP1 の発現量を低下させることを見出した。これらを正常マウスに経口投与し、生体内での PLP1 発現抑制効果も検証した。これらの化合物は今後 PLP1 重複症例の治療薬の候補として有用であると考えられる。

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。昨年度、PLP1 遺伝子の異常が否定された PMD 類似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って同定した原因遺伝子の候補領域とヒト脳発現データベースとの照らし合わせにより、候補遺伝子約 300 を抽出した。本年度、これらの中から原因遺伝子の同定を目指したが、最終的に最近 PMD 類似の先天性白質形成不全症の原因遺伝子として報告された Cx47 (GJC2) のプロモーター領域に変異を見出すことができた。

SOX10 の発現調節機構として、一昨年度にユビキチンと SUMO1 の翻訳後修飾が SOX10 の発現量の調節を行っていることを見出した。そして、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、昨年度は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。この結果、競合的にユビキチンと SUMO1 の翻訳後修飾を受ける SOX10 内のリジン基をアルギニン基に置換した SOX10 をトランスジェニックマウスとして導入すると、100%の個体が発生早期に致死性となることが明らかになった。

本年度はさらに、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 SOX10 遺伝子変異をこのトランスジェニックマウスの系を用いて導入し、生体内でその病態の解析を行うことが出来るツールとして、動物モデルの開発を行った。作成したモデルは、内在性の SOX10 のコード領域を蛍光蛋白ピーナス単体 cDNA に置換したものと PCWH 型の変異 SOX10cDNA に置換したものの2種類である。前者により内在性 SOX10 の発現に一致して、強い蛍光を発するマウスの作成に成功した。これにより、この BAC トランスジェニックの手法が、内在性 SOX10 に一致したトランスジーンを発現を得られる事が分かった。後者により変異型 SOX10 を発現するトランスジェニックマウスので、これは PCWH に関連する症状を呈す

ることが明らかになりつつある。この詳細については、分担研究報告に記載されている。これらの研究により、我々が1999年に初めて見出し、その後その疾患概念を確立した PCWH のマウスモデルが初めて確立された。

早産児の虚血性大脳白質傷害の解析については、これまで行ってきた超早産児の PVL 剖検脳を用いた解析を継続した。特に剖検例が少なく貴重な長期生存例について、新たに2症例を確保することが出来た。これらは、これまで同様に解析に用いられ、都合43例の PVL 剖検例となった。本年は、昨年まで行ってきたヒト剖検脳を用いた解析に加え、動物モデルの確立を目指した。E16 に BrdU で標識した後、E18 に妊娠マウスの子宮動脈を一時的結紮し、生後7日目に解析した。まだ生存仔が2匹しか得られず、手技の技術的改善が必要と思われるが、これらの個体では BrdU の免疫染色にて、標識された神経細胞の移動が障害され、目的部位に至らず皮質あるいは白質にとどまっている細胞の数が正常に比べて有意に多い事が分かった。動物モデルは、これまで症例で得られた所見が再現出来るか、そして、その所見に関わる病態は何であるか、最後にそれらの症状を治療することが出来るのか、といった点を明らかにするために重要であると思われる。まだプレリミナリー

な結果が得られたのみであるが、今後さらに解析をすすめる必要があると思われる。

#### 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と期待される。

三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。本年度をもって、本研究課題の研究期間が満了となるが、本研究により数多くの大脳白質病変の病態により迫る知見を得る事が出来た。課題に迫っては、まだ完結に至っていない研究もあるので、今後さらにこれらの研究を継続してい

く。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、さらに国民の健康維持に資することが期待される。

#### 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

「神経堤細胞のライブイメージングマウス」発明者：赤澤智宏、共同発明者：高坂新一、井上健、井上高良  
出願中



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

研究代表者 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、疾患モデル動物を用いた解析を行った。ペリツェウス・メルツバッハ病（PMD）の原因遺伝子 *PLP1* の点変異による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、その有効性を昨年に引き続き検討した。これにより、PMD に対する治療薬としてクルクミンが有用である可能性を示唆した。また、遺伝性白質変性症 PCWH 患者に見いだされた *SOX10* 変異を導入したトランスジェニックマウスを作成し、その表現型の解析を行った。これにより、はじめて PCWH の動物モデルの創出に成功した。

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、疾患動物モデルを用い、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。方法は、*PLP1* 遺伝子に点変異(A242V)をもつ重症型 PMD の自然発症型モデルマウス MSD に対して、生後3日目よりクルクミンを経口投与し、その治療効果を一般状態、寿命、神経病理学的解析および分子遺伝学解析などにより、検討した。さらに、細胞薬理学的な効果を検証するために、オリゴデンドロサイトの初代培養系を確立した。

(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。我々は昨年度、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、これを細胞培養系(*in vitro*)の解析で実証した。そこで、本年度は、これらの生体内での分子病態を明らかにするために PCWH のモデルマウスの創出を目的として、変異型 *SOX10* を導入した BAC トランスジェニックを作成した。さらに、これらの遺伝学的および表現型解析を行い、PCWH のモデルとしての妥当性を検討した。

### 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 昨年度、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、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が、これらの非ミエリン形成細胞ではPLP1蛋白が非常に不安定であることが明らかになった。その理由に関しては、依然不明である。そこで、本年度はMSDおよび野生型のマウスの脳からオリゴデンドロサイトの初代培養系を確立し、これを用いた薬理病態の解明を目指した。オリゴデンドロサイトは、生直後のマウスの脳より混合培養として一次培養を行った後、震盪培養により分離し、二次培養後、PLP1やMBPの発現を確認した。この結果、約90%の純度でオリゴデンドロサイトの分離培養が確立出来たことを確認した。これらの細胞は、形態的には未熟な前駆細胞(OPC)と思われた。MSDと野生体から同様にオリゴデンドロサイト初代培養細胞を確立し、ERストレスマーカーの発現を比較した。In vivoでは、BiP、CHOPなどのERストレスマーカーが上昇することが知られているが、今回MSDから確立したオリゴデンドロサイト培養細胞ではこれらの上昇が見られなかった。これは、これらの細胞がまだ未分化な状態であり、PLP1蛋白の発現量が成熟オリゴデンドロサイトよりも低い、ERストレスが細胞にかかっていないのではないかと考えら

れた。今後、これらの細胞を分化させ、髄鞘蛋白の発現を亢進させる実験系の確立が必要であることがわかった。

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引き続き行った。昨年度までに、MSDの寿命が非投与群では中央値28日で死亡するのに比べ、投与群では35日と約1週間延長した( $p<0.05$ )。本年度は、より詳細な病理学および分子薬理的検討を行った。PMDの本体である髄鞘形成については、電子顕微鏡、髄鞘化繊維数の定量、MBP免疫染色、MBP蛋白量の定量など様々なアプローチから評価を試みたが、いずれの方法でも髄鞘化の促進を示すような所見は得られなかった。

MSDマウスでは、折畳み異常をおこした変異体PLP1蛋白のERへ蓄積とこれによるERストレスの誘導により、オリゴデンドロサイトのアポトーシスがおこり、これが髄鞘形成不全の原因となると考えられている。そこで、クルクミン投与により、このオリゴデンドロサイトのアポトーシスに変化が起るかどうかを検討した。まず、TUNEL法およびcaspase3免疫染色とニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに特異的なマーカー(NueN、GFP、CNPase)との二重染色を行い、ほぼ100%のアポトー



シス陽性細胞がオリゴデンドロサイトであることを確認した。その上で、MSD および野生型のマウスを用いた解析で、大脳白質におけるアポトーシス陽性細胞の数を定量的に解析した。その結果、クルクミン投与により内包および皮質下白質で減少していることが明らかになった。

クルクミン投与の薬理機構を解明するために、ER ストレス反応に関わる分子の mRNA 発現量の変化を、定量的 RT-PCR により解析した。内包および脊髄の mRNA を抽出し、これを用いた。BiP、Herp、Calnexin、Calreticulin、Chop、Gadd34 の 6 分子を標的とした。生後 14 日目の非投与 MSD 群では、非投与野生型に比べ、上記の 6 分子すべてで発現の上昇が内包で見られた。脊髄では BiP と Chop のみで上昇が観察された。これらの変化は、クルクミン投与により軽減しなかった。生後 21 日の検体では、非投与群での ER ストレスマーカーの変化そのものが、あまり見られなかった。以上の結果、クルクミン投与は、少なくともこの解析系で検出できる感度において、ER ストレス反応に関与する分子の発現量に影響を与えない事が推測された。以上の結果より、クルクミンが PLP1 点変異による PMD の治療薬の候補となる可能性が示唆された。分子薬理病態として、オリゴデンドロサイトの細

胞死の抑制が明らかになったが、ER ストレスに関する作用は依然、明らかになっていない。また、クルクミン投与により、髄鞘形成を促進するような劇的な効果を示唆する所見は見出せなかった。

**(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** 本年度は、昨年度から行っている BAC トランスジェニックのシステムを用いた PCWH モデルマウスの作成をすすめた。昨年度までに行ってきた SOX10 変異の機能解析の結果、PCWH の原因となっている SOX10 変異は優性阻害作用と機能獲得作用の 2 つが存在することが明らかになった。そこで今回は機能獲得作用を持つと考えられる SOX10 の延長型変異について、トランスジェニックマウスを作成し、生体内での SOX10 変異の病態を探ることにした。トランスジェニックは SOX10 の転写調節領域が広範囲に渡り、通常のプラスミドベースの遺伝子導入が使用出来ないことから、巨大ゲノム DNA をインサートとして持つ BAC クローンを用いたトランスジェニックの系を用いることとした。ゲノムデータベースより SOX10 ゲノム領域を上流下流にわたって約 250Kb の大きさで含む 1 クローンを選択した。これを大腸菌内での組換えにより、蛋白コード領域をトランスジーンに置換

した。トランスジーンは N 末に蛍光蛋白 Venus を融合させた延長型ヒト SOX10cDNA で、コントロールとして、Venus を挿入したものを作成した。これについては、赤澤の分担報告書に詳細が記載されている。常法に則り、受精マウス胚に BAC DNA を打込み、偽妊娠母親マウスの子宮に移植して、トランスジェニックマウスを得た。現在 2 ラインが選ばれ、1 ラインについて詳細な解析されている。多くの個体が、生後 3 週目に離乳したあとに死亡することが明らかとなった。これらの個体は、腸管が膨張していることが明らかとなり、巨大結腸症の症状と考えられた。そこで、生後 11 日目の個体について、腸管神経叢のマーカーである PGP9.5 の免疫染色による解析を行ったところ、トランスジェニックマウスでは、野生型に比較して、明らかに PGP9.5 陽性の細胞がゲンショウしており、腸管神経叢の発生の異常が起こっており、Hirschsprung 病の表現型を呈していることが示唆された。ほぼすべてのトランスジェニックマウスの体毛の色素が部分的に脱失していることから、メラノサイトの分化異常の存在が疑われた。精神保健研究所知的障害部稲垣真澄はくしの協力により、聴性脳幹反応 (ABR) の測定を行ったところ、トランスジェニックマウスでは、閾値が著しく低下しており、感音

性難聴が存在することが明らかになった。体毛の色素異常とあわせ、Wardenburg 症候群の表現型と考えられた。

生後 10 日頃に特に著明な運動の障害が見られることから、神経系の何らかの異常が存在することが示唆された。生後 20 日ごろの脳を観察したところ、HE 染色では、明らかな異常を見出すことが出来なかったが、MBP の免疫染色を行ったところ、MPB の発現の低下が、髄鞘化のプロセスにそって遅れていることが示される所見が得られた。これらの解析は、まだ十分ではないが、中枢神経の髄鞘化の遅延を示す所見として、注目している。

末梢神経系の解析として、座骨神経の標本を採取したが、トランスジェニックマウスでは、繊維束の形成の異常を思わせる肉眼所見が得られた。今後、MBP などの髄鞘蛋白に対する免疫染色や、電子顕微鏡での髄鞘化の観察を行う予定である。

これらの一連の所見より、今回作成したトランスジェニックマウスは OCWH の 4 つの表現型のコンポーネントをすべて有している可能性が高い。このマウスは PCWH 表現型を呈する初めての動物モデルであり、今後の病態解析に活用出来ると考えている。

#### 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、PMD モデルマウス MSD を用いて引き続き行った。その結果、マウスの寿命の延長とオリゴデンドロサイトの細胞死の抑制効果が見られ、クルクミンが点変異による PMD の治療薬候補となる可能性が示唆された。しかしながら、分子薬理動態に関しては、まだ十分に理解されておらず、今後の検討課題として残された。

(b)我々が最初に報告し、その疾患概念を確立した大脳白質変性症を伴う複合型神経堤症候群 PCWH のモデル動物の確立を目指し、トランスジェニックマウスを作成し、その表現型の解析を行った。まだ、解析中ではあるが、これまでに PCWH の 4 つの表現型コンポーネントを示唆する所見が得られており、初めての PCWH のモデルとなる可能性が高い。

## 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さらに知見を得ることができ、PMD の治療薬候補として検証をすすめることが出来た。加えて、我々が確立した型は他の候補薬の検証に用いることが出来るので、今後新たな候補化合物のスクリーニングをすすめていきたいと考えている。

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解析の結果を生かし、本年度は BAC トランスジェニックマウスの手法を用いて、初めて PCWH の動物モデルの作成に成功した。今後このモデルの解析を継続し、PCWH の病態を明らかにしていくとともに、治療法開発への足がかりとしたいと考えている。

## F. 研究発表

### (1) 論文発表

原著

1. Takano K, Nakagawa E, Inoue K, Kamada F, Kure S, Goto YI A loss-of-function mutation in the *FTSJ1* gene causes nonsyndromic X-linked mental retardation in a Japanese family. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2008 Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.; 147B(4):



479-84

2. 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 SMARCAL1. *J Neuropath Exp Neurol* 2008;67:565-77

#### 書籍

1. 井上 健 遺伝子治療の最前線  
編集：有馬正高、加我牧子、稲垣真澄  
小児神経学 2008 診断と治療社 p510-511

#### (2) 学会発表

##### シンポジウム

1. K. Inoue. PCWH-a complex neurocristopathy caused by SOX10 mutation. 2008,9,16. 2nd International SOX meeting 淡路島

##### 国際学会

1. K. Inoue, T. Ohyama, Y. Sakuragi, R. Yamamoto, NA.

Inoue, L-H. Yu, 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. Jun 9, 2008. 18th Meeting of the European Neurological Society, Nice, France

2. Inoue, K. Takano, Y. Goto. Nonsense-mediated mRNA decay may be involved in the down-regulation of the *Alu*-containing splicing variants. Nov 13 2008. 58<sup>th</sup> Annual meeting of the American Society of Human Genetics, Philadelphia, USA

##### 国内学会

1. 井上健、赤澤智宏、山本良子、井上直子、Lupski, JR. PCWH-新たな遺伝性ミエリン疾患をとりまく SOX10 変異の分子病態メカニズム、第 31 回日本神経科学大会、2008, 7, 9 東京
2. 余荔華、岩下晴美、山本良子、出口貴美子、B. Antalffy、井上直子、伊藤雅之、後藤雄一、小坂仁、井上 健 クルクミン：モデルマウスを用いた Pelizaeus-Merzbacher 病の治療法開発の

試み 第53回日本人類遺伝学会 2008年9月28日 東京

3. 井上健、桜木陽介、山本良子、井上直子、後藤雄一、JR Lupski  
SOX10遺伝子変異による複合型  
神経堤症候群PCWHの分子病態  
の解明 第53回日本人類遺伝学会 2008年9月30日 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

遺伝性髄鞘形成不全における転写因子 SOX10 分子メカニズムの解析

研究分担者 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** 小児期大脳白質病変は早産時の虚血性大脳白質障害によるものと、遺伝性髄鞘形成不全症候群を含む。転写因子 SOX10 変異によって、遺伝性白質変性症をきたすことが報告され、その分子メカニズムが注目されている。SOX10 は中枢神経系の白質形成、末梢神経のシュワン細胞の発生に重要な役割を果たしている。SOX10 はユビキチンと SUMO1 による翻訳後修飾を受けて、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。*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。さらに蛍光蛋白質 VENUS を SOX10 プロモーター下に発現させた VENUS トランスジェニックマウスによって、白質の構成要素であるオリゴデンドロサイトをライブで可視化できる世界で初のマウスを得た。

A 研究目的

SOX（SRY-related HMG box-containing gene）は、哺乳動物の精巣決定因子である SRY の HMG box と高い相同性を持つ転写因子として同定された。SOX ファミリーは約 30 種類にわたり、脊椎動物では高度に保存されている。この中で、神経堤細胞の発生・分化に深くかかわっている転写因子として、SOX8、SOX9、SOX10 が知られている。この三つは構造・発現パターンが類似していることから、SOX ファミリーの中のサブファミリーとして「E グループ」と呼ばれる。E グループ

の中で、SOX10 が特に神経堤細胞特異的に発現することは古くから知られていた。また、SOX10 のヒト遺伝子変異が、神経堤細胞に由来する組織の脱落、機能不全を呈することも報告されていた。

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を目的とした。更に、変異 SOX10 を遺伝子組換え技術で導入したトランスジェニックマウスを作成し、機能解析への新たなツールの開発を手がけた。



## B 研究方法

SOX10 の発現は、未分化なオリゴデンドロサイト前駆体から成熟したオリゴデンドロサイトまで特異的かつ長期間持続する。したがって、SOX10 の遺伝子発現を経時的にトレースすることができれば、脳白質の発生・分化・増殖・移動を包括的にモニターすることが可能となる。海外のいくつかのグループが SOX10 の発現パターンに注目し、遺伝子改変動物を作成する目的で、SOX10 の転写調節領域（プロモーター領域）を同定する試みを行った。驚いたことに、SOX10 の発現をドライブするに十分なゲノム上の調節領域は、翻訳領域を挟んで約 100kbp にまたがっていることが報告された。この長大なプロモーター領域は、通常のトランスジェニックマウス作成に用いるプラスミドベクターへの組み込みは不可能な大きさである。本研究は、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。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 の遺伝子変異（SOX10 の翻訳終始コドンに欠如したために 83 アミノ酸ほど non coding 領域が過剰に付加された

変異）。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組み換えられていた。組換え BAC DNA からインサートを切り出して、C57B3 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、(i)胎児羊膜や生体の尾端からゲノム 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、(ii)個体識別目的の耳パンチ断片を凍結切片作成し鏡検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

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。①の BAC Tg マウスは正常に発生し交配も可能だった。成体マウスの蛍光シグナルは、末梢の神経堤細胞由来の臓器（メラノサイト、副腎髄質クロマフィン細胞、末梢神経等）、中枢神経のオリゴデンドロサイトに特異的に観察された。しかし、②の活性型 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いるなど、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観察することが可能である。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開発されていた。しかし、このマウスは SOX10 の haploinsufficiency (ハプロ不全) によって、ミュータントマウスとして報告された *Dom* と全く同じフェノタイプを呈した。一方、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である。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いながら、十分な蛍光強度を有する個体が得られた（特許出願中）。

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。

本研究成果でもっとも注目される点は、作成した 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 を具現する極め



て独創的な疾患モデル動物の作成に成功した。このマウスの詳細な解析によって、PCWHの病態解析が動物レベルで可能となった。

## G 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hashimoto M, Ishii K, Nakamura Y, Watabe K, Kohsaka S, Akazawa C. Neuroprotective effect of sonic hedgehog up-regulated in Schwann cells following sciatic nerve injury. (2008) *J Neurochem*. 107(4):918-27.

2. Liang C, Lee JS, Inn KS, Gack MU, Li Q, Roberts EA, Vergne I, Deretic V, Feng P, Akazawa C, Jung JU. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. (2008) *Nat Cell Biol*. 10(7):776-87.

3. 志村健作、石井邦弥、松尾望、赤澤智宏 BAC トランスジェニックマウス作成法を用いた Neural Crestopathy (神経堤関連疾患) 解析の新規モデルマウス作成 順天堂医学 in press.

### 2. 学会発表

1. 井上健、赤澤智宏、山本良子、井上直子、Lupski, JR. PCWH-新たな遺伝性ミエリン疾患をとりまく SOX10 変異の分子病態メカニズム. 第 31 回日本神経科学大会. 2008, 7, 9 東京国際フォーラム

2. 石井邦弥、橋本学、中村泰子、高坂新一、赤澤智宏. BDNF を介したソニックヘッジホッグによる損傷神経修復. 第 31 回日本神経科学大会. 2008, 7, 9 東京国際フォーラム

3. 松尾望、石井邦弥、亀谷富由樹、荒木亘、高坂新一、赤澤智宏. Class C-Vps 複合体による細胞内 BACE 蛋白の制御機構. 第 31 回日本神経科学大会. 2008, 7, 9 東京国際フォーラム.

4. 赤澤智宏、井上高良、井上健、井上由紀子、高坂新一. VENUS-SOX10 トランスジェニックマウスを用いた神経堤細胞の分化・増殖・移動のイメージング. 第 31 回日本神経科学大会. 2008, 7, 9 東京国際フォーラム.