

201442011A

厚生労働科学研究委託費  
(難治性疾患等克服研究事業)  
難治性疾患実用化研究事業

治療薬が現存しない先天性中枢神経脱髄疾患の独自の  
病態モデルを作成し、その治療標的分子を探索する  
研究に向けて

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 山内 淳司

平成 27 (2015) 年 3 月



本報告書は、厚生労働省の科学研究委託事業による委託業務として、山内淳司が実施した平成 26 年度「治療薬が現存しない先天性中枢神経脱髄疾患の独自の病態モデルを作成し、その治療標的分子を探索する研究に向けて」の成果を取りまとめたものです。

## 目 次

### I. 委託業務成果報告(総括)

治療薬が現存しない先天性中枢神経脱髄疾患の独自の病態モデルを作成し、その治療標的分子を探索する研究に向けて

山内淳司

----- 1

### II. 委託業務成果報告(業務項目)

#### 1. 病態モデルの作成研究

山内淳司

----- 9

#### 2. 病態モデルの髄鞘組織構造解析

寺田信生

----- 17

#### 3. 病態モデルの神経機能評価

緒方 徹

----- 23

#### 4. 病態モデルの生化学および分子薬理的評価

加藤 稔

----- 27

### III. 学会等発表実績

----- 33

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## 治療薬が現存しない先天性中枢神経脱髄疾患の独自の病態モデルを作成し、その治療標的分子を探索する研究に向けて

山内 淳司（独）国立成育医療研究センター研究所薬剤治療研究部分子薬理室室長）

### 研究要旨

先天性の中枢神経系の脱髄疾患はかつてペリチェウス・メルツバッハ病（PMD）とよばれ、*plp1*という一つの原因遺伝子の変異で髄鞘形成不全が誘導されると考えられていた。2010年代に入り、遺伝子解析技術が著しく進歩した結果、新型シークエンサーを用いた疾患遺伝子研究が盛んに行われるようになった。その結果、PMDと考えられていた疾患のなかに*plp1*以外の原因遺伝子が発見され、現在、それが約10種類見出されている。このような背景のもと、これらの疾患総称としてhypomyelinating leukodystrophyという名称が提唱され、原因遺伝子ごとにHLD1（*plp1*遺伝子を原因とするPMD）からHLD2、HLD3と登録順によぶことが提案されている。このように疾患原因遺伝子の解析が急速に進んだ反面、その病態原因に関する研究は、遺伝子解析の研究のスピードに追従できない状態が続いている。そこで、本研究では本疾患の病態原因およびその背景にある疾患の共通原因となる可能性のある分子経路を明らかにする目的で、これらのモデル動物の作成を行った。本研究では、機能未知のFAM126Aという原因遺伝子を病因とするHLD5の組織モデルおよびモデルマウスを作成することに成功し「本遺伝子の異常で脳の髄鞘形成異常がおこること」を明らかとした。HLD5変異でFAM126A蛋白が凝集することがこの疾患の一要因であることも明らかにした。モデルマウスに関しては組織構造的に髄鞘形成不全（脱髄も観察される）を示し、予備的実験結果ではあるが、他の脱髄疾患と同じように四肢の動作不全もおこることも判明している。現在、HLD1に関する先行実験で明らかにした創薬標的分子（プロテアーゼやキナーゼ）がHLD5モデルマウスに有効かどうか検討しているところである。さらに、HLDのモデル組織およびマウスを作成することで疾患に関与する特有の、または共通の分子経路を明らかにし、創薬標的分子の探索研究を推進させたい。

### 業務担当：

山内淳司・（独）国立成育医療研究センター研究所・室長

寺田信生・（国）信州大学大学院医学系研究科・教授

緒方 徹・国立障害者リハビリテーションセンター・スポーツ科学支援センター長

加藤 稔・田辺三菱製薬株式会社・副主任研究員

### A. 研究目的

神経組織は大きく神経細胞とグリア細胞から

構成される。どちらの細胞が先に変性しても結果として神経線維の変性が誘導される。

さて、グリア細胞は神経細胞を保護する能力を有する細胞である。したがって、グリア細胞の機能不全は結果として神経細胞を変性させるのである。これは神経組織全体の変性を意味し、神経細胞が先に変性する疾患よりも重篤な疾患である。

例えば、例外はあるものの、神経細胞に病因があるアルツハイマー病に代表される神経変性症は発症後、通常、比較的長い期間を経て最終的な

症状に至る。これに対し、ペリチェウス・メルツバハ病 (Pelizaeus-Merzbacher disease [PMD]) とよばれる先天性のグリア性疾患は、重篤な症状を示す。その特徴としては四肢の振戦にはじまり歩行期に入っても歩行困難性を示し、さまざまな脳機能障害が併発する。そして成人までの生存率がきわめて低い。

中枢神経系のグリア細胞には複数の細胞種が存在することが知られているが、そのなかにミエリン (髄鞘) 形成細胞がある。それは希突起膠細胞 (オリゴデンドログリア細胞) とよばれ、PMD の初期病変はここにおこる。PMD は先天性の髄鞘形成不全疾患である。

欧米では既に疫学的調査が終了しており、地域性はあるものの、20 万人から 30 万人に 1 人の頻度で病因を有するという結果がでていいる。国内では約 100 家族、およそ 200 人が病因をもつと推定されている。

PMD の原因遺伝子産物は四回膜貫通型構造を有すると推定される PLP1 蛋白質である。PMD は、この PLP1 をコードする遺伝子異常でおこる病気である。PLP1 は髄鞘膜間をつなげる「ジッパー」のような役割をもつホモ結合性の細胞膜間接着分子であり、この遺伝子変異が原因で髄鞘膜間の結合異常がおきるために、PMD 病変にみられる髄鞘形成不全がおきると考えられている。

この原因遺伝子が数十年前に同定されたにもかかわらず、今日に至っても、対症療法以外の治療方法や特異的な治療薬は開発されていない。その理由はいくつかあるが、そのひとつは、まったく治療薬の標的分子が明らかにされていないことにある。さらに、髄鞘組織の構造にも理由がある。病変組織である髄鞘はオリゴデンドログリア細胞が神経細胞の軸索の周りを幾重にも巻くという複雑な構造をとっている。したがって、もし再生医療技術を応用するとしても、現時点では、そのような複雑な組織構造を再生することは難しいと考えられる。実際に、幹細胞を用いた再生医療が米国西海岸を中心とする大学および企業連携で試されたことはあるが、期待された成果が

得られずに治験が終了した。

この状況をさらに複雑化している事象がある。PLP1 は PMD の唯一の原因遺伝子産物であると考えられてきたが、かつて PMD と診断されていたもののなかに他の原因遺伝子があることが明らかにされた。これらは最近の遺伝子解析技術の進歩による成果で、新型シーケンサーによる変異解析の結果発見された新しい遺伝子変異 (そのほとんどは点変異) である。

最近、この疾患総称として、NCBI の OMIM から hypomyelinating leukodystrophy (髄鞘形成不全を伴う白質変性疾患 [HLD]) という名称が提案されており、原因遺伝子の同定順に番号を付加することが推奨されている。すなわち、PLP1 を原因とする PMD は HLD1 とされ、現在まで、論争中のひとつの疾患分類をぬかすと HLD8 までの 7 種類知られている。

本研究ではこれらの疾患モデルを作製することで、その疾患背景に存在すると考えられる共通の分子経路を明らかにし、可能な限り広範囲な疾患に適用可能な創薬標的分子を明らかにすることを目的としている。今回、HLD5 の疾患モデル組織およびマウスの作成に成功し、それがインビトロでもインビボでも髄鞘形成不全を起こすことを明らかにした。今後、順次、モデルマウスの作成を継続し、脱髄疾患に関する先行研究も加味しつつ、それらを利用した創薬標的分子の探索研究を行いたいと考えている。

## B. 研究方法

【インビトロでの髄鞘形成を再現するために必要な神経細胞の単離】

まず、神経細胞の単離に関して述べる。神経細胞は、胎生中期のラットやマウスの神経節から実体顕微鏡を用いて単離する。神経節を用いる理由は他の神経細胞に比べて、10 倍以上の神経軸索を伸ばすことができるため、後述の共培養が長時間安定するためである。さて、神経節単離後、それを 0.25% トリプリン (シグマ社が良い) で処理し、細胞を分散させる。その後、I 型コラーゲン基質



でコートされた 25 mm カバーガラス上に神経細胞をまき、2 から 3 日おきに 100 ng/ml NGF と N2 サプリメントおよび 5% ウシ胎児血清を含む DMEM 培養液を交換する。このとき、交互に、フルオロウリジンを含む培養液を使用する。これによって、神経細胞以外の線維芽細胞などが除去される。

これらの条件下で 2 から 3 週間培養すると、高純度の神経細胞が得られる。この条件で神経軸索を 10mm 以上伸ばす細胞もある。

**【インビトロでの髄鞘形成を再現するために必要なオリゴデンドログリア細胞の単離】**

次に、グリア細胞の単離に関して述べる。オリゴデンドログリア細胞の単離はきわめて難しいが、研究の結果、安定した単離、培養法の確立に成功した。以下、ラット大脳からオリゴデンドログリア細胞の精製方法を順に述べる。

① 胎生 15 日のラット大脳（小脳や視床領域を採取しないように注意する）数個を摘出し、0.25% トリプシンで組織を分解する。このとき、数分毎に組織が分解されているか注意深く観察する。

② 組織が完全に分解されてきたら、10%血清の入った MEM 培養液を入れ分解反応を止め、遠心し、沈殿した細胞をポリリジン（PLL）（シグマ社が良い）でコートとした細胞培養皿にまく。

③ 1 週間後、0.05% トリプシン（シグマ社が良い）で細胞をはがし、再び PLL でコートとした細胞培養皿にまく。

④ さらに 1 週間後、0.05% トリプシンで細胞をはがし、細菌培養皿にまく。この過程で、オリゴデンドログリア細胞前駆細胞が 95% まで精製される。

⑤ 2 日後、10 ng/ml PDGF 及び 10 ng/ml bFGF の入った Raff 培地に換え、2 日間培養する。この過程で、オリゴデンドログリア細胞前駆細胞が劇的に増殖する。

⑥ 2 日後、10 ng/ml PDGF を抜き、10 ng/ml bFGF と 30 ng/ml T3 および 40 ng/ml T4 ホルモンを添加した Raff 培地に換え、オリゴデンドログリア細胞への分化誘導をかける。実験状況に応じ、1 日から 7 日間培養する。

以上の方法で、高純度のオリゴデンドログリア細胞前駆細胞およびオリゴデンドログリア細胞を得ることができる。

**【髄鞘変性を再現するインビトロの共培養システム】**

十分に神経軸索を伸ばした神経節神経細胞上に、およそ  $3 \times 10^6$  個のオリゴデンドログリア細胞（正確に述べると、オリゴデンドログリア細胞前駆細胞）をまく。さて、上述の分化培地で、およそ 5 から 7 日間、2 細胞間の接触培養を行うと、オリゴデンドログリア細胞前駆細胞が神経軸索に沿って増殖する。その後、数週間すると、オリゴデンドログリア細胞前駆細胞が髄鞘形態をもつオリゴデンドログリア細胞に分化し、インビトロで髄鞘組織が形成される。この場合、NGF 中和抗体や NGF 中和蛋白質を用いて、髄鞘形成を積極的に誘導することもある。インビトロでの髄鞘形成は実際に生体内でできる髄鞘形成のタイムコースとほぼ等しく、それぞれの時期の遺伝子変動（トランスクリプトームのプロファイリング）はほぼ生体内と同じであることを確認している。

オリゴデンドログリア細胞前駆細胞が神経軸索上で増殖するときに、PLP1 に代表される原因遺伝子産物をコードするレトロウイルスを感染させると、髄鞘形成不全がインビトロで再現される。ただし、感染したオリゴデンドログリア細胞は病的な状態ではあるが、その細胞死は観察されない。HLD1 (PMD) のモデルではそれが観察されないことは先行実験で検証済みである。この実験系は 2008 年にヒューマンサイエンス振興財団の審査を経て、同財団を通して特許出願（特願 2008-208155）した培養系に若干の変更を加えたシステムである。

**【疾患モデルマウスを作成するための遺伝子改変方法】**

疾患変異遺伝子産物をオリゴデンドログリア細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成する。

そのトランスジェニックマウス用のベクターは既に完成している。それは独自に単離した強力なオリゴデンドログリア細胞特異的プロモーター（山内 GenBank Acc.No. JF429449）下流に疾患変異遺伝子を挿入し、それを受精卵にインジェクションして作成するものである。このベクター内に挿入される遺伝子は疾患発症初期に髄鞘形成不全および脱髄が観察される脳梁特異的に発現する。トランスジェニックマウスは数カ月という短期間で目的のマウスが作成できるため、疾患モデルマウスを計画期間内で作成することは可能である。

しかし、もし疾患変異によって、遺伝子産物の安定性がなくなることで、疾患が誘導されると推定される場合は、疾患原因遺伝子のノックアウトマウスを作成する。これは同一プロモーター下流に人工マイクロ RNA 骨格で外挿された人工 RNA 干渉配列を配置することで構築できる（鳥居ら Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014）。

勿論、研究の過程で、ノックアウトマウスを作成したほうが良いと判断した場合は、その作成を定法にしたがって行う。クラシカル・ノックアウトマウスおよびコンディショナル・ノックアウトマウスの作製技術は数年前に研究室に導入済みである。また、コンディショナル・ノックアウトマウスにおいて、コンディショナル・ノックアウトを達成するための組織特異的ディレーターマウス（Cre マウス）も研究室に揃っている。

#### 【生化学的な評価方法】

独自に作成した髄鞘特異的抗体（髄鞘塩基性蛋白質など）に発色色素を付加したものをを用いて、ドットプロット方法などで簡便に髄鞘形成不全（抗体交差率の低下）を測定する。

また、いくつかのプロテアーゼやキナーゼの活性が増減していることが HLD1 における先行研究（未発表データ）で判明しているため、それらの活性測定方法も開発している。可能な限り人工基質を利用したタイタープレートリーダーを用いた簡便な方法を検討している。これらは創薬標的

分子の探索研究にも応用されている。

#### 【組織構造の評価方法】

まず、簡便に、独自に作成した髄鞘特異的抗体を用いた組織染色を行うことで、組織構造評価を行う。

次に、正確に、髄鞘形成不全、脱髄病態を評価するためには、二重構造型髄鞘などの特徴的な髄鞘病態を観察する必要がある。そのために電子顕微鏡を用いて高次構造解析を行うが、資料調整の前処理として「生体内凍結方法」を用いると、病的で壊れやすい髄鞘をほぼ生体内にある状態で固定作業まで行うことができる。この方法を用いてインビトロおよびインビボで髄鞘形成不全を評価する。発展途上の技術ではあるものの、髄鞘構造変化を観察する行程に応用可能である。

#### 【神経機能の評価方法】

直接的に髄鞘変性を運動試験として評価する方法は確立されていないため、他の中枢神経髄鞘形成不全疾患のモデルマウスで用いられているテイルフリック試験やローターロード試験を HLD マウスに適合するように各種パラメーターの設定を行うが、HLD モデルマウスは最終的には強い神経変性病態を示すために、低ストレス刺激を加えることがパラメーター調整の基準になる。

また、神経の伝導速度測定も検討するが、脳内神経は一般的に同方向に一樣ではないため電気伝導速度の測定は一般的な感覚神経の電気伝導速度の測定方法と異なり工夫が必要になる。電極等の大きさを変更しつつ検討している。

#### （倫理面への配慮）

組換え DNA 実験に関しては指針に従い、各施設の換え DNA 実験委員会を通して承認を得ており、その規則を遵守し実験を行っている。

実験動物および遺伝子改変動物の取り扱いに関しても指針に従い、各施設の動物実験委員会を通して承認を得ており、その規則を遵守し実験を行っている。また 3Rs の原則も常に注意しながら

実験を進めている。

## C. 研究結果

### 【インビトロモデルで疾患を再現する】

インビトロで HLD5 の髄鞘形成不全モデル作成に成功した。現在、これらを用いて創薬標的分子の探索スクリーニングが可能かどうか検討している。

先行研究での HLD1 モデルの構築時に明らかにした創薬標的分子 (MAP キナーゼやプロテアーゼなど) が本疾患でも適用可能か今後、検討する。もしこれらが本モデルにも適用可能であれば、既にアッセイ系が確立されているため、標的分子に対する化合物スクリーニング研究に入ることができる。

### 【インビトロで髄鞘組織を再現する技術の改良】

病態を再現するもとなる神経組織の効率的な再構築に関する論文も (宮本ら米国細胞生物学会誌 *Mol. Biol. Cell*) 発表し、同紙の表紙でその人工的に作成された神経組織の写真が紹介された。主要な改良点はオリゴデンドログリア細胞の前駆細胞の前の細胞 (グリア系の前駆細胞と命名されているものと同一であると推定) を単離し、インビトロでそれを前駆細胞まで分化させることで、以前に比べ 10%から 30%多くの細胞数の獲得が可能になり、髄鞘形成効率も上昇した。

### 【インビボモデルで疾患を再現する】

当該年度に HLD2 および HLD3 に関しては欧米製薬企業での創薬を目指した病態モデルの開発情報があつたため、HLD4 以降のモデルの開発を優先した。そのなかで、初めての先天性中枢神経脱髄疾患 5 型 (HLD5) のモデルマウスの作成に成功した (宮本ら *J. Clin. Neurosci.* 2014)。HLD5 は機能未知の FAM126A という遺伝子産物の点変異 (53 番目のロイシンがプロリンに変異) が原因であるとされている。このマウスにおいて、疾患発症初期に変性が観察される脳梁部に髄鞘形成不全がおきていることが再現された。

新たに判明したこととして、疾患変異蛋白質が脳梁内のオリゴデンドログリア細胞内に凝集し、疾患変異蛋白質が発現しているオリゴデンドログリア細胞では髄鞘がまったく形成させていないことが分かった。

### 【モデルの組織および機能評価】

現在、将来の創薬探索研究に対しても本モデルは耐えうるか (強い妥当性をもつか) つまり、神経機能等が髄鞘形成不全を示しているか慎重に検討しているところである。

予備実験結果であるものの、凍結法等を用いた新しい電子顕微鏡解析で髄鞘形成不全に特徴的な二重構造様の異常髄鞘の所見が HLD5 モデルマウスで観察されている。また、ローターロード試験では HLD5 モデルマウスは HLD1 ほどの強い異常は示さないものの、それに準じた異常があることが判明した。

これらの技法はほとんどの神経系に適用可能であった (論文発表の項に、さまざまな組織システムでの応用例がある)。

## D. 考察

HLD5 の髄鞘形成不全をインビトロおよびマウス個体レベルで再現することに成功した。現在、髄鞘形成不全による組織構造異常および神経機能評価の検討を慎重に行い、このモデルが疾患モデルに適しているか詳細に研究をすすめている。

HLD5 の原因遺伝子産物の機能は不明ではあるものの、疾患点変異により、蛋白質凝集が誘導されるため、何らかの小胞体ストレス応答がおきる可能性が示された。これはインビトロでもインビボでも観察された現象である。実際には、アルツハイマー病のアミロイド凝集やパーキンソン病のパーキン蛋白質に関わる凝集などから誘導されるような強力なストレスシグナルが入力されるわけではないが、その部分的な応答をインビトロおよびインビボレベルで確認することができた。

その応答のなかに MAP キナーゼ経路 (Jun キナ



一ゼ群)の活性化がみられた。これは HLD1 病態をもつ細胞でも見られ、一部の細胞ストレス応答時にも活性化すると考えられているキナーゼ群であるため、共通の病態の分子経路である可能性が高い。これらの分子経路に関わる遺伝子改変マウスは既に研究室で所有しているため、今後創薬標的としての可能性があるか検討が必要である。

さらにモデル構築を進め、組織学および神経機能的に、それらを総合評価し、全モデルが疾患を再現しているか慎重に研究を進める。これらを用い、本疾患の共通の分子経路を明らかにし、炎症性の髄鞘形成不全疾患等の類似性の高いさまざまな神経系の疾患にそれらの研究が応用できるか検証する。

#### E. 結論

- ① HLD5 の髄鞘形成不全インビトロで再現することに成功した。
- ② HLD5 の髄鞘形成不全をインビボで再現することに成功した。本疾患モデルマウスは(独)医薬基盤研究所から学術機関に無償提供される体制にある。
- ③ ここで開発される電子顕微鏡標本作製の新しい技術、神経機能試験、化合物探索システムを利用し、さまざまな神経系の脱髄疾患研究に応用する。
- ④ HLD5 の疾患原因のひとつに蛋白凝集を引き起こすことが考えられた。蛋白凝集シグナルは HLD5 の髄鞘形成不全をすべて説明でないが、一部の MAP キナーゼ経路 (Jun キナーゼ群) が関与していることも判明した。今後、これらの経路が髄鞘形成不全に共通の分子標的になるかどうか検討する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yuki Miyamoto, Natsuki Yamamori, Tomohiro

Torii, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi\* (2014) Rab35, acting through ACAP2 switching off Arf6, negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination. *Mol. Biol. Cell* 25, 1532-1542: \*Corresponding author

2) Yuki Miyamoto, Takahiro Eguchi, Tomohiro Torii, Kazuaki Nakamura, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi\* (2014) Hypomyelinating leukodystrophy-associated missense mutant of FAM126A/hyccin/DRCTNNB1A aggregates in the endoplasmic reticulum. *J. Clin. Neurosci.* 21, 1033-1039: \*Corresponding author

3) Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, Shuji Takada, Hideki Tsumura, Miyuki Arai, Kazuaki Nakamura, Katsuya Ohbuchi, Masahiro Yamamoto, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi\* (2014) In vivo knockdown of ErbB3 in mice inhibits Schwann cell precursor migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 452, 782-788: \*Corresponding author

4) Tomohiro Torii\*, Yuki Miyamoto, Kenji Tago, Kazunori Sango, Kazuaki Nakamura, Atsushi Sanbe, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi\* (2014) Arf6 guanine-nucleotide exchange factor cytohesin-2 binds to CCDC120 and is transported along neurites to mediate neurite growth. *J. Biol. Chem.* 289, 33887-33903: \*Corresponding authors

5) Kamijo S, Saitoh Y, Ohno N, Ohno S, Terada N. Immunohistochemical study of mouse sciatic nerves under various stretching conditions with "in vivo cryotechnique" *Journal of Neuroscience Methods*, 227:181-188 2014

6) Saitoh Y, Terada N, Ohno N, Hamano A, Okumura

N, Jin T, Saiki I, Ohno S. Imaging of thrombosis and microcirculation in mouse lungs of initial melanoma metastasis with in vivo cryotechnique. *Microvascular Research*, 91:73-83 2014

7) Wu B, Ohno N, Saitoh Y, Bai Y, Huang Z, Terada N, Ohno N. Immuno- and Enzyme- histochemistry of HRP for demonstration of blood vessel permeability in mouse thymic tissues by “in vivo cryotechnique”. *Acta Histochem Cytochem*; in press. 2014

8) Terada N, Saitoh Y, Ohno N, Ohno S. Membrane skeleton in Schmidt-Lanterman incisure in Schwann cells of peripheral nervous system. *Springer, Schwann Cell Development and Pathology*; Eds. Sango K. and Yamauchi J.; p.29-45. 2014

9) Ohno N, Sakoh T, Saitoh Y, Terada N, Ohno S. Schwann cell-Axon interactions: The molecular and metabolic link between Schwann cells and axons. *Springer, Schwann Cell Development and Pathology*; Eds. Sango K. and Yamauchi J.; p.47-67. 2014

10) 齊藤百合花、寺田信生、大野伸彦、大野伸一. 生体内凍結技法による肺組織切片標本上での生体物質分布と血行動態の可視化法. *山梨医科学雑誌* 29, 11-18, 2014

11) Fujiwara S, Hoshikawa S, Ueno T, Hirata M, Saito T, Ikeda T, Kawaguchi H, Nakamura K, Tanaka S, Ogata T (corresponding), SOX10 Transactivates S100B to Suppress Schwann Cell Proliferation and to Promote Myelination. *PLoS ONE* 9(12):e115400, 2014

12) Nagao M, Lanjakornsiripan D, Itoh Y, Kishi Y, Ogata T, Gotoh Y, HMGN family proteins

promote astrocyte differentiation of neural precursor cells. *Stem Cells* 32(11):2983-2989, 2014

## 2. 学会発表

1) 宮本 幸、鳥居知宏、田上昭人、山内淳司 : New mechanisms of the peripheral nerve development and regeneration by Dcok6 (ショートスピーチ) 2014年9月・日本神経科学会・横浜

2) 鳥居知宏、宮本 幸、田上昭人、山内淳司 : In vivo expression of the Arf6 guanine-nucleotide exchange factor cytohesin-1 in mice exhibits enhanced myelin thickness in nerves (セッションスピーチ) 2014年9月・日本神経科学会・横浜

3) 山内淳司 : ミエリン形成を司る新しい細胞内シグナル・ネットワーク (ワークショップ) 2014年9月・日本組織細胞化学会総会学術集会/日中合同組織細胞化学セミナー・松本

4) 山内淳司 : 末梢神経の髄鞘発生とオンとオフを制御するスイッチ・シグナル (シンポジウム) 2014年9月29日~10月1日・日本神経化学会・奈良

5) 宮本 幸、山内淳司 : 中枢神経脱髄疾患 HLD5 変異による異常 FAM126A 蛋白質は脳梁で凝集し脱髄を誘導する可能性がある (シンポジウム : 企画/座長 板東良雄、山内淳司) 2014年9月29日~10月1日・日本神経化学会・奈良

6) 寺田信生、齊藤百合花、大野伸彦、上條明生、大野伸一. 生きたマウス末梢神経線維の伸展機能状態下構造とシグナル分子機構の解析. (ワークショップ ; 神経の構造と機能をもたらす分子を捉える) 第 55 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 松本 2014年9月

7) 寺田信生. 生きた動物生体内臓器の動的機能分子形態像の解析. (学会奨励賞受賞講演) 第 46 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. 東京 2014 年 10 月

8) 上條明生、齊藤百合花、大野伸彦、大野伸一、寺田信生. マウス坐骨神経における膜骨格蛋白 4.1G との抗 angiomin 抗体の免疫交差反応性の検討. 第 74 回日本解剖学会中部支部学術集会. 金沢 2014 年 10 月

9) Nagao, M., Darin, Lanjakornsiripan., Itoh, Y., Kishi, Y., Gotoh, Y., Ogata, T. HMGN family proteins promote astrocyte differentiation of neural precursor cells. Neuroscience2014, Washington DC, USA, 2014/11/15-11/19. Abstract, 2014, 497.14/B43.

10) 緒方徹. 脊髄損傷後のコレステロール代謝阻害剤投与は髄鞘の再生を阻害する. 第 33 回日本運動器移植・再生医学研究会, 東京, 2014-09-27. プログラム集, 2014, p. 36.

11) 緒方徹. 慢性病態における軸索損傷マーカー pNF-H の意義, 第 33 回日本運動器移植・再生医学研究会, 東京, 2014-09-27. プログラム集, 2014, p.41.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



業務項目

治療薬が現存しない先天性中枢神経脱髄疾患の独自の病態モデルを作成し、その治療標的分子を探索する研究に向けて  
—病態モデルの作成研究—

山内 淳司（(独) 国立成育医療研究センター研究所薬剤治療研究部分子薬理室室長）

研究要旨

アルツハイマー病やパーキンソン病のように神経細胞それ自体に病態原因がある神経変性症はよく知られおり、それに対する医学研究も国内外で精力的に研究されている。これに対して、神経細胞を保護する役割をもつグリア細胞が原因で誘導される神経変性もある。しかし、これらの疾患患者数がアルツハイマー病やパーキンソン病の患者数に比べ多くないため、その研究の進展は、学術機関や民間製薬企業を含めても、きわめておそい。

ペリチェウス・メルツバッハ病はそのひとつで、先天性の中枢神経系のオリゴデンドログリア細胞の変性疾患である。ここ数年間の著しい遺伝子解析技術の進歩で、一遺伝子性疾患と考えられていたペリチェウス・メルツバッハ病も複数の原因遺伝子から構成されることが明らかにされた。現在、欧米ではこれらの疾患総称としてhypomyelinating leukodystrophyという名称が提唱され、原因遺伝子の発見順にHLD1からHLD8まで分かっている。

このように疾患原因遺伝子の解析が急速に進んだ反面、その病態原因に関する国内外の研究は遺伝子解析研究に追従できない状態が続いている。そこで、本研究では本疾患の病態原因およびその背景にある疾患の共通原因となる可能性のある分子経路を明らかにする目的で、これらのモデル動物の作成を行った。本研究では、機能未知のFAM126Aとい原因遺伝子を病因とするHLD5のモデルマウスを作成することに成功し「本遺伝子の異常で脳の髄鞘形成異常がおこること」および、おそらく「その異常でgain-of-function形質が誘導されること」を明らかとした。これらの疾患モデル動物を作成することで疾患に関与する疾患特有または共通の分子経路を明らかにし、創薬標的分子の探索研究を推進させたいと考えている。

A. 研究目的

アルツハイマー病やパーキンソン病のように神経細胞に病態原因があり、それ自体が変性する神経変性疾患はよく知られている。その一方で、神経細胞の機能を高め、それを保護する役割をもつグリア細胞が原因となって起きる神経変性疾患もある。

これはグリア細胞が神経細胞よりも先に変性し、グリア細胞の機能不全が起こり、結果として神経細胞が変性する一群の疾患のことである。これらは、神経組織全体が変性するため、神経細胞

に病態原因をもつ疾患よりも重篤であると考えられている。

ペリチェウス・メルツバッハ病（Pelizaeus-Merzbacher disease [PMD]）は、この種の変性疾患である。中枢神経系のグリア細胞には複数の細胞種が存在することが知られているが、そのなかにミエリン（髄鞘）形成細胞である。それは希突起膠細胞（オリゴデンドログリア細胞）とよばれ、PMDの初期病変はここにおこる。

PMDは先天性の髄鞘形成不全疾患である。欧米では既に疫学的調査が終了しており、地域性はあ

るものの、20万人から30万人に1人の頻度で病因を有するという結果がでていいる。国内では約100家族、およそ200人が病因をもつと推定されている。PMDの原因遺伝子産物は四回膜貫通型構造を有すると推定されるPLP1蛋白質である。PMDは、このPLP1をコードする遺伝子異常でおこる病気である。PLP1は髄鞘膜間をつなげる「ジッパー」のような役割をもつホモ結合性の細胞膜間接着分子であり、この遺伝子変異が原因で髄鞘膜間の結合異常がおきるために、PMD病変にみられる髄鞘形成不全がおきると考えられている。

このように、髄鞘形成に重要な遺伝子の変異に起因するPMDは重篤な疾患であることが予想できる。その特徴としては四肢の振戦と歩行困難を示し、さまざまな脳機能障害が併発するため、20歳までの生存率はきわめて低い。

しかし、この主要な原因遺伝子が数十年前に同定されたにもかかわらず、今日に至っても、その特異的治療薬や治療方法が開発されていない。その理由はいくつかあるが、そのひとつは、まったく治療薬の標的分子が明らかにされていないことにある。さらに、髄鞘組織の構造にも理由がある。病変組織である髄鞘はオリゴデンドログリア細胞が神経細胞の軸索の周りを幾重にも巻くという複雑な構造をとっている。したがって、もし再生医療技術を応用するとしても、現時点では、そのような複雑な組織構造を再生することは難しいと考えられる。実際に、幹細胞を用いた再生医療が米国西海岸を中心とする大学および企業連携で試されたことはあるが、期待された成果が得られずに治験が終了した。

最近、この状況をさらに複雑化している事象がある。PLP1はPMDの唯一の原因遺伝子産物であると考えられてきたが、他にも複数の原因遺伝子が明らかにされた。これらは最近の遺伝子解析技術の進歩によるもので、新型シーケンサーによる変異解析の結果発見されたPMDの疾患解析による新しい遺伝子変異である。最近、本疾患の総称として、NCBIのOMIMからhypomyelinating leukodystrophy（髄鞘形成不全を伴う白質変性疾

患[HLD]）という名称が提案されており、原因遺伝子の同定順に番号を付加することが推奨されている。PLP1を原因とするPMDはHLD1と命名され、現在まで、論争中の1疾患分類をぬかすとHLD8までの7種類知られている。

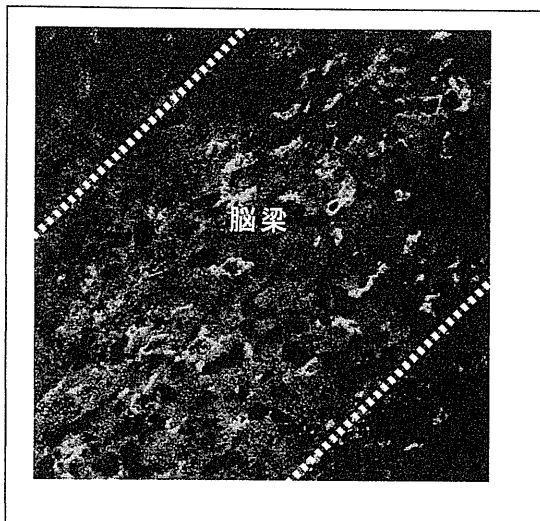
本研究では、これらの疾患モデルを作製することで、その疾患背景に存在すると考えられる共通の分子経路を明らかにし、可能な限り広範囲な疾患に適用可能な創薬標的分子を明らかにすることを目的としている。今回、HLD5の疾患モデルマウスの作成に成功し、それが脳の髄鞘形成不全を起こすことを明らかにした。また、同時にインビトロモデルの作成も成功した。今後もモデルマウスの作成を継続し、それらを利用した創薬標的分子探索研究を行いたいと考えている。

## B. 研究方法

### 【疾患モデルマウスを作成するための遺伝子改変方法】

疾患変異遺伝子産物をオリゴデンドログリア細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成する。

そのトランスジェニックマウス用のベクターは既に完成している。それは独自に単離した強力なオリゴデンドログリア細胞特異的プロモーター（山内 GenBank Acc.No.JF429449）下流に疾患変異遺伝子を挿入し、それを受精卵にインジェクションして作成するものである。下の蛍光写真は、蛍光蛋白質遺伝子とそのベクターに挿入し、疾患発症初期に髄鞘形成不全および脱髄が観察される脳梁特異的（次項枠内の写真：点線間の部分が脳梁、白抜き部分が髄鞘）に発現するか調べたものである。トランスジェニックマウスは数ヶ月という短期間で目的のマウスが作成できるため、疾患モデルマウスを計画期間内で作成することは可能である。



しかし、もし疾患変異により遺伝子産物の安定性がなくなること、疾患が誘導されると判断される場合は、疾患原因遺伝子のノックダウンマウスを作成する。これは同一プロモーター下流に人工 miRNA 骨格で外挿された人工 RNA 干渉配列を配置することで構築できる（鳥居ら Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014）。

勿論、研究の過程で、ノックアウトマウスを作成したほうがいと判断した場合は、その作成を定法にしたがって行う。クラシカル・ノックアウトマウスおよびコンディショナル・ノックアウトマウスの作製技術は研究室に導入されている。

#### 【インビトロでの髄鞘形成を再現するために必要な神経細胞の単離】

まず、神経細胞の単離に関して述べる。神経細胞は、胎生中期のラットやマウスの神経節から実体顕微鏡を用いて単離する。神経節を用いる理由は他の神経細胞に比べて、10 倍以上の神経軸索を伸ばすことができるため、後述の共培養が長時間安定するためである。さて、神経節単離後、それを 0.25%トリプリン(シグマ社が良い)で処理し、細胞を分散させる。その後、I 型コラーゲン基質でコートされた 25 mm カバーガラス上に神経細胞をまき、2 から 3 日おきに 100 ng/ml NGF と N2 サプリメントおよび 5%ウシ胎児血清を含む DMEM 培養液を交換する。このとき、交互に、フルオロウ

リジンを含む培養液を使用する。これによって、神経細胞以外の線維芽細胞などが除去される。

これらの条件下で 2 から 3 週間培養すると、高純度の神経細胞が得られる。この条件で神経軸索を 10mm 以上伸ばす細胞もある。

#### 【インビトロでの髄鞘形成を再現するために必要なオリゴデンドログリア細胞の単離】

次に、グリア細胞の単離に関して述べる。オリゴデンドログリア細胞の単離はきわめて難しいが、研究の結果、安定した単離、培養法の確立に成功した。以下、ラット大脳からオリゴデンドログリア細胞の精製方法を順に述べる。

- ① 胎生 15 日のラット大脳（小脳や視床領域を採取しないように注意する）数個を摘出し、0.25%トリプシンで組織を分解する。このとき、数分毎に組織が分解されているか注意深く観察する。
- ② 組織が完全に分解されてきたら、10%血清の入った MEM 培養液を入れ分解反応を止め、遠心し、沈殿した細胞をポリリジン (PLL) (シグマ社が良い) でコートとした細胞培養皿にまく。
- ③ 1 週間後、0.05%トリプシン (シグマ社が良い) で細胞をはがし、再び PLL でコートとした細胞培養皿にまく。
- ④ さらに 1 週間後、0.05%トリプシンで細胞をはがし、細菌培養皿にまく。この過程で、オリゴデンドログリア細胞前駆細胞が 95%まで精製される。
- ⑤ 2 日後、10 ng/ml PDGF 及び 10 ng/ml bFGF の入った Raff 培地に換え、2 日間培養する。この過程で、オリゴデンドログリア細胞前駆細胞が劇的に増殖する。
- ⑥ 2 日後、10 ng/ml PDGF を抜き、10 ng/ml bFGF と 30 ng/ml T3 および 40 ng/ml T4 ホルモンを添加した Raff 培地に換え、オリゴデンドログリア細胞への分化誘導をかける。実験状況に応じ、1 日から 7 日間培養する。

以上の方法で、高純度のオリゴデンドログリア細胞前駆細胞およびオリゴデンドログリア細胞を得ることができる。



### 【髄鞘変性を再現するインビトロの共培養システム】

十分に神経軸索を伸ばした神経節神経細胞上に、およそ  $3 \times 10^6$  個のオリゴデンドログリア細胞（正確に述べると、オリゴデンドログリア細胞前駆細胞）をまく。さて、上述の分化培地で、およそ5から7日間、2細胞間の接触培養を行うと、オリゴデンドログリア細胞前駆細胞が神経軸索に沿って増殖する。その後、数週間すると、オリゴデンドログリア細胞前駆細胞が髄鞘形態をもつオリゴデンドログリア細胞に分化し、インビトロで髄鞘組織が形成される。この場合、NGF 中和抗体や NGF 中和蛋白質を用いて、髄鞘形成を積極的に誘導することもある。インビトロでの髄鞘形成は実際に生体内でできる髄鞘形成のタイムコースとほぼ等しく、それぞれの時期の遺伝子変動（トランスクリプトームのプロファイリング）はほぼ生体内と同じであることを確認している。



オリゴデンドログリア細胞前駆細胞が神経軸索上で増殖するとき、PLP1 に代表される原因遺伝子産物をコードするレトロウイルスを感染させると、髄鞘形成不全がインビトロで再現される。ただし、感染したオリゴデンドログリア細胞は病的な状態ではあるが、その細胞死は観察されない。前項枠内の写真は神経細胞の上にオリゴデンド

ログリア細胞添加し共培養を行ったものである。コントロールでの白抜きの部分が形成された髄鞘である。HLD1 (PMD) のモデルではではそれが観察されないことが分かる。

この実験系は 2008 年にヒューマンサイエンス振興財団の審査を経て、同財団を通して特許出願（特願 2008-208155）した培養系に若干の変更を加えたシステムである。

#### （倫理面への配慮）

組換え DNA 実験やインビトロでの非増殖性ウイルスの感染実験に関しては（独）国立成育医療研究センター研究所組換え DNA 実験委員会を通して承認を得ており、その規則を遵守し実験を行っている。山内は（独）国立成育医療研究センター研究所組換え DNA 実験委員会の常任委員でもあるため、その任務を補佐しながら所内全体の組換え DNA 実験に関して慎重に対処している。

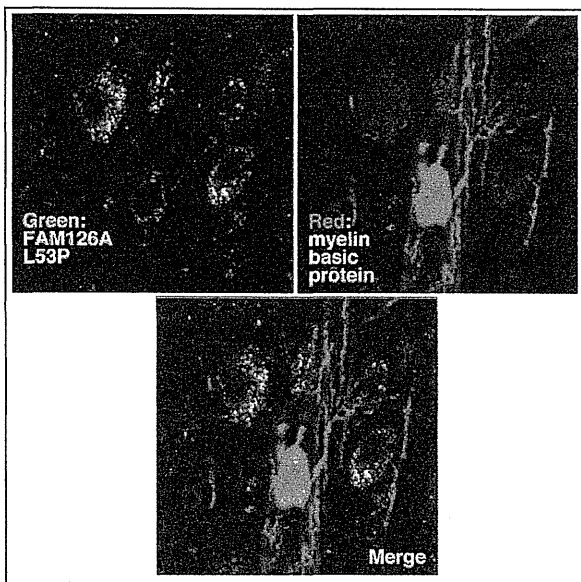
実験動物および遺伝子改変動物の取り扱いに関しても同センターの承認を得ており、3Rs を遵守し実験を行っている。また、山内は積極的に実験動物管理会議にも出席しており、その役割を補佐しながら、所内の関連実験に関する課題担当者とも繁茂に情報交換を行っている。

### C. 研究結果

#### 【インビボモデルで疾患を再現する】

当該年度に HLD2 および HLD3 に関しては欧米製薬企業での創薬を目指した病態モデルの開発情報があったため、HLD4 以降のモデルの開発を優先した。そのなかで、初めての先天性中枢神経脱髄疾患 5 型 (HLD5) のモデルマウスの作成に成功した（宮本ら J. Clin. Neurosci. 2014）。HLD5 は機能未知の FAM126A という遺伝子産物の点変異（53 番目のロイシンがプロリンに変異）が原因であるとされている。次項の写真（宮本らの論文より改変後転載した）はモデルマウスの脳梁部に髄鞘形成不全がおきている写真である。脳梁部は疾患発症初期に変性が観察される部分である。Green と記載された部分（薄い白抜き）は疾患変異蛋白質が

脳梁のオリゴデンドログリア細胞内に凝集したことを示すものである。Red と記載された灰色抜きの部分は髄鞘が出来ていることを示す。Merge とある写真から、疾患変異蛋白質が発現しているオリゴデンドログリア細胞では髄鞘が形成されていないことが分かる。これは、病態形質を示す細胞では髄鞘が形成されていないことを意味し一部の MAP キナーゼ群が活性化されていることも判明している。



現在、将来の創薬探索研究に対しても本モデルは耐えうるか（強い妥当性をもつか）つまり、神経機能等が髄鞘形成不全を示しているか各班員とともに慎重に検討しているところである。

#### 【インビトロモデルで疾患を再現する】

また、HLD5 のインビトロのモデルも同論文（宮本ら）で作製に成功しており、先の写真のようなインビボでの形態とほぼ同様な形態を示した。

一方、病態を再現するもとなる神経組織の効率的な再構築に関する論文も（宮本ら米国細胞生物学会誌 Mol. Biol. Cell）発表し、同紙の表紙でその人工的に作成された神経組織の写真が紹介された。

#### D. 考察

【インビボモデルで疾患を再現することに関し

て】

HLD5 の髄鞘形成不全をマウス個体レベルで再現することに成功した。現在、髄鞘形成不全による神経機能評価（行動および神経伝導速度等）を行い、このモデルが疾患モデルに適しているか検討している。

本疾患の原因遺伝子産物の機能は不明ではあるものの、疾患点変異により、蛋白質凝集が誘導されるため、何らかの小胞体ストレス応答がおきる可能性が示された。一般的に議論されるような強力なストレスシグナルが入力されるわけではないが、部分的な応答をインビボレベルで確認することができた。つまり、疾患変異による形質獲得が HLD5 の疾患原因である可能性がある。小胞体ストレスは一部の末梢神経側の先天性の髄鞘形成不全疾患でも起こることが知られているので、その共通性は考えられる。現在、この点についても詳細に検討を進めている。

【インビトロモデルで疾患を再現することに関して】

インビトロで HLD5 の髄鞘形成不全モデル作成に成功した。現在、これらを用いて創薬標的探索スクリーニングが可能かどうか検討している。同時に、先行研究での HLD1 モデルの構築時に明らかにした創薬標的分子（MAP キナーゼなど）が本疾患でも適用可能か検討する。HLD5 でも MAP キナーゼ群の上昇が観察されている（未発表データ）という知見を加えておく。

#### 【予備的研究と今後の展開】

今後、さらにモデル構築を進め、組織学および神経機能的にそれらを評価し、モデルが疾患を再現しているか慎重に研究をすすめる。これらを用い、これらの疾患の共通の分子経路を明らかにし、炎症性の髄鞘形成不全疾患等の類似性の高い疾患にそれらの研究が応用できるか検証したい。

また、他の神経系における脱髄疾患研究への応用も現在検討中であり、病態を司る経路の一般性を解明したい。

## E. 結論

1) HLD5 の髄鞘形成不全をマウスで再現することに成功した。

2) HLD5 の髄鞘形成不全をインビトロで再現することに成功した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yuki Miyamoto, Natsuki Yamamori, Tomohiro Torii, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi\* (2014) Rab35, acting through ACAP2 switching off Arf6, negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination. *Mol. Biol. Cell* 25, 1532-1542: \*Corresponding author

2) Yuki Miyamoto, Takahiro Eguchi, Tomohiro Torii, Kazuaki Nakamura, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi\* (2014) Hypomyelinating leukodystrophy-associated missense mutant of FAM126A/hyccin/DRCTNNB1A aggregates in the endoplasmic reticulum. *J. Clin. Neurosci.* 21, 1033-1039: \*Corresponding author

3) Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, Shuji Takada, Hideki Tsumura, Miyuki Arai, Kazuaki Nakamura, Katsuya Ohbuchi, Masahiro Yamamoto, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi\* (2014) In vivo knockdown of ErbB3 in mice inhibits Schwann cell precursor migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 452, 782-788: \*Corresponding author

4) Tomohiro Torii\*, Yuki Miyamoto, Kenji Tago, Kazunori Sango, Kazuaki Nakamura, Atsushi

Sanbe, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi\* (2014) Arf6 guanine-nucleotide exchange factor cytohesin-2 binds to CCDC120 and is transported along neurites to mediate neurite growth. *J. Biol. Chem.* 289, 33887-33903: \*Corresponding authors

### 2. 学会発表

1) 宮本 幸、鳥居知宏、田上昭人、山内淳司：New mechanisms of the peripheral nerve development and regeneration by Dcok6 (シヨートスピーチ) 2014年9月・日本神経科学会・横浜

2) 鳥居知宏、宮本 幸、田上昭人、山内淳司：In vivo expression of the Arf6 guanine-nucleotide exchange factor cytohesin-1 in mice exhibits enhanced myelin thickness in nerves (セッション) 2014年9月・日本神経科学会・横浜

3) 山内淳司：ミエリン形成を司る新しい細胞内シグナル・ネットワーク (ワークショップ) 2014年9月・日本組織細胞化学会総会学術集会/日中合同組織細胞化学セミナー・松本

4) 山内淳司：末梢神経の髄鞘発生とオンとオフを制御するスイッチ・シグナル (シンポジウム) 2014年9月29日～10月1日・日本神経化学会・奈良

5) 宮本 幸、山内淳司：中枢神経脱髄疾患 HLD5 変異による異常 FAM126A 蛋白質は脳梁で凝集し脱髄を誘導する可能性がある (シンポジウム：企画/座長 板東良雄、山内淳司) 2014年9月29日～10月1日・日本神経化学会・奈良

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし



2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

治療薬が現存しない先天性中枢神経脱髄疾患の独自の病態モデルを作成し、その治療標的分子を探索する研究に向けて  
—病態モデルの髄鞘組織構造解析—

寺田 信生（(国) 信州大学大学院医学系研究科教授）

研究要旨

神経系における脱髄疾患を解明するためには、髄鞘を形成する新規の蛋白を探索し、それらの神経線維における正確な位置や組織構造、さらに関連蛋白との連関を明らかにすることが重要である。そのために組織構造や構成蛋白の局在を従来の試料作製法を用いた解析に加えて、生体内の動態や水分を保持した生きた状態を反映した試料作製法を用いて検討することも必要である。病態モデルとして、細胞内シグナル蛋白と連動すると考えられるグリア細胞における膜骨格蛋白複合体について検討し、膜骨格蛋白を構成する4.1ファミリー蛋白の4.1Gが髄鞘の構造体であるシュミット・ランターマン切痕(SLI)の形態形成に関与し、その遺伝子欠損マウスではシグナル蛋白であるMembrane protein palmitoylated (MPP)6、さらに接着分子Cell adhesion molecule (CADM)4の髄鞘の膜内への輸送による局在化を失うこと、また癌関連蛋白Srcのリン酸化状態が変化することを明らかにした。

さらに、この4.1G-MPP6-CADM4複合体をもつSLIを含む髄鞘に含まれる神経線維の外力を実際に受けたときの形態変化について、血流を保持したまま生きた状態で瞬時に細胞組織を凍結することで生体物質をその位置と分子構造をそのまま保持できる生体内凍結技法を用いて解析した。神経線維は外力に応じて形態を数珠状に変化させたが、それに対抗するようにSLI形態を変化させることが明らかとなり、神経線維での髄鞘のSLIの外力への緩衝機構を直接に可視化することができた。さらに生体内凍結技法を用いて、アルブミンなどの可溶性蛋白も試料作製中に流出や移動をさせずそのまま保持できるために、神経線維内での生体内を反映した正確な局在を明らかにした。以上のように髄鞘の組織構造解析のために最新的手法を用いて新規蛋白の役割を検討し、これらの蛋白の破綻が脱髄疾患の病態モデルになり得ると考えている。

また、この過程で、これらの病変構造体を解析する新しい電子顕微鏡前処理技術「生体内凍結技法」等の開発に成功したと考えている。今後の髄鞘構造への研究応用が期待され、現在応用研究が進行中である。

A. 研究目的

1) 光学顕微鏡および電子顕微鏡による関連蛋白局在の解析

髄鞘を形成する新規蛋白について遺伝子改変マウスを作製し、その形態と機能変化を野生型マウスと光学顕微鏡、電子顕微鏡レベルで比較検討する。神経系では、ヒトでも遅延性に神経疾患が発症することがあるように、マウスの加齢による

経時的変化が想定され、形態および蛋白発現と局在を詳細に検討する。

2) 凍結技法による顕微鏡3次元蛋白複合体解析方の開発

髄鞘を形成する新規蛋白について、シグナル蛋白の接着蛋白などとの相互位置関係について、免疫染色して蛋白分子を同定する。

シグナル蛋白、膜骨格蛋白、膜内接着蛋白が連動した機構が大切と思われるが、生体に本来ある水分を加味した解析法の必要性として、神経線維の運動時における受動的な形態変化について、凍結技法を用いて検討した。この構造蛋白として、伸縮を自在にしながら血管を流れる赤血球にある膜骨格蛋白に着目し、神経線維の伸展をグリア細胞が検知して神経突起を保護している可能性を仮説とした。この伸縮をそのまま保持できる方法は私たちが開発した生体内凍結技法であり、本研究で生体内凍結試料を作製した蛋白局在解析を目的とした。

### 3) 髄鞘形成における構造やシグナルに関わる複合体形成蛋白の探索

髄鞘を形成する新規蛋白を同定し、さらにそれらの蛋白複合体としての連関を解析することを目的とする。そのために免疫沈降法、GST 融合蛋白 Pull-down 法、Two-hybrid 法などの結果に基づき、関連蛋白の候補の発現と結合性を検討し可能性の高いものを絞り込む。

## B. 研究方法

### 1) 髄鞘形成におけるシグナルに関わる複合体形成蛋白の探索

抗体による免疫沈降法、GST 融合蛋白 Pull-down で得られるゲルの質量分析を用いて、最適な条件設定を行い、蛋白同定を試みた。この際、保有する 4.1B および 4.1G 遺伝子欠損マウス試料における複合体形成の比較が有用であった。

### 2) 光学顕微鏡および電子顕微鏡による関連蛋白局在の解析

従来の試料作製法として、麻酔マウスの心臓よりアルデヒド還流固定、坐骨神経や大脳の神経組織を摘出し、後固定後、脱水、包埋して切片を作製した。

### 3) 凍結技法による顕微鏡 3 次元蛋白複合体解析方の開発

上記の蛋白分布について、光学顕微鏡および電子顕微鏡のための包埋法によってその局在を明らかにするとともに、神経組織内における立体構築についても明らかにした。

免疫染色のためには、アルデヒド固定後、蔗糖に入れ、クライオスタットで凍結切片を作製。シグナル蛋白や膜骨格蛋白への抗体、および既知の接着装置蛋白（閉鎖結合：occludin, ZO-1（基底分画と側面分画の境界に局在）；密着結合：カドヘリン、カテニン、さらに種々のイオンチャネルや髄鞘蛋白に対する抗体を用いて、多重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により、免疫蛍光組織像観察をして局在を比較した。

神経線維におけるシグナル蛋白、膜骨格蛋白もしくは膜内貫通蛋白の局在について、生体内凍結技法を用いてした解析。この方法では細胞接着の生体内における状態の空間的に保持した位置での解析に優れる。その理由は、通常の化学固定、アルコール脱水などの試料処理に伴う組織収縮などによる細胞間の位置関係の変化やそれに伴う組織収縮が改善されるためである。

具体的には、麻酔下マウスを開腹、神経系の臓器（脳や坐骨神経）を露出し、血流が維持された組織に液体窒素で冷却したイソペンタン・プロパン混合液（ $-193^{\circ}\text{C}$ ）を直接かけて生体内凍結した。電顕のためには、凍結メス刃による切断を併用した。生体内凍結標本を凍結置換固定し、包埋、切片作製し、光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察した。

### （倫理面への配慮）

動物実験は動物実験規程に従って承認を得て行った。また遺伝子組み換え実験は、遺伝子組み換え実験規程に従って承認を得た。

具体的には、遺伝子組み換えマウス、および解析のための DNA 実験については組換え DNA 実験安全管理規程に基づき、生態系を乱さないための安全対策に留意した。組換え動物の拡散防止措置として、逃亡防止機能を持つ専用ケージおよび扉付き飼育ラック内で飼育、飼育室は出入りにネズミ返しを装着し、常時、閉鎖としている。飼育室