

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461570

研究課題名(和文) 骨髄移植とグレリン投与を併用したRett症候群への新しい治療法の開発

研究課題名(英文) A new strategy for the treatment of rett syndrome with ghrelin and bone marrow transplantation

研究代表者

西 芳寛 (Nishi, Yoshihiro)

久留米大学・付置研究所・研究員

研究者番号：20352122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：レット症候群(RTT)にはグリア細胞の機能異常が存在する。RTTの異常グリアを骨髄移植で正常グリアに置換すると、RTTの神経症状が一部回復すると報告されている。脳腸ホルモン・グレリンはグリア細胞の異常興奮を鎮静化する。本研究ではRTTモデルマウスの異常グリア細胞を骨髄移植で正常グリアに置換して、さらにグレリンを投与することでRTTマウスの神経障害・生命予後が回復するか否かを検討した。結果、骨髄移植によるRTTマウスの生命予後の改善は確認できなかった。但し、グレリン投与で骨髄非移植RTTマウスの神経症状・病状経過が一部改善された。グレリン投与によるRTTへの治療応用の可能性が確認された。

研究成果の概要(英文)：Rett syndrome(RTT) is a congenital neurodevelopmental disease with glial dysfunction. Derecki NC reported that, in RTT-model mice (RTT mice), an exchange of abnormal glial cells to normal ones by bone marrow transplantation (BMT) partially ameliorated neuronal disorders together with an elongation of their life-span. Ghrelin, a brain-and-gut hormone, has been reported to calm down the hyper-excited glial cells through the functional ghrelin-receptor on them. In this study, we injected ghrelin once a day for 14 days to BMT-treated or non-BMT-treated RTT mice and checked their neuronal phenotype according to the method of Derecki NC. We also checked their life-span. In BMT-RTT mice with or without ghrelin-injection, we could find out no significant evidence for the elongation of life-span nor amelioration of neuronal condition in comparison to non-BMT RTT mice. Although, in non-BMT RTT mice with ghrelin-treatment, significant improvement of their neuronal condition was revealed.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：グレリン レット症候群 骨髄移植 放射線障害

1. 研究開始当初の背景

(1) Rett 症候群 (RTT) はメチル化 DNA 結合蛋白因子: MecP2 の異常で発症する発達障害疾患である (Matsuishi T, *Brain Dev* 2011)。RTT には脳内のグリアの機能異常が報告されており、骨髄移植で脳内の異常グリアを正常グリアに置換すると疾患モデルマウス (RTT マウス) の神経症状と生命予後が改善されると報告されている (Derecki NC, *Nature*, 2012)。

(2) グレリン (Ghr) は本学の児島らが 1999 年に発見した脳腸ホルモンであり (Kojima M, *Nature* 1999) 食欲促進・GH 分泌促進・自律神経調節・過興奮グリアの鎮静作用などが報告されている (Nishi Y, *Peptides*, 2011)。

(3) われわれは Ghr の血中濃度が RTT 女児で低下している可能性を報告してきた (Hara M, Nishi Y, Matsuishi T, *Int J Dev Neuro*, 2011)。

2. 研究の目的

(1) RTT モデルマウス (MecP2-null mouse: RTT マウス) の病態に Ghr の産生・分泌異常が関係するかどうかを知る目的で、同ホルモンの血中濃度と脳内発現量・含量を検討する。

(2) RTT マウスにおける Ghr の産生障害と MecP2 異常との接点について、micro-RNA の発現調節の観点から解析する。

(3) RTT マウスへの骨髄移植による脳内グリア置換の手技を Derecki らの方法を参考にし、骨髄移植による RTT マウスの神経症状・生命予後への効果について検討する。

(4) 骨髄移植 (BMT) の実施・非実施マウスへの Ghr 投与による神経症状・生命予後への効果について検討する。

(5) 全身放射線照射マウスへのグレリン投与による血球保護効果、及び、照射後の血中グレリン動態について Pilot Study を実施する。

(6) RTT 女児への Ghr 投与による神経症状への影響について Pilot Study を実施する。

3. 研究の方法

(以下 (1) - (6) は研究目的の番号に対応)

(1) RTT マウスのグレリン産生・分泌動態: RIA 法で RTT マウス (Mecp2tm1/Bird mice) の血中・胃内・脳内グレリン含量を測定し、同系統の野生型マウス (C57BL/6J) と比較検討した。総グレリン (T-Ghr)・活性化オクタン酸修飾グレリン (C8-Ghr)・活性化デカン酸修飾グレリン (C10-Ghr) の各々について個別の RIA 法で測定した。

RTT マウス脳内でのグレリン mRNA 発現量を、グレリンアシル化酵素 (GOAT) mRNA・グレリン脱アシル化酵素 (APT-1) mRNA と併せて RT-PCR 法で半定量解析した。

(2) Mecp2-microRNA 系による脳内グレリンの産生調節: RTT マウス脳内での micro-RNA 137, 138 の発現量を RT-PCR 法で半定量測定して、RTT マウス脳内での活性化グレリン含量低下と MecP2 機能障害の関係を検討した。

(3) マウスへの骨髄移植手技の確立: 野生型 C57BL/6J マウスに 9.5 Gy の線を全身照射後に GFP-Tg マウスの骨髄細胞を尾静脈から注入して骨髄移植 (BMT) を行い、BMT 後の一定期間で末梢血を回収して GFP-Tg 由来の白血球の出現を蛍光顕微鏡で観察した。移植骨髄生着後のマウスから脳組織を回収して、脳内グリア細胞の蛍光発色を指標に、移植骨髄に由来する脳内グリアの生着の有無を検討した。

(4) RTT マウスへの BMT・Ghr 投与の効果: 上記 (3) の方法で RTT マウスに BMT を行ない、BMT 後の RTT マウスの生存率と神経症状について Derecki らの Score 法で検討した。BMT-RTT マウスの腹腔内に活性化オクタン酸グレリン (C8-Ghr) 3.0 micro-g/body を連日投与して生存率・神経症状の改善効果について検討した。非骨髄移植のマウス (non-BMT RTT マウス) にも同様の方法でグレリン投与を実施して、生存率・神経症状を観察した。

(5) 放射線障害への Ghr 投与の効果: 野生型 C57BL/6J マウスに骨髄抑制量 3.0 Gy の全身照射 (Xir-3G) を行い、血中・胃内グレリンの濃度・含量の推移を前述の RIA 法で継続的 (day 0-30) に測定した。Xir-3G 後のマウスに C8-Ghr 5.0 micro-g/body を 3 日間で 4 回静注投与して、末梢血中の血球数 (RBC, 総 WBC, リンパ球、顆粒球) を継続的に測定し、同ホルモンによる骨髄抑制の保護効果について Pilot Study を実施した。

(6) RTT 症例の神経症状への Ghr 投与効果: 本研究の分担研究者を中心として、施設倫理委員会等への諸手続き完了後に、RTT の 4 症例に 3.0 micro-g/Kg x 3 day の C8-Ghr 静注を実施し、静注後 3 週間で臨床症状 (SDCF) を観察し、Dystonia Score (Burke-Fahn-Marsden Dystonia Rating Scale: BFMDRS) ほかを算出して、RTT 症例の神経症状に対するグレリンの投与効果について Pilot Study を実施した。

4. 研究成果

(1) RTT マウスのグレリン産生・分泌動態: ヒト RTT 症例と同様に、RTT マウスでもグレリンの血中濃度・脳内含量の低下が観察された。野生型マウスと比較して RTT マウス脳内

では活性型 C10-Ghr の有意な含量低下が確認された(生後 7-8 週齢での検討)。脳内グレリンおよびグレリンアシル化(活性化)酵素: GOAT の mRNA 発現量は野生型・RTT マウス間で有意な相違は確認されなかった。一方で、グレリン脱アシル化(不活性化)酵素である APT-1 mRNA の発現亢進が RTT マウスの脳内で確認された。APT-1 による活性化グレリンの脱アシル化(不活性化)の亢進が、RTT マウスの脳内での活性型グレリン含量の低下に関与すると考えられた。

(2) Mecp2-microRNA 系による脳内グレリンの産生調節: RTT 発症の原因蛋白である MecP2 は各種の microRNA (Mir) の発現調節を行っており MecP2-null マウス脳内での mir-138 の発現低下が報告されている(Urdinguio RG, *Epigenetics*, 2010)。さらに Mir-138 による APT-1 の発現抑制を介した G-protein subunit の細胞内局在変化による脳神経細胞のシナプス調節が確認されている(Siegel G, *Nature Cell Biol*, 2010)。本研究の RT-PCR を用いた解析では、生後 7-8 週齢の RTT マウス脳内での Mir-138 の発現低下が確認された(図 1)。従って、RTT マウス脳内での C10-Ghr の含量低下には、MecP2 の機能障害による Mir-138 の発現抑制が、グレリン脱アシル化(不活性化)酵素である APT-1 (Satou M, Nishi Y, *Endocrinology*, 2010) の機能亢進と、APT-1 自体の mRNA 発現亢進という、2 つの経路を通じて起こることが判明した。

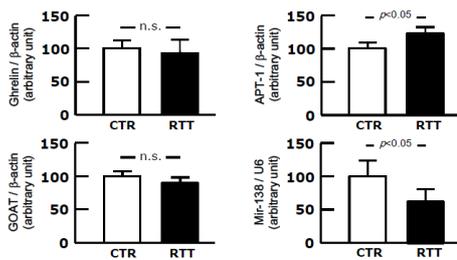


図 1 RTT マウス脳内でのグレリン関連遺伝子の発現

(3) マウスへの骨髄移植手技の確立: C57BL/6J マウスに 9.5 Gy の 線全身照射を実施して、3 時間後に GFP-Tg マウス(C57BL/6J の遺伝背景)を同種骨髄移植することで、移植骨髄の生着率 ~ 40% の移植手技を確立した。移植骨髄の生着後 1 - 2 か月での被移植マウス脳内グリアの GFP 発色も確認された。

(4) RTT マウスへの骨髄移植・グレリン投与効果の検討: 上記の骨髄移植(BMT)による RTT マウスへの骨髄細胞の生着率は 10%未満であり、移植後 2 週間内外での Critical Period を超えて生き残る比率は 7.6%であった。移植成功の RTT マウスでの生存率の延長は確認できず、有意な神経所見の改善も確認できなかった。その一方で、骨髄非移植マウス(non-BMT RTT マウス)にグレリンを

連日で腹腔内投与すると、一定の期間、RTT マウスの神経症状が改善された(図 2)。

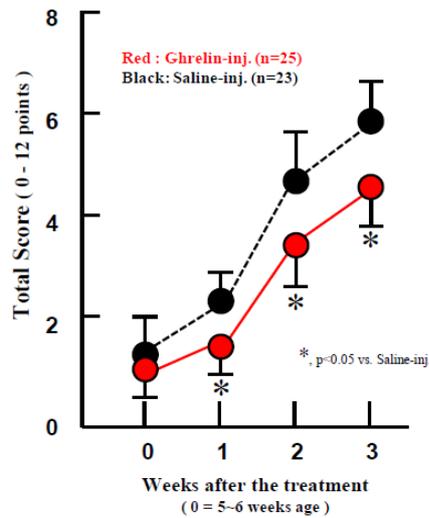


図 2-1 RTT マウス神経症状に対するグレリンの連日投与の効果 (Scoring は図 2-2)

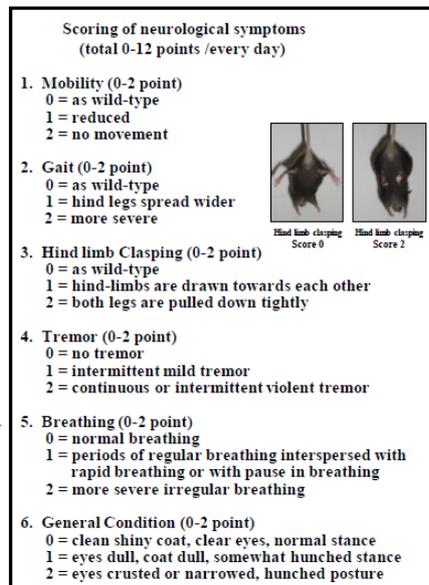


図 2-2 RTT マウス神経症状のスコアリング

但し、同マウスの神経症状はグレリン投与後も徐々に進行して、最終的な生存期間の延長効果は確認できなかった(図 3)。

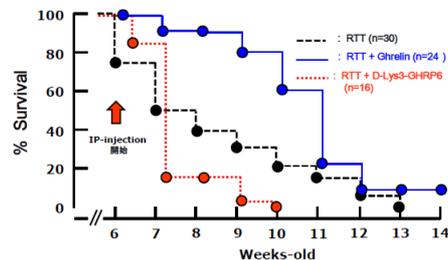


図 3 腹腔内へのグレリン連日投与による RTT マウスの生存率への影響 (D-Lys3-GHRP6: グレリン Antagonist)

(5) 放射線障害へのGhr投与の効果：BMTとグレリン投与によるRTTマウスへの治療効果の検討中に、消化管障害線量：5-9 Gyの被ばくRatにグレリンを投与すると消化管障害の防護効果が発揮されることが報告された（Wang Z, *PLoSone*, 2015）。このため、本研究のサブテーマとして、グレリンによる放射線障害への防護効果について検討した。使用動物を野生型マウス（C57BL/6J）として、照射線量については、より低線量である骨髄抑制量の3 Gyで検討した（Xir-3G）。さらに、被ばく動物の体内で産生されるグレリンが生体修復作用に直接関与するか否かを知る目的で、Xir-3Gマウスの胃内・血中グレリン量の推移を3種類のRIA（T-Ghr, C8-Ghr, C10-Ghr RIA）で継時的に測定した。結果、Xir-3Gマウスの血中総Ghr濃度は照射後7-30日で持続的に上昇し、活性型C8-Ghrの濃度も照射後7日目を中心に有意に上昇した。この結果は消化管障害線量：10 Gyをラットに照射したWang Zらの報告と異なっていた。Xir-3Gマウス胃内のグレリン含量は、照射後0-30日で有意な増減を認めなかった。この結果も、既報の消化管障害線量：15 Gy被ばくラットで得られたもの（Lee B, *Int J Radiation Res*, 2013）とは異なっていた。Xir-3GマウスにC8-Ghr 5.0 micro-g/bodyを3日間で4回静注投与すると、照射後の末梢血RBC, 総WBC, リンパ球数の減少が有意に抑制され、各血球数は早期に照射前のレベルに復帰した。上記の結果をもとに、その機序の詳細を解明すべく、今後、H.28-30年度の科研費研究（課題番号16K09815）を展開していく。

(6) RTT症例の神経症状へのGhr投与効果：今回の動物実験の結果を受けて、本研究の分担研究者による「RTT症例へのグレリン投与の効果」のPilot Studyが実施された。結果、グレリン投与によりRTT症例の錐体外路症状が軽減される可能性が示された。

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 8 件）

Ghrelin improves dystonia and tremor in patients with Rett syndrome: A pilot study. Yuge K, Hara M, Kojima M, Matsuishi T. *J Neurol Sci* 377 219-223 (2017).

Mole ghrelin: cDNA cloning, gene expression, and diverse molecular forms in *Mogera imaizumii*. Satou M, Kaiya H, Nishi Y, Kangawa K, Sugimoto H. *Gen Comp Endocrinol* 232, 199-210 (2016).

Voluntary exercise contributed to an amelioration of abnormal feeding behavior,

locomotor activity and ghrelin production concomitantly with a weight reduction in high fat diet-induced obese rat. Mifune H, Tajiri Y, Nishi Y, Kojima M. *Peptides* 71, 49-55 (2016).

Identification of activated protein C as a ghrelin endopeptidase in bovine plasma. Satou M, Nishi Y, Hosoda H, kangawa K, Sugimoto H. *J Endocrinol* 224, 61-73 (2015).

De novo SHANK3 mutation causes Rett syndrome-like phenotype in a female patient. Hara M, Ohba C, Yamashita Y, Matsuishi T. *Am J Med Genet A*. 167 1593-1596 (2015).

Relation between circulating levels of GH, IGF-1, ghrelin and somatic growth in Rett syndrome. Hara M, Nishi Y, Hosoda H, Kangawa K Kojima M, Matsuishi T. *Brain Dev* 9, 794-800 (2014).

Rett syndrome: the state of research, and future perspectives. Matsuishi T *Nihon Rinsho* 71, 2043-2053 (2013).

Changes in subcellular distribution of n-octanoyl or n-decanoyl ghrelin in ghrelin-producing cells. Nishi Y, Mifune H, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4 84-94. (2013).

〔学会発表〕（計 12 件）

放射線被ばく後のグレリン産生分泌動態とグレリンによる血球保護効果の検討：
西 芳寛、那須沙織、細田洋司、御船弘治、児島将康：第 89 回 日本内分泌学会学術総会 2016 4/21-4/23（京都）

糖代謝・脂質代謝・グレリン産生に及ぼす性差・年齢・運動習慣の影響：川上真代、佐々木 亨、西 芳寛：第 54 回 日本糖尿病学会九州地方会 2016 10/14-10/15（鹿児島）

Ghrelin ameliorates radiation-induced acute hematopoietic injury. Nishi Y, Nasu S, Kawakami M, Hosoda H, Kushino A：第 93 回 日本生理学会総会 2016 3/21-3/23（札幌）

高脂肪食負荷マウスにおけるグレリン末梢投与後の摂食行動：御船弘治、原 健人、西 芳寛、児島将康：第 88 回 日本内分泌学会学術総会 2015 4/23-4/25（東京）

グレリン遺伝子欠損マウスの摂食行動と自発運動について：御船弘治、西 芳寛、田尻裕司、児島将康：第 36 回 日本肥満学会

学術総会 2015 10/2-10/3 (名古屋)

肥満ラットにおけるグレリン動態に及ぼす自発運動の効果: 御船弘治、原 健人、西 芳寛: 第 87 回 日本内分泌学会学術総会 2014 4/24-4/26 (福岡)

食塩負荷・妊娠 Dahl-S ラットの胎盤内で認められる NO-sGC system と Natriuretic peptide system の異常について: 西 芳寛、多久島祥代: 2014 生理学講座夏季合同セミナー 2014 8/20 (久留米)

cDNA cloning of ghrelin and gene regulation in Mogera Imaizumii. : 佐藤元康、西 芳寛、杉本博之: 第 87 回 日本生化学大会 2014 10/16-10/18 (京都)

生後発達に伴うマウスの脳内グレリン含量の変動に関する検討: 平田留美子、西 芳寛、御船弘治、細田洋司、寒川賢治、児島将康、松石豊次郎: 2013 4/19-4/21 (広島)

分泌顆粒内でのアシル化グレリンの分布と動態・電子顕微鏡を用いた検討: 西 芳寛、御船弘治、矢吹 映、細田洋司、寒川賢治、児島将康: 第 86 回 日本内分泌学会学術総会 2013 4/25-4/27 (仙台)

Rett 症候群モデルマウスへのグレリン投与による治療効果の検討: 西 芳寛、平田留美子、細田洋司、御船弘治、馬田敏幸、寒川賢治、児島将康、松石豊次郎: 第 31 回 内分泌代謝学サマーセミナー 2013 7/11-7/13(湯布院)

活性化プロテイン C による短縮型グレリンの生成とその生理活性: 佐藤元康、西 芳寛、杉本博之: 第 86 回 日本生化学会大会 2013 9/11-9/13 (横浜)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 抗デカン酸修飾型グレリン抗体、デカン酸修飾型グレリン測定方法、デカン酸修飾型グレリン分離回収方法

発明者: 西 芳寛

権利者: 大学法人 久留米大学

種類: 特許

番号: 特許第 5354158 号

出願年月日: 2013 年 8 月 22 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 1 件)

名称: 抗デカン酸修飾型グレリン抗体、デカン酸修飾型グレリン測定方法、デカン酸修飾型グレリン分離回収方法

発明者: 西 芳寛

権利者: 大学法人 久留米大学

種類: 特許

番号: 特許第 5354158 号

出願年月日: 2013 年 8 月 22 日

取得年月日: 2013 年 9 月 6 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

Researchmap 「研究者 西 芳寛」

<http://researchmap.jp/read0212158/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 芳寛 (NISHI, Yoshihiro)

久留米大学・分子生命科学研究所・研究員

研究者番号: 20352122

(2) 研究分担者

御船 弘治 (MIFUNE, Hiroharu)

久留米大学医学部・動物実験センター・

准教授

研究者番号: 70174117

(3) 研究分担者

太田 啓介 (OHTA, Keisuke)

久留米大学医学部・顕微解剖学・准教授

研究者番号: 00258401

(4) 研究分担者

馬田 敏幸 (UMATA, Toshiyuki)

産業医科大学・アイソトープ研究センタ

ー・准教授

研究者番号: 30213482

(5) 研究分担者

松石 豊次郎 (MATSUIISHI, Toyojiro)

久留米大学医学部・小児科学・名誉教授

研究者番号: 60157237

(6) 連携研究者

児島 将康 (KOJIMA, Masayasu)

久留米大学・分子生命科学研究所・教授

研究者番号: 20202062

(7) 連携研究者

佐藤 元康 (SATOU, Motoyasu)

獨協医科大学・生化学・助教

研究者番号: 20418891

(8) 研究協力者

那須 沙織 (NASU, Saori)

久留米大学医学部・放射線同元素施設・

研究員・技術職員

研究者番号: 9075434359