

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：82611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670485

研究課題名(和文)モルフォリーノの特異的遺伝子発現抑制を介した先天性大脳白質形成不全症の治療研究

研究課題名(英文) Treatment of congenital hypomyelinating leukodystrophy using the gene suppression effect of morpholino

研究代表者

井上 健 (Inoue, Ken)

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

研究者番号：30392418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Pelizaeus-Merzbacher病は、中枢神経系の髄鞘形成不全を特徴とする小児神経難病である。最も頻度の高い変異であるPLP1重複は、過剰遺伝子発現がその病態と考えられるが、現在有効な治療法はない。そこで、本研究ではPLP1重複変異に対する治療法を開発するために、合成核酸様物質モルフォリーノによるPLP1遺伝子の特異的発現抑制を用いたアンチセンス療法の開発を試みた。特異的遺伝子発現抑制効果のある修飾モルフォリーノを設計・合成し、生後のPLP1トランスジェニックマウスの脳室内および脳実質内への投与実験を行った。モルフォリーノの脳組織毒性が明らかとなり、本治療法開発は困難と判断した。

研究成果の概要(英文)：Pelizaeus-Merzbacher disease is a hypomyelinating leukodystrophy characterized by failure of myelination. the most frequent mutation is PLP1 duplication that lead to gene overexpression, but no cure is available. In this study, we employed a synthetic antisense oligonucleotide-like reagent, morpholino, to develop a therapy for PLP1 duplication. We designed and produced modified morpholino that can specifically suppress PLP1 expression. We treated PLP1 transgenic mice by injecting morpholino into ventricle or cerebral parenchyma. However, we found that morpholino is toxic to brain tissue and concluded that morpholino is inappropriate to use in the treatment of PLP1 duplication.

研究分野：神経遺伝学、分子生物学、神経科学

キーワード：トランスレーショナルリサーチ 脳神経疾患 アンチセンス 発現抑制 治療法開発

1. 研究開始当初の背景

Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) は、遺伝的な要因により、生来中枢神経系の髄鞘形成が不完全であるためにおこる先天性大脳白質形成不全症の代表的疾患である(1)。臨床的には、知的面および運動面での重度の発達障害と眼振、痙性対麻痺、筋緊張低下、小脳失調、ジストニア、アテトーゼなどの神経症状を呈する小児の稀少性神経難病である。疾患原因遺伝子 *PLP1* は、中枢神経系の主要な髄鞘膜蛋白質をコードする。最も頻度の高い変異は *PLP1* 遺伝子のゲノム重複で、分子病態はコピー数の増加による過剰発現である(2)。我々は *PLP1* 重複を報告してから、これまでこの小児神経難病の診断や病態の解明に取り組んできた。しかしながら、現在もなぜ品質的には全く問題がない正常な遺伝子量が倍量産生されるだけで、非常に重篤な病態を引き起こすのかは不明であり、有効な治療法も見出されていない。

品質上全く問題がない遺伝子産物が過剰にあることが、小児の脳の発達過程で重要な大脳の髄鞘形成を妨げるのであれば、この遺伝子産物の発現を適量に減らしてやることによりこの疾患を治せるのではないか。一見、直接的で簡潔な原理であるが、実際にはこれを生体内で可能にすることは容易ではなく、現在までのところ、動物実験モデルのレベルでもその治療法は確立されていない。そこで我々は、遺伝子の発現を生体内で抑制的に調節する効率的かつ安全な技術を確立し、これを用いて PMD の治療法を開発することを目指す。具体的には、合成核酸様物質モルフォリーノを用いて、PMD モデルマウスでの生体内 *PLP1* 遺伝子発現抑制の技術を確立することを目標とする。

2. 研究の目的

Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) は、中枢神経系の髄鞘形成不全を特徴とする小児神経難病である。最も頻度の高い変異である *PLP1* 重複は、過剰遺伝子発現がその病態と考えられるが、現在有効な治療法はない。そこで、本研究では *PLP1* 重複変異に対する治療法を開発するために、合成核酸様物質モルフォリーノによる *PLP1* 遺伝子の特異的発現抑制を用いたアンチセンス療法の開発を行う。モルフォリーノは、効果の持続性、効率、安全性から最も臨床応用の可能性の高いアンチセンスオリゴである。対象は *PLP1* 重複のモデル動物である *PLP1* トランスジェニックマウスで、脳実質内、脳室内、血管内、鼻腔内など様々な投与方法について検討し、最も効果的な治療法を探る。この研究成果は、ゲノム病一般の治療法開発に応用可能な技術として期待できる。

3. 研究の方法

PLP1 重複変異による PMD に対する非ペプチド修飾モルフォリーノ (VivoM) 治療の前臨床試験として、培養細胞とモデル動物を用いて下記の項目についての *PLP1* 発現抑制による治療効果の検証を行う。

培養細胞系での VivoM の遺伝子抑制効率の検証

野生型マウスでの VivoM の各種投与方法による発現抑制効率の検証とプロトコルの確立

非侵襲的投与方法の開発と効果の検証

PMD モデルマウスでの VivoM の治療効果の検証

4. 研究成果

I. 培養細胞系での VivoM の遺伝子抑制効率の検証

A. 標的遺伝子に対する最適なモルフォリーノの配列の選定

通常、遺伝子発現抑制のためには、蛋白質翻訳開始コドン付近にモルフォリーノを設計した。*PLP1* 遺伝子は、翻訳開始部位が1つだけであるので、これが標的となる。配列の決定は、GeneTools 社の専用ソフトを用い、最適と予想される配列を決定した。

B. 培養細胞を用いた遺伝子抑制効果の検証
十分な 5' UTR を含む *PLP1*cDNA (VivoM 結合配列を含む) を GFP 上流に組み込んだ発現プラスミドを構築した。これを HeLa 細胞に一過性に導入した後、VivoM を培地中に投与し、遺伝子抑制効果を蛍光顕微鏡およびウェスタンブロットにより観察し、VivoM は特異的に *PLP1* 蛋白質の発現を抑制することを確認した。

II. 野生型マウスおよび *PLP1* トランスジェニックマウスでの VivoM の各種投与方法による発現抑制効率の検証とプロトコルの確立

野生型マウスの大脳に VivoM を直接投与し、*PLP1* 発現量のウェスタンブロット法および蛍光免疫染色法などにより遺伝子抑制効果の検定を行った。投与時期は、出生直後から1週間後ごろまで、安全かつ有効な投与濃度および用量の検討を行う。投与方法は、まず確実に発現抑制効果を検証するために、大脳実質内に単回投与し、一定日数後に *PLP1* 免疫染色で接種部位での *PLP* 発現抑制の効果を検証。次に、脳室内に投与し、より広範囲での発現抑制効果を検証することとした。しかし、脳実質内投与でも脳室内投与でも、コントロールおよび *PLP1* 標的モルフォリーノともに投与後数日のうちにマウスが死亡した。生食投与群では、死亡個体はほぼみられないことから、投与による脳外傷が原因ではなく、モルフォリーノの細胞障害性が原因であることが示唆された。実際に脳実質を観察すると、

投与部位の組織が軟化していることが明らかとなった。

そこで、投与量を減らして細胞障害性を回避できるかどうかを検証したが、5分の1量程度の原料でも、一部、組織毒性を認めため、モルフォリーノの使用は、実臨床に応用しうる治療法の開発には適さないとの結論に至った。

そこで、現在は、モルフォリーノに代わる発現抑制治療として、AAVを用いたshRNAによる発現抑制治療法の検討を実施している。

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 13 件)

1. Lassuthová P, Zaliová M, Inoue K, Haberlová J, Sixtová K, Sakmaryová I, Paderová K, Mazanec R, Zámečník J, Sisková D, Garbern J, Seeman P. Three new PLP1 splicing mutations demonstrate pathogenic and phenotypic diversity of Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Child Neurol.* 2013;29(7):924-931. doi: 10.1177/0883073813492387. PubMed PMID: 23771846. (査読有)
2. Matsufuji M, Osaka H, Gotoh L, Shimbo H, Takashima S, Inoue K. Partial PLP1 deletion causing X-linked dominant spastic paraplegia type 2. *Pediatric Neurology.* 2013;49(6):477-81. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2013.07.012 (査読有)
3. 井上 健, 岩城明子, 黒澤健司, 高梨潤一, 出口貴美子, 山本俊至, 小坂 仁 先天性大脳白質形成不全症:ゲノム解析から診断、治療への取り組み 脳と発達 2013;45(2);122-126 (査読無)
4. Takanashi J, Osaka H, Saitsu H, Sasaki M, Mori H, Shibayama H, Tanaka M, Nomura Y, Terao Y, Inoue K, Matsumoto N, Barkovich J. Different patterns of cerebellar abnormality and hypomyelination between POLR3A and POLR3B mutations. *Brain Dev.* 2014; 36(3): 259-63. doi: 10.1016/j.braindev.2013.03.006 (査読有)
5. Gotoh L, Inoue K, Helman G, Mora S, Maski K, Soul JS, Bloom M, Evans SH, Goto Y, Caldovic L, Hobson GM, Vanderver A. GJC2 promoter mutations causing Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Mol Genet Metab.* 2014;111(3):393-8. doi:10.1016/j.ymgme.2013.12.001 (査読有)
6. Morimura T, Numata Y, Nakamura S, Hirano E, Gotoh L, Goto Y, Urushitani M, Inoue K. Attenuation of endoplasmic reticulum stress in Pelizaeus-Merzbacher disease by an anti-malaria drug, chloroquine. *Exp Biol Med.* 2014;239(4):489-501. doi: 10.1177/1535370213520108 (査読有)
7. Numata Y, Gotoh L, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi JI, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H, Inoue K. Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies. *J Neurol.* 2014; 261(4):752-8. DOI : 10.1007/s00415-014-7263-5 (査読有)
8. Kuroiwa-Numasawa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. Involvement of ER stress in dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher disease with PLP1 missense mutations shown by iPSC-derived oligodendrocytes. *StemCellReports* 2014;2(5):648-61. doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.03.007 (査読有)
9. Yamamoto T, Shimojima K, Uemura A, Uematsu M, Nakayama T, Inoue K. SLC16A2 mutations in two Japanese patients with Allan-Herndon-Dudley syndrome. *HumGenVar* 2014;1:14010. doi:10.1038/hgv.2014.10 (査読有)
10. Ito Y, Inoue N, Inoue YU, Nakamura S, Matsuda Y, Inagaki M, Ohkubo T, Asami J, Terakawa YW, Kohsaka S, Goto Y, Akazawa C, Inoue T, Inoue K. Additive dominant effect of a SOX10 mutation underlies a complex phenotype of PCWH. *Neurobiol Dis.* 2015;80:1-14. doi: 10.1016/j.nbd.2015.04.013. (査読有)
11. Osaka H, Inoue K. Pathophysiology and emerging therapeutic strategies in Pelizaeus-Merzbacher Disease. *Expert Opinion on Orphan Drugs.* 2015;3(12): 1447-1459. DOI:10.1517/21678707.2015.1106315 (査読有)
12. Sumida K, Inoue K, Takanashi J, Sasaki M, Watanabe K, Suzuki M, Kurahashi H, Omata T, Tanaka M, Yokochi K, Iio J, Iyoda K, Kurokawa T, Matsuo M, Sato T, Iwaki A, Osaka H, Kurosawa K, Yamamoto T, Matsumoto N, Maikusa N, Mastuda H, Sato N. The magnetic resonance imaging spectrum of Pelizaeus-Merzbacher disease: A multicenter study of 19 patients. *Brain Dev.* 38(6):571-80. doi: 10.1016/j.braindev.2015.12.007 (査読有)
13. Omata T, Nagai J, Shimbo H, Koizume S, Miyagi Y, Kurosawa K, Yamashita S, Osaka H, Inoue K. A splicing mutation of proteolipid protein 1 in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain Dev.* 38(6):581-4. doi: 10.1016/j.braindev.2015.12.002. (査読有)

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Inoue K, Morimura T, Numata Y, Yu L-H, Gotoh L, Yamamoto R, Inoue N, Antalffy B, Deguchi K, Osaka H, Goto Y. Preclinical studies for the treatment of Pelizaeus-Merzbacher disease with clinically applicable compounds, curumin and chloroquine. 2013.6.8-11. 23rd Meeting of the European Neurological Society, Fira de Barcelona, Barcelona, Spain.
2. Deguchi K, Kubo K, Armstrong D, Nakajima K, Inoue K. Abnormal neuronal migration with ischaemic brain injuries may cause cognitive dysfunction in extremely preterm infants. 2013.6.8-11. 23rd Meeting of the European Neurological Society, Fira de Barcelona, Barcelona, Spain.
3. 井上 健、高梨潤一、小坂 仁、佐藤典子 先天性大脳白質形成不全症の脳 MRI 画像データベース構築への取り組み 第 55 回日本小児神経学会総会、2013 年 6 月 1 日 大分(大分オアシスタワーホテル)
4. 沼田有里佳、呉繁夫、後藤雄一、井上 健 Pelizaeus-Merzbacher 病の細胞内分子病態:小胞体ストレスとシャペロンダイナミクス 第 55 回日本小児神経学会総会、2013 年 5 月 3 0 日 大分(大分オアシスタワーホテル)
5. Inoue K, Itoh Y, Saito S, Aoki I, Barkovich J, Takanashi J. Brain N-acetylaspartate is Increased in mouse models of Pelizaeus-Merzbacher disease: implication for human imaging findings. 2013.10.22-26. 63rd Annual meeting of the American Society of Human Genetics, Boston Convention & Exhibition Center, Boston, USA.
6. Numata Y, Morimura T, Nakamura S, Hirano E, Kure S, Goto Y, Inoue K. More than ER stress: molecular mechanism for misfolded PLP1 that impacts subcellular dynamics and clinical severity of Pelizaeus-Merzbacher disease. 2013.10.22-26. 63rd Annual meeting of the American Society of Human Genetics, Boston Convention & Exhibition Center, Boston, USA.
7. 井上 健、後藤玲央、Helman G, Mora S, Maski K, Soul JS, Bloom M, Evans SH, 後藤 雄 一 , Caldovic L, Hobson GM, Vanderver A. Pelizaeus-Merzbacher-like 病 : GJC2 遺伝子の新規プロモーター変異とその分子病態 第 56 回日本小児神経学会総会、2014 年 5 月 29-31 日浜松(アクトシティ浜松)
8. Inoue K, Numata Y, Morimura T, Nakamura S, Goto Y. PLP1 missense mutations impair subcellular organelle dynamics that impact clinical severity of Pelizaeus-Merzbacher disease. 2014.7.19-24. 20th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience. Hilton Montreal Bonaventure, Montreal, Canada
9. K. Deguchi , K Kubo, K Nakajima K. Inoue. Abnormal neuronal migration with ischemic brain injury in extremely preterm infants underlies subsequent cognitive impairment. 2014.7.19-24. 20th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience. Hilton Montreal Bonaventure, Montreal, Canada
10. 白川 由佳、泉 仁美、中村 祥子、井上 健、後藤 雄一、稲垣 真澄 bronx waltzer マウス変異遺伝子 Srrm4 の脳内発現と GABAergic interneuron への影響 第 37 回神経科学学会大会、2014 年 9 月 11-13 日 横浜(パシフィコ横浜)
11. Inoue K, Ito Y, Inoue N, Inoue YU, Nakamura S, Matsuda Y, Inagaki M, Ohkubo T, Asami J, Terakawa YW, Kohsaka S, Goto Y, Akazawa C, Inoue T. Additive toxicity of SOX10 mutation underlies a complex neurological phenotype of PCWH 2014.10.18-22. The 64th American Society of Human Genetics Annual Meeting. San Diego Convention Center, San Diego, USA
12. 井上 健、マンガリイ・プリアンティ、沼田有里佳、中村祥子、守村敏史、佐谷秀行、後藤雄一 PLP1 点変異の新規分子病態を標的としたドラッグ・リポジショニングによる Pelizaeus-Merzbacher 病の治療法開発 第 59 回日本人類遺伝学会、2014 年 11 月 19~22 日 東京(タワーホール船堀)
13. 井上 健、マンガリイ・プリアンティ、西澤絢子、李珩、沼田有里佳、中村祥子、守村敏史、佐谷秀行、後藤雄一 既存薬ドラッグ・リポジショニングによる Pelizaeus-Merzbacher 病の治療候補薬の探索 第 57 回日本小児神経学会総会、2015 年 5 月 28-30 日大阪(帝国ホテル大阪)
14. K Inoue, P.R. Mangalika, A Nishizawa, H Li, Y Numata, S Nakamura, T Morimura, H Saya, Y Goto. Seeking drugs for Pelizaeus-Merzbacher disease using drug repositioning approach targeting a novel cellular pathology. The 65th American Society of Human Genetics Annual Meeting. 2015.10.6-10. Baltimore Convention Center, Baltimore, USA

〔図書〕(計 3 件)

1. 井上 健 それ以外の先天性大脳白質形成不全症 編集 水澤英洋 新領域別症候群シリーズ No.28「神経症候学(第2版) III」 日本臨牀社 p876-883. 2014
2. 井上 健 髄鞘低形成 (Pelizaeus-Merzbacher 病) 編集 水澤英洋 新領域別症候群シリーズ No.29「神経症候学(第2版) IV」 日本臨牀社 p264-269. 2014
3. Inoue K. Genetic risk factors for neurodegenerative diseases. In: Wada K, ed. Neurodegenerative Disorders as Systemic Diseases. Springer Japan, Tokyo. 2015, 117-134.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 健 (INOUE, Ken)

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

研究者番号：30392418