

200833014B

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

(H18-こころ-一般-015)

平成18年度～20年度 総合研究報告書

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18年度～20年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告	
小児期の脳白質病変の病態解明に関する研究	----- 1
井上 健	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 25
V. 研究成果の刊行物・別刷	----- 31

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）
総合研究報告書

小児期の脳白質病変の病態解明に関する研究

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って、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った。代表的な遺伝性髄鞘形成不全症であるPMDに対する治療法開発研究を行い、オリゴデンドロサイトのERストレスを標的とした治療候補薬の有効性を確認した。また、SOX10遺伝子異常による新たな遺伝性髄鞘形成不全症の分子病態の理解を進めた。さらに、周産期の虚血性白質病変に伴う高次脳機能障害の原因として、神経幹細胞の障害とこれに伴う生後の神経細胞の遊走と成熟の異常を見いだした。これらの所見は、小児期の脳白質病変の予防と治療法の開発のための有意義な知見であると思われる。

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

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、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。

本研究は、下記の相互に関連する3つの課題について研究を行ったので、それぞれについてその成果を記す。

I. 遺伝性髄鞘形成不全症ペリツェウス・メルツバッハ病 (PMD) の病態解明とこれに基づく治療法の開発研究

II. SOX10異常による遺伝性髄鞘形成不全症 PCWH の分子病態の解明

III. 超早産児の虚血性大脳白質病変に伴う神経前駆細胞の傷害と大脳発達障害の病態解明

B. 研究方法

本研究課題は、国立精神・神経センター組換え DNA 委員会、動物実験倫理審査委員会で承認されている。ヒト剖検脳標本を用いた解析、DNA 遺伝子解析に関する解析については、国立精神・神経センター倫理委員会に承認されている。また、DNA 遺伝子解析に関する解析に関して、神奈川県立こども医療センター倫理委員会で承認さ

れている。また、本課題は東京医科歯科大学組換え DNA 委員会および動物実験倫理委員会で承認されている。

I. 遺伝性髄鞘形成不全症ペリツェウス・メルツバッハ病 (PMD) の病態解明とこれに基づく治療法の開発研究
本研究課題は、研究分担者小坂 仁との共同研究として行った。PMD は小児期の遺伝性大脳白質病変を来たす代表的な疾患の1つで、主要なミエリン構成蛋白 proteolipid protein 1 (PLP1) をコードする遺伝子の異常が原因であることが知られている。我々は、下記のいくつかのテーマについて検討を行った。

I-1. 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。

I-2. アミノ酸置換型変異体 PLP 1 の細胞内挙動と臨床的重症度の規定因子の探索

軽症な表現型を来す PLP 変異として *rsh* (I186T), W152L, 重症変異として W152R, *msd* (A242V) 変異を有する PLP 遺伝子を作成した。FLAG タグ、あるいは EGFP のタグの上流にこれら変異型および正常型 PLP 遺伝子をクローニングしたプラスミドを作成し、COS 細胞に一過性および安定発現し、経時的に細胞内局在を共焦点顕微鏡下に観察した。またそれぞれの遺伝子の転写量を定量的 PCR 法にて測定し、ウエスタンブロッティングにより蛋白量を半定量した。またそれぞれの変異 PLP の小胞体シャペロンとの免疫沈降実験を行い、小胞体への局在を生化学的に検証するとともに、各種インヒビターを用いた場合の蛋白存在量の上昇率を定量することにより、これら蛋白

の分解がライソゾーム (阻害薬; Z-phe-phe-fluoromethyl ketone, bafilomycin A₁)、プロテオゾーム (阻害薬; MG132, lactacystin) カルパイン (阻害薬; Ac-Leu-Leu-methioninal) のいずれで起きているのか検証した。またとくにプロテオゾーム分解に、特徴的なユビキチン化を確かめるためにユビキチン遺伝子のプラスミドと共発現し免疫沈降法を行い、ユビキチン化の有無を確かめた。

I-3. PLP1 遺伝子重複による PMD に対する治療薬候補の同定と検証

PMD は、種々の PLP 遺伝子の変異が原因となることが知られている。とりわけ PLP 1 遺伝子重複は、PMD の患者半数程度に及び、最も頻度が高いことが知られている。しかしながら、PLP1 点変異による PMD と同様に、これに対する根治的な治療薬はまだない。そこで、我々は、PLP1 遺伝子重複の治療薬開発のため内因性に *plp1* を発現することが知られているラット C6 グリオーマ細胞を用いた薬物スクリーニングにより、*plp* 遺伝子の発現を抑制する薬剤の同定を目的として研究を行った。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 2.5×10^5)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1mlをwellに直接添加した(Final concentration; 10mM)。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。

II. SOX10異常による遺伝性髄鞘形成不全症 PCWH の分子病態の解明

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。

II-1. 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

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と仮説を立てた。本研究では、特にSOX10の延長型変異に注目し、SOX10野生体およびPCWHに伴う延長型変異体を細胞培養系(in vitro)に導入して、転写因子活性等の機能解析を行うことにより、その機能獲得変異としての分子病態を明らかにした。

II-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

SOX10の翻訳後修飾による発現調節機構を明らかにすることを目的とした。SOX10の転写活性は、Connexin32プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み合わせたレポーターアッセイを指標とした。SOX10の翻訳後修飾の中でユビキチン化、SUMO化について注目し、修飾される標的リジン残基を同定するためにSOX10アミノ酸のリジン残基をアルギニンに置換したKRミュータントを作製した。SOX10の細胞内局在の解析にはPML(pro-myelocytic leukemia)蛋白との共存について解析した。

II-3. BACトランスジェニックマウスを用いたSOX10発現トレーサーの開

発と生体内での翻訳後修飾の解析

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、大脳白質の発生・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 *in vitro* で見いだされた翻訳後修飾部位に変異を導入した活性型 SOX10 を VENUS の下流に *in frame* に結合

したもの。

II-4. BAC トランスジェニックマウスを用いた PCWH モデルマウスの作成
PCWH の原因となる SOX10 変異の生体内での分子病態を明らかにするための PCWH 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。SOX10 の転写調節領域は広範囲に渡り、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。基本的な方法は、II-3 に倣った。大腸菌内での組換えにより、野生型 SOX10 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 PCWH 型のヒト変異型 SOX10cDNA である。これは、蛋白 C 末に 3'UTR からの翻訳延長を伴う変異体である。コントロールとして、野生型マウスおよび Venus 単体を挿入した BACtg マウスを用いた。

III. 超早産児の虚血性大脳白質病変に伴う神経前駆細胞の傷害と大脳発達障害の病態解明

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。

III-1. ヒト超早産児の剖検脳を用いた神経病理学的解析—脳室周囲や脳室下領域に焦点を当てた解析

超早産児における脳室周囲白質軟化症 (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した。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。さらに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。

III-2. 羊 PVL モデルの脳検体を用いた解析

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、II-1 と同様に免疫組織学的に検討した。

III-3. ヒト超早産児の剖検脳を用いた神経病理学的解析—大脳白質と皮質に焦点を当てた解析

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4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 などをもちいた組織学的解析を行った。

III-4. 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

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に関する病態モデルの確立を目指し、細胞培養系を用いた実験系の確立を目指した。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。分化の過程を、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。

III-5. マウスを用いた超早産児脳虚血障害モデルの作成

ヒトの超早産児で認められた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。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. 研究結果

I. 遺伝性髄鞘形成不全症ペリツェウス・メルツパッハ病 (PMD) の病態解明とこれに基づく治療法の開発研究

I-1. 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

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。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($p < 0.05$)。そこで、より詳細な病理学のおよび分子薬理的検討を行った。髄鞘形成の促進の有無については、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こ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、GFPA、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。

I-2. アミノ酸置換型変異体 PLP1 の細胞内挙動と臨床的重症度の規定因子の探索

【変異蛋白の局在】

従来すべての PLP 変異蛋白は小胞体に局在すると報告されていたが、今回の条件下では、経時的に観察するとすべての変異体が小胞体に局在するわけではなかった。一過性発現後 12 時間程度では、正常および異常 PLP の多くは小胞体に分布するが、PLP-W152L および PLP-W152R は明らかに小胞体外に局在していた。これらの変異体は lamin と共発現しており、一部が核膜に存在していることを示した (Neuroscience 2006)。小胞体に局在する異常蛋白; PLP-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 PLP-wt, PLP-W162L および W152R では認めず、小胞体での品質管理機構は通過していることが示唆された。また異常 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キング異常を起こしていることを示した。またこれら 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、また二重染色により小胞体のマーカーであるBiPと共局在を確かめた。その結果、小胞体通過後①ライソゾームに主として局在する変異体；W152L および W152R 変異②小胞体に局在する蛋白；*rsh* (I186T), *msd* (A242V)変異③形質膜まで到達する蛋白；正常型の3種類に分けられたが、これらは重症度の違いを説明しなかった。

【蛋白質発現および分解系】

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EGFP発現系ではカルパイン分解系の関与が強いことがわかった。

I-3. PLP1 遺伝子重複による PMD に対する治療薬候補の同定と検証

最適化された実験の条件下、すでに安全性が確認されている食物化合物ライブラリー（日本水産株式会社中央研究所 健康基盤研究室 竹尾 仁良博士の好意により譲渡）をもちいてスクリーニングを開始した。およそ 150 の食品ラ化合物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。

II. SOX10異常による遺伝性髄鞘形成不全症 PCWH の分子病態の解明

II-1. 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 の延長型変異 (1400del12) について細胞培養系(in vitro)での解析を行い、これが機能獲得型変異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ター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、機能獲得型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 α -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。

II-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

S³⁵メチオニンでラベルした SOX10 の細胞内代謝は、半減期が 30 分と短寿

命であり細胞内で速やかに分解されることがわかった。その分解系に関する解析で、SOX10 はユビキチン修飾を受け、プロテアソームで分解されることが明らかになった。更に、SOX10 は SUMO 化による修飾を受けることも明らかになった。すなわち、SOX10 は細胞内においてユビキチン化と SUMO 化によって競合的に修飾されていることが示された。

in vitro mutagenesis で SOX10 アミノ酸のリジン残基 (K) を順次アルギニン残基 (R) に置換した KR ミュータントを作製し、修飾を受けるリジン残基を同定した。その結果、55 番目と 357 番目のリジン残基がユビキチン化・SUMO 化を受けることがわかった。実際、55 番目、357 番目の両方のリジン残基をアルギニンに置換した K55,357R というミュータントでは、ユビキチン化も SUMO 化も観察されなくなることがわかった。

SOX10 の転写活性をすべての KR ミュータントについて Connexin32 プロモーターを用いて解析した。その結果、ユビキチン化・SUMO 化修飾される 55 番目と 357 番目のリジン残基を置換したミュータントで転写活性が有意に上昇した。更に細胞内局在について 55 番目と 357 番目のリジン残基をアルギニンに置換したミュータントでは PML 蛋白

との共存が観察されなかった。

II-3. BAC トランスジェニックマウスを用いた SOX10 発現トレーサーの開発と生体内での翻訳後修飾の解析

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、①の VENUS 単独 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。

II-4. BAC トランスジェニックマウスを用いた PCWH モデルマウスの作成

SOX10 変異体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、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 陽性の細胞が減少しており、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 稲垣真澄博士の協力により、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、中枢あるいは末梢神経系に何らかの異常が存在することが示唆された。生後 20 日ごろの大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。

III. 超早産児の虚血性大脳白質病変に伴う神経前駆細胞の傷害と大脳発達障害の病態解明

III-1. ヒト超早産児の剖検脳を用いた神経病理学的解析—脳室周囲や脳室下領域に焦点を当てた解析

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、これらの細胞が脳室周囲領域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。HE 染色、Musashi1、Nestin の免疫染色等の結果を踏まえ、脳室周囲の障害部位の広がりをも 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。

III-2. 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。

III-3. ヒト超早産児の剖検脳を用いた神経病理学的解析—大脳白質と皮質に焦点を当てた解析

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層に限局する 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。

III-4. 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

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。

III-5. 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生まれた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。

D. 考察

I. 遺伝性髄鞘形成不全症ペリツェウス・メルツパッハ病 (PMD) の病態解明とこれに基づく治療法の開発研究

遺伝性髄鞘形成不全症PMDの治療法開発を目指し、その分子病態解明や動物モデルを用いたPMDの治療評価系の確立を行った。我々は、薬剤の投与管理から効果判定、薬理病態の検証に至るまでの実験系を確立することができた。

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、点変異によるPMDモデルマウスMSD

を用いて、分子シャペロン療法の候補として注目したクルクミンの治療効果の検討をこの評価系を用いて行った。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。

一方、PLP1遺伝子重複に対する治療薬候補の同定に関して、C6細胞培養系を用いた化合物ライブラリーからのスクリーニングにより、いくつかの候補治療薬を見いだした。今後、PLP1トランスジェニックマウスを用いたこの評価系により、これらの治療効果の検証を行うことが容易にできる。これらの分子薬理機序を明らかにすると共に、PMDの病態に基づく治療法の開発を進めていく。

II. SOX10異常による遺伝性髄鞘形成不全症PCWHの分子病態の解明

PCWHは、研究代表者らが疾患概念を確立し、疾患原因遺伝子SOX10を同定した遺伝性髄鞘形成不全症の1つであるが、本研究でその分子病態をin vitroのみならずin vivoで明らかにすべく、解析をすすめた。特に本研究成果として、200kbpに及ぶマウスSOX10 BAC クローンをを用いるこ

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。

PCWH型の変異体SOX10遺伝子を組み込んだ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、解析途中ではあるが、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のモデルマウスとなる可能性が高い。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。SOX10の翻訳後修飾の病態への関連性については、さらに詳細な検討が必要であるが、遺伝性疾患の新たな分子病態としての可能性もあり、興味深い。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。

III. 超早産児の虚血性大脳白質病変に伴う神経前駆細胞の傷害と大脳発達障害の病態解明

超未熟児の頻度の高い後遺症である

高次脳機能障害の原因について、神経幹細胞の障害と、これに基づく生後の大脳発達障害に焦点を当てて検討した。これは新たな視点に基づく病態モデルであるが、これを支持する所見が得られた。すなわち、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が多数存在することを見いだした。この所見は、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ることができる。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。

さらに、これらの所見を実験的に再現し、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。

周産期脳虚血障害には白質病変をはじめ、多様な病態が関与していると思われるが、神経前駆細胞の脱落と神経細胞の遊走や成熟の異常という見地から、今後さらに、新たなモデル動物の創成や最新の画像解析技術を用いた臨床的検索等を通じて、超未熟児における高次脳機能障害の病態に迫りたい。

E. 結論

1) 研究成果の学術的意義について

小児期の大脳白質病変をきたす様々な疾患の病態解明と病態に基づく治療法開発において、先進的な成果を挙げることができた。

課題Iに関しては、初めての遺伝性髄鞘形成不全症治療薬としてのクルクミンの有効性を確認することができた。今後、さらに詳細な分子薬理機構の解明により、クルクミンの標的分子を明らかにしていく。近年、多くの疾患における共通の病態としてERストレスが注目されている。我々の研究成果は、クルクミンが遺伝性髄鞘形成不全症のみならず、共通の細胞分子病態を介する他の疾患にも応用できる可能性を示

唆する。

課題IIでは、SOX10遺伝子変異が、PCWHを引き起こす分子病態機構を初めて明らかにすることができた。また、BAC-Tgの作成により、神経堤幹細胞研究や白質変性症の病態研究において、その過程を追跡することができ、有用な研究試材の確立し、さらに初めてPCWHの動物モデルを確立することができた。この結果、今後の遺伝性白質形成不全症の研究の進展において非常に有用な学術的基盤を整えることができた。

課題IIIでは、超早産児の高次脳機能障害の新たな病態モデルとして、神経前駆細胞の障害とこれに基づく生後の大脳発達の障害モデルについて、これを支持する所見を多数例の患者検体の解析から得ることができた。近年、剖検数が減少する中、40例という数の解析ができたことは、所見の有意性に関して重要である。今後、動物モデルを用いた分子レベルでの解析、生存している患者での非侵襲的な画像解析等を通じて、この病態モデルが支持されるか、検証していく必要がある。

2) 研究成果の行政的意義について

遺伝性髄鞘形成不全症は、これまで患者数が少なく、罹患組織の生体試料が採取できないこと等より、疾患の診断が困難であり、また実態調査等もほとんど行われてこなかった。しかし、

この10年程で、画像および遺伝子診断技術の向上や疾患概念の確立と原因遺伝子の同定が進んだ。こういった状況を踏まえて、本研究は、本邦における遺伝性髄鞘形成不全症の医療の進歩に資する基盤となる知見を得るための研究に取り組んだ。その結果、初めて遺伝性髄鞘形成不全症の治療薬候補が見いだされ、さらにより効果的な治療薬候補を発見するための病態理解と疾患モデルの確立等の基盤整備ができたことは意義深い。我々の研究成果は、今後医療現場での遺伝性髄鞘形成不全症の診断や治療に貢献し得るものと考えられる。

周産期脳虚血性障害の後遺症としての高次脳機能障害は、患者数が非常に多く、行政的意義は大きい。周産期医療の発展により、超早産児の生命予後は飛躍的に向上しているが、その反面、後の高次脳機能障害を合併する率が大きく、今後の厚生労働行政上、大きな課題となってくると思われる。本研究で提唱された神経前駆細胞障害モデルによる新たな病態は、今後、この疾患の後遺症の病態を明らかにし、その予防策を講じるための基盤となる知見になる可能性がある。本研究で得られた知見は、その多くが剖検による検体の解析によるものであり、依然、患者集団全体に適用される病態であるか検討する必要がある。今後の動物モ

デルや生存患者での知見を集積していくことにより、より実体的な病態を解明することが重要であると思われる。

3) その他、特記事項

大脳白質は、大脳の主要な部分を占め、乳児から老人に至るまで、様々な脳の疾患で冒される組織である。近年の研究で、大脳白質は単なる神経繊維の「通路」のみならず、大脳発生から認知機能に至るまで、様々な脳機能において、重要な働きをしていることが知られてきている。しかし、本邦では、疾患標的臓器としての体系的な大脳白質に関する研究があまり行われてこなかった。本研究は、小児期の疾患に焦点を絞って大脳白質の研究を行ったが、今後本研究の知見は、例えばアルツハイマー病などの白質病変や多発性硬化症の再髄鞘化等に関しても、活かされてくると推定される。

F. 研究発表

(1) 論文発表

【原著】

1. Lee JA, Madrid RE, Sperle K, Ritterson CM, Hobson GM, Garbern J, Lupski JR, Inoue K. Spastic paraplegia type 2 associated with axonal neuropathy and apparent *PLP1* position effect. *Ann Neurol.* 2006;59(2):398-403.
2. Lee JA, Inoue K, Cheung SW, Shaw CA, Stankiewicz P, Lupski JR. Role of genomic architecture in *PLP1* duplication causing Pelizaeus-Merzbacher disease. *Hum Mol Genet.* 2006; 15(14):2250-65
3. 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.
4. Kim, B. Y., Sahara, Y., Yamamoto, A., Kominami, E., Kohsaka, S., and Akazawa, C. The interaction of mammalian Class C Vps with nSec-1/Munc18-a and syntaxin 1A regulates presynaptic release. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 350, 691-697, 2006.
5. Yogosawa, S., Kawasaki, M., Wakatsuki, S., Kominami, E., Shiba, Y., Nakayama, K., Kohsaka, S. and Akazawa, C. Monoubiquitylation of GGA3 by hVPS18 regulates its ubiquitin-binding ability. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 350, 82-90, 2006 (cover article).
6. Koizume, S., Takizawa, S., Fujita, K., Aida, N., Yamashita, S.,