

6. 研究発表

A. 論文発表

1. Gotoh L, Inoue K, Helman G, Mora S, Maski K, Soul JS, Bloom M, Evans SH, Goto Y, Caldovic L, Hobson GM, Vanderver A. GJC2 promoter mutations causing Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Mol Genet Metab*. 2014;111(3):393-8.
2. Morimura T, Numata Y, Nakamura S, Hirano E, Gotoh L, Goto Y, Urushitani M, Inoue K. Attenuation of endoplasmic reticulum stress in Pelizaeus-Merzbacher disease by ar8, anti-malaria drug, chloroquine. *Exp Biol Med*. 2014;239(4):489-501
3. Numata Y, Gotoh L, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi JI, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H, Inoue K. Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies. *J Neurol*. 2014; 261(4):752-8.
4. Kuroiwa-Numasawa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. Involvement of ER stress in dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher disease with PLP1 missense mutations shown by iPSC-derived oligodendrocytes. *StemCellReports* 2014;2:1-14.
5. Yamamoto T, Shimojima K, Umemura A, Uematsu M,

Nakayama T, Inoue K. *SLC16A2* mutations in two Japanese patients with Allan-Herndon-Dudley syndrome. *HumGenVar* 2014;1:14010.

6. 井上 健 それ以外の先天性大脳白質形成不全症 編集 水澤英洋 新領域別症候群シリーズ No.28 「神経症候学 (第2版) III」 日本臨牀社 p876-883. 2014
7. 井上 健 髓鞘低形成 (Pelizaeus-Merzbacher 病) 編集 水澤英洋 新領域別症候群シリーズ No.28 「神経症候学 (第2版) IV」 日本臨牀社 p264-269. 2014

B. 学会発表

1. 井上 健、後藤玲央、Helman G, Mora S, Maski K, Soul JS, Bloom M, Evans SH, 後藤雄一, Caldovic L, Hobson GM, Vanderver A. Pelizaeus-Merzbacher-like病 : GJC2遺伝子の新規プロモーター変異とその分子病態 第56回日本小児神経学会総会、2014年5月29-31日浜松 (アクトシティ浜松)
2. Inoue K, Numata Y, Morimura T, Nakamura S, Goto Y. *PLP1* missense mutations impair subcellular organelle dynamics that impact clinical severity of Pelizaeus-Merzbacher disease. 2014.7.19-24. 20th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience. Hilton Montreal Bonaventure, Montreal, Canada
3. 白川 由佳、泉 仁美、中村 祥子、井上 健、後藤 雄一、稲垣 真澄 bronx waltzerマウス変異遺伝子

- Srrm4の脳内発現とGABAergic interneuronへの影響 第37回神経科学学会大会、2014年9月11-13日横浜（パシフィコ横浜）
4. Inoue K, Ito Y, Inoue N, Inoue YU, Nakamura S, Matsuda Y, Inagaki M, Ohkubo T, Asami J, Terakawa YW, Kohsaka S, Goto Y, Akazawa C, Inoue T. Additive toxicity of *SOX10* mutation underlies a complex neurological phenotype of PCWH 2014.10.18-22. The 64th American Society of Human Genetics Annual Meeting. San Diego Convention Center, San Diego, USA
 5. 井上 健、マンガリイ・プリアンティ、沼田有里佳、中村祥子、守村敏史、佐谷秀行、後藤雄一 *PLP1*点変異の新規分子病態を標的としたドラッグ・リポジショニングによるPelizaeus-Merzbacher病の治療法開発 第59回日本人類遺伝学会、2014年11月19～22日東京（タワーホール船堀）
7. 知的財産権の出願・登録状況
なし

遺伝子重複を標的とした AAV による shRNA 遺伝子治療

業務主任者：岡田尚巳 日本医科大学生化学・分子生物学
研究協力者：岡田浩典 日本医科大学生化学・分子生物学

研究要旨

PLP1 遺伝子重複による過剰発現を標的病態とし、PLP1 特異的 RNAi 機能を発現する AAV ベクターを用いた発現抑制による治療法の確立を目的として検討を進めた。In silico で推定された PLP1 特異的 shRNA より、実際に効果の高い配列を選抜した。AAV ベクターを作製する前段階として、この配列を元に、PLP1 特異的 RNAi 機能発現 AAV ベクタープラスミドを構築した。

A. 研究目的

ペリツェウス・メルツバッハー病 (PMD) は、乳児期に出現する眼振と頭部の振戦を特徴とする X 連鎖劣性の遺伝病である。PLP1 遺伝子の欠失による発現低下または重複による過剰発現のどちらであっても原因となり、中枢神経におけるミエリン形成異常を引き起こす。特に重複が原因として頻度が高く、治療法の開発が急がれている。

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは世界で初めて生物製剤として医薬承認を得たウイルスベクターであり、*in vivo* での高い安全性と遺伝子導入効率を誇る。本研究では、重複により過剰発現している PLP1 遺伝子を RNAi により特異的に抑制する AAV ベクターを用い、適切な範囲の PLP1 発現量に調節する新規治療法の確立を目指す。

B. 研究方法

1) PLP1 遺伝子への RNAi を誘導するために、まずは *in silico* で推定された高精度の siRNA 候補配列データベースより、ヒトおよびマウス PLP1 特異的 siRNA 候補配列を各々

の種において 4 種類選定した。これらを shRNA として発現するプラスミドを、ヒトまたはマウス PLP1 発現プラスミドベクターと共に HeLa 細胞に co-transfection し、24 時間後に RNA を抽出、qPCR にて RNAi 効率を定量した。

2) マウス PLP1 に対する RNAi 効果が認められた siRNA 配列を参考に、AAV ベクターに搭載するためのコンストラクトを設計した。

C. 研究結果

1) ヒト PLP1 特異的 shRNA では 4 種類の候補全てで RNAi を認めたが、特に 3 種類において高い効果を認めた。一方、マウス PLP1 特異的 shRNA の場合には、1 種類で僅かな効果しか確認できなかったが、残り 3 種類において比較的高い RNAi 効果を認めた。

2) CAG プロモーター下に先述の shRNA を参考にした pro-miRNA が 3'UTR に挿入された mRNA が転写される発現カセットを AAV2ITR パッケージングシグナル間に配置したベクタープラスミドを構築した。

D. 考察

PLP1 遺伝子への RNAi 効率が異なるいくつかの miRNA 配列が見つかり、これは AAV ベクターを用いて個体で PLP1 遺伝子の発現抑制を行う際に選択肢となり得る。

E. 結論

PLP1 特異的 RNAi 機能発現 AAV ベクターを作製する準備が完了した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hiromi Hayashita-Kinoh, Naoko Yugeta, Hironori Okada, Yuko Nitahara-Kasahara, Tomoko Chiyo, Takashi Okada and Shin'ichi Takeda: Intra-Amniotic rAAV-Mediated Microdystrophin Gene Transfer Improves Canine X-Linked Muscular Dystrophy and May Induce Immune Tolerance. *Mol Ther. - Nucleic Acids*. [in press]
2. Ohtsuka Y, Kanagawa M, Yu CC, Ito C, Chiyo T, Kobayashi K, Okada T, Takeda S, Toda T: Fukutin is prerequisite to ameliorate muscular dystrophic phenotype by myofiber-selective LARGE expression. *Sci Rep*. 2015 (in press)
3. Sumimasa Arimura, Takashi Okada, Tohru Tezuka, Tomoko Chiyo, Yuko Kasahara, Toshiro Yoshimura, Masakatsu Motomura, Nobuaki Yoshida, David Beeson, Shin'ichi Takeda, Yuji Yamanashi. DOK7 Gene Therapy Benefits Mouse Models

of Diseases Characterized by Defects in the Neuromuscular Junction. *Science*. (in press)

4. Hira R, Ohkubo F, Masamizu Y, Ohkura M, Nakai J, Okada T, and *Matsuzaki M. Reward-timing-dependent bidirectional modulation of cortical microcircuits during optical single-neuron operant conditioning. *Nat Commun* (in press)
 5. Masamizu Y, Tanaka YR, Tanaka YH, Hira R, Ohkubo F, Kitamura K, Isomura Y, Okada T, Matsuzaki M; Two distinct layer-specific dynamics of cortical ensembles during learning of a motor task. *Nat Neurosci*. 17(7):987-94, 2014
 6. Yuko Nitahara-Kasahara, Hiromi Hayashita-Kinoh, Tomoko Chiyo, Akiyo Nishiyama, Hironori Okada, Shin'ichi Takeda and Takashi Okada; Dystrophic mdx mice develop severe cardiac and respiratory dysfunction following genetic ablation of the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Human Molecular Genetics*, 23(15):3990-4000, 2014
 7. Yuko Nitahara-Kasahara, Shin'ichi Takeda and Takashi Okada. Cell therapeutic approaches using multipotent mesenchymal stromal cells for muscular dystrophy. *Inflammation and Regeneration*. (in press)
- ### 2. 学会発表
1. Hironori Okada, Hidetoshi Ishibashi, Hiromi Hayashita-Kinoh,

Tomoko Chiyo, Chiaki Masuda,
Yuko Nitahara-Kasahara, Shin'ichi
Takeda, Takashi Okada. Induction
of Local OPMD Histopathology in

Common Marmoset By rAAV1 and
8-Mediated Transduction. ASGCT
17th Annual Meeting May 21-24,
2014 DC, USA

遺伝子重複を標的とした AAV による shRNA 遺伝子治療

業務主任者：井上 健¹

業務分担者：岡田尚巳²

研究協力者：李コウ¹、岡田浩典²

1 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第二部

2 日本医科大学 生化学・分子生物学(分子遺伝学)

研究要旨

Pelizaesus-Merzbacher 病 (PMD) は proteolipid protein 1 (*PLP1*) 遺伝子の異常が原因で起こる X 連鎖性劣性遺伝疾患である。*PLP1* 遺伝子変異には遺伝子重複、点変異、遺伝子欠失などが存在する。最も頻度が高いのは *PLP1* 遺伝子重複である。*PLP1* 遺伝子のコピー数が増え、正常配列の *PLP1* 遺伝子の発現量が増加することによって、髄鞘形成不全をきたすと考えられる。過剰発現した *PLP1* 蛋白質は細胞内でコレステロールと結合したまま、後期エンドソーム／リソソームに蓄積することが明らかになっており、病態との関連性が示唆されている。*PLP1* 遺伝子量依存的に症状が重症化すること、オリゴデンドロサイトの分化の最終段階でアポトーシスに陥り、神経細胞髄鞘化が障害されることが明らかになっている。そこで、我々はこれまで治療法がない *PLP1* 遺伝子重複変異による PMD に対して、直接病因に作用するような AAV による shRNA 遺伝子治療法の開発を行った。HeLa 細胞を用いた一過性発現培養細胞系で *PLP1* 遺伝子を 80% 以上の効率で発現抑制する shRNA 配列を 3 個確定した。現在、感染実験に用いるウィルスの血清型が構築およびオリゴデンドロサイトへの導入のための血清型決定を実施中である。本研究の成果は、PMD からゲノム病一般の治療法開発に応用可能な技術として期待できる。

1. 研究目的

Pelizaesus-Merzbacher 病 (PMD) は、遺伝的な要因により、生来中枢神経系の髄鞘形成が不完全であるためにおこる先天性大脳白質形成不全症の代表的疾患である。臨床的には、知的面および運動面での重度の発達障害と眼振、痙性対麻痺、筋緊張低下、小脳失調、ジストニア、アテトーゼなどの神経症状を呈する小児の稀少性神経難病である。疾患原因遺伝子 *PLP1* は、中枢神経系の主要な髄鞘膜蛋白質をコー

ドする。最も頻度の高い変異は *PLP1* 遺伝子のゲノム重複で、分子病態はコピー数の増加による過剰発現である。我々は *PLP1* 重複を報告してから、これまでこの小児神経難病の診断や病態の解明に取り組んできた。しかしながら、現在もなぜ品質的には全く問題がない正常な遺伝子量が倍量産生されるだけで、非常に重篤な病態を引き起こすのかは不明であり、有効な治療法も見出されていない。品質上全く問題がない遺伝子産物が過剰にあることが、

小児の脳の発達過程で重要な脳の髄鞘形成を妨げるのであれば、この遺伝子産物の発現を適量に減らしてやることによりこの疾患を治せるのではないか。一見、直接的で簡潔な原理であるが、実際にはこれを生体内で可能にすることは容易ではなく、現在までのところ、動物実験モデルのレベルでもその治療法は確立されていない。そこで我々は、遺伝子の発現を生体内で抑制的に調節する効率的かつ安全な技術を確立し、これを用いて PMD の治療法を開発することを目指す。本研究では *PLP1* 重複変異に対する治療法を開発するために、合アデノ随伴ウイルス (AAV) に組み込んだ *PLP1* 特異的 shRNA を用いた発現抑制による治療法を開発を行う。AAV ベクターは、非病原性ウイルスに由来し、非分裂細胞に効率良く遺伝子導入でき、そのような標的細胞では遺伝子発現が長期間持続することから、遺伝子治療用ベクターとして期待されている。また、適切な血清型の AAV ベクターが標的細胞の種類に応じて用いられる。本研究の研究対象は *PLP1* 重複のモデル動物である *PLP1* トランスジェニックマウスで、脳実質内、脳室内、腹腔内など様々な投与方法について検討し、最も効果的な治療法を探る。この研究成果は、ゲノム病一般の治療法開発に応用可能な技術として期待できる。

2. 研究方法

PLP1 重複による PMD は最も頻度の高いので、特に治療法開発が急務である。*PLP1* 遺伝子重複による過剰発現を標的病態とし、アデノ随伴ウイルス (AAV) に組み込んだ *PLP1* 特異的 shRNA を用いた発現抑制による治療法の確立を目指す。

A. HeLa 細胞系を用いた shRNA の効果確認

HeLa 培養細胞系でマウスおよびヒト *PLP1* ベクターとマウスおよびヒト *PLP1* shRNA ベクターそれぞれを 1:1, 1:4, 1:9 の比率で共トランスフェクションし、24 時間後、強制発現した *PLP1* 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で評価した。

B. アデノ随伴ウイルス (AAV) 合成と精製

多くの shRNA ベクターは、RNA ポリメラーゼ III プロモーターによって転写されるが、生体内での shRNA 強制発現は、時折、細胞がウイルスの攻撃と誤認され、インターフェロン反応を引き起こす。この問題は RNA ポリメラーゼ II によって転写される miRNA には観察されていない。更に、miRNA システムはノックダウン効率が高い、複数のターゲットをノックダウンすることができる、組織特異的発現する等の利点がある。そこで、我々は shRNA 配列を miRNA 型に変換して合成し、ベクターに組み込んだ後に、アデノ随伴ウイルス (AAV) -GFP ベクターに組換える。この AAV ベクターを用いて、AAV の大量精製を実施する。

3. 研究結果

HeLa 細胞を用いた一過性発現培養細胞系でマウスおよびヒトの *PLP1* 遺伝子を 80% 以上の効率で発現抑制する shRNA 配列をそれぞれ 3 個確定した。さらにこれらを RNA ポリメラーゼ II プロモーター下に発現を誘導する miRNA システムに適応させるために、miRNA 型に設計変更した。この配列を合成しクローニングベクターに組み込んだ後に、アデノ随伴ウイルス (AAV)

ベクターに組換えた。この AAV ベクターを用いて、今後 AAV の大量精製を実施する予定である。また、感染実験に用いるウィルスの血清型が構築およびオリゴデンドロサイトへの導入のための血清型決定を実施中である。

4. 考察

PLP1 遺伝子重複を標的とした AAV による shRNA 遺伝子治療プロジェクトは、本年度より開始されたものである。初年度は、今後の研究に用いられる資材の作成を中心に実施された。マウスおよびヒト PLP1 を標的とした shRNA 配列の設計を行い、実施にその効果を HeLa 細胞への PLP1 一過性発現の系を用いて実施した。その結果、高効率にマウスおよびヒト PLP1 の発現を抑制する shRNA 配列を少なくとも 3 種同定することができた。次にこれらを AAV ウィルスに組み込んで発現させるためのカセットの構築を行った。shRNA を高効率に発現させるためには、これまでよく使われて来たシステムは、RNA ポリメラーゼ III によって転写される U6 プロモーター下に shRNA 配列を組み込むものである。しかし、近年より高い発現を可能にするシステムとして、CAG プロモーターを用いた RNA ポリメラーゼ II による転写システムを用いる系が開発されており、今回もこの系を用いることとした。これは GFPcDNA の下流の 3'UTR から siRNA の形で設計した shRNA を発現させるもので、高効率な発現を得ることができるのみならず、用いるプロモーターによって、組織特異的あるいは時期特異的な発現を誘導することも可能である。この特性は、先天性大脳白質形成不全症のように、標的細胞でのみ shRNA を発現させることがメリットになる疾患については、特に副

作用の可能性を減らすという意味で、治療的なメリットが大きいと考えている。例えば、PLP1 プロモーターを用いることにより、オリゴデンドロサイト特異的に shRNA の発現を誘導できる。

実際の治療実験を開始する前に、いくつか解決しなければならない課題が残っている。その 1 つが血清型の決定である。本研究課題では、オリゴデンドロサイトが標的細胞となるため、オリゴデンドロサイトへの感染効率が高い血清型の AAV を選択する必要がある。これまでの知見より、マウス脳への AAV 投与において、オリゴデンドロサイトへの感染効率は AAV8 と AAV9 で比較的高いことが知られている。そこで、我々は今回用いる出生直後のマウスにおいて、この 2 つの血清型について検証することにした。今後、これらの血清型のコントロール AAV を感染させた後に、オリゴデンドロサイトマーカーを用いた免疫染色により、感染効率の検証を実施していく予定である。

5. 結論

中枢神経系の髄鞘の形成不全疾患である PMD を標的とした治療法開発のため、shRNA-AAV を用いた遺伝子発現抑制による PLP1 重複変異の治療の研究を行っている。これまで治療法がない PLP1 遺伝子重複変異による PMD に対して、直接病因に作用するような治療法の開発への糸口を見出すことが可能である。更に、PMD 以外の疾患の治療にも応用できる。ある特定の遺伝子のコピー数の増減という共通の分子病態が基盤となる遺伝性疾患は、近年、ゲノム病という新たな疾患概念でとらえられ、自閉症、ニューロパチー、発達遅滞をはじめ多数の疾患

がある。本研究の成果は、他のゲノム病の治療法としても応用され、多くのゲノム病患者を救うきっかけとなると期待される。

6. 研究発表

A. 論文発表

1. Gotoh L, Inoue K, Helman G, Mora S, Maski K, Soul JS, Bloom M, Evans SH, Goto Y, Caldovic L, Hobson GM, Vanderver A. GJC2 promoter mutations causing Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Mol Genet Metab.* 2014;111(3):393-8.
2. Morimura T, Numata Y, Nakamura S, Hirano E, Gotoh L, Goto Y, Urushitani M, Inoue K. Attenuation of endoplasmic reticulum stress in Pelizaeus-Merzbacher disease by an anti-malaria drug, chloroquine. *Exp Biol Med.* 2014;239(4):489-501
3. Numata Y, Gotoh L, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi JI, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H, Inoue K. Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies. *J Neurol.* 2014; 261(4):752-8.
4. Kuroiwa-Numasawa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. Involvement of ER stress in dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher disease with PLP1 missense mutations shown by

iPSC-derived oligodendrocytes. *StemCellReports* 2014;2:1-14.

5. Yamamoto T, Shimojima K, Umemura A, Uematsu M, Nakayama T, Inoue K. *SLC16A2* mutations in two Japanese patients with Allan-Herndon-Dudley syndrome. *HumGenVar* 2014;1:14010.
6. 井上 健 それ以外の先天性大脳白質形成不全症 編集 水澤英洋 新領域別症候群シリーズ No.28 「神経症候学 (第2版) III」 日本臨牀社 p876-883. 2014
7. 井上 健 髄鞘低形成 (Pelizaeus-Merzbacher 病) 編集 水澤英洋 新領域別症候群シリーズ No.28 「神経症候学 (第2版) IV」 日本臨牀社 p264-269. 2014

B. 学会発表

1. 井上 健、後藤玲央、Helman G, Mora S, Maski K, Soul JS, Bloom M, Evans SH, 後藤雄一, Caldovic L, Hobson GM, Vanderver A. Pelizaeus-Merzbacher-like病 : GJC2遺伝子の新規プロモーター変異とその分子病態 第56回日本小児神経学会総会、2014年5月29-31日浜松 (アクトシティ浜松)
2. Inoue K, Numata Y, Morimura T, Nakamura S, Goto Y. *PLP1* missense mutations impair subcellular organelle dynamics that impact clinical severity of Pelizaeus-Merzbacher disease. 2014.7.19-24. 20th Biennial Meeting of the International Society for Developmental

- Neuroscience. Hilton Montreal Bonaventure, Montreal, Canada
3. 白川 由佳、泉 仁美、中村 祥子、井上 健、後藤 雄一、稲垣 真澄
bronx waltzerマウス変異遺伝子 *Srrm4* の脳内発現と GABAergic interneuron への影響 第37回神経科学会大会、2014年9月11-13日横浜 (パシフィコ横浜)
 4. Inoue K, Ito Y, Inoue N, Inoue YU, Nakamura S, Matsuda Y, Inagaki M, Ohkubo T, Asami J, Terakawa YW, Kohsaka S, Goto Y, Akazawa C, Inoue T. Additive toxicity of *SOX10* mutation underlies a complex neurological phenotype of PCWH 2014.10.18-22. The 64th American Society of Human Genetics Annual Meeting. San Diego Convention Center, San Diego, USA
 5. 井上 健、マンガリイ・プリアンティ、沼田有里佳、中村祥子、守村敏史、佐谷秀行、後藤雄一
*PLP1*点変異の新規分子病態を標的としたドラッグ・リポジショニングによる Pelizaeus-Merzbacher 病の治療法開発 第59回日本人類遺伝学会、2014年11月19~22日東京 (タワーホール船堀)
 7. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

幹細胞移植による髄鞘の再生治療

業務主任者：井上 健¹

業務分担者：小坂 仁²

研究協力者：中村祥子¹、新保裕子³

1 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第二部

2 自治医科大学 小児科

3 神奈川県立こども医療センター

研究要旨

遺伝性大脳白質形成不全症のひとつ、Pelizaeus-Merzbacher 病(PMD) は、PLP1 遺伝子変異を原因として起こる中枢神経系の髄鞘形成不全を特徴とする難治性神経疾患である。オリゴデンドロサイトが成熟できずに脱落するため重篤な症状を示すが、これまでのところ有効な治療法がなく、細胞移植治療に期待が持たれている疾患である。先行研究では移植細胞リソースとしてES 細胞や胎児由来神経幹細胞が用いられており、治療効果が見られることが報告されている。しかしながらこれらの細胞の使用は倫理面での問題が大きく、法令上の制限もあり臨床応用は難しい。そこで本研究ではこれらの問題をクリアでき、さらに移植治療効果に期待が持てる細胞リソースである間葉系幹細胞のひとつ、歯髄幹細胞を用いて細胞移植治療効果の検討を行った。健常者より乳歯由来2株、智歯由来2株の歯髄幹細胞株を樹立し、性状解析を行った。RT-PCR および免疫染色での発現解析により、未分化歯髄幹細胞は間葉系幹細胞のマーカーおよび神経幹細胞マーカーを発現しているが、オリゴデンドロサイト系譜の転写因子は発現していなかった。次に大脳白質形成不全症モデルマウスである MSD マウスや shiverer マウスを用いて移植方法を検討した。これまでの病理解析の結果、未分化歯髄幹細胞は *in vivo* 条件下にて移植後4週以降には Olig2 陽性になっており、このことから、移植された歯髄幹細胞がオリゴデンドロサイト系譜へと分化していることが示唆された。これまでの結果から歯髄幹細胞は髄鞘形成不全さらには脱髄疾患などの治療における有用な移植細胞リソースになりうると思われる。

1. 研究目的

遺伝性大脳白質形成不全症のひとつ、Pelizaeus-Merzbacher 病(PMD) は、

PLP1 遺伝子変異を原因として起こる中枢神経系の髄鞘形成不全を特徴とする難治性神経疾患である。オリゴデン

ドロサイトが成熟できずに脱落するため重篤な症状を示すが、これまでのところ有効な治療法がなく、細胞移植治療に期待が持たれている疾患である。移植された細胞が脱落するオリゴデンドロサイトを補充する、もしくは移植された細胞から分泌される栄養因子によってレシピエントのオリゴデンドロサイト前駆細胞から生み出される成熟型オリゴデンドロサイトの分化、生存が維持されるなどの効果が期待されている。先行研究では移植細胞リソースとしてES 細胞や胎児由来神経幹細胞が用いられており、治療効果が見られることが報告されている。しかしながらこれらの細胞の使用は倫理面での問題が大きく、法令上の制限もあり臨床応用は難しい。また遺伝性大脳白質形成不全症は先天性疾患であるため、患者由来 iPS 細胞も利用が難しい。そこで本研究ではこれらの倫理面での問題をクリアでき、さらに移植治療効果に期待が持てる細胞リソースとして、間葉系幹細胞のひとつである歯髄幹細胞に着目した。歯髄幹細胞は未分化状態で神経幹細胞マーカーを発現しており、神経系に分化しやすいと考えられること、また脊髄損傷モデルラットに移植したところ生体内でオリゴデンドロサイトのマーカーを発現したという報告があるため、この細胞を用い疾患モデルマウスへの細胞移植治療効果の検討を行った。

2. 研究方法

* 歯髄幹細胞株の樹立と性状解析

健常者の智歯および脱落乳歯より歯髄幹細胞を採取し、間葉系幹細胞培養条件下で継代を繰り返して歯髄幹細胞株を樹立した。性状解析は間葉系幹細胞マーカー、神経幹細胞マーカー、神経細胞マーカー、オリゴデンドロサイトマーカー、アストロサイトマーカーなどの発現を免疫染色及びRT-PCR法での遺伝子発現解析で行った。

* 疾患モデルマウスへの細胞移植治療効果の検討

治療効果の高い移植方法を開発するため、未分化歯髄幹細胞を以下の3通りの方法で移植し、移植時期や移植部位による治療効果の検討を行った。

- ① 新生児期(P1~P4) 第三脳室内に移植 MSD マウス使用
- ② 新生児期(P1~P4) 脳梁、海馬采、小脳白質の3部位に移植 免疫不全 shiverer マウス使用
- ③ 幼若期(4~6週齢) 脳梁、海馬采、小脳白質の3部位に移植 免疫不全 shiverer マウス使用

研究開発当初は免疫不全疾患モデルマウスラインができていなかったため、①に関しては毎日免疫抑制剤シクロスポリンを移植個体に経口投与する方法で移植実験を行った。移植細胞は $5 \times 10^4/\text{ml}$ で1か所1~2 ml移植を行った。移植に用いる歯髄幹細胞は継代数8~10継代までのものを使用した。移植後3週、4週、6週、8週後にサンプリングを行い、病理解析を行った。移植細胞はヒト核抗体による免疫染色で識別し、生着率の良さを検討した。また移植された細胞がオリゴデンドロ

サイト系譜へ分化しているかどうかはオリゴデンドロサイトへ分化する初期段階で発現する転写因子 Olig2 の免疫染色で判断した。

3. 研究結果

* 歯髄幹細胞株の樹立と性状解析

私たちが樹立した歯髄幹細胞株も、既報告と同様、間葉系幹細胞マーカー (CD29, Vimentin) 及び神経幹細胞マーカー (CD90, Nestin) を発現していた。造血幹細胞マーカー (CD34) は発現していなかった。神経幹細胞から分化しうる、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトのそれぞれについて発現解析を行うと、神経細胞マーカーとしては幼若神経細胞マーカー Tuj1 は発現していたが、成熟神経細胞マーカー NeuN は発現していなかった。アストロサイトマーカーとしては Vimentin は発現していたが、GFAP は発現していなかった。オリゴデンドロサイトの分化・成熟に必須の転写因子群 Olig1, Olig2, Sox10, Nkx2.2 についてはどの転写因子も発現していないことが分かった。

歯髄幹細胞を規定する遺伝子発現についてはいまだ議論が多いが、多くのグループで報告されているように、私たちが樹立した歯髄幹細胞でも間葉系幹細胞マーカー及び神経幹細胞マーカーが同時に発現し、造血幹細胞マーカーは発現していないことが観察された。
* 疾患モデルマウスへの細胞移植治療効果の検討

① 新生児期 (P1~P4) 第三脳室内に移植

移植後 3 週後でも脳室内に異所性の細胞塊が存在しており、脳実質への移植細胞の浸潤は観察されなかった。そのため、この移植方法は不適切と判断した。

② 新生児期 (P1~P4) 脳梁、海馬采、小脳白質の 3 部位に移植

移植後 3 週では Olig2 が一部の細胞で、移植後 4 週以降は移植細胞のすべてで Olig2 陽性になっていた。未分化歯髄幹細胞は Olig2 陰性であることから、移植後生体内でオリゴデンドロサイト系譜へと分化していくことが示唆された。しかしながら、新生児では頭部の保定が非常に困難なため、移植実験の再現性が低く、移植細胞の生着率も低かった。また母マウスによる食殺の頻度も高く、実験遂行に困難が多かったため、移植時期を幼若期マウスに切り替え、治療効果の検討を行った。

③ 幼若期 (4~6 週齢) 脳梁、海馬采、小脳白質の 3 部位に移植

移植時期を新生児から幼若期に変更することで、生着率や移植細胞の分化のスピードが変わることも懸念されたが、この方法でも移植後 4 週以降で移植細胞のほぼすべてが Olig2 陽性になっていた。このことから、生体内で未分化歯髄幹細胞がオリゴデンドロサイト系譜に分化するのに必要な時間は移植時期にはあまり影響を受けないと考えられる。また、幼若期マウスを用いることで頭部保定が容易になり、移植技術が安定し、移植細胞の生着率も向上し

た。現在は成熟型オリゴデンドロサイトへ分化しているのか、髄鞘形成が行われているのか、などを詳細に検討中である。

4. 考察

私たちが樹立した歯髄幹細胞株でも既報告同様、間葉系幹細胞マーカー及び神経幹細胞マーカーが同時に発現し、造血幹細胞マーカーは発現していないことが観察された。

ヒト歯髄幹細胞を用いた細胞移植治療法開発の基盤研究として、疾患モデルマウスを用い、移植時期、移植部位の検討を行った。疾患モデルマウスの寿命の長さや、本疾患が新生児期から症状を呈することを鑑み、まずは新生児マウスでの細胞移植方法の確立を目指したが、移植技術の確立は困難であった。そのため、移植時期を幼若期マウスに変更し、まずは移植された未分化歯髄幹細胞がオリゴデンドロサイトに分化しうるかどうかを検証した。その結果、移植後4週以降、移植細胞はほぼすべてOlig2陽性になっており、オリゴデンドロサイト系譜へ分化していることが示唆された。成熟型オリゴデンドロサイトへ分化しているのか、髄鞘形成が行われているのか、などは現在詳細に検討中である。幼若期マウスへの細胞移植は新生児期での移植と比較すると移植細胞の生着率は高いが、疾患モデルマウスの振戦の表現型の改善はなかなか見られていない。今後はより治療効果の高い移植方法の開発として、オリゴデンドロサイト系譜へ分

化誘導をかけた歯髄幹細胞を用いるなどの方法も検討したいと考えている。

5. 結論

ヒト歯髄幹細胞が先天性大脳白質形成不全症の細胞移植治療のリソースとして利用できるかどうか、疾患モデルマウスへの移植実験をもとに検証中である。これまで得られた結果より、移植された未分化歯髄幹細胞のほぼすべてが移植後4週以降は生体内でオリゴデンドロサイト系譜へ分化していることが示唆され、細胞移植治療のリソースとして有用であると期待される。

6. 研究発表

A. 論文発表

1. Gotoh L, Inoue K, Helman G, Mora S, Maski K, Soul JS, Bloom M, Evans SH, Goto Y, Caldovic L, Hobson GM, Vanderver A. GJC2 promoter mutations causing Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Mol Genet Metab.* 2014;111(3):393-8.
2. Morimura T, Numata Y, Nakamura S, Hirano E, Gotoh L, Goto Y, Urushitani M, Inoue K. Attenuation of endoplasmic reticulum stress in Pelizaeus-Merzbacher disease by an anti-malaria drug, chloroquine. *Exp Biol Med.* 2014;239(4):489-501
3. Numata Y, Gotoh L, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi JI, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H, Inoue K. Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating

- leukodystrophies. *J Neurol.* 2014; 261(4):752-8.
4. Kuroiwa-Numasawa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. Involvement of ER stress in dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher disease with PLP1 missense mutations shown by iPSC-derived oligodendrocytes. *StemCellReports* 2014;2:1-14.
 5. Yamamoto T, Shimojima K, Umemura A, Uematsu M, Nakayama T, Inoue K. *SLC16A2* mutations in two Japanese patients with Allan-Herndon-Dudley syndrome. *HumGenVar* 2014;1:14010.
 6. 井上 健 それ以外の先天性大脳白質形成不全症 編集 水澤英洋 新領域別症候群シリーズ No.28 「神経症候学 (第2版) III」 日本臨牀社 p876-883. 2014
 7. 井上 健 髄鞘低形成 (Pelizaeus-Merzbacher 病) 編集 水澤英洋 新領域別症候群シリーズ No.28 「神経症候学 (第2版) IV」 日本臨牀社 p264-269. 2014
- B. 学会発表
1. 井上 健、後藤玲央、Helman G, Mora S, Maski K, Soul JS, Bloom M, Evans SH, 後藤雄一, Caldovic L, Hobson GM, Vanderver A. Pelizaeus-Merzbacher-like病 : GJC2遺伝子の新規プロモーター変異とその分子病態 第56回日本小児神経学会 総会、2014年5月29-31日浜松 (アクトシティ浜松)
 2. Inoue K, Numata Y, Morimura T, Nakamura S, Goto Y. *PLP1* missense mutations impair subcellular organelle dynamics that impact clinical severity of Pelizaeus-Merzbacher disease. 2014.7.19-24. 20th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience. Hilton Montreal Bonaventure, Montreal, Canada
 3. 白川 由佳、泉 仁美、中村 祥子、井上 健、後藤 雄一、稲垣 真澄 bronx waltzerマウス変異遺伝子 *Srrm4* の脳内発現と GABAergic interneuronへの影響 第37回神経科学学会大会、2014年9月11-13日横浜 (パシフィコ横浜)
 4. Inoue K, Ito Y, Inoue N, Inoue YU, Nakamura S, Matsuda Y, Inagaki M, Ohkubo T, Asami J, Terakawa YW, Kohsaka S, Goto Y, Akazawa C, Inoue T. Additive toxicity of *SOX10* mutation underlies a complex neurological phenotype of PCWH 2014.10.18-22. The 64th American Society of Human Genetics Annual Meeting. San Diego Convention Center, San Diego, USA
 5. 井上 健、マンガリイ・プリアンティ、沼田有里佳、中村祥子、守村敏史、佐谷秀行、後藤雄一 *PLP1*点変異の新規分子病態を標的としたドラッグ・リポジショニングによるPelizaeus-Merzbacher病の治療法開発 第59回日本人類遺伝学会、2014年11月19~22日東京 (タワーホール船堀)

7. 健康危険情報
特記事項無し

8. 知的財産権の出願・登録状況
なし

臨床応用に向けた治療評価尺度の作成と実効性の検証

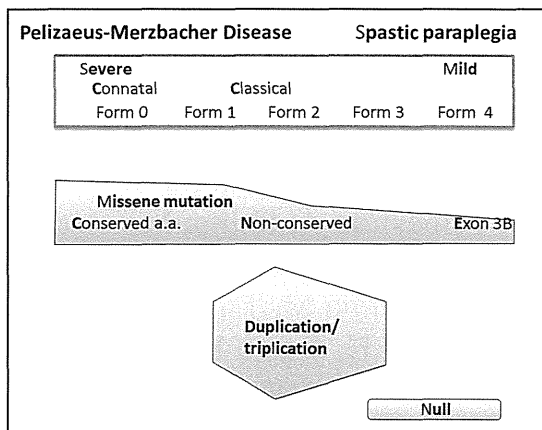
業務主任者 小坂 仁 自治医科大学小児科
業務分担者 出口貴美子 慶應義塾大学解剖学
研究協力者 青木志保 自治医科大学小児科

研究要旨

先天性大脳白質形成不全症に対する臨床試験の治療効果評価のために自然歴を考慮した評価尺度の確立をめざした。H26年度は、既存の神経疾患評価尺度を参考にし、遺伝性髄鞘形成不全群の中核疾患である Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) の患者で臨床評価尺度の臨床的妥当性の評価を、患者会の協力を得ておこなった。Gross Motor Function Measure、The Newcastle Paediatric Mitochondrial Disease Scale (Section 1, 3)、Barry-Albright Dystonia Scale、PMD functional disability scoring はいずれも重症度を反映した評価を短時間で行うことが可能であったが、The Newcastle Paediatric Mitochondrial Disease Scale (Section 2)は、評価法として適切ではないと考えられた。

A. 研究目的

先天性大脳白質形成不全症の治療効果を適切に判定するには、効果判定のための尺度および自然歴との比較が必要である。2013年に Pelizaeus-Merzbacher 病の新たな臨床重症度尺度として functional disability scoring (FDS) system が提唱された (Lukka, et al, 2013)。この尺度の妥当性を従来から、用いられている臨床評価尺度と比較することにより評価することを目的とした。



図, Pelizaeus-Merzbacher 病の重症度分類

B. 研究の方法

小児期の運動発達評価法としては、主として、脳性麻痺の児童の粗大運動能力を経時的に測定

するものとして、Gross Motor Function Measure; GMFM (Russel et al,1993)が汎用され、腹臥位と寝返りでの評価 17 項目 (満点 51 点)、座位での評価 20 項目 (満点 60 点)、四つ這いと膝立ちでの評価 14 項目 (満点 42 点)、立位での評価 13 項目 (満点 39 点)、歩行、走行とジャンプ 24 項目 (満点 72 点) からなる。またミトコンドリア病患者の臨床評価として、用いられている The Newcastle Paediatric Mitochondrial Disease Scale; NPMDS (Phoenix, et al, 2006) は、Section 1 では視覚、聴覚、コミュ

ニケーション、食事方法、自立度、移動、学業の7項目からなり、異常なしの0点から最大21点となる、Section 2ではsystem specific involvementとして、けいれん、脳症、梗塞様発作、腸管、内分泌系、呼吸器系、心血管系、腎、肝、血管系の10項目からなり、異常なし；0点、から最重症30点までとなる、Section 1、2では評価者は、介護者である。Section 3は、医師による評価となり、成長、発達、視力、眼球運動、筋症、失調、錐体路、錐体外路、末梢神経障害の評価からなり、異常なしの0点から最重症31点となる。主として全身の筋緊張亢進を評価するBarry-Albright Dystonia Scaleではジストニアの程度を0；なし～4；重症に分け、部位として眼、口、頸部、体幹、上肢、下肢で評価し、異常なしの0点から最重症24点となる。また最近PMDの評価尺度として、提唱されたFDSでは、学校、会話、食事、着替え、排泄、書字、座位、歩行、呼吸からなり、最重症が0点である。PMD家族会のセミナーの歳家族の協力を経て、2家族に参加して頂き、小児神経科医2名（小坂、出口）で2014年11月3日の患者会セミナーに合わせておこなった。

C. 研究結果（表1）

症例1, (Connatal type, Form 0;図)
現在6歳6ヶ月男児。40W3200gで出生し、新生児一過性多呼吸で酸素を一時的に使用した。新生児聴力スクリーニングで難聴を指摘された。哺乳不足が初発症状で、6ヶ月で診断に至っている。未だ定額のない最重症のPMD児。Proteolipid protein 遺伝子、PLP1に、c.757 T > A, p.Ser253Thr変異を有する。

症例2, (Classical type, Form 1;図1)

現在5歳1ヶ月男児。38W2389gで狭骨盤の為帝王切開で出生した。3ヶ月の時保健婦が眼振に気づき、1歳で診断に至っている。PLP1 遺伝子の3重複をもつ。頸定はあるが座位獲得ができない、

古典型の経過である。

Individual	Case 1	Case 2
Age, sex	6y6m	5y1m
genotype	c.757 T > A (p.Ser253Thr)	triplication
NPMDS; Sec.1	14	12
Sec. 2	0	0
Sec. 3	23	17
Barry-Albright	13	3
GMFM	0	27
PMDFDS ²	3	6

表 症例の評価結果

D. 考察

それぞれの評価方法においても重症度を反映した、結果を得たが、NPMDS, Section 2 は双方の症例において、加点がなく、評価としては重症度が反映されていなかった。

E. 結論

今回用いた評価方法は、NPMDS, Section 2を除き、PMDの重症度を反映していた。評価に要する時間は合計で20分程度であり、外来で通常診療として、使用可能な評価尺度と考えられた。NPMDS, Section 2は今回の最重症、重症症例で異常なし、と判定されており、PMDの評価法としては適切で無いと思われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Ogata K, Matsumoto

- N, Miyake N. A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link? *Hum Genet* 2014 ; 133 : 225-34
2. Okabe T, Aida N, Niwa T, Nozawa K, Shibasaki J, Osaka H. Early magnetic resonance detection of cortical necrosis and acute network injury associated with neonatal and infantile cerebral infarction. *Pediatr Radiol*. 2014; 53; 448-58
 3. Akiyama T, Osaka H, Shimbo H, Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endoh F, Yoshinaga H. A Japanese Adult Case of Guanidinoacetate Methyltransferase Deficiency. *JIMD Rep*. 2014 ; 12 : 65-9
 4. Wada T, Haddad MR, Yi L, Murakami T, Sasaki A, Shimbo H, Kodama H, Osaka H, Kaler SG. A Novel Two-Nucleotide Deletion in the ATP7A Gene Associated With Delayed Infantile Onset of Menkes Disease. *Pediatr Neurol*. 2014; 50: 417-20
 5. Shimbo H, Takagi M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Aida N, Osaka H. A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. *Mol Genet Metab Report*, 2014; 1:133–138.
 6. Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H. A Three-Year-Old Boy With Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Presenting With Episodic Ataxia. *Pediatr Neurol*. 2014 Jan;50(1):99-100.
 7. Nakashima M, Takano K, Osaka H, Aida N, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Causative novel PNKP mutations and concomitant PCDH15 mutations in a patient with microcephaly with early-onset seizures and developmental delay syndrome and hearing loss. *J Hum Genet*. 2014 Aug;59(8):471-4.
 8. Miyatake S, Osaka H, Shiina M, Sasaki M, Takanashi J, Haginoya K, Wada T, Morimoto M, Ando N, Ikuta Y, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Ogata K, Matsumoto N, Saitsu H. Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies. *Neurology*. 2014 Jun 17;82(24):2230-7.
 9. Kouga T, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Yamakawa K, Osaka H. Effect of CYP2C19 polymorphisms on stiripentol administration in Japanese cases of Dravet syndrome. *Brain Dev*. 2014 May 9.
 10. Kato M, Saitsu H, Murakami Y, Kikuchi K, Watanabe S, Iai M, Miya K, Matsuura R, Takayama R, Ohba C, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hamano S, Osaka H, Hayasaka K, Kinoshita T, Matsumoto N.

- PIGA mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. *Neurology*. 2014 May 6;82(18):1587-96.
11. van de Kamp J, Errami A, Howidi M, Anselm I, Winter S, Phalin-Roque J, Osaka H, van Dooren S, Mancini G, Steinberg S, Salomons G. Genotype-phenotype correlation of contiguous gene deletions of SLC6A8, BCAP31 and ABCD1. *Clin Genet* 2014 Mar 5. doi: 10.1111/cge.12355. [Epub ahead of print]
 12. Numata Y, Gotoh L, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi J, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H, Inoue K. Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies. *J Neurol*. 2014 Apr;261(4):752-8.
 13. Nakamura K, Osaka H, Murakami Y, Anzai R, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kinoshita T, Matsumoto N, Saitsu H. PIGO mutations in intractable epilepsy and severe developmental delay with mild elevation of alkaline phosphatase levels. *Epilepsia*. 2014 Feb;55(2):e13-7.
 14. Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. Involvement of ER Stress in Dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1 Missense Mutations Shown by iPSC-Derived Oligodendrocytes. *Stem Cell Reports*. 2014 Apr 24;2(5):648-61.
 15. Tamaura M, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, Osaka H. Seizure recurrence following pyridoxine withdrawal in a patient with pyridoxine-dependent epilepsy. *Brain Dev*. 2014 Aug 7. pii: S0387-7604(14)00185-5. doi: 10.1016/j.braindev.2014.07.008. [Epub ahead of print]
 16. Kodera H, Osaka H, Iai M, Aida N, Yamashita A, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Mutations in the glutamyl-tRNA synthetase gene cause early-onset epileptic encephalopathy. *J Hum Genet*. 2014 Dec 4. doi:10.1038/jhg.2014.103. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25471517.
 17. Takano K, Tsuyusaki Y, Sato M, Takagi M, Anzai R, Okuda M, Iai M, Yamashita S, Okabe T, Aida N, Tsurusaki Y, Saitsu H, Matsumoto N, Osaka H. A Japanese girl with an early-infantile onset vanishing white matter disease resembling Creeleukoencephalopathy. *Brain Dev*. 2014 Oct 27. pii: S0387-7604(14)00250-2. doi:10.1016/j.braindev.2014.10.002. [Epub ahead of print]
 18. Niwa T, Aida N, Osaka H, Wada