

平成21年 6月 5日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19591000
研究課題名 (和文) Desert Hedgehog 遺伝子変異による末梢神経障害の病態解明と治療法開発
研究課題名 (英文) Investigation for the pathogenesis of neurological disorders due to Desert hedgehog gene mutation and development of new treatment
研究代表者 梅原 藤雄 (UMEHARA FUJIO) 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師 研究者番号：20271140

## 研究成果の概要：

ヒト DHH 遺伝子発現プラズミドの作成に成功し、COS 細胞への遺伝子導入による DHH 蛋白の産生・分泌を確認したこと。さらに、このプラズミドをラット坐骨神経損傷モデルにおいて、intraneural injection を行い、その効果を検討した。ラット末梢神経損傷モデルにおいて、pDHH の神経束内注入法では、一部には再生促進効果がみられたものの、対象に比べ統計学的に優位な再生促進効果は確認できていない。より有効な投与方法の改良が今後の課題である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：Desert hedgehog, 末梢神経障害, 遺伝子治療, シュワン細胞, 遺伝子変異

## 1. 研究開始当初の背景

*Desert hedgehog (Dhh)* 遺伝子は Hedgehog ファミリーに属し、脊椎動物において末梢神経及び精巣分化に重要な役割を果たしている。ヒト *DHH* 遺伝子変異では、Minifascicle 形成を特徴とする末梢神経障害 (Minifascicular neuropathy) と 46XY 性腺形成不全症を来す。我々は世界で初めて DHH 遺伝子変異による新しい遺伝性末梢神経障害を報告し、新しい疾患単位であることを

明らかにした ((Acta Neuropathologica 1999, Am J Human Genet 2000, Mol Cell Biol 2004)。マウスでは、Dhh 及びその受容体である Patched 2 は末梢神経及び性腺において胎児期—新生児期にかけて強く発現しており、器官形成に重要な役割を果たしていると推定されていた。現在までに我々は、Dhh シグナル伝達経路が、末梢神経の発生・恒常性の維持・再生過程に関与していることを明らかにしてきた。(Sepideh NB, Umehara F, et al.

J Neurobiol 2006, Sharghi-Namini, S., Umehara, F., et al. J Neurosci 2006, Umehara F., et al. Behav Brain Res. 2006)。また、Dhh KO マウスでは、末梢神経周膜の形成以外にも、有髄線維及び無髄神経線維、血管形成にも影響していることを見出し、Dhh が末梢神経全体の形成に関与していることも明らかにした。Hedgehog は分泌型蛋白で、種々の臓器・器官の形態形成に重要な役割を果たすことから、近年これらの分子を用いた再生医療への応用が注目されている。Hedgehog ファミリーのひとつである Sonic hedgehog (SHH) は中枢神経、心臓、血管などの臓器形成に関与する。実験的糖尿病ラットモデルでは、末梢神経における Dhh mRNA の発現が低下しており、リコンビナント SHH 蛋白の全身投与により、末梢神経障害機能の回復が促進されることが報告された。さらに、2005 年実験的心筋虚血モデルにおいて、虚血心筋部位で再生過程に Shh/patched 1 の発現が亢進していることが示され、さらにこの部位に Naked SHH DNA を局所注入することにより、虚血部位の縮小、心機能の改善を促進させることが出来ることが報告された (Kusano et al. Nat Med 2005)。このモデルで示された現象は、先に我々が末梢神経損傷後の再生過程において Dhh/Patched 2 の発現が平行して亢進しているのと同じ現象である。末梢神経系においては Dhh が主に発現していることから、Dhh 分子を末梢神経障害の局所に発現させることにより、末梢神経障害の再生を促進させることを示唆している。しかもこれは糖尿病性末梢神経障害のような多発性神経炎のような例でも応用が期待できる (Calcutt et al. J Clin Invest 2003) ことから、広く末梢神経障害の再生促進効果が期待出来る。

## 2. 研究の目的

Hedgehog ファミリーのひとつである Sonic hedgehog (Shh) が心筋虚血部に過剰発現し、SHH 発現プラズミドを局所に注入することにより、虚血部位の縮小、機能回復の促進を可能にすることが報告され、Hedgehog 遺伝子導入による再生医療への応用が期待されてい

る。本研究は、DHH 発現プラズミドの移入による末梢神経障害の新たな治療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1. ヒト *DHH* 遺伝子発現プラズミド (phDHH) の末梢神経損傷モデルへの移入

昨年度、ヒト *DHH* 遺伝子発現プラズミドの作成に成功し、COS 細胞への遺伝子導入による DHH 蛋白の産生・分泌を確認したことを報告した。本年度は、このプラズミドをラット坐骨神経損傷モデルにおいて、intra-neural injection を行い、その効果を検討した。

1) プラズミドの作成：ヒト *DHH* 遺伝子 amino-terminal domain coding sequence を pCMV-Script PCR mammalian expression vector (Stratagene) に組み込んだ。以下の 3 種類のプラズミドを作成した。86：DHH N 末端がストップ コドン、87：DHH N 末端に His を 6 個標識、最後がストップコドン、DHH-myc：DHH N 末端に myc を標識し、最後がストップコドン。3 種の *DHH* 遺伝子を組み込んだ pCMV-Script PCR mammalian expression vector を COS 細胞に transfection し、その cell lysate 及び culture supernatant を用いて、Western blot を行い、cell lysate における蛋白の発現、細胞外分泌を確認している。

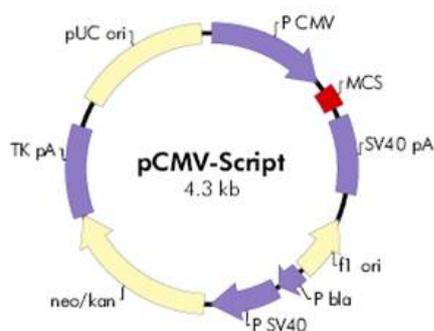
### 2) 末梢神経損傷モデルの作成：Lewis rat

8-10 週齢を用いた。ペントバルビタール腹腔内投与を行い、麻酔下に下肢皮膚を切開し、坐骨神経を露出し、2 分間ペンアンで圧迫を加えた。圧迫解除後、圧迫部位及びその近傍の神経束内にプラズミドを注入し、皮膚を縫合した。対照として反対側坐骨神経に同様の損傷を加えた後、*DHH* 遺伝子を含まないプラズミド、または生食を同量注入した。以後臨床症状の観察を行い、2 週後または 4 週後に深麻酔下に死亡せしめ、坐骨神経を採取し、

病理学的検討を行った。また、2週目に一部のラットにおいて電気生理学的検査を行った。

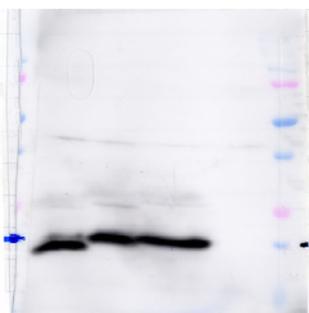
#### 4. 研究成果

1) Cell lysate 及び culture supernatant において、Western blot で約 19 kDa の蛋白を確認した。これらは抗 His 抗体及び抗 Myc 抗体によってそれぞれ特異的に認識された。この結果により、この DHH 発現ベクターを transfection した細胞において、DHH 蛋白 (N 末端) を産生・分泌することを確認した。



DHH 発現ベクター

Dhh Dhh Dhh N M  
His myc



Anti-Dhh (N-terminus) ab (N-19)

Western blot

2) ラット末梢神経損傷モデルにおける神経再生促進効果：phDHH 投与坐骨神経では、生食投与よりも神経線維の再生効果が促進されている例が存在したが、個体差があり、統計学的有意差は得られなかった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

1. Umehara, F\*, Hagiwara, T, Yoshimura,

M, Higashi, K. Arimura, K. Enlarged, multifocal upper limb neuropathy with HTLV-I associated myelopathy in a patient with chronic adult T-cell leukemia. *J Neurol Sci* 266:167-170, 2008. (査読有り)

2. Hayashi D, Kubota R, Takenouchi N, Nakamura T, Umehara F, Arimura K, Izumo S, Osame M. Accumulation of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-infected cells in the cerebrospinal fluid during the exacerbation of HTLV-I-associated myelopathy. *J Neurovirool.* 14:459-63, 2008. (査読有り)

3. Yoshida Y, Ikematsu S, Muramatsu H, Sakakima H, Mizuma N, Matsuda F, Sonoda K, Umehara F, Ohkubo R, Matsuura E, Goto M, Osame M, Muramatsu T. Expression of the heparin-binding growth factor midkine in the cerebrospinal fluid of patients with neurological disorders. *Intern Med* 47:83-89, 2008. (査読有り)

4. Matsuura E, Umehara F\*, Nose H, Higuchi I, Matsuoka E, Izumi K, Kubota R, Saito M, Izumo S, Arimura K, Osame M. Inclusion body myositis associated with human T-lymphotropic virus-type I infection: eleven patients from an endemic area in Japan. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:41-49, 2008. (査読有り)

5. 梅原藤雄、有村公良. POEMS 症候群 (Crow-Fukase 症候群) *Clinical Neuroscience* 26:244-245, 2008 (査読なし)

6. **梅原藤雄** 自己免疫性末梢神経障害  
血液浄化療法—2008 腎と透析 第65  
巻増刊号 pp454-458, 2008 (査読なし)
7. Hirano R, Interthal H, Huang C,  
Nakamura T, Deguchi K, Choi K,  
Bhattacharjee MB, Arimura K, **Umehara**  
**F**, Izumo S, Northrop JL, Salih MA,  
Inoue K, Armstrong DL, Champoux JJ,  
Takashima H, Boerkoel CF  
Spinocerebellar ataxia with axonal  
neuropathy: consequence of a Tdp1  
recessive neomorphic mutation. EMBO J.  
26:4732-4743, 2007. (査読有り)
8. **Umehara F\***, Nose H, Saito M, Fukuda M,  
Ogino M, Toyota T, Yuhi T, **Arimura K**,  
Osame M. Abnormalities of spinal  
magnetic resonance images implicate  
clinical variability in human T-cell  
lymphotropic virus type I-associated  
myelopathy. J Neurovirol 13:260-267,  
2007. (査読有り)
9. Hirano R, Interthal H, Huang C,  
Nakamura T, Deguchi K, Choi K,  
Bhattacharjee MB, **Arimura K**, **Umehara**  
**F**, Izumo S, Northrop JL, Salih MA,  
Inoue K, Armstrong DL, Champoux JJ,  
Takashima H, Boerkoel CF  
Spinocerebellar ataxia with axonal  
neuropathy: consequence of a Tdp1  
recessive neomorphic mutation. EMBO J.  
26:4732-4743, 2007 (査読有り)
10. **梅原藤雄**、**有村公良**. 末梢神経障害の治  
療の進歩 神経治療学 24 : 445~448,

2007(査読なし)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅原 藤雄 (UMEHARA FUJIO)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師  
研究者番号 : 20271140

(2) 研究分担者

橋口 照人 (HASHIGUCHI TERUTO)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教  
授  
研究者番号 : 70250917

有村 公良 (ARIMURA KIMIYOSHI)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教  
授  
研究者番号 : 30140908

(3) 連携研究者

なし