

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

小児期白質形成不全症の診断・治療法の確立

研究分担者 小坂 仁

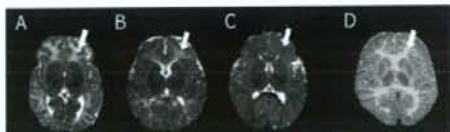
神奈川県立こども医療センター

**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。それらの患者の多くは PLP 遺伝子重複を持つがおよそ半数の患者では、遺伝子異常が見つからない。今年度は、遺伝子重複を持つ患者の治療を目的として、①昨年度樹立したスクリーニング系を用い PLP 重複治療薬スクリーニングを行った。細胞レベルで PLP 発現量を 50%以上低下させる化合物を 2 種類、30-50%低下させる薬物を 11 種類見いだした。現在これらの食品化合物を正常マウスに投与し候補薬の絞り込みを行っている。②PLP 遺伝子異常を認めない家系において連鎖解析候補遺伝子を検索し、1 家系で調節領域の変異をホモに有する候補遺伝子を見いだした。

**A；研究目的**

小児の劇的な発達は生後から 1 歳までに顕著であり、この間に定頸、座位そして歩行を獲得する。中枢神経のオリゴデンドロサイトによるニューロン周囲のミエリン形成（＝髄鞘化）が、この発達の基盤をなす (Fig. 1A-C)。我々は MRI が臨床現場で用いられ始めた、1990 年前後より先天的に髄鞘化の認められない遺伝性白質形成不全症；Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD；Fig.1D) に対してプロテオリピドプロテイン(proteo lipid protein; PLP)の

解析を行ってきた。今までに PLP 遺



**Fig.1 髄鞘化と Pelizaeus-Merzbacher 病** 白質の髄鞘化に伴い新生児 (A)、3ヶ月 (B)、12ヶ月 (C) と信号強度が、水分に近い高信号から徐々に低信号化していく。Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) では3歳になっても髄鞘形成がみられない (D)。

伝子の種々の変異が PMD の原因になり、とりわけ PLP 遺伝子重複の患者が半数程度に及ぶことを示してきた (Inoue, K., H. Osaka, K. et al. *Am J*

*Hum Genet*, 1996, Osaka H., Inoue, K et al. *Ann Neurol*, 1999, Inoue, K., H. Osaka. K. et al. *Ann Neurol*, 1999)。我々はこの成果に基づき、PLP 異常の診断系を確立し(Inoue, K., H. Osaka. K. et al. *Am J Hum Genet*, 2002)十数年に渡り診断・病態解析を行ってきた。MRI の普及と、遺伝子診断により、軸索変性が生じるより前に、遺伝子診断がなされる例が増えてきた。細胞変性をきたす前に PLP 過剰発現を抑制すれば、停止した髄鞘化の解消と二次的細胞変性の予防による治療が可能と考える。現在までに治療を目指した研究報告、論文は見あたらない。PLP の過大産生は髄鞘化の障害をきたし、臨床的な重篤な運動・精神発達遅滞を生じる。やがて 10 歳前後には、髄鞘化不全から 2 次性の軸索変性に伴い退行が始まり、30 台までに死亡することが多い。今年度は PMD 患者数として最も多い、遺伝子重複の治療薬開発のため内因性の plp 発現を認められるラット C6 グリオーマを用いた薬物スクリーニングを行った。また今まで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。我々は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され、その染色体上の候補遺伝子が、数百となり解析可能な遺伝子数となったため個々の候補遺伝子解析に着手した。

## B. 研究方法

(1) ラット C6 グリオーマから内因性の PLP 遺伝子の RNA を抽出し、定量的 PCR 装置を用い内因性の PLP 発現を RT-PCR 法により測定した ( $\Delta\Delta$  Ct 法)。十分量の PLP 遺伝子検出が可能であり、かつ薬物スクリーニングに十分必要な精度を有していることが明らかになったため、スクリーニングに最適な条件を決定した。6cm dish に播種し (細胞数にして  $2.5 \times 10^5$ ) 培地は DMEM+1%FBS が、薬物スクリーニングの最適な条件であった。各 well

あたりの培地量は 2ml とし、20mM の化合物 1 $\mu$ l を well に直接添加した (Final concentration; 10 $\mu$ M)。その後、48 時間培養し、写真を撮影、形態学的な変化の有無を確認し、RNA 抽出と定量を行った。

(2) 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 前後と考えられており、我々は昨年までに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ている。今年度新たに網羅的解析にてミエリンに発現していることが明らかになっている遺伝子をデータベースに加えた。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し、順次プライマーを設計し、患者で塩基配列決定したのち blast で正常配列との相違を検討した。

## C、研究結果

(1) 重複治療薬スクリーニング  
最適化された実験の条件下、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すでに安全性が確認されている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。およそ 150 の食品ラ

イブラリーに関してスクリーニングを終了し、PLP の発現が 50%以上低下する食品化合物を 2 種類、30%以上低下する食品化合物を 11 種類同定した (Fig. 2)。

Fig. 2 化合物添加による PLP 発現変化(C6 グリオーマ)

ratio*	number of chemicals
<0.5	2
$\geq 0.5, <0.7$	11
$\geq 0.7, <2.0$	120
$\geq 2.0, <5.0$	10
$\geq 5.0$	5

ratio: plp with chemical/plp without chemical, normalized by HPRT expression \* Mean of duplicate

## (2) 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。その内最も、広い候補領域に存在する遺伝子数はおよそ 30 であった。順次ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定したところ、候補領域のほぼ中心に位置する遺伝子の、調節領域に変異をみいだした。この変異は、患者においては homozygous に存在していた。50 例の正常人でこの領域の変異を検討したが、全て正常配列であり、報告されている SNIP もない。この変異により、遺伝子発現に変化が

見られるか、芽球化した血液を用いて検討したが、解析に十分な発現が認められなかった。

#### D. 考察

最も変異として多い PLP 遺伝子重複の患者に対する治療候補薬を見いだしたので、今後モデルマウスへの投与を経て患者治療への可能性を示した。また常染色体劣性遺伝形式をとる白質形成不全症の新たな遺伝子変異の候補を見いだしたので、今後機能解析を通じて表現型との関係を探る。

(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. Goto, A., Wang, Y. L., Kabuta, T., Setsuie, R., Osaka, H., Sawa, A., Ishiura, S., and Wada, K. (2008). Proteomic and histochemical analysis of proteins involved in the dying-back-type of axonal degeneration in the gracile axonal dystrophy (gad) mouse. *Neurochem Int.*

2. Saitsu, H., Kato, M., Mizuguchi, T., Hamada, K., Osaka, H., Tohyama, J., Uruno, K., Kumada, S., Nishiyama, K., Nishimura, A., *et al.* (2008). De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet* 40, 782-788.
3. Tanaka, M., Hamano, S., Sakata, H., Adachi, N., Kaga, K., Osaka, H., and Kurosawa, K. (2008). Discrepancy between auditory brainstem responses, auditory steady-state responses, and auditory behavior in two patients with Pelizaeus-Merzbacher disease. *Auris Nasus Larynx* 35, 404-407.

##### 書籍

1. 小坂 仁 Pelizaeus-Merzbacher 病;小児中枢神経疾患の画像診断 2008 東京医学社 484-485
2. Osaka, H., Mazaki, E., Okamura, N., Iai, M., Yamada, M., Yamakawa, K., Yamashita, S. Distinct clinical course of epilepsy with an scn2a mutation- comparison with scn1a mutations. *Biology of*

Seizure Susceptibility in Developing Brain. Progress in Epileptic Disorders Series, Vol. 6 Takao Takahashi, Yukio Fukuyama, John Libbey Eurotext, Montrouge (Paris), France 87-100

3. 小坂仁、黒澤健司、井合瑞江、山下純正. Pelizaeus-Merzbacher 病の遺伝子診断 69 巻、神経内科印刷中

#### 学会発表

1. 小坂仁、黒澤健司、井合瑞江、山田美智子、山下純正 Pelizaeus-Merzbacher 病の治療薬スクリーニング系の作成第 50 回日本小児神経学会総会 平成 20 年 5 月 30 日東京
2. 小坂仁、辻 恵、高木篤史、鮫島希代子、井合瑞江、山下純正 多発性硬化症類似の中樞神経病変を示す Charcot-Marie-Tooth 病の 1 例第 49 回関東小児神経学会 平成 20 年 9 月 20 日静岡
3. Pelizaeus-Merzbacher 病の治療 小坂仁、黒澤健司、井合瑞江、山田美智子、山下純正 第 50 回日本先天代謝異常学会総会 平成 20 年 10 月 30 日米子

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

研究分担者 出口貴美子 出口小児科、国立精神・神経センター

**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。我々は昨年度までに、PVLに伴って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が広く障害されることを明らかにした。また、長期生存例では、大脳白質に異所性の神経細胞が多数存在すること、また大脳皮質の介在神経の層特異的な配置の異常が見られることなどから、神経細胞の移動の異常が起こっていることが示唆された。これら超早産児脳における神経前駆細胞の脆弱性と神経細胞の移動の異常は、しかしヒトの剖検脳検体で明らかではあるが、その病態を詳細に調べるためのモデルシステムが存在しない。そこで本年度は、これらの病態モデルの確立を行うことを目的として、神経幹細胞の分化培養における低栄養低酸素負荷による *in vitro* の実験系の確立、そして妊娠マウスの子宮動脈結紮による *in vivo* 動物モデルの作成を行った。現在、まだ中途ではあるが、神経幹細胞培養の低栄養低酸素負荷では、細胞形態が著明に変化していることから、分化の異常が起こっていることが示唆された。また、妊娠マウスの子宮動脈結紮モデルでは、少ないながら出産個体を得ることが出来、これらのマウス脳の解析により、神経細胞の移動の障害を示唆する所見を得ることが出来た。今後、これらのモデル実験系を確立することにより、超早産児の虚血性脳障害の詳細な病態の解析に供することが出来るのではないかと考えた。

**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

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

昨年度までに、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。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であるHuB、MAP2、NeuNや成熟した脳での第II層のマーカであるCalbindinなどをもちいた組織学的解析を行った。その結果、大脳白質におけるHuB、MAP2、NeuNなどの

postmitotic な神経細胞のマーカによる免疫組織学的解析にて、これらのマーカ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。

そこで、本年度はこれらヒトの超早産児で認められている神経前駆細胞の脆弱性と神経細胞の移動の異常に関する病態モデルの確立を目指した。

(a) 第1に神経幹細胞の分化培養における低栄養低酸素負荷による*in vitro*の実験系の確立を行った。神経幹細胞は、胎生期E13.5の胎児の脳からニューロスフェア法を用いて作製した。これを約1週間後に、二次スフェアとした後、これを分化用の接着処理を施したグラスボトムウェルに播種し、分化誘導を行った。この際、一部の細胞は培地を低グルコース培地に変更し、低酸素窒素チャンバーにて培養し、低栄養点酸素負荷を与えた。分化の仮定を、経時的に顕微鏡観察を行い、これを約10時間のビデオとして、記録した。

(b) マウスを用いた超早産児脳虚血障害モデルの作成を試みた。妊娠マウス胎生期16日にBrdUを腹腔内投与

し、細胞追跡用のマーカーとした。胎生18日目に開腹し、子宮動脈を30分、結紮し血流を遮断した。その後結紮部を解き、再還流したことを確認した後に閉腹し、飼育室に戻した。満期産の個体の脳を生後7日目に取り出し、抗BrdU抗体で免疫染色し、その分布部位について検討した。

(c) これらに加え、新たなヒト超早産児の長期生存例の剖検脳の検体入手することが出来たので、昨年度までと同様に神経病理学的な解析を行った。

## C. 研究結果

**(a) 神経幹細胞の分化培養における低栄養低酸素負荷** タイムラプスビデオ撮影装置の設定調整などに手間取り、十分な解析をすることが出来なかったが、神経幹細胞の分化培養における低栄養低酸素負荷による細胞の分化の変化を捉えることが出来た。通常の培養条件では、神経細胞へ分化していく細胞とグリア細胞に分化していく細胞が、放射状に拡大し、特に神経細胞の軸索の様な突起をのぼして移動していく様子が観察出来るのであるが、低栄養低酸素負荷を加えた細胞は、これら神経細胞の軸索の進展と移動が抑制され、逆にグリア状の胞体の大きな細胞が平べたく接着している様子が多く観察された。これらの形態的な特徴をもつ細

胞がどのような種類のものであるのかは、まだ特定されておらず、今後免疫染色を用いた解析で、これを明らかにしていきたい。また、この系を用いて、培養液中に神経保護物質や成長因子などを加え、それらの効果を測定する実験系の確立を目指したい。

**(b) マウスを用いた超早産児脳虚血障害モデルの作成** 子宮動脈結紮による虚血負荷を加えた3匹の妊娠マウスより産まれた30匹の仔のうち、7日目まで生き延びた個体はわずか2匹のみであった。対象として、開腹のみを行った妊娠マウス1匹は、正常に出産し、7日目までに死亡した個体もなかった。これら2匹の虚血負荷個体と対照個体から脳を取り出し、凍結切片を作製した後、抗BrdU抗体を用いて免疫染色を行った。対照群では、BrdU陽性細胞は、脳室上衣層と大脳皮質IIからIII層に集中して観察され、他の大脳皮質や大脳白質にはわずかに存在するのみであった。これに対し、虚血負荷を与えられた個体では、同様に脳室上衣層と大脳皮質IIからIII層にBrdU陽性細胞が多く存在するが、それ以外のIVからVI層までの大脳皮質や、大脳白質に散らばるように数多く存在している様子が観察された。検索個体数が少ないので、今後、個体数を増やして検討を行っていく必要があるが、これらの所見はヒト剖検脳で得ら



れた神経細胞の移動の障害の所見と類似しており、今後この病態を解析するための有用なモデルとなる可能性があると思われた。

(c) **新たなヒト超早産児の長期生存例の剖検脳**の検体の解析 2例の超早産児の長期生存例の剖検脳を入手し、これを解析した。昨年度の報告の内容に準ずる結果を得ることが出来た。長期生存例は剖検数が少なく、貴重であり、今回の症例を含め2年以上の生存例が合計4例となった。

#### 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。

我々は昨年度まで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起こっていることを見出した。さらに、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異常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、その後の神経発身に障害を来し、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。本年度はこれらの所見を実験的に再現し、さらに詳細な病態の解析や治療法の開発を行うために必要なモデル実験系の開発を行った。具体的には、神経幹細胞培養の分化誘導中に低栄養低酸素負荷をかけ、分化の変化を観察する *in vitro* の実験系と、胎児期のマウスに虚血負荷を施し、生後にその後の大脳の発達過程を BrdU で追跡する *in vivo* の実験系である。共に十分な検討がなされるまでには至っていないが、現段階においては有用なモデルとして今後の研究に活用可能な期待が出来る所見が得られている。今後、さらにモデルとしての再現性を確立し、超早産児の虚血性脳障害の病態研究に用

いていきたい。

### E. 結論

神経幹細胞培養の低栄養低酸素負荷では、細胞形態が著明に変化していることから、分化の異常が起こっていることが示唆された。また、妊娠マウスの子宮動脈結紮モデルでは、少ないながら出産個体を得ることが出来、これらのマウス脳の解析により、神経細胞の移動の障害を示唆する所見を得ることが出来た。今後、これらのモデル実験系を確立することにより、超早産児の虚血性脳障害の詳細な病態の解析に供することが出来るのではないかと考えられた。

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

2. Elizondo LI, Cho KS, Zhang W, Yan J, Huang C, Huang Y, Choi K, Sloan EA, Deguchi K, Lou S, Baradaran-Heravi A, Takashima H, Lücke T, Quirocho FA, Boerkoel CF, Schimke immuno-osseous dysplasia: SMARCAL1 loss-of-function and phenotypic correlation. *J Med Genet.* 2009;46(1):49-59.

#### (2) 学会発表

国際学会

1. Deguchi K, Antalffy B., Takei H., Powell S., Yamamoto R., D'Arcangelo G., Inoue K. A neuronal migration regulator Reelin pathway may be involved in the white matter pathology in Alzheimer's disease. Jun 10, 2008. 18th Meeting of the European Neurological Society, Nice, France

### G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

資料1

## 平成20年度 第3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20年度 研究報告会議

日時：平成20年1月22日（木）17-19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

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		出口貴美子
17:40		小坂 仁
18:00		赤澤智宏
18:20		井上 健
18:40	ディスカッション	
19:00	閉会	

## 抄録

分担研究 井上 健

### 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

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

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。

本研究は、国立精神・神経センター神経研究所 余荔華、岩下晴美、山本良子、井上直子、井上高良、井上由紀子氏ら、および本研究班員 小坂 仁、赤澤智宏氏らの協力により行われた。

## BAC トランスジェニックマウスによる小児大脳白質病変の モデル動物作成

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

小児大脳白質病変の病態解明のためには、大脳白質の発生・分化メカニズムの理解、および小児白質病変を具現したモデルマウスの作出が重要な役割を果たす。本研究ではマウス発生工学的手法を駆使することで、この両面を解決しようと試みた。

大脳白質、特にオリゴデンドロサイトの発生・分化に重要な役割を果たしている転写因子 SOX10 のプロモーター領域に、蛍光タンパク質 VENUS を挿入して外来性に発現させるトランスジェニックマウスを作出した。我々はインサートサイズが 200kbp に及ぶ BAC クローンを鋳型として、大腸菌内相同組み換え技術を応用し、BAC 内のマウス SOX10 遺伝子の翻訳領域を VENUS に置換することによって、BAC トランスジェニックマウスを作成した。この組み換えマウスは、SOX10 の発現細胞に時間特異的・部位特異的に VENUS を発現していた（特許出願中）。次に、ヒト SOX10 の遺伝子変異によって発症した小児疾患をマウスで再現するために、上記 BAC クローンに、ヒト SOX10 遺伝子変異を挿入した BAC トランスジェニックマウスを作成した。このマウスは、ヒトの複合型大脳白質病変 PCWH のモデル動物として世界で始めて作成されたものであり、極めて重要なモデル動物であることが示唆された。

## 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。それらの患者の多くは PLP 遺伝子重複を持つがおよそ、半数の患者では遺伝子異常が見つからない。今年度は、遺伝子重複を持つ患者の治療を目的として、①昨年度樹立したスクリーニング系を用い PLP 重複治療薬スクリーニングを行った。②PLP 遺伝子異常を認めない 2 家系において、連鎖解析を行い、候補遺伝子を検索し 1 家系で候補遺伝子を見いだした。

### 方法；

- ① C6 グリオーマ細胞の培地に最終濃度  $10\mu\text{M}$  となるよう薬物を添加し、48 時間培養後 形態学的変化を観察するとともに内因性 PLP の mRNA 発現量を定量した。内部標準としては Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase を用いた。次に、細胞系スクリーニングにて PLP 発現量の低下をみた薬物を 5 週令の CD1(ICR) マウスを用い、胃管ゾンデを用い投与した。投与量は、ヒトで確認されている最大安全量を体重換算した。7 日間連日投与後 大脳を摘出し PLP の発現量を測定した。薬物ライブラリーとして、ヒトでの安全性が確認されている食品化合物ライブラリーを用いた。
- ② homozygosity mapping により原因遺伝子領域を狭められた家系について、中枢神経系で発現している遺伝子に関して、順次シークエンシングを行い、原因遺伝子を特定する。

### 結果および考察；

- ① 細胞レベルで PLP 発現量を 50% 以上低下させる化合物を 2 種類、30-50% 低下させる薬物を 11 種類見いだした。現在これらの食品化合物を正常マウスに投与し候補薬の絞り込みを行っている。PLP トランスジェニックマウスでの治療効果を判定し、臨床応用を目指す。
- ① SNP array による候補領域に存在する遺伝子を順次スクリーニングし、1 家系で調節領域の変異をホモに有する候補遺伝子を見いだした。今後発現解析を行い、原因遺伝子であることの検証を行う。



## 超早産児脳虚血性脳障害の病態解明に関する研究

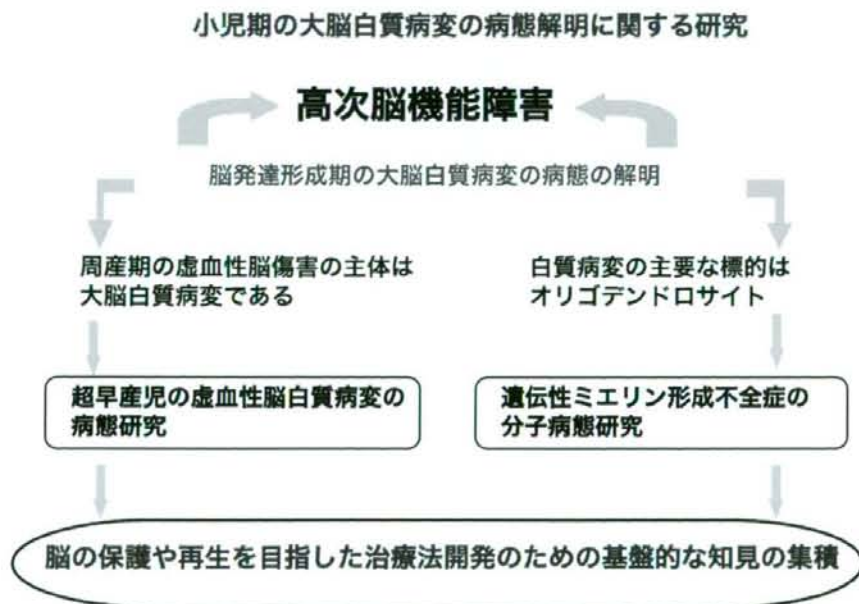
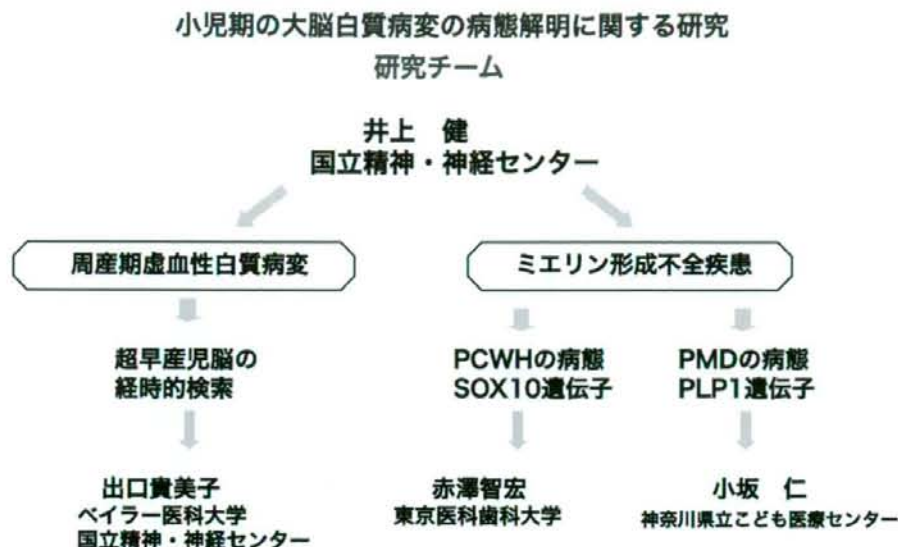
出口貴美子

出口小児科、国立精神神経センター、神経研究所

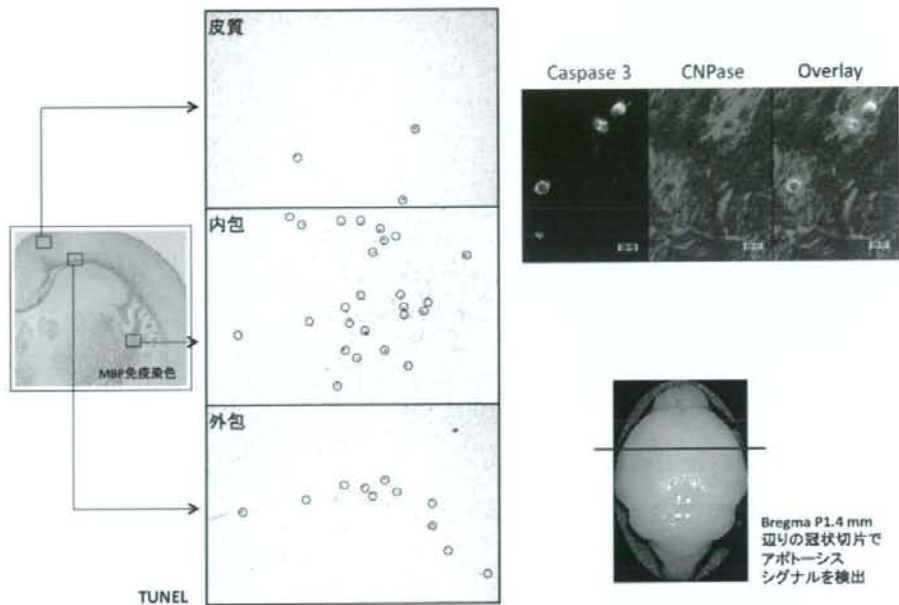
超早産児における脳室周囲白質軟化症（PVL）を含む虚血性脳障害の神経後遺症は、運動発達障害より高次脳機能障害の頻度が高い事が注目されているが、その原因は明らかではない。我々は昨年度までに、PVL に伴って脳室周囲および脳室下領域（VZ/SVZ）に存在する神経前駆細胞が広く障害されることを明らかにした。また、長期生存例では、大脳白質に異所性の神経細胞が多数存在すること、また大脳皮質の介在神経の層特異的な配置の異常が見られることなどから、神経細胞の移動の異常が起こっていることが示唆された。これら超早産児脳における神経前駆細胞の脆弱性と神経細胞の移動の異常は、しかしヒトの剖検脳検体で明らかではあるが、その病態を詳細に調べるためのモデルシステムが存在しない。そこで本年度は、これらの病態モデルの確立を行うことを目的として、神経幹細胞の分化培養における低栄養低酸素負荷による *in vitro* の実験系の確立、そして妊娠マウスの子宮動脈結紮による *in vivo* 動物モデルの作成を行った。現在、まだ中途ではあるが、神経幹細胞培養の低栄養低酸素負荷では、細胞形態が著明に変化していることから、分化の異常が起こっていることが示唆された。また、妊娠マウスの子宮動脈結紮モデルでは、少ないながら出産個体を得ることが出来、これらのマウス脳の解析により、神経細胞の移動の障害を示唆する所見を得ることが出来た。今後、これらのモデル実験系を確立することにより、超早産児の虚血性脳障害の詳細な病態の解析に供することが出来るのではないかと考えた。

スライド資料 (抜粋)

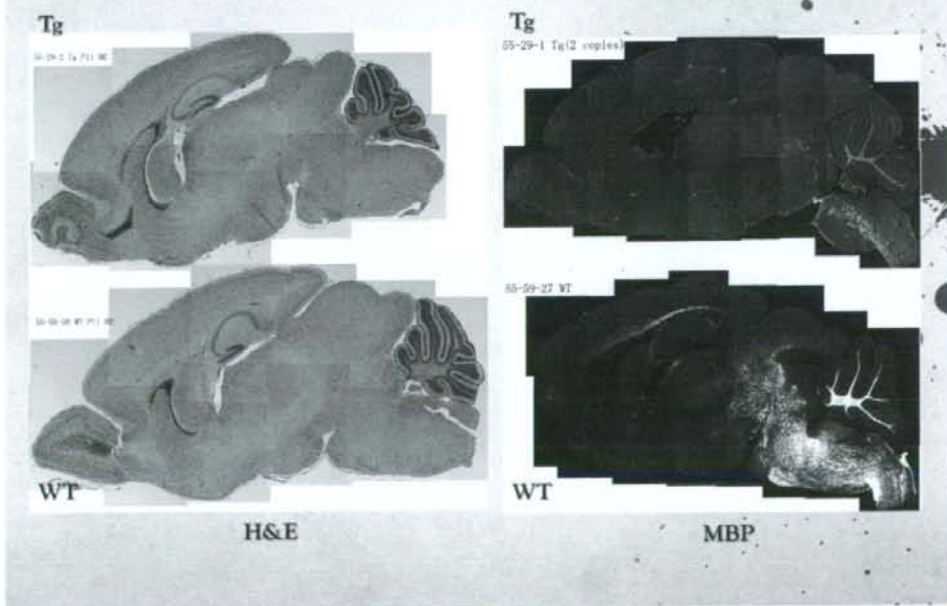
1. 井上 健



クルクミン投与によりオリゴデンドロサイトのアポトーシスが抑制された



Reduced MBP expression in the white matter of Tg mice



2. 赤澤智宏

本研究班での研究成果

- 神経堤細胞のライブイメージングマウスの樹立  
→ 特許出願中
- 大脳白質病変のモデルマウス作成

