

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16237

研究課題名(和文) Pelizaeus-Merzbacher病治療薬の簡便なスクリーニング法の開発

研究課題名(英文) Simple screening method for Pelizaeus-Merzbacher disease drug

研究代表者

植松 有里佳(沼田)(Numata-Uematsu, Yurika)

東北大学・大学病院・特任助手

研究者番号：70735779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：先天性大脳白質形成不全症の中で最も頻度の高いPelizaeus-Merzbacher病(PMD)は、PLP1遺伝子変異により発症する難治性の疾患であり、未だに有効な治療法はない。本研究では、PLP1遺伝子点変異に伴う最重症型のPMDに対する培養モデルの構築を試みたが、安定した構築はできなかつたため、PLP1遺伝子の機能喪失変異によって生じる軽症型PMDの症状に合致する末梢神経の髄鞘化障害をきたす培養モデルを作成し、この培養モデルに関して形態学的な観察を行い、髄鞘形成が障害されていることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PMDは、先天性大脳白質形成不全症の中で最多の疾患であり、難治に経過する疾患であることから、本症例における治療法開発が望まれる。本研究においては、最重症型を示すPMDの治療法開発には至らなかつたものの、PLP1遺伝子の機能喪失変異によって生じる軽症型PMDの症状に合致する末梢神経の髄鞘化障害をきたす培養モデルを作成し、この培養モデルに関して形態学的な観察を行い、髄鞘形成が障害されていることを確認した。今後、軽症型PMDにおける治療応用により、社会に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD), which is the most common congenital cerebral white matter deficiency, is a refractory disease caused by a mutation in the PLP1 gene, and there is still no effective treatment. In this study, we attempted to construct a culture model for the most severe form of PMD associated with a PLP1 gene point mutation, but we could not construct a stable model. We made a culture model that causes the myelination of nerves, and morphologically observed this culture model to confirm that the myelination was impaired.

研究分野：小児神経学

キーワード：大脳白質形成不全症 髄鞘化障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Pelizaeus-Merzbacher 病(PMD)は、PLP1 遺伝子変異により発症する、最も頻度の高い先天性大脳白質形成不全症である(Numata Y et al, J Neurol 2014)。PLP1 は、中枢神経系の髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの主要な膜蛋白質で、4 回膜貫通型の構造をとり、髄鞘形成や軸索の維持に重要な働きを示す。そのため PMD では、先天的に大脳の髄鞘化が障害され、臨床症状としては、生直後からの眼振で発症し、幼児期には低緊張を呈するものの次第に痙性四肢麻痺を呈する最重症型から、痙性対麻痺のみを呈する軽症型まで非常に幅が広いことが知られている(Inoue K. Neurogenetics 2005)。重症型を示す PLP1 遺伝子点変異の病態としては、小胞体ストレスにより、オリゴデンドロサイトのアポトーシスが生じることが知られており、小胞体ストレスを抑制することが、オリゴデンドロサイトのアポトーシスを抑制し、症状を改善すると考えられている。小胞体ストレスを抑制する候補化合物として、変異 PLP1 遺伝子の HeLa 細胞での一過性強制発現系において、15 種類の化合物を同定しているが、従来までの報告から、PMD 治療薬としての真の有用性を検討するためには、実際に PLP1 が発現、機能するオリゴデンドロサイトでの効果を検証する必要がある。

2. 研究の目的

中枢神経の髄鞘化が障害される PLP1 遺伝子点変異による重症型 PMD は、小胞体ストレスを抑制することが、病態を改善し、髄鞘化を促進できることが、モデルマウスでは明らかにされているが、ヒトへの有効な治療法は未だ見つかっていない。本研究では、研究者がこれまでの研究から見出した、小胞体ストレスを改善させる可能性のある食品由来の 15 種類の化合物を用いて、PLP1 遺伝子点変異による PMD の細胞内病態を改善し、髄鞘化を誘導することができるかを明らかにすることを目的とする。この化合物のスクリーニングに用いる培養系として、本研究では、オリゴデンドロサイトの初代培養系を用いて、これらの化合物の小胞体ストレスの抑制効果を検討することにより、PMD の治療薬の簡便なスクリーニング方法を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

- (1) 従来から用いられてきたマウスの胎児由来のオリゴデンドロサイトの初代培養系を用いて、この培養系で PMD の病態を再現するために、レンチウイルスベクターを用いて変異体 PLP1 を導入することにより、重症型 PMD の疾患培養モデルを作成する。
- (2) 確立した髄鞘化培養モデルにおいて、小胞体ストレスが生じているか、またオリゴデンドロサイトの分化が障害されているかということ、小胞体ストレス関連マーカー遺伝子の発現やアポトーシスの発生状況について確認する。
- (3) 疾患培養モデルに、候補となる化合物 15 種類を添加し、小胞体ストレスの軽減やアポトーシスの抑制が得られる薬剤を選出する。

4. 研究成果

(1) PLP1 遺伝子点変異を導入したオリゴデンドロサイト初代培養系の確立
既に確立しているオリゴデンドロサイトの初代培養系は、胎生 14 日目のマウスの大脳半球を用いる。この培養系で PMD の病態を再現するために、レンチウイルスベクターを用いて変異体 PLP1 の導入を行った。用いる点変異は、マウスでもヒトでも最重症型の PMD の原因となる変異である PLP1A243V 変異を用いた。しかし、レンチウイルスを導入すると、細胞が培養しているプレートから剥離してしまい、安定的に培養系を維持することが困難であった。PLP1A243V 変異の細胞毒性の強さなども影響することも考え、比較的軽症の変異である PLP1W163L 変異や PLP1I187T 変異でも行ったが、やはり細胞が剥離した。プレートやプレートのコート剤の検討も行ったが、培養維持が困難であり、ウイルス導入により、オリゴデンドロサイトの培養系を維持することが困難である状況が予想された。

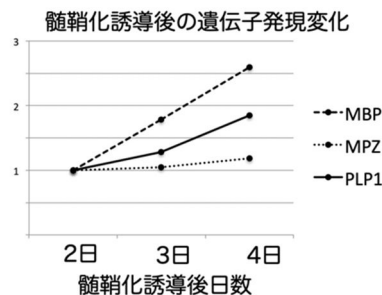
当初予定していた重症型 PMD の疾患培養モデルの作成は非常に困難な状況があったため、

PLP1 遺伝子の機能喪失変異による軽症型 PMD の疾患培養モデルの作成を試みることにした。

PMD は、前述の通り痙性四肢麻痺を呈する最重症型から、痙性対麻痺のみを呈する軽症型まで非常に幅が広いことが知られている。重症例では、中枢神経系のオリゴデンドロサイトの機能障害、細胞死が生じる一方、PLP1 遺伝子の機能喪失変異で生じる軽症型 PMD は、痙性対麻痺を呈し、PLP1 が機能しないものの不完全な形で髄鞘自体は形成されることから、軽症になることが知られている。さらに、この軽症型 PMD では、点変異では認められない末梢神経障害を引き起こすことが知られている。PMD は中枢神経系の髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの膜タンパク質である PLP1 の遺伝子変異が原因であるが、末梢神経系の髄鞘を形成するシュワン細胞は、PLP1 の発現は極めて少ないとされていることから、PLP1 遺伝子の機能喪失変異による軽症型 PMD で、もともと PLP1 が発現していない末梢神経になぜ障害を合併するのかは明らかにされていない。

(2)軽症型 PMD の疾患培養モデルの構築および、PLP1 遺伝子の発現変化の検討

上記の通り、末梢神経の髄鞘化を担うシュワン細胞においては、PLP1 遺伝子の発現は、極めて低いということが知られているので、既に確立している末梢神経髄鞘化培養モデルにおいて PLP1 遺伝子の変化についての検討をまず行った。すると、髄鞘化を誘導して初期の段階では、他の髄鞘関連遺伝子と同様に発現の上昇が認められることが確認された。



髄鞘化培養モデルでアスコルビン酸投与により髄鞘化を誘導後2日目を基準としたMBP、MPZ、PLP1遺伝子の遺伝子発現変化

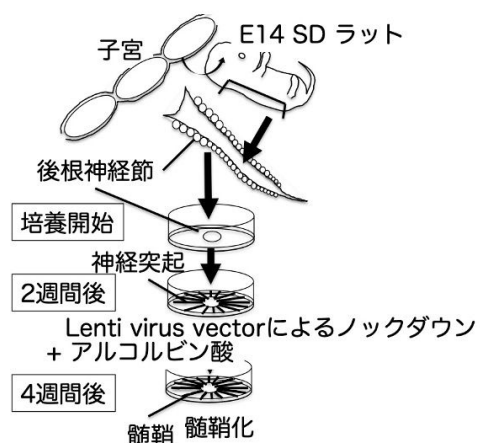
従来から、末梢神経の髄鞘を形成するシュワン細胞では、PLP1 遺伝子の発現は極めて低いということが知られていたが、この結果からは、髄鞘の発生初期の段階では、PLP1 遺伝子の発現が末梢神経の髄鞘化に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。さらに、この培養モデルにおいて、PLP1 遺伝子をノックダウンすることにより、PLP1 遺伝子の機能喪失変異に伴う病態を再現できる可能性があると考えた。

(3)軽症型 PMD の培養モデルにおける末梢神経髄鞘化障害の評価

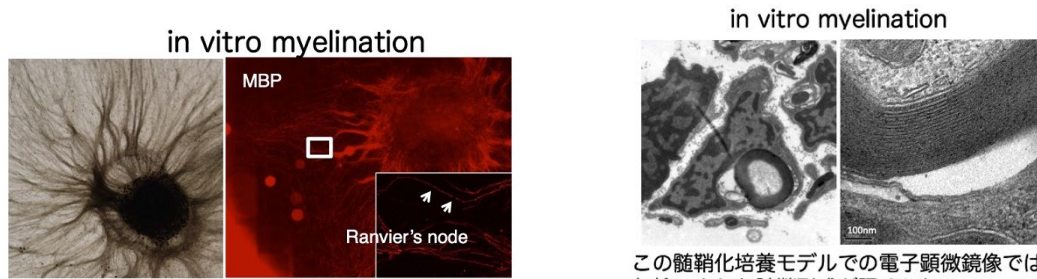
既に確立している胎生 14 日目のラットの胎児を用いた、後根神経節の explant culture を作成した。この培養系は、アスコルビン酸を投与して髄鞘化を誘導することができる。この末梢神経の髄鞘化培養モデルを用いて、アスコルビン酸添加により髄鞘化を誘導する直前に PLP1 遺伝子をレンチウイルスを用いてノックダウンし、アスコルビン酸を添加して末梢神経の髄鞘化を誘導した。

末梢神経の髄鞘化の評価については、免疫組織学的手法を用いて、検討を行った。

まず、コントロールでは、以下のように成熟した髄鞘に局在するミエリン塩基性蛋白(myelin

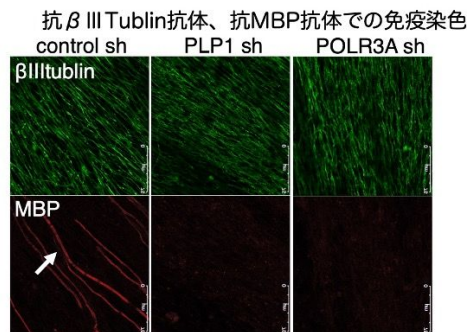


basic protein; MBP)抗体が陽性となり、成熟した髄鞘が形成されていることが確認された。さらに、この培養モデルを電子顕微鏡を用いて詳細に観察したところ、軸索に髄鞘が巻きついている様子が観察され、ラットの座骨神経とほぼ同様の形態をとっていることが観察されている。



この髄鞘化培養モデルでの電子顕微鏡像では、年輪のような髄鞘形成が認められる。

PLP1 遺伝子をノックダウンし、コントロールと同様に抗 MBP 抗体を用いて、免疫組織化学的に解析したところ、抗 MBP 抗体 の染色性が消失していることが観察された。



抗 β III Tubulin抗体、抗MBP抗体での免疫染色
control sh PLP1 sh POLR3A sh
PLP1遺伝子、POLR3A遺伝子のノックダウンした髄鞘化培養モデルの免疫組織化学では、 β III Tubulin抗体(神経軸索マーカー)は染色されるが、コントロールで認められるMBP抗体(成熟髄鞘マーカー)での染色性が消失している。

さらに、PMD 以外の先天性大脳白質形成不全症で末梢神経障害が合併することが知られている、POLR 関連白質異常症の原因遺伝子である、POLR3A 遺伝子をノックダウンして、抗 MBP 抗体の染色性について確認したところ、上記の通り染色性が消失しており、髄鞘化が障害されている可能性が示唆された。さらに、電子顕微鏡を用いて形態学的な詳細な検討が必要と思われ、今後行なっていく予定である。PLP1 遺伝子の機能喪失変異だけでなく、POLR3A 遺伝子の機能喪失でも、髄鞘化障害が再現できたことは、近年遺伝子解析技術の進歩に伴って、末梢神経障害の原因となる新規疾患原因遺伝子として同定される多くの疾患原因遺伝子の病態解析に応用が可能である可能性が示唆された。また、PLP1 遺伝子が末梢神経の発生過程で重要な意味を持つ可能性が示唆された。

(4) 軽症型 PMD の治療薬スクリーニング

(3)で示した通り、軽症型 PMD においては、病態が完全には明らかにされておらず、末梢神経障害がなぜ引き起こされるのかも分かっていない。末梢神経の髄鞘化を誘導する薬剤としては、アスコルビン酸が知られており、先天的に末梢神経の髄鞘化の障害をきたす Charcot-Marie-Tooth 病のモデルマウスでは、髄鞘化が促進されることが報告されている。アスコルビン酸は、強い抗酸化剤であり、近年、コエンザイム Q10、ビタミン E、レチノイドといった抗酸化作用を有する薬剤が髄鞘化を誘導し、末梢神経障害に対する治療効果があることが報告されている (Hyung et al. Sci Rep.2015;5:15122)。このことから、今後は、上記抗酸化剤を候補として、(3)で障害されている MBP の染色性が改善される薬剤を選出していくことを目指したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 植松有里佳、植松貢、佐藤亮、井上健、呉繁夫
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植松有里佳、植松貢、井上健、呉繁夫
2. 発表標題 先天性大脳白質形成不全症における末梢神経障害の病態解明
3. 学会等名 第61回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	井上 健 (Inoue Ken) (30392418)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第二部・室長 (82611)	