

令和元年5月21日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09982

研究課題名(和文)ミトコンドリア関連新規髄鞘化障害遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of mitochondrial related novel myelinating disorder gene

研究代表者

植松 貢(Uematsu, Mitsugu)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：90400316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低分子RNAのミトコンドリア内への輸送に関与する新規候補遺伝子PNPT1が中枢神経系に及ぼす影響について病態解析を行った。Direct reprogramming法を用いて神経細胞に直接分化させたところ、PNPT1遺伝子異常を持つ髄鞘化障害症例ではコントロールに比して症例の神経細胞は早期にアポトーシスを起こす生存率の低下を認めることを見出した。さらに、野生型ラット由来の脊髄後根神経節の初代培養系においてPNPT1遺伝子をノックダウンしたところ、髄鞘化が著明に遅延することが確認された。確立したこの実験系を用いて、さらなる解析と治療薬スクリーニングを行うことが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低分子RNAのミトコンドリア内への輸送に関与するPNPT1遺伝子の異常による中枢神経障害の解析は、低分子RNAが先天性髄鞘化障害に関与するメカニズムを解明する鍵である。本研究により、低分子RNAがミトコンドリアへ輸送されることが髄鞘化の機序に必須であることを明らかとなり、さらに今回確立した実験系を用いて、今後治療薬のスクリーニングを行うなどの応用も可能となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the pathophysiology of the central nervous system of the novel candidate gene PNPT1, which is involved in the transport of small RNAs into mitochondria. Direct differentiation into neurons using the "Direct reprogramming" method found that in the case of myelination disorder cases with PNPT1 gene abnormality, the neurons in the cases show a decrease in survival rate that causes apoptosis earlier than in the control. Furthermore, knockdown of the PNPT1 gene in the primary culture system of dorsal root ganglia from wild-type rats confirmed that myelination was significantly delayed. Using this established experimental system, it became possible to conduct further analysis and therapeutic drug screening.

研究分野：小児神経学

キーワード：ミトコンドリア 髄鞘化 線維芽細胞 ラット アポトーシス Direct reprogramming

## 1. 研究開始当初の背景

先天性髄鞘化障害(先天性大脳白質形成不全症)は精神運動発達障害や痙性麻痺など多彩な臨床症状を呈する疾患で、頭部 MRI の T2 強調画像で低髄鞘化を示唆するびまん性高信号を認める。その原因は proteolipid protein1(PLP1)遺伝子異常(Pelizaeus-Merzbacher 病)が最も多いとされているが(Numata et al. J Neurol.2014;261:752-58)、多くの髄鞘化障害の原因は未だ不明である。申請者は平成 19 年度よりシークエンス法と MLPA 法を用いて、平成 22 年度からは CGH アレイ法を加え、さらに平成 25 年度からは次世代シークエンサーによる解析を行って、全国から収集した先天性髄鞘化障害 29 例の解析を行ってきた。その結果、29 例中 19 例(65.5%)で遺伝学的異常を同定し得た。PLP1 遺伝子異常 3 例、18q-症候群 3 例が最も多かった(Uematsu et al. Hum Genet. 135:89-98, 2016)。エクソームシークエンスによる解析の結果、姉弟例において常染色体上の新規髄鞘化障害原因遺伝子 PNPT1 を同定した。姉弟とも重度の精神運動発達遅滞を認め、頭部 MRI にて T2 強調画像のびまん性白質高信号を確認した。ミスセンス変異は父由来、ナンセンス変異は母由来の複合ヘテロ接合変異であり、健常の同胞では変異を認めなかったことから常染色体劣性遺伝と考えられた。原因不明の他の髄鞘化障害患者 35 名において、PNPT1 遺伝子の変異スクリーニングを施行したが変異は認めなかった。症例の皮膚線維芽細胞から抽出した蛋白を用いたウエスタンブロットでは、PNPT1 遺伝子がコードする蛋白の発現低下を認め、病的変異が示唆された。PNPT1 遺伝子は核由来の低分子 RNA (RNaseP RNA, MRP RNA, 5S rRNA, tRNAs) をミトコンドリア内へ輸送する PNPase をコードしている。同じ先天性髄鞘化障害の原因遺伝子として報告された POLR3A および POLR3B 遺伝子は、低分子 RNA の転写を担う RNA polymerase III をコードしており、低分子 RNA の減少が髄鞘化障害の発症に関連すると考えられている(Saito et al. Am J Hum Genet.2011;89:644-651)。しかし低分子 RNA が髄鞘化障害に関与する機序は未だ明らかでない。

## 2. 研究の目的

今回の研究は、低分子 RNA のミトコンドリア内への輸送に関与する新規遺伝子 PNPT1 が中枢神経系に及ぼす影響について、症例の線維芽細胞やラット、マウスなどを用いた病態解析を行い、治療薬について検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 症例の線維芽細胞を用いた解析

近年報告された Direct reprogramming 法 (Xue et al. Cell 2013) を用いて、線維芽細胞から神経細胞に直接分化させ、神経細胞体や神経突起の伸長の異常の有無や神経細胞の細胞生存率の低下について検討する。

### 2) ラット後根神経節を用いた髄鞘化培養モデルによる機能解析

野生型ラットの脊髄後根神経節の培養細胞を用いた髄鞘化培養モデル(Fan et al. J. Neurochem.2015)において、PNPT1 や POLR3B などをレンチウイルスを用いてノックダウンし、形態学的解析及び神経細胞やオリゴデンドロサイトのマーカー蛋白質の異常について、免疫組織化学的手法及びウエスタンブロットを用いた生化学的手法等を用いて検討する。

### 3) ノックアウトマウスのオリゴデンドロサイト前駆細胞を用いた解析

当研究室で作成した PNPT1 遺伝子のノックアウトマウスを用いてオリゴデンドロサイト前駆細胞の初代培養を作成し、成熟に伴って発現が変化するマーカー蛋白(MBP, PLP, Oligo2)を、免疫組織科学的な手法及びウエスタンブロットを用いた生化学的手法を用いて解析する。

### 4) 神経細胞、オリゴデンドロサイトにおけるミトコンドリア病治療薬の効果の検討

本学で開発したミトコンドリア病治療薬 MA-5 が PNPT1 遺伝子異常を有する神経細胞やオリゴデンドロサイトにおいて生存率を上昇させるか、そして髄鞘化を促進する作用を有するかについて検討する。さらに、他の試薬や成分についても、食品ライブラリー等を用いたスクリーニングを行って検討し、治療薬の候補を見出す。

## 4. 研究成果

### 1) 症例の線維芽細胞を用いた解析

PNPT1 遺伝子異常を持つ髄鞘化障害症例およびコントロールの線維芽細胞を用いて、Direct reprogramming 法を用いて神経細胞に直接分化させる系を確立することに成功した(図 1)。その結果、分化させた細胞はコントロールに比して PNPT1 遺伝子変異を持つ症例の神経細胞が早期に細胞死に至ることが判明した。抗 cleaved caspase3 抗体による染色を行ったところ、PNPT1 遺伝子異常を有する症例の神経細胞体で陽性であり、細胞死の原因はアポトーシスであることが確認された(図 2)。

図 1

Direct reprogramming法による線維芽細胞から神経細胞への分化

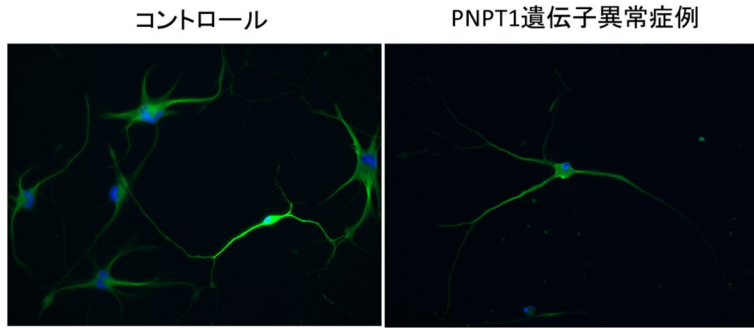
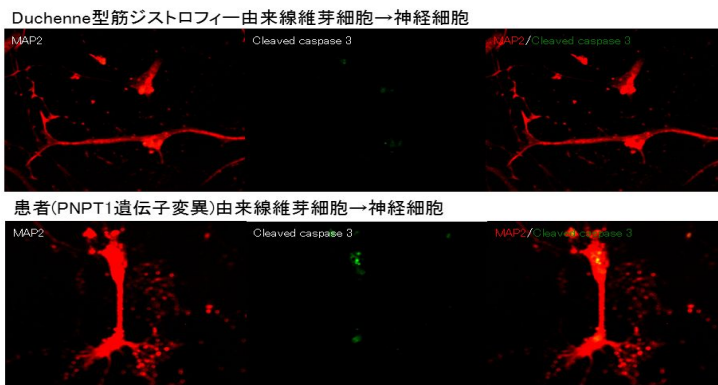


図 2

PNPT1遺伝子変異を有する患者由来の神経細胞は抗cleaved caspase3抗体陽性



神経細胞の細胞死が誘導されている可能性がある。

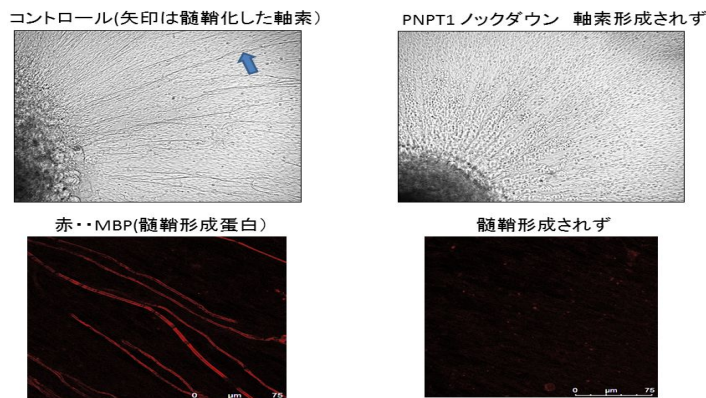
この PNPT1 変異神経細胞における早期アポトーシスの機序について、neuron の各種マーカーやアポトーシス関連蛋白の解析を行って、アポトーシスを起こす神経細胞の種類や動いているカスケードを同定することを目指したが、分化した PNPT1 遺伝子変異神経細胞は不安定であり、さらに培養条件などの検討が必要と考えられた。

2) ラット後根神経節を用いた髄鞘化培養モデルによる機能解析

野生型ラット由来の脊髄後根神経節の初代培養を行い、in vivo で末梢神経の髄鞘化を再現することに成功した。この培養系において PNPT1 遺伝子や髄鞘化に関連する PLP1 遺伝子、POLR3B 遺伝子をレンチウイルスを用いてノックダウンして培養を行った。その結果、コントロールに比して PLP1 遺伝子のノックダウンでは髄鞘化形成が低下し、POLR3B のノックダウンでは髄鞘化がごくわずかであり、PNPT1 遺伝子のノックダウンでは全く髄鞘化が見られないことが確認された (図 3)

図 3

末梢神経髄鞘化培養モデルノックダウン実験



本年度確立した上記 1), 2) の 2 つの実験系を用いて、PNPT1 遺伝子異常が髄鞘化障害に与える影響について、今後免疫組織科学的な手法及びウエスタンブロットを用いた生化学的手法を用いた解析を行い、治療薬スクリーニングを行っていく予定である

### 3) ノックアウトマウスのオリゴデンドロサイト前駆細胞を用いた解析

当科で作成した PNPT1 遺伝子のノックアウトマウスはほぼ胎内致死であった。そこで Crisper/Cas9 法を用いて症例のミスセンス変異の導入を試みたが、変異遺伝子の配列の問題で作成困難であり、ノックアウトマウスを用いたオリゴデンドロサイト前駆細胞の解析は困難であった。また、野生型マウスのオリゴデンドロサイトを初代培養して PNPT1 遺伝子のノックダウンを行う系の確立を目指したが、培養の条件設定がまだ不十分な状態である。

### 4) 神経細胞、オリゴデンドロサイトにおけるミトコンドリア病治療薬の効果の検討

1) で確立した症例の線維芽細胞を神経細胞に分化する系を用いて、酸化ストレス物質の測定と、MA-5 (抗酸化ストレス新規薬) によるアポトーシスのレスキューの可能性、さらに食品ライブラリー等を用いたスクリーニングを行う予定であったが、線維芽細胞から分化誘導した神経細胞が早期にアポトーシスを起こしてしまいそのままでは解析困難であった。今後培養方法やノックダウンの方法など、さらに条件検討を行って治療薬の検討を行う予定である。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

1 . Sato R, Arai-Ichinoi N, Kikuchi A, Matsunashi T, Numata-Uematsu Y, Uematsu M, Fujii Y, Murayama K, Ohtake A, Abe T, Kure S. Novel biallelic mutations in the PNPT1 gene encoding a mitochondrial-RNA-import protein PNPase cause delayed myelination. Clin Genet. 93: 242-7, 2018

2 . Arai-Ichinoi N, Uematsu M, Sato R, Suzuki T, Kudo H, Kikuchi A, Hino-Fukuyo N, Matsumoto M, Igarashi K, Haginoya K, Kure S. Genetic heterogeneity in 26 infants with a hypomyelinating leukodystrophy. Hum Genet. 135: 89-98, 2016

### 〔学会発表〕(計 1 件)

**植松 有里佳**, **植松 貢**, 佐藤 亮, 井上 健, 呉 繁夫

線維芽細胞から神経細胞への direct conversion による疾患原因遺伝子変異の機能解析  
第 60 回日本小児神経学会学術集会、2018 年

### 〔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

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：植松 有里佳（沼田）

ローマ字氏名： Yurika Numata-Uematsu

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：特任助手

研究者番号（8桁）：70735779

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。