

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08313

研究課題名(和文) クラッペ病モデルマウスのオリゴデンドロサイトで見られる発達異常の分子病態解析

研究課題名(英文) Molecular pathology of developing oligodendrocyte in a mouse model of Krabbe disease.

研究代表者

榎戸 靖 (Enokido, Yasushi)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・細胞病態研究部・室長

研究者番号：90263326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：クラッペ病(KD)はガラクトシルセラミダーゼの欠損により乳幼児期に脱髄を発症するライソゾーム病の一つである。患者の多くは生後6ヶ月以内に重度の運動発達異常を発症し、早期に死亡するが、その治療法は未だ確立されていない。今回、KDの脱髄を惹起する病態メカニズムの解明とその治療応用を目指し解析を行なった。本研究により、KDの病因の一つとされるオリゴデンドロサイトの細胞障害にmiR-219の機能不全が深く関わることを示された。また、オリゴデンドロサイトにおけるサイコシン産生酵素として、ASAHI1の関与が示唆された。miR-219を標的とするKDの新たな治療戦略の発展が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クラッペ病の主徴とされるオリゴデンドロサイトの変性脱落ならびに細胞内サイコシン産生経路の分子メカニズムは、これまで大きな謎とされてきた。本研究で明らかとなった「クラッペ病におけるmiR-219の機能不全とその病態改善効果」は、本疾患の発症機構の理解にとどまらず、オリゴデンドロサイトの分化・成熟異常を伴う他の小児脱髄疾患や神経発達障害の新たな治療法開発にもつながる可能性を持つことから、本研究成果は学術的独自性と創造性の双方を備えたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Krabbe disease (KD) is an inherited demyelinating disease caused by the deficiency of galactosylceramidase activity. Most of the patients are characterized by early-onset cerebral demyelination with oligodendrocyte (OL) death.

By using twitcher mice, an authentic mouse model of KD, we have demonstrated that KD OLs exhibit cell-autonomous developmental defects and undergo apoptotic death associated with the aberrant accumulation of endogenous psychosine. In the present study, we further investigated the role of miR-219 in the cellular pathogenesis of twitcher mouse OLs. We found that expression and functional activity of miR-219 were repressed in developing twitcher mouse OLs. We also found that exogenously supplemented miR-219 rescued their developmental defects and apoptotic death. miR-219 also reduced endogenous accumulation of psychosine in twitcher OLs.

Our findings provide new insights into the role of miR-219 for the treatment of OL pathologies in KD.

研究分野：Molecular neuropathology

キーワード：クラッペ病 オリゴデンドロサイト ミエリン 脱髄 マイクロRNA ライソゾーム病 脂質異常症 miR-219

### 1. 研究開始当初の背景

クラッペ病 (KD) は、グロバイド細胞白質ジストロフィーとも呼ばれ、ガラクトシルセラミド分解酵素 (GALC) の欠損によって乳幼児期に脱髄を発症するライソゾーム病の一つである。患者の多くは生後 6 ヶ月以内に重度の運動発達異常を呈し、その後早期に死亡するが、未だ治療法は確立していない。

現在まで、KD に関する最も有力な病態仮説として、半世紀ほど前に提唱された「サイコシン仮説」が知られる。本仮説は、『GALC 欠損により、細胞毒性を持つサイコシン (ガラクトシルセラミドのリゾ体) が髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイト (OL) 内に蓄積し、それらの細胞死ならびに脱髄を惹起する』との考えに基づくものである。しかし、KD の OL における「細胞障害メカニズム」ならびに「サイコシン産生経路」には、今尚明らかでない点が多い (図 1 ; Miyatake & Suzuki *BBRC* 1972; Igisu & Suzuki *Science* 1984)。こうした問題の背景には、「KD の

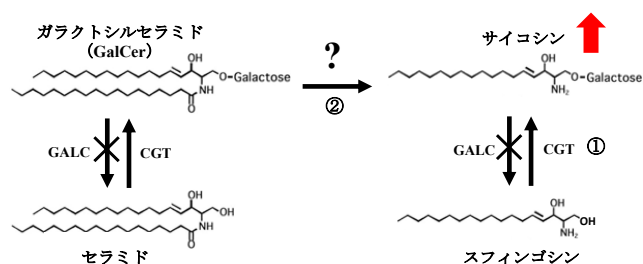


図 1. KD におけるサイコシンの産生・分解経路

GALC欠損 (×印) により、その基質であるサイコシンが蓄積する (GalCerは蓄積しない)。サイコシンの産生経路として、① CGTによってスフィンゴシンから産生される経路、及び② 未知の酵素 (ASAHI?) によってGalCerから産生される経路、の2つが想定されている。

OL で惹起される病態を生化学的、細胞生物学的に解析するための優れた *in vitro* の実験系が存在しなかった」ことが大きな要因の一つであった。また、細胞死や脱髄に先立ち、発達過程の KD の OL 内でどのような病態変化が生じているかは、これまで殆ど解析されていなかった。

そこで我々は、本研究課題の開始に先立ち、KD の疾患モデルマウスである Twitcher マウス (twi マウス) の脳から単離した OL 前駆細胞 (OPC) の初代培養系を確立し、それらが細胞死に至るまでの病変を *in vitro* で再現した。これにより、KD マウスの OL では、(i) 経時的な内因性サイコシンの蓄積 (図 2)、(ii) 細胞自律的な発達異常と細胞死、(iii) OL の分化成熟に必要な Akt/mTOR シグナルの活性低下、が見られることを見出した (Inamura et al., *Neurobiol Dis* 2018)。

### 2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に明らかにした上記成果の発展を目的として、(i) KD マウス OL における分子病態メカニズム、及びそれらを改善するための治療標的の同定、(ii) KD マウス OL における未知のサイコシン産生経路の探索、について解析をおこなった。

### 3. 研究の方法

研究開始に先立ち、既に我々は、OL の正の分化制御因子として働くマイクロ RNA である、miR-219 (Dugas et al., *Neuron* 2010; Wang et al., *Dev Cell* 2017) が、培養下の KD マウス OL で有意に発現低下していることを明らかにしていた。また近年、脱髄疾患の創薬ターゲットとしてのマイクロ RNA への関心が高まっていることから (Emery, *Science* 2010; Junker et al., *Nat Rev Neurol* 2011)、KD への病態関与ならびに治療標的分子としての miR-219 の可能性について検討することにした。まず始めに、マウス脳組織を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法により、正常及び KD マウス脳内の miR-219 発現分布を解析した。次に、初代培養した KD マウス OL を用い、レポーターアッセイによる miR-219 の細胞内活性、及びそれらの細胞障害に対する miR-219 のレスキュー効果を調べた。また、miR-219 によって KD マウス OL 内のサイコシンの異常蓄積が

改善するか、細胞ならびに脳組織レベルで解析した。

#### 4. 研究成果

正常ならびに KD マウス脳組織内の miR-219 発現を *in situ* ハイブリダイゼーションとリアルタイム PCR で調べた。その結果、miR-219 を発現する OL の細胞数ならびに細胞あたりの miR-219 含量が KD マウスで顕著に減少していた

(図 2; Inamura et al., *Brain Pathol* 2021)。また、KD マウス OL では、miR-219 の活性ならびに標的遺伝

子 (Sox10 や PDGFR $\alpha$ ) の mRNA に対する発現抑制効果の低下が見られた (未発表データ)。さらに、KD マウス OL で惹起される分化成熟異常ならびに細胞死に対する miR-219 の効果を調べたところ、顕著な病態改善効果が観察された (図 3; Inamura et al., *Brain Pathol* 2021)。

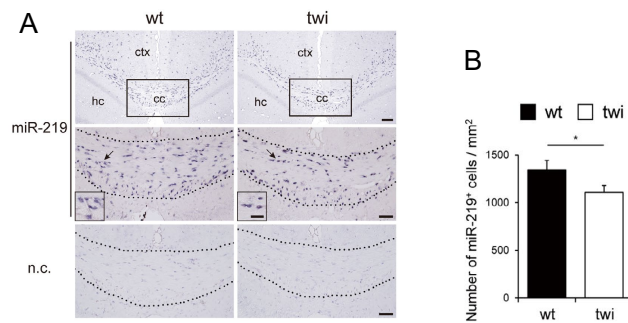


図 2 KD モデルマウス (twi) 脳でみられる miR-219 陽性 OL の減少 (A) 正常 (左) ならびに KD (右) マウス脳梁における miR-219 陽性 OL (黒) に対する *in situ* ハイブリダイゼーションとその数の比較 (B)。Inamura et al., *Brain Pathol* (2021) から改変。

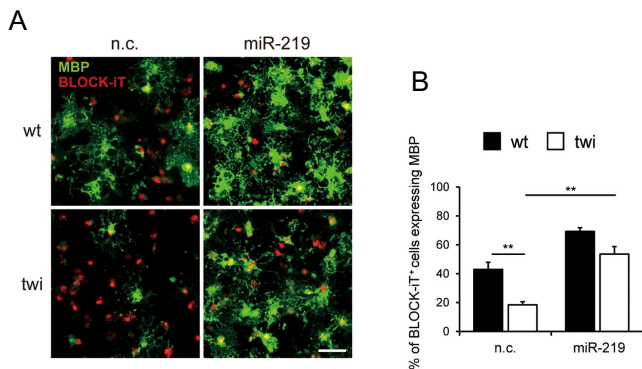


図 3 miR-219 は KD マウス OL でみられる分化成熟異常をレスキューする (A) 初代培養した正常 (wt) ならびに KD (twi) マウス OL に対する miR-219 の効果とその数の比較 (B)。(緑) MBP、(赤) miR-219 を処理した OL。Inamura et al., *Brain Pathol* (2021) から改変。

り、先天性脱髄疾患をはじめとするヒト疾患との直接の関連は全く知られていなかった。この点、本研究成果はヒト遺伝性脱髄疾患の病因ならびに治療標的としてのマイクロ RNA の役割を世界で初めて示した、学術的にも社会的にも極めて重要なものと考えられる。

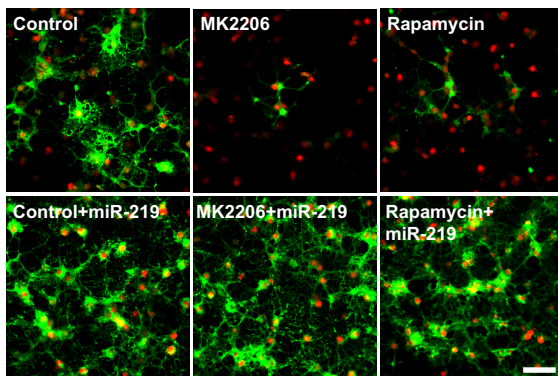


図 4 Akt/mTOR シグナル阻害剤 (MK2206 及びラパマイシン) による OL の分化抑制 (上段) は、共に miR-219 によってレスキューされる (下段)。(緑) MBP、(赤) Olig2。

近年、マイクロ RNA を標的とする脱髄疾患治療に多くの関心が寄せられている。特に、miR-219 に関しては、クプリゾンやリゾレシチン等で誘導した多発性硬化症モデルならびにウイルス感染によって誘導される白質変性症において、再髄鞘化促進や OL に対する細胞死抑制効果が報告されている。しかし、これらは全て人為的に誘導した脱髄モデル動物での知見であ

今回、論文報告した上記成果に加え、本研究課題に関するその他の成果としては、(i) 初代培養した KD マウス OL にレンチウイルスベクターを用いて恒常活性化型 Akt を遺伝子導入すると KD マウス OL の分化異常や細胞死がレスキューされること、さらに、(ii) miR-219 が Akt/mTOR シグナルによって正の発現制御を受けていることを明らかにしている (図 4、未発表データ)。また、miR-219 によって KD マウス OL 内のサイ

コシン含量が減少し、さらにこの時、サイコシン産生酵素として注目される ASAHI (Li et al., *PNAS* 2019) の発現が低下することを明らかにした (未発表データ)。これらの結果は、miR-219

による KD マウス OL の病態改善効果が、Akt/mTOR シグナルを介した分化・成熟促進のみならず、OL 内の脂質代謝への作用によることを示すものであり、今後、RNA-seq 解析等による網羅的解析の必要性を示唆するものと考えられる。

一方、研究開始当初の課題の一つであった「KD マウス OL 特異的な恒常活性化型 Akt の発現による個体レベルの病態改善効果の *in vivo* 解析」については、PLP-Akt-DD マウス脳内の Akt シグナル活性が文献データと比べて極めて低いことが判明し、十分な解析には至らなかった。そこで、この問題に対するの解決策として、今回新たに見出された「Akt シグナルの活性化で発現誘導される miR-219 の役割」に注目し、OL 特異的プロモーター下で miR-219 を発現するアデノ随伴ウイルスベクター (pAAV-hCNP-ZSGreen1-miR-219) を KD マウス脳に導入することにした。現在、これらの解析を継続研究課題で引き続き行なっている。また、「サイコシン産生酵素阻害剤による病態改善効果の解析」については、L-シクロセリンが部分的に KD マウス OL の細胞障

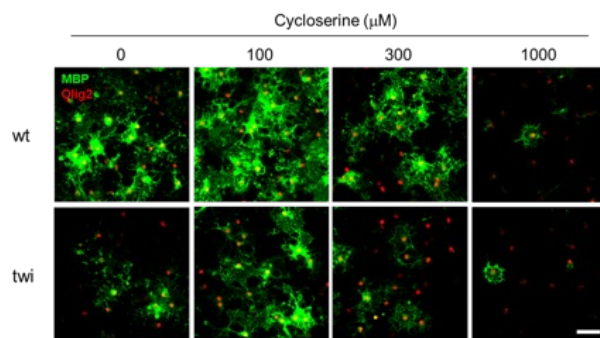


図5 シクロセリンはKD マウス OL の分化異常を一部改善する。  
(緑) MBP、(赤) Olig2

害を改善する一方 (図5)、ASAHI の阻害剤であるカルモフルは OL に対する強い細胞毒性を示し、治療薬としての効果は期待できないことが判明した。このため本課題については、多発性硬化症や知的障害の治療薬として髄鞘形成促進効果が注目されるクレマスチンやソベチロムの効果について、引き続き解析をおこなっている。

#### <引用文献>

- ① Miyatake T, Suzuki K. Globoid cell leukodystrophy: additional deficiency of psychosine galactosidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972;48:538–43.
- ② Igisu H, Suzuki K. Progressive accumulation of toxic metabolite in a genetic leukodystrophy. *Science.* 1984;224:753–5.
- ③ Inamura N, Kito M, Go S, Kishi S, Hosokawa M, Asai K, et al. Developmental defects and aberrant accumulation of endogenous psychosine in oligodendrocytes in a murine model of Krabbe disease. *Neurobiol Dis.* 2018;120:51–62.
- ④ Dugas JC, Cuellar TL, Scholze A, Ason B, Ibrahim A, Emery B, et al. Dicer1 and miR-219 are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron.* 2010;65:597–611.
- ⑤ Wang H, Moyano AL, Ma Z, Deng Y, Lin Y, Zhao C, et al. miR-219 cooperates with miR-338 in myelination and promotes myelin repair in the CNS. *Dev Cell.* 2017;40:566–82.
- ⑥ Emery B. Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science.* 2010;330:779–82.
- ⑦ Junker A, Hohlfeld R, Meinel E. The emerging role of microRNAs in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2011;7:56–9.
- ⑧ Inamura N, Go S, Watanabe T, Takase H, Takakura N, Nakayama A, Takebayashi H, Matsuda J, Enokido Y. Reduction in miR-219 expression underlies cellular pathogenesis of oligodendrocytes in a mouse model of Krabbe disease. *Brain Pathol* 2021; e12951.
- ⑨ Li Y, Xu Y, Benitez BA, Nagree MS, Dearborn JT, Jiang X, et al., Genetic ablation of acid ceramidase in Krabbe disease confirms the psychosine hypothesis and identifies a new therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116:20097–20103.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inamura N, Go S, Watanabe T, Takase H, Takakura N, Nakayama A, Takebayashi H, Matsuda J, Enokido Y	4. 巻 31
2. 論文標題 Reduction in miR-219 expression underlies cellular pathogenesis of oligodendrocytes in a mouse model of Krabbe disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Pathology	6. 最初と最後の頁 e12951
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bpa.12951	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukushi D, Inaba M, Katoh K, Suzuki Y, Enokido Y, Nomura N, Tokita Y, Hayashi S, Mizuno S, Yamada K, Wakamatsu N	4. 巻 185
2. 論文標題 R3HDM1 haploinsufficiency is associated with mild intellectual disability.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Med Genet A	6. 最初と最後の頁 1776-1786
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ajmg.a.62173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Inamura N, Go S1, Watanabe T, Takase H, Nakayama A, Takebayashi H, Matsuda J, Enokido Y
2. 発表標題 miR-219 ameliorates pathogenesis of oligodendrocyte in a mouse model of Krabbe disease
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasushi Enokido, Shinji Go, Soichiro Kishi, Hiroshi Takase, Kiyofumi Asai, Hirohide Takebayashi, Junko Matsuda, Naoko Inamura
2. 発表標題 Pathophysiological analysis and therapeutic approach for inherited leukodystrophy with defective myelin lipid metabolism.
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoko Inamura, Shinji Go, Soichiro Kishi, Hiroshi Takase, Kiyofumi Asai, Hirohide Takebayashi, Junko Matsuda, Yasushi Enokido
2. 発表標題 Improvement of abnormal differentiation and maturation in Krabbe disease mouse oligodendrocytes
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎戸 靖、稲村直子、郷 慎司、中山敦雄、竹林浩秀、松田純子
2. 発表標題 ライソゾーム病モデルマウスを用いた発達期脳白質障害の分子病態解析
3. 学会等名 第111回東海臨床遺伝・代謝講和会
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	稲村 直子  (Inamura Naoko)		
研究協力者	鬼頭 桃子  (Kito Momoko)		
研究協力者	松田 純子  (Matsuda Junko)		

6. 研究組織（つづき）

	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	郷 慎司  (Go Shinji)		
研究協力者	渡辺 昂  (Watanabe Takashi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関