

平成30年 5月30日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19644

研究課題名(和文) 食品由来化合物によるCharcot-Marie-Toothの病態改善

研究課題名(英文) Improvement of pathology of Charcot-Marie-Tooth disease by food-derived compounds

研究代表者

植松 有里佳(沼田)(Uematsu, Yurika)

東北大学・大学病院・特任助手

研究者番号：70735779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経の髄鞘化が障害されるCharcot-Marie-Tooth病(CMT)は、有効な治療法は未だない。本研究では、CMTの病態に關与していることが報告されているオートファジー誘導や小胞体ストレスを改善させる可能性のある21種類の化合物を用いて、髄鞘化を誘導することができるかを明らかにすることが目的である。まず、簡便にかつ効率よく髄鞘化が再現できる培養モデルの作成を目指し、ラットの胎児の後根神経節の explant cultureを用いたところ、ミエリン塩基性蛋白陽性の髄鞘が非常に高い効率で観察された。今後CMTの原因遺伝子を導入する方法を検討し、化合物スクリーニングを行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is impaired in peripheral nerve myelination. There is no effective treatment for CMT. Autophagy or ER stress is reported to be involved in the pathology of CMT. The purpose of this study is to clarify whether myelination can be induced using 21 kinds of compounds that may improve autophagy induction or ER stress. First, we aimed to prepare a culture model that can easily and efficiently reproduce myelination, and when we used the explant culture of the rat's fetus dorsal root ganglion. In this culture, myelin basic protein positive myelination was observed with extremely high efficiency. We plan to conduct compounds screening considering the method of introducing causal genes of CMT in the future.

研究分野：小児科学

キーワード：末梢神経障害

1. 研究開始当初の背景

末梢神経の髄鞘化が障害される Charcot-Marie-Tooth 病(CMT)は、典型例では0歳から20歳までに発症し、四肢の感覚と運動が徐々に障害されていく遺伝性の末梢神経脱髄性疾患である。有病率は約 1/2500 人と比較的頻度は高く、これまで 40 種類以上の原因遺伝子が報告されている。末梢神経の髄鞘を形成するシュワン細胞の膜蛋白質である PMP22 遺伝子の重複を最も高頻度に認め、他にも PMP22 を含む髄鞘関連遺伝子の点変異などが多数報告されている。遺伝子検査などにより、診断に至る症例は増えているが、現在まで有効な治療法は確立されていない。病態としては、PMP22 遺伝子の重複は、細胞内分解系の一つであるオートファジー (Fortun J et al. J Neurosci. 2003)が関与し、点変異では、異常な蛋白質が小胞体に蓄積することで生じる小胞体ストレスによりシュワン細胞の細胞死が誘導される (Pennuto M et al. Neuron. 2008)ことが病態の一つであると報告されている。CMT の治療法を開発する上で、上記の CMT の細胞内病態を改善することが治療法の候補と考えられるが、培養細胞を用いて髄鞘化を観察する研究は技術的に難しいこともあり、詳細な検討は未だなされていない。

2. 研究の目的

末梢神経の髄鞘化が障害される Charcot-Marie-Tooth 病(CMT)は、オートファジーの誘導や小胞体ストレスを抑制することが、病態を改善し、髄鞘化を促進できることが、モデルマウスでは明らかにされているが、ヒトへの有効な治療法は未だ見つかっていない。本研究では、研究者がこれまでの研究から見出した、オートファジー誘導や小胞体ストレスを改善させる可能性のある食品由来の 21 種類の化合物を用いて、CMT の細胞内病態を改善し、髄鞘化を誘導することができるかを明らかにすることを目的とする。この化合物のスクリーニングに用いる培養系として、従来からのラットの胎児由来のシュワン細胞と後根神経節を共培養系よりもさらに簡便で、効率よく髄鞘化を誘導できる培養系を確立することが必要である。さらに CMT の原因として報告されている PMP 遺伝子をこの培養系に導入することで、髄鞘化が障害される CMT 培養モデルを作成することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 従来から用いられてきたラットの胎児由来のシュワン細胞と後根神経節を共培養する系よりも、より効率よく髄鞘化が行われる初代培養系 (髄鞘化培養モデル)を確立し、この培養モデルと *in vivo* での髄鞘化を比較することでこのモデルが末梢神経の髄鞘化を再現していることを確認する。髄鞘化の形態学的な観察に関しては、免疫組織化学的

法、電子顕微鏡を用いて行う。

(2) 確立した髄鞘化培養モデルに CMT の原因遺伝子である変異 PMP22 遺伝子あるいは野生型 PMP22 遺伝子をエレクトロポレーションを用いて遺伝子導入し、発現させることで、CMT 培養モデルを確立する。この培養モデルを用いてオートファジー誘導や小胞体ストレスを改善させる可能性のある食品由来の 21 種類の化合物が、髄鞘化を誘導することができるかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 末梢神経髄鞘化培養モデルの作成
従来から、末梢神経の髄鞘化を再現した髄鞘化培養モデルは、ラットのシュワン細胞と後根神経節由来の初代培養を共培養し、髄鞘化を誘導することが知られているアスコルビン酸で髄鞘化を誘導する培養系であったが、この方法は、薬剤スクリーニングに用いる方法としては簡便ではなく、髄鞘化の効率も高くはなかった。疾患に対する薬剤スクリーニングに用いるためには簡便で、効率よく髄鞘化を誘導する方法が必要であることから、初代培養の方法について検討したところ、図1のように、胎生 14 日目のラットの胎児の後根神経節の explant culture を用いてアスコルビン酸で髄鞘化を誘導することによっても、髄鞘化を誘導できることが分かった。Explant culture であることから、簡便な方法であり、スクリーニングに用いるには、適切な方法と考えた。

< 後根神経節の培養方法 >

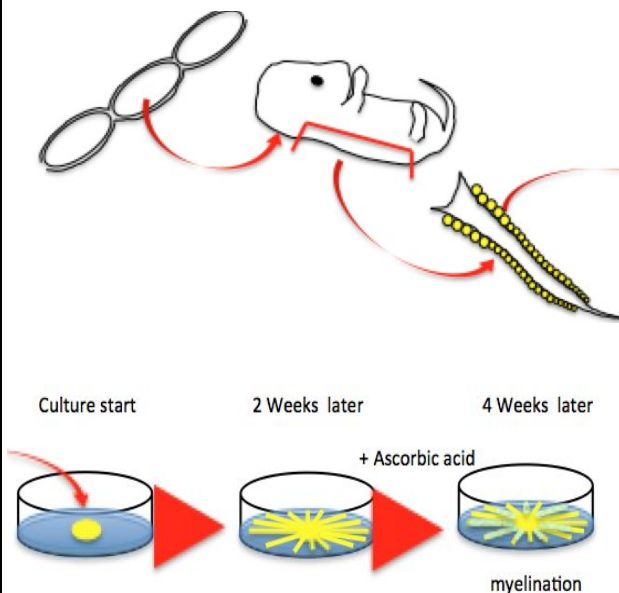


図 1: ラットの胎児由来の後根神経節の培養方法
ラットの後根神経節を培養開始し、2 週間後にアスコルビン酸を投与し、髄鞘化誘導を開

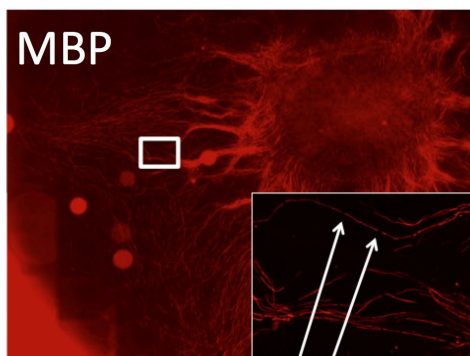
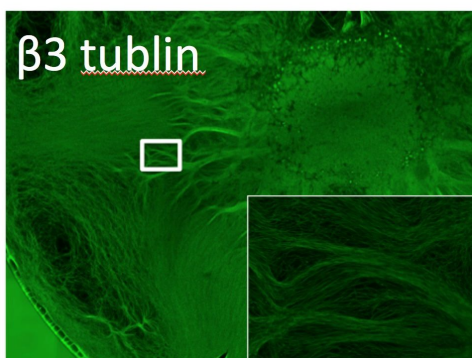
始する。その後さらに2週間後に髄鞘化が観察される。

(2) 培養モデルの髄鞘化の確認

この培養モデルの髄鞘化の程度を観察するために、免疫組織化学的手法、電子顕微鏡を用いて髄鞘を観察を行った。まず髄鞘に局在するミエリン塩基性蛋白 (myelin basic protein; MBP) の発現を免疫組織化学的に観察したところ、アスコルビン酸添加後3日目から MBP の発現が認められ、最終的には図2のように、非常に多くの軸索で、高い MBP の発現が得られることが観察された。詳細な観察により、免疫組織化学的にも *in vivo* の有髄神経で観察されるランビエ絞輪が形成されることが分かった。

さらに、この培養モデルを電子顕微鏡を用いてさらに詳細に観察したところ、図3のように、軸索に髄鞘が巻きついている様子が観察され、ラットの座骨神経とほぼ同様の形態をとっていることが観察された。

< 免疫組織学的観察 >



ランビエ絞輪

図2; 後根神経節の explant culture の開始後28日目での 3Tublin、MBP の免疫組織化学的観察

< 電子顕微鏡を用いた観察 >

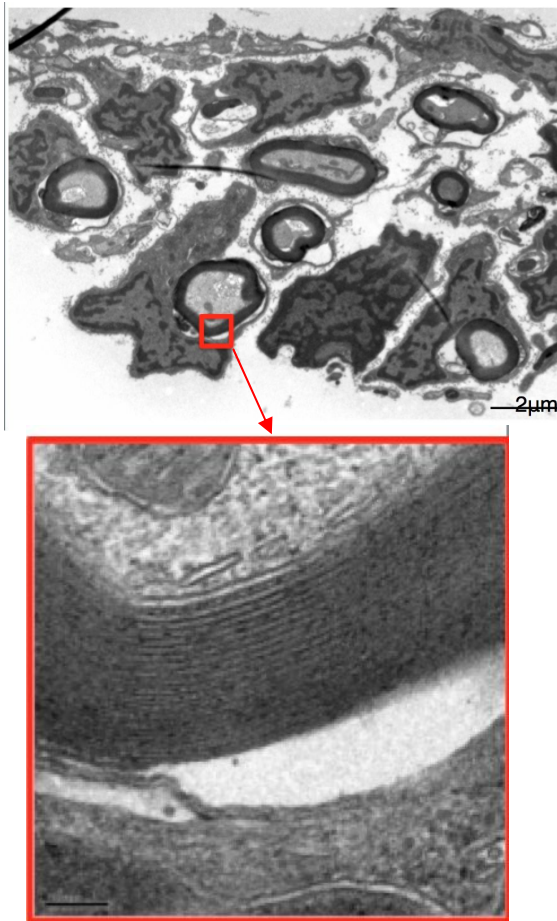


図3: 後根神経節の explant culture 開始後28日目での電子顕微鏡での観察

(3) CMT 培養モデルの確立及び食品由来化合物のスクリーニング

(2)で髄鞘化が効率よく観察された髄鞘化培養モデルを用いて、CMT での病態を再現するために、CMT の原因遺伝子である変異 *PMP22* 遺伝子あるいは野生型 *PMP22* 遺伝子をこの培養モデルにエレクトロポレーションを用いて遺伝子導入した。しかし、遺伝子導入を行うと、培養細胞が生存できなくなることが分かった。そこで、同様の遺伝子について、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入を試みた。この方法では、細胞は培養開始後28日まで生存することが可能であった。しかし、(2)と同様の方法で、免疫組織化学的な観察を行ったところ、図2とほぼ同様に MBP の染色性が確認できることが判明し、髄鞘化が障害される CMT の培養モデルとしては適していないことが判明した。原因としては、遺伝子導入後アスコルビン酸による髄鞘化の分化誘導を行うまでも14日間培養を行うため、培養中にシュワン細胞が増殖することから、導入遺伝子の発現が低下することが考えられた。そこで、分化誘導を行った直後にレンチウイルスベクターによる遺伝子導入を試みた。しかし、アスコルビン酸投

与直後は培養系が不安定な状態になるためか、細胞が生存できず、遺伝子導入によってCMTの培養モデルを確立することは、難しかった。

この問題点も踏まえて、今後は高い遺伝子発現効率を維持しながら、細胞が生存可能な培養条件を検討する必要がある。まずは、培養開始後に遺伝子導入を行う日程として、培養開始後何日目で行うのが適切か検討をする必要がある。

CMT 培養モデルが確立できた際には、オートファジー誘導や小胞体ストレスを改善させる可能性のある食品由来の21種類の化合物が、髄鞘化を誘導することができるかを明らかにしていきたいと考えている。

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

1) 植松有里佳, A New model of myelination: morphological findings and attempts to reproduce CMT, 第58回日本小児神経学会学術集会, 2016年6月15~17日 東京

2) Y Numata-Uematsu, A New model of myelination: morphological findings and attempts to reproduce CMT, 14th International Child Neurology Congress, 2016年5月1~5日 アムステルダム(オランダ)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

東北大学医学部小児科

<http://www.ped.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植松 有里佳 (Yurika, Numata-Uematsu)

東北大学・大学病院・特任助手

研究者番号：70735779