

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380180

研究課題名(和文) ミエリン変異ラットを用いたミエリン修復・再生ダイナミックスの解明と治療戦略の構築

研究課題名(英文) Analyses of myelin repair/regeneration for establishment of therapeutic strategy using the myelin mutant rat

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(系)・准教授

研究者番号：20244668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規ミエリンミュータントVFラットの原因遺伝子Dopey1を発見した。Dopey1が、ミエリン形成時の細胞内輸送や、神経細胞・軸索とOL間の相互作用において重要であることを示した。

dmyラットの病態解析を行い、オリゴデンドロサイトの分化に関わる転写因子(PDGFR α , Olig2, Nkx2.2)が減少し、オリゴデンドロサイトの分化・成熟・機能異常が生じ、ミエリン形成障害に至る可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We identified a nonsense mutation in the Dopey1. We also demonstrated a marked reduction in myelin components both at mRNA and protein levels during myelinogenesis in the VF rats. In addition, proteolipid protein and myelin-associated glycoprotein accumulated in oligodendrocyte cell body. Dopey1 is likely to be involved in the traffic of myelin components. Our results highlighted the importance of Dopey1 for the development and maintenance of the CNS myelin. We examined transcription factors (PDGFR α , Olig2, Nkx2.2) in the dmy rat. These factors were reduced in the affected dmy rat, suggesting impaired development, maturation and function in the oligodendrocyte.

研究分野：獣医病理学

キーワード：脱髄 ミエリン オリゴデンドロサイト ミトコンドリア 多発性硬化症 モデル動物 再生

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム研究の中心課題は、遺伝子の機能解析研究とその応用研究になる。各種の遺伝子改変モデルマウスが開発され、特定の遺伝子異常と病変形成メカニズムが明らかになりつつあるが、多くの遺伝子の機能には動物間の種差があることが知られている。例えば、我々のグループは、ミエリン低形成を特徴とする mv ラットが膜型アトラクチンのヌル欠損であることを明らかにしているが (Kuwamura M et al. Lab Invest.2002), ヒト、ラットのアトラクチンは膜型および分泌型が存在するのに対して、マウスでは膜型のみが発現しており、アトラクチンの生理・機能的役割には動物間の差異が存在する。こうした動物間の種差を考慮すると、ヒトの治療を見据えたトランスレーショナルリサーチを目指すためには、多くのモデル動物を多面的に解析し、病態を比較検討することが重要となる。

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、ウイルスなど様々な原因により障害され、ミエリンの低形成や消失 (脱髄) が引き起こされる。特に、ヒトの多発性硬化症は米国で約 10 万人が、日本でも約 5000 人が罹患し、特定疾患に認定されている指定難病である。多発性硬化症患者は、再発と寛解をくり返し、傷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の修復には至らない。

2. 研究の目的

中枢神経系のミエリン (髄鞘) の異常は、振戦、運動麻痺、視力障害などを引き起こす。代表的なミエリン疾患である多発性硬化症において、障害されたミエリンはある程度修復・再生することが知られているが、完全なミエリン再生に至ることは難しく、ミエリン

再生をいかにして効果的に導くかがミエリン疾患の治療の最重要課題となっている。ミエリンの再生は、ミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトの再生・分化・成熟が必要であり、数多くのサイトカインや分化調整因子が関与することが知られているが、そのネットワークの全貌は不明なままである。

本申請課題では、dmy ラット、mv ラット、VF ラットという原因および病態の異なる複数のミエリン疾患モデル動物のミエリン修復過程を形態学的、機能学的および分子生物学的に比較検討し、病変部で展開される蛋白・脂質の輸送、酸化ストレス反応、サイトカイン・分化調整因子のネットワークを明らかにし、ミエリンと軸索、他のグリア細胞との相互関係の詳細に検討することにより、ミエリン修復に障壁となっている因子を明らかにし、新たなミエリン疾患の治療戦略を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) VF ラットの原因遺伝子探索

これまでの予備的解析によって得られた VF ラットの原因遺伝子の候補遺伝子について、ホモ型、ヘテロ型、野生型間で cDNA 配列、ゲノム DNA 配列を決定・比較し、責任変異を同定する。また、Real time-PCR 法を行って、発現動態を解析する。これらのラットの脊髄から mRNA を抽出し、vf 候補遺伝子特異プライマーを用いて解析する。得られたデータとミエリンの発達過程、ミエリン病変の進行過程を比較検討する。

(2) ミエリン崩壊時におけるグリア細胞の細胞内小器官動態

ミエリン形成・再生に関わる蛋白・脂質の産生およびその細胞内輸送を評価する目的で、ゴルジ装置、小胞体、ミトコンドリアなどの細胞内小器官に対するマーカー抗体と PLP、MBP などのミエリン構成成分に対する抗体を

用いて、多重免疫組織化学を行い、それらの細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。さらに、ピラトームを用いて作製した 50 マイクロ厚のサンプルに対して、上記と同じ多重免疫組織化学を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて三次元観察を行い、立体構築を再現することにより、ミエリン蛋白の産生異常および細胞内輸送異常を明らかにする。

(3)オリゴデンドロサイトの分化・成熟に係わる転写因子の網羅的比較発現解析

VF ラットでは、脊髄白質におけるオリゴデンドロサイトの細胞密度が増加しており、10 週齢以降では小型で突起伸長の乏しい未分化オリゴデンドロサイトが認められることを示した。これは VF ラットの病理発生として、オリゴデンドロサイトの成熟異常があることを示唆している。オリゴデンドロサイトの分化・成熟には、Olig1, Olig2, Nkx2.2 などの転写因子や Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) や PLP などの蛋白発現が重要であることが明らかとなっている。これらの転写因子や蛋白発現のミエリン病変への役割を解明する目的で、dmy ラット、mv ラット、VF ラットでの発現動態を調べる。ミュータントラットおよびコントロールラットの脊髄および脳より mRNA を抽出し、cDNA を逆転写し、マイクロアレイ解析にて遺伝子発現の状況をスクリーニングする。スクリーニングによって、変動が予想される転写因子やミエリン関連蛋白遺伝子を選択し、Real time PCR 法にて、ミュータント間の比較、成長および症状進展に伴う経時的変動を比較検討する。さらに興味ある変動が見られた蛋白については、Western blot 解析を行い、経時的变化についても詳細を調べる。

(4)免疫電顕法を用いたミエリンダイナミクスの超微形態

免疫電顕法を用いて、ミエリン疾患ラットの原因遺伝子の産生蛋白の局在を調べる。さらに、電顕レベルの細胞内小器官の異常とミエリン構成蛋白の分布異常を調べる。解析には銀増感法と DAB 法を組み合わせることにより、ミエリン蛋白と細胞内小器官の関連性を詳細に解析し、オリゴデンドロサイトの異常を探る。

4. 研究成果

(1)VF ラットの病態・遺伝解析

新規のミエリン異常ミュータントである VF ラットの遺伝子解析を行い、ホモ型ラットにおいて顕著な発現低下の認められた *Dopey1* 遺伝子において、ナンセンス変異を発見した。免疫組織化学的解析により VF ラットの原因遺伝子産物は、オリゴデンドロサイトおよび神経細胞の細胞質に発現していることが確認された。一方、ホモ型ラットでは DOPEY1 蛋白の発現細胞は認められなかった。今回初めて、これまで機能が不明であった *Dopey1* 遺伝子が、ミエリン形成時の細胞内輸送や、神経細胞・軸索と OL 間の相互作用において重要であることを示した。これらの研究成果を国際専門誌である *Glia* 誌に発表した。

各週齢の VF ラット脊髄白質におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)の動態を経時的に解析した。VF ラットの Olig2 mRNA 発現量は、10 週齢で有意な上昇が、Nkx2.2 mRNA 発現量は全週齢において低下傾向を示した。Pdgfr alpha mRNA 発現量は、4 週齢で増加、10 週齢以降で低下した。Olig2 に強陽性を示す OPC 数は、10 週齢以降で明らかに増加した。以上より、VF ラットにおける OL の成熟異常が示唆され、ミエリン低形成に関与していると考えられた。

(2) ミエリン変異ラットの比較病態解析

中枢神経系のミエリン崩壊を特徴とする

dmy ラットの病態解析では，原因遺伝子 MRS2 が主に分布する神経細胞の病態に注目して解析した．6, 7, 8 週齢の dmy ラットのホモ型および対照ラット(野生型)の脊髄を腹索・灰白質・背索にわけて採材し，Real-time PCR 法により，各部位におけるオリゴデンドロサイトの分化に関わる転写因子の mRNA 発現量を測定した．抗ミトコンドリア COX 抗体を用いた免疫組織化学解析により，神経細胞におけるミトコンドリアの変化を比較した．抗 Golgi 抗体，抗ユビキチン抗体を用いた免疫組織化学解析と，PLP に対する *in situ* hybridization 法によって，腹索のオリゴデンドロサイトの染色性を比較した．その結果，オリゴデンドロサイトの分化に関わる転写因子 (PDGFR alpha, Olig2, Nkx2.2) は 6, 7, 8 週齢のホモ型ラットにおいて，特に灰白質で減少した．7, 8 週齢のホモ型ラットにおいて，神経細胞におけるミトコンドリアの免疫染色性が低下した．ホモ型ラットの腹索においてみられる腫大したオリゴデンドロサイトの細胞質内に Golgi 抗体に対する免疫染色性の増強がみられ，また，ユビキチンの免疫染色性も増加した．以上より，神経細胞におけるミトコンドリアの異常に伴い，オリゴデンドロサイトの分化・成熟・機能異常が生じ，ミエリン形成障害がおこっている可能性が示された．

dmy ホモ型ラットにおいて顕著な発現増加を示すある遺伝子 (遺伝子 X) に着目し，その発現動態をそれぞれのミエリン形成異常の病態と比較検討することにより，ミエリン崩壊のメカニズムを解明することを目的とした．dmy ホモ型ラットでは，対照ラットと比較して，遺伝子 X の mRNA 発現の著しい増加が認められた．また，その発現は 4 週齢から 8 週齢まで病変の進行に伴い上昇し，特に病変形成の著しい腹索における発現上昇が最も顕著にみられた．一方，mv ラット

や VF ラットでは軽度の発現上昇がみられた．これらの結果から，遺伝子 X は，dmy ラットにおけるミエリン崩壊に関与すると考えられた．当研究室のこれまでの研究結果から，dmy ラットの病変進行過程には酸化ストレスが関与していることが示唆されている．以上より，遺伝子 X は dmy ラットにおいて，酸化ストレスにより引き起こされるミエリン崩壊の病理発生に関与している可能性が示唆された．

dmy ラットと tremor (TRM)ラットの比較病態解析を行った．7, 8 週齢の dmy ラットの脊髄腹索において Nkx2.2 陽性 OPC が有意に減少した．このことから dmy ラットではオリゴデンドロサイトの分化・成熟異常が起きていることが示唆された．TRM ラットでは Nkx2.2 の免疫染色性に差は認められなかった．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 の発現が減弱していた．TRM ラットでは対照ラットと比較して，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．このことから dmy ラットでは成熟オリゴデンドロサイトの機能異常が起きているのに対し，TRM ラットでは成熟異常が起きている可能性が示唆された．

5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Tanaka M, Izawa T, Yamate J, Franklin RJM, Kuramoto T, Serikawa T,

Kuwamura M.

The VF rat with abnormal myelinogenesis has a mutation in Dopey1

Glia 62: 1530-1542, 2014. 査読有

doi: 10.1002/glia.22698

Tanaka M, Soma K, Izawa T, Yamate J, Franklin RJM, Kuramoto T, Serikawa T, Kuwamura M.

Abnormal myelinogenesis in the central nervous system of the VF mutant rat with recoverable tremor

Brain Res 1488: 104-112, 2012. 査読有
doi: 10.1016/j.brainres.2012.09.037

Kuwamura M, Inumaki K, Tanaka M, Shirai M, Izawa T, Yamate J, Franklin RJ, Kuramoto T, Serikawa T.

Oligodendroglial pathology in the development of myelin breakdown in the dmy mutant rat.

Brain Res 1389:161-168, 2011. 査読有
doi: 10.1016/j.brainres.2011.03.009

[学会発表](計7件)

田中美有, 井澤武史, 山手丈至, Dan Ma, Chao Zhao, Franklin RJM., 桑村 充

中枢性ミエリン再生における Dopey1 の発現動態

第31回日本毒性病理学会

2015年1月29日

タワーホール船堀(東京都江戸川区)

田中美有, 井澤武史, 山手丈至, Franklin RJM., 庫本高志, 芹川忠夫, 桑村 充

ミエリン異常ミュータント VF ラットの Dopey1 変異

第157回日本獣医学会学術集会

2014年9月10日

北海道大学高等教育推進機構(札幌市)

田中美有, 井澤武史, 山手丈至, Franklin RJM., 庫本高志, 芹川忠夫, 桑村 充

VF ラットにおけるオリゴデンドロサイトの分化・成熟異常

第124回関西実験動物研究会

2014年12月5日

京都大学楽友会館(京都市)

田中美有, 井澤武史, 山手丈至, Franklin RJM, 庫本高志, 芹川忠夫, 桑村 充

ミエリン異常ミュータント VF ラットにおけるオリゴデンドロサイトの機能評価

第156回日本獣医学会学術集会

2013年9月21日

岐阜大学(岐阜市)

Kuwamura M, Tanaka M, Izawa T, Yamate J, Franklin RJM, Kuramoto T, and Serikawa T.

Ultrastructural studies on the VF mutant rat with recoverable tremor.

ACVP & ASVCP 2013 Concurrent Annual Meeting

2013年11月16日~11月20日

Montreal, Canada

Tanaka M, Izawa T, Yamate J, Franklin RJM, Kuramoto T, Serikawa T, and Kuwamura M.

Disrupted maturation of oligodendrocytes in the VF mutant rat.

ACVP & ASVCP 2013 Concurrent Annual Meeting

2013年11月16日~11月20日

Montreal, Canada

長谷川優子, 山手丈至, 井澤武史, 庫本高志, 芹川忠夫, 桑村 充

ミエリン異常ミュータント dmy ラットのミエリン崩壊における神経細胞の病態

第116回関西実験動物研究会

2012年12月14日

京都大学学友会館(京都市)

〔その他〕

ホームページ等

大阪府立大学 獣医病理学教室 ホームページ

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

大阪府立大学 プレスリリース

<http://www.osakafu-u.ac.jp/info/publicity/release/2014/pr20140529.html>

6．研究組織

(1)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

(2)研究分担者

山手丈至 (Yamate Jyoji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：50150115

(3)連携研究者

庫本高志 (Kuramoto Takashi)

京都大学・医学部・准教授

研究者番号：20311409