

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08225

研究課題名(和文)先天性大脳白質形成不全症に伴う末梢神経障害の病態解明と治療法の確立

研究課題名(英文)Identifying the pathogenesis and treatment of peripheral neuropathy associated with congenital hypomyelinating leukodystrophy

研究代表者

植松 有里佳(沼田有里佳)(Uematsu, Yurika)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70735779

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000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も最も頻度の高いPelizaeus-Merzbacher病(PMD)の中で、PLP1ナンセンス変異によるPMDでは、末梢神経障害を認める。ラットの胎児の後根神経節由来の髄鞘化培養モデルにおいてレンチウイルスベクターを用いてPLP1を機能喪失させ、免疫染色すると、髄鞘化のマーカータンパク質であるMBPの染色性が低下していることが確認でき、この培養系がPLP1遺伝子のナンセンス変異に伴うPMDのモデルになりうる可能性が示唆された。この培養系はCharcot Marie Tooth病のモデルマウスでも髄鞘化障害を再現できたため、多くの疾患に応用できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PLP1遺伝子のナンセンス変異に伴うPMD軽症型では、末梢神経障害が生じることは知られている。末梢神経系の髄鞘を形成するシュワン細胞において、PLP1の発現は極めて少ないとされているが、PLP1が末梢神経の髄鞘形成において、どのような生理的機能を持ち、その機能喪失により、なぜ特異的に末梢神経障害を引き起こすのか、その機序は、全く明らかにされていない。この培養モデルが確立することで、末梢神経におけるPLP1の機能などが解明できる可能性がある。また簡便に作成できる培養モデルであることから今後創薬研究にも貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文):Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD) is the most frequent congenital hypomyelinating disorders in CNS. PMD caused by nonsense mutations of PLP1 gene presents peripheral neuropathy. We investigated whether loss of function of PLP1 in vitro myelination using explant culture of dorsal root ganglia derived from fetal rat show hypomyelination. In the cultured myelinated model, PLP1 was knocked down using lentivirus, and immunostaining revealed reduced staining of MBP, a marker protein for myelination, suggesting that this culture system may be a model for PMD associated with nonsense mutations in the PLP1 gene. This culture system may be applicable to modeling PNS diseases, including Charcot Marie Tooth disease (CMT), in culture.

研究分野：先天性大脳白質形成不全症

キーワード：先天性大脳白質形成不全症 Pelizaeus-Merzbacher病 末梢神経障害 髄鞘化培養モデル

## 1. 研究開始当初の背景

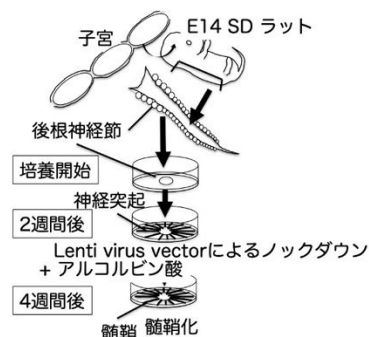
先天性大脳白質形成不全症は、先天的に中枢神経系の髄鞘化が障害される疾患群であり、10万人に1.4人の発症頻度であると報告されている(Numata et al. J Neurol. 2014; 261: 752-758)。生後から眼振や痙性麻痺などの多彩な症状を呈し、多くは重篤な症状を呈するが、その一群に末梢神経障害が合併することが知られている。これらには、先天性大脳白質形成不全症の中でも最も頻度の高い Pelizaeus-Merzbacher 病(PMD)の軽症型サブグループのほか、先天性白内障を伴う髄鞘形成不全症、POLR3A 関連白質ジストロフィーなどいくつかの疾患が含まれる。末梢神経障害の合併は、診断を行う上でも臨床的に非常に重要であるが、その原因や病態はほとんど解明されていない。PMD は、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となる。特に PLP1 遺伝子のナンセンス変異による PMD は、PLP1 遺伝子の重複やアミノ酸置換変異による PMD に比較して軽症であるにも関わらず、これらの変異では認められない末梢神経障害を合併し、病態としては、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構により PLP1mRNA が分解されるので、機能喪失変異となる。末梢神経系の髄鞘を形成するシュワン細胞において、PLP1 の発現は極めて少ないとされているが、PLP1 が末梢神経の髄鞘形成において、どのような生理的機能を持ち、その機能喪失により、なぜ特異的に末梢神経障害を引き起こすのか、その機序は、全く明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、先天性大脳白質形成不全症に合併する末梢神経障害の病態を解明すること、及び本疾患の治療につながる髄鞘化を誘導する薬剤を選出することである。末梢神経障害を有する先天性大脳白質形成不全症として、もっとも頻度の高い PLP1 ナンセンス変異による PMD を対象とし、末梢神経において PLP1 が機能喪失した時に、末梢神経に生じる変化を、申請者がすでに確立している PMD の末梢神経培養モデルを用いて形態学的、生化学的に検討する。さらに、この培養モデルで認められる末梢神経の髄鞘化障害を改善して、髄鞘化を誘導する薬剤を選出することを旨とする。

## 3. 研究の方法

(1)ラットの胎児から、脊髄後根神経節を初代培養する。培養開始後に、通常では、アスコルビン酸を用いて髄鞘化を誘導するが、その際 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 PLP1 をノックダウンして PLP1 遺伝子の発現を低下させた上で、アスコルビン酸を加え、PLP1 遺伝子のナンセンス変異による PMD 軽症型で認められる末梢神経障害を再現する培養モデルを作成する。



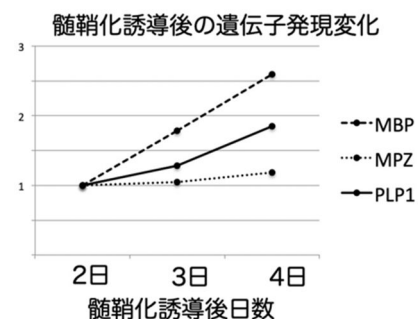
(2) 確立した髄鞘化培養モデルにおいて、PLP1 遺伝子のナンセンス変異で認められる PMD 軽症型の末梢神経障害が認められるか、形態学的、生化学的に観察を行う。

(3) 疾患培養モデルに、候補となる化合物 15 種類を添加し、髄鞘化が促進するが得られる薬剤を選出する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 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

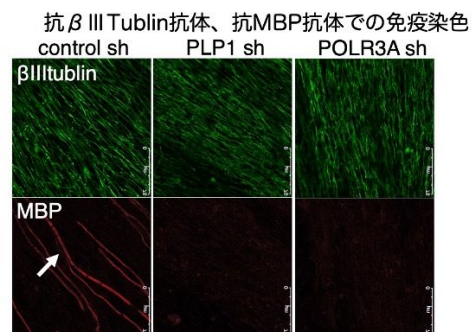
PMD は、痙性四肢麻痺を呈する最重症型から、痙性対麻痺のみを呈する軽症型まで非常に幅が広いことが知られている。PLP1 遺伝子の機能喪失変異で生じる軽症型 PMD は、痙性対麻痺を呈し、PLP1 が機能しないものの不完全な形で髄鞘自体は形成されることから、軽症になることが知られている。さらに、この軽症型 PMD では、点変異では認められない末梢神経障害を引き起こす。PMD は中枢神経系の髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの膜タンパク質である PLP1 の遺伝子変異が原因であるが、末梢神経系の髄鞘を形成するシュワン細胞は、PLP1 の発現は極めて少ないとされていることから、PLP1 遺伝子の機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が明らかにされていない。そのため、まず、我々が従来から確立している髄鞘化培養モデルで髄鞘化を誘導する過程で PLP1 遺伝子の発現が認められるのか確認する必要があった。髄鞘化培養モデルにおいて PLP1 遺伝子と他の髄鞘化のマーカー遺伝子である MPZ、MBP の発現の変化は右図のように上昇することがわかり、PMD の軽症型を反映している可能性が示唆された。



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

##### (2) 軽症型 PMD の疾患培養モデルの形態学的観察

この結果から、従来は PLP1 での末梢神経での機能については確認されていなかったが、PLP1 髄鞘化が誘導されることで何らかの機能を有し、発現上昇が認められる可能性が示唆された。末梢神経の髄鞘化の過程で発現が上昇する PLP1 遺伝子の機能喪失することで、髄鞘化が阻害されるかを確認するために、この培養モデルでアスコルビン酸を投与する前に PLP1 遺伝子をレンチウイルスベクターを用いてノックダウンし、その後アスコルビン酸投与をおこなった。Control と比較して、PLP1 遺伝子をノッ



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、 $\beta$  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。

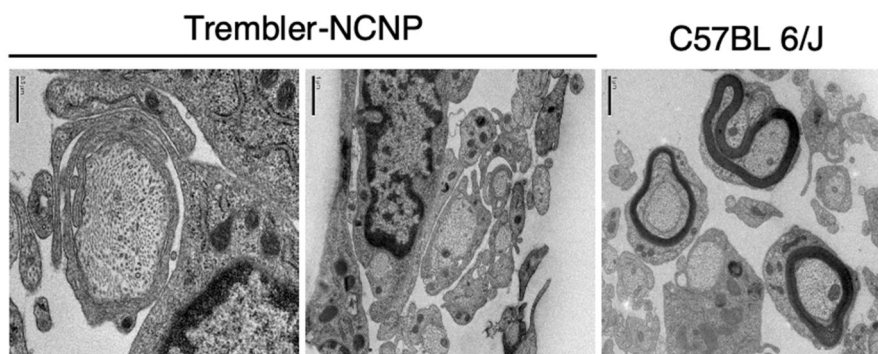
クダウンした培養モデルでは、右図のように髄鞘化のマーカータンパク質である MBP の染色性が低下していることが確認できた。また PMD と同様に先天的に髄鞘化が障害される POLR 関連白質ジストロフィーの原因遺伝子として知られている POLR3A 遺伝子をノックダウンした場合でも、PLP1 遺伝子をノックダウンした場合と同様に MBP の染色性の低下が認められ、他の髄鞘化障害を引き起こす疾患にも応用できる可能性が示唆された。

### (3) 髄鞘化を誘導する可能性がある化合物の同定

これまでの結果で確立した PMD 軽症型を再現した培養モデルにおいて、臨床応用も考え、200 種類の既存の薬剤ライブラリーを添加して、髄鞘化が誘導できるか検討した。しかし、明らかに髄鞘化が促進する薬剤は同定できなかった。

### (4) 培養モデルの他の疾患への応用についての検討

ここまでの結果から、この髄鞘化培養モデルが他の疾患についても応用可能である可能性が示唆された。PMD は非常に稀な疾患であるため、より頻度の高い疾患にも応用可能であるかを検討することにした。またこの培養モデルはラットの胎児を用いているが、マウスでも作成できるか検討した。末梢神経障害をきたす代表的な疾患として、Charcot Marie Tooth 病のモデルマウスである Trembler-NCNP を用いた。コントロールとしては、C57BL6/J マウスを用い、ラットとマウスの発達過程を加味して、ラットでは P14 で作成していたがマウスでは P12 の妊娠マウス由来の後根神経節を培養した。ところ、下図右のように髄鞘化が誘導され軸索に髄鞘が巻いている様子が確認できた。同様に Trembler-NCNP マウスで後根神経節での初代培養を行ったところ、下図左のように 2-3 巻ほど軸索に髄鞘が巻き付く様子は確認できたが、C57BL6/J マウスで認められたような髄鞘化は確認できなかった。このことから、Charcot Marie Tooth 病の培養モデルにもなることが示唆された。今後の治療開発に発展できる可能性があると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Numata-Uematsu Y, Wakatsuki S, Kobayashi-Ujiie Y, Sakai K, Ichinohe N, Araki T.	4. 巻 18
2. 論文標題 In vitro myelination using explant culture of dorsal root ganglia: An efficient tool for analyzing peripheral nerve differentiation and disease modeling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0285897
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0285897. eCollection 2023.	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 植松 有里佳
2. 発表標題 シンポジウム 未来につながるPhysician Scientist 治療を目指した病態解明研究 大脳白質形成不全症の疾患モデル細胞を用いた病態解明
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------