

令和元年6月24日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04595

研究課題名(和文) ミエリン変性疾患解明に向けたミエリンとニューロンの新たな相互関係の解明

研究課題名(英文) Analyses of new relationship between myelin and neurons for elucidation of myelin degenerative disease

研究代表者

桑村 充 (Kuwamura, Mitsuru)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：20244668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：dmyラットではミエリ病変が形成されるよりもかなり以前からTRMラットの原因遺伝子であるAspartoacylase(Aspa)遺伝子およびASPA蛋白の発現低下が見られることが明らかとなった。Aspa遺伝子がオリゴデンドロサイトの機能異常のマーカーとなることが示唆された。dmyラットでは、Tribbles homolog 3 (Trib3)が顕著な発現上昇を示し、dmyラットのミエリン障害における酸化ストレスや小胞体ストレスの関与が示唆された。Aspaノックアウトラットでは、ミエリンの水腫状変化が認められ、アストロサイトの機能障害とオリゴデンドロサイトの分化異常が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数のミエリン疾患モデルラットの病態比較から、Aspa遺伝子の発現がオリゴデンドロサイトの機能を評価する指標として優れていること、Trib3がミエリン障害における酸化ストレスや小胞体ストレスの指標となり得ることを示した。難治性疾患のミエリン病変の病理発生を検討する上で、興味深い知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Prior to the myelin destruction at 7-8 weeks, disrupted expression of Aspa mRNA and ASPA protein undergoes from early stage of myelinogenesis. The ASPA protein is localized to oligodendrocytes, suggesting that the Aspa gene serves as a marker for oligodendrocyte dysfunction. In addition, detailed pathological analysis suggested that both mutants might have oligodendrocyte differentiation, maturation and dysfunction. In dmy rats, Tribbles homolog 3 (Trib3) showed a marked increase in expression, suggesting the involvement of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in myelin injury in dmy rats. Pathological analysis of newly established Aspa knockout rats was carried out, and in Aspa knockout rats, edema-like changes of myelin were observed, suggesting astrocyte dysfunction and oligodendrocyte differentiation abnormalities.

研究分野：獣医病理学

キーワード：オリゴデンドロサイト ミエリン モデル動物 多発性硬化症 脱髄

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系のミエリン(髄鞘)は、神経の刺激伝導における絶縁体として働いているが、遺伝子異常、自己免疫、薬物、ウイルスなどの様々な原因によって障害され、ミエリンの低形成や消失(脱髄)が引き起こされる。ヒトの代表的なミエリン疾患である多発性硬化症は、北ヨーロッパでは10万人に50~100人の罹患率、日本でも10万人に8~9人の罹患率と推測されており、厚生労働省の難病指定を受けている。多発性硬化症は再発と寛解を繰り返し、障害を受けたミエリンはある程度再生していることが知られているが、最終的に完全なミエリン修復には至らない。多発性硬化症の直接的な原因は自己免疫性疾患と考えられているが、治療のためにはミエリンの変性をいかに防御し、再生能力をいかに引き出すかが重要であり、ミエリン異常を示す動物モデルはミエリンの形成、維持、再生を研究するうえで極めて重要なツールとなる。

#### 2. 研究の目的

中枢神経系のミエリン(髄鞘)の代表的な疾患である多発性硬化症は、厚生労働省の難病指定を受けており、その克服にはミエリンの変性と再生をどうコントロールするのが課題である。いずれのミュータントも、原因遺伝子は神経細胞を中心に発現しており、その発現異常がどのようにミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトを障害するのかわからない。本研究は、これらのミエリン疾患動物の神経細胞とミエリンの相互関係に注目し、健全なミエリンを保つためには神経細胞のどの機能が必要なかを解明し、ミエリン疾患の治療戦略を構築することを目的とした。

#### 3. 研究の方法

##### (1)dmy ラットと TRM ラットの病態比較

dmy ラットはミトコンドリアのマグネシウムチャンネルである MRS2 遺伝子の変異により発症する。カナバン病は中枢神経の白質変性症の一つであり、原因遺伝子 aspartoacylase(Aspa)の変異により引き起こされる。TRM ラットは自然発症カナバン病モデルである。dmy ラットおよび TRM ラットの病態を比較検討することにより、ミエリン崩壊のメカニズムの詳細を解明することを目的とした。

##### (2)dmy ラットにおける Trib3 の異常発現上昇

マイクロアレイ解析によって、dmy ラットの病変進展時に伴って Tribbles homolog 3 (Trib3)が発現上昇することを見いだした。リアルタイム PCR 法、免疫組織化学 およびウエスタンブロッティング法を用いて、dmy ラットの病態進展における Trib3 の発現動態を調べた。

##### (3)VF ラットの原因遺伝子 Dopey1 の機能解析

Dopey1 欠損によるミエリン変性モデル VF ラットの詳細な病態解析および DOPEY1 蛋白の機能解析を行った。VF ラットの病態解析: 10 週齢の VF ホモ型発症ラット 3 匹、野生型対照ラット 6 匹を 4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定後、パラフィン包埋し、組織切片を作製した。作製した切片に対してオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)マーカー Pdgfra (血小板由来成長因子受容体)mRNA に対する in situ hybridization を行い、Pdgfra 陽性細胞数をカウントした。DOPEY1 蛋白の機能解析: 野生型対照ラットの脳ライセートから、共免疫沈降法により DOPEY1 蛋白複合体を精製した。SDS 化した DOPEY1 蛋白複合体に対して Western blot 法と銀染色を行った。銀染色で検出されたバンドを細切して LC/MS 解析を行い、DOPEY1 蛋白と相互作用する蛋白の同定を行った。同定された蛋白に対する逆共免疫沈降法を行った。

##### (4)TRM ラットと Aspa ノックアウトラットの病態解析

TRM ラットと新たなカナバン病モデルとして期待されている Aspa ノックアウト(AspaKO)ラットを用いて、中枢神経のシンプルな白質である視神経に着目し、病態解明を行った。4, 8, 12 週齢の AspaKO ラットのホモ型および対照ラット(野生型)の視神経を採材し、組織学的評価および透過型電子顕微鏡観察を行った。また、視神経のパラフィン切片に対して各種グリア細胞に対する免疫組織化学染色(PDGFR $\alpha$ , Olig2, GFAP)を行った。また PLP, MBP などのミエリン関連蛋白や GFAP, AQP4 に対する RT-PCR を行い、ミエリン関連蛋白に対するウエスタンブロッティング(WB)を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1)dmy ラットと TRM ラットの病態比較

dmy ラットでは脊髄腹索を中心にミエリンの崩壊が観察され、TRM ラットでは脊髄白質において腫大した軸索が認められた。TRM ラットでは対照ラットと比較して、NF-H の染色性に大きな違いは認められなかったが、dmy ラットの脊髄腹索、側索では NF -H

が凝集している軸索が認められた。これらのことから、両ミュータントラットで軸索の機能障害がおこっていることが示唆された。TRM ラットでは対照ラットと比較して、GLUT1 の染色性に大きな変化は認められなかったが、dmy ラットの脊髄腹索、側索では腫大したオリゴデンドロサイトで GLUT1 の発現上昇が認められた。これらの結果から、両ミュータントラットで細胞内のエネルギー産生異常に関連するオリゴデンドロサイトの機能的な変化が起こっていることが示唆された。TRM ラットでは対照ラットと比較して Olig2 および Nkx2.2 の染色性に差は認められなかったが、7, 8 週齢の dmy ラットの脊髄腹索において Nkx2.2 強陽性 OPC が有意に減少した。dmy ラットでは対照ラットと比較して、オリゴデンドロサイトの PLP mRNA の発現が減弱しており、TRM ラットでは PLP 陽性の突起の伸長が悪く、未熟な形態をしたオリゴデンドロサイトが多数認められた。以上より、両ミュータントラットではオリゴデンドロサイトの分化・成熟・機能異常が生じていることが示された。

さらに、dmy ラットではミエリ病変が形成されるよりもかなり以前から TRM ラットの原因遺伝子である Aspartoacylase(*Aspa*)遺伝子および ASPA 蛋白の発現低下が見られることが明らかとなった。ASPA 蛋白はオリゴデンドロサイトに局在しており、*Aspa* 遺伝子がオリゴデンドロサイトの機能異常のマーカーとなることが示唆された。これらの成果を Brain Res 誌に発表した。

#### (2)dmy ラットにおける Trib3 の異常発現上昇

リアルタイム PCR 法、免疫組織化学 およびウエスタンブロッティング法によって、Trib3 およびその蛋白 TRB3 は dmy ラットにおいて顕著な発現上昇を示すが、他のミエリンミュータントである mv ラットおよび VF ラットでは発現変動を示さないことを明らかにし、Trib3 は病変が顕著となるよりも初期に発現 上昇すること、主に神経細胞とオリゴデンドロサイトにおいて発現することを明らかにした。以上の結果より、dmy ラットは酸化ストレスや小胞体ストレスを受けており、それらのストレスにより Trib3 の発現が上昇した可能性が示唆された。これらの成果を PLoS One 誌に発表した。

#### (3)VF ラットの原因遺伝子 Dopey1 の機能解析

VF ラットの原因遺伝子 Dopey1 の機能を明らかにする目的で、全身諸臓器における Dopey1 の発現を RT-PCR 法にて検討したところ、Dopey1 発現 は中枢神経系に加えて、幾つかの実質臓器においても発現しており、その役割が注目された。

脊髄 Pdgfra 陽性 OPC 数は、野生型対照ラットと比較して VF ホモ型発症ラットで、増加傾向にあった。DOPEY1 蛋白と複合体を形成している蛋白として Fibromodulin や ADP-ribosylation factor-like protein 2 (ARL2) を候補蛋白として実験を進めている。

#### (4)TRM ラットと Aspa ノックアウトラットの病態解析

カナバン病モデル Aspa ノックアウトラットの病態解析を行った。ホモ型の大脳、小脳、脊髄といった中枢神経系の広範囲で空胞形成が認められた。ホモ型ラットでは脊髄全体のミクログリアと脊髄灰白質のアストロサイトの活性化がみられ、脊髄全体で未熟オリゴデンドロサイトの増加および成熟オリゴデンドロサイトの減少も認められた。透過型電子顕微鏡では、脊髄の白質および灰白質の軸索内でミトコンドリアの腫大や増数、軸索の水腫、ミエリンの離解が認められた。白質の水腫状となった軸索内に、電子密度の高い糸くず状およびドーナツ状の異常な構造物も散見された。

4 週齢の AspaKO ラットで空胞形成が、透過型電子顕微鏡ではミエリンの水腫状変化がみられ、ミエリン形成障害が示唆された。4 週齢の AspaKO ラットでは野生型 対照ラットと比べ、PDGFR $\alpha$  (オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー) 陽性細胞数が有意に増加し、8 週齢では減少傾向にあった。Olig2 (オリゴデンドロサイトマーカー) 陽性細胞 数も同様の所見が観察された。また、4, 8 週齢で GFAP (アストロサイトマーカー) の染色性の低下がみられた。RT-PCR では、8 週齢の AspaKO ラットで MBP (ミエリン塩基性蛋白質) と GFAP の mRNA 発現が有意に減少し、WB では 4 週齢の AspaKO ラットで MBP 蛋白の有意な減少、4, 8 週齢で GFAP 蛋白の有意な減少がみられた。以上より、AspaKO ラットの視神経では、ヒトのカナバン病と同様に空胞病変とミエリンの水腫状変化が認められ、アストロサイト機能障害、オリゴデンドロサイトの分化異常が示唆された。

Shimotsuma Y, Tanaka M, Izawa T, Yamate J, Kuwamura M  
Enhanced Expression of Trib3 during the Development of Myelin Breakdown in dmy  
Myelin Mutant Rats.  
PLoS One 11(12)e0168250, 2016

Kuwamura M, Tanimura S, Hasegawa Y, Hoshiai R, Moriyama Y, Tanaka M,  
Takenaka S, Nagayoshi H, Izawa T, Yamate J, Kuramoto T, Serikawa T  
Downregulation of aspartoacylase during the progression of myelin breakdown in the  
dmy mutant rat with mitochondrial magnesium channel MRS2 defect  
Brain Research (in press)

Konishi S, Tanaka N, Mashimo T, Yamamoto T, Sakuma T, Kaneko T, Tanaka M,  
Izawa T, Yamate J, Kuwamura M  
Pathological characteristics of Ccdc85c knockout rats: a rat model of genetic  
hydrocephalus  
Exp Anim (in press)

〔学会発表〕(計5件)

Kuwamura M, Tanimura S, Tanaka M, Izawa T, Kuramoto T, Yamate J  
Histological and ultrastructural studies on the Canavan disease model rat  
Combined Annual Meeting of ACVP, ASVCP and STP (国際学会)  
2015年10月17日～2015年10月21日ミネアポリスコンベンションセンター, ミネア  
ポリス, 米国

谷村聡美, 田中美有, 竹中重雄, 井澤武史, 庫本高志, 山手丈至, 桑村 充  
ミエリン異常ミュータントラットの病態比較  
第128回関西実験動物研究会 2015年12月 京都大学楽友会館, 京都市

星合里香, 井澤武史, 山手丈至, 西谷あい, 田中美有, 庫本高志, 桑村 充  
カナバン病モデル Aspa ノックアウトラットの病態解析  
第136回関西実験動物研究会 2017年12月 京都大学楽友会館, 京都市

安井 彩, 田中美有, 竹中重雄, 井澤武史, 山手丈至, 桑村 充  
遺伝性ミエリン変性モデル VF ラットの病態および 原因遺伝子 Dopey1 の機能解析  
第136回関西実験動物研究会 2017年 京都大学楽友会館, 京都市

森山裕至, 井澤武史, 庫本高志, 山手丈至, 桑村 充  
カナバン病モデル AspaKO ラットの視神経の病態解析  
第6回日本獣医病理学専門家協会学術集会 2019年3月 府中市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/path/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：井澤 武史  
ローマ字氏名：Izawa Takeshi  
所属研究機関名：大阪府立大学  
部局名：生命環境科学研究科  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：20580369

研究分担者氏名：山手 丈至  
ローマ字氏名：Yamate Jyoji  
所属研究機関名：大阪府立大学  
部局名：生命環境科学研究科  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：50150115

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：庫本高志  
ローマ字氏名：Kuramoto Takashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。