

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08270

研究課題名(和文) Direct reprogramming法を用いた先天性大脳白質形成不全症の解析

研究課題名(英文) Analysis using direct reprogramming method for congenital hypomyelinating leukodystrophy

研究代表者

植松 貢 (Uematsu, Mitsugu)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90400316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：先天性大脳白質形成不全症の原因として低分子RNAの異常が報告されているが病態は不明である。本研究では2つの方法を用いてその解析を行った。まず線維芽細胞から神経細胞への分化を簡便に誘導するDirect reprogramming法を用いた解析を行い、症例の神経細胞ではコントロールと比して分化しづらく早期にアポトーシスを起こすことを明らかにした。さらに、ラット脊髄後根神経節細胞の初期培養法を用いてPNPT1、POLR3A等の低分子RNA関連遺伝子のノックダウン解析を行い、髄鞘化障害や軸索成長障害が起こることを確認した。今後これらの実験解析法を用いて治療法の検索などに応用していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的独自性について、まず低分子RNAの異常が大脳白質形成不全症に関連することをPNPT1遺伝子変異症例の線維芽細胞を用いた解析によって明らかにしたことである。さらに、iPS細胞などと比較して簡便なDirect reprogramming法を用いて解析する系を確立できたことが、今後の大脳白質形成不全症の機能解析や、治療法の探索にも役立つ。低分子RNAの異常に関与するPOLR3A、POLR3B遺伝子異常は症例数も多いため、本研究により神経細胞の異常が起こること確認できたことは、臨床へのインパクトも大きい。

研究成果の概要(英文)：Abnormalities in small RNAs have been reported as a cause of congenital hypomyelinating leukodystrophy, but the pathogenesis is unknown. In this study, we used two methods to analyze the pathogenesis of the disease. First, we used direct reprogramming, a simple method to induce differentiation of fibroblasts into neurons, and found that the neurons in the case were less differentiated than those in controls and apoptotic at an early stage. In addition, we performed knockdown analysis of low-molecular-weight RNA-related genes such as PNPT1 and POLR3A using an early culture method of rat spinal dorsal root ganglion cells, and confirmed that myelination and axonal growth defects occur. We plan to apply these experimental analysis methods to the search for treatment methods in the future.

研究分野：小児神経学

キーワード：先天性大脳白質形成不全症 ミトコンドリア 低分子RNA Direct reprogramming

## 1. 研究開始当初の背景

先天性大脳白質形成不全症は、精神運動発達障害や痙性麻痺など多彩な臨床症状を呈し、頭部MRIのT2強調画像で白質の高信号を特徴とする疾患群である。10万人あたり1.4名程度の発症率とされ、髄鞘を形成する構造蛋白をコードする *PLP1* 遺伝子異常による Pelizaeus-Merzbacher 病が最も多い(Numata et al. J Neurol 2014; 261: 752-58)が、全エクソーム解析を含む詳細な遺伝子解析を行っても約1/3は原因不明である(Arai-ichinoi, Uematsu et al. Hum Genet. 2016; 135:89-98)。他の原因遺伝子として *POLR3A* および *POLR3B* 遺伝子が知られており、低分子RNAの転写を担うRNA polymerase III をコードしていることから、低分子RNAの減少が大脳白質形成に関連する可能性が示唆されている(Saito et al. Am J Hum Genet. 2011; 89: 644-651)。しかし、その発症機序に関する報告はほとんどなされていないのが現状である。

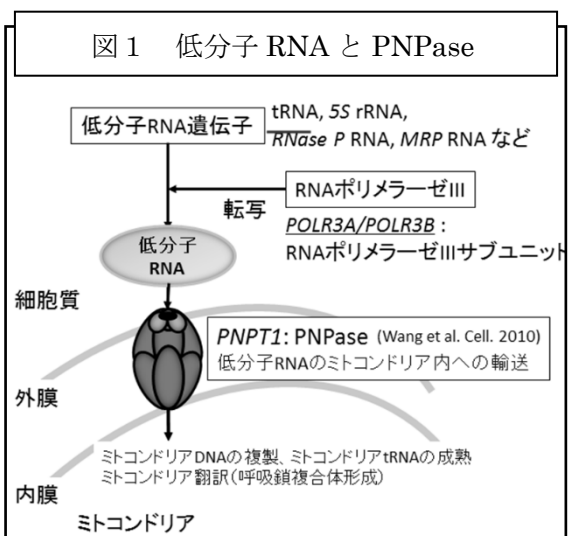
遺伝子異常の機能解析を行うにあたり、患者由来の細胞を用いる方法が望ましく、iPS細胞を用いた研究が多くなされているが、時間と費用が多くかかる問題点がある。2013年に線維芽細胞を用いて神経細胞への直接分化を行う方法(Direct reprogramming)が報告され(Xue et al. Cell 2013; 152: 82-96)、線維芽細胞を用いて神経細胞の機能解析を簡便に行うことが可能となった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、低分子RNAに関連する *PNPT1* や *POLR3B* などの遺伝子異常が、脳の神経細胞やオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞形成にどのように影響するのか解析することである。申請者はこれまで先天性大脳白質形成不全症の遺伝子解析を多数例で行い、平成27年に姉弟例において、新規候補遺伝子 *PNPT1* に複合ヘテロ接合変異を同定した。本遺伝子は核由来の低分子RNA (RNaseP RNA, MRP RNA, 5S rRNA, tRNAs) をミトコンドリア内へ輸送する酵素 PNPase (polynucleotide phosphorylase) をコードしており、ノックアウトマウスは胎生致死となる重要な酵素である(図1)。

症例の解析を詳細に行った結果、PNPaseの低下、ミトコンドリア呼吸鎖の機能低下、そして低分子RNAの細胞質からミトコンドリア内への輸送能低下を証明し、*PNPT1* 遺伝子を大脳白質形成不全症の原因遺伝子として論文に報告した(Sato, Uematsu et al. Clin Genet. 2018; 93: 242-247)。

本遺伝子のさらなる解析のためにCRISPER/Cas9システムを用いて姉妹例の遺伝子変異導入を持つモデルマウスの作成を試みたが困難であり、遺伝子変異の脳神経やグリア細胞などへの影響を解析することが難しく



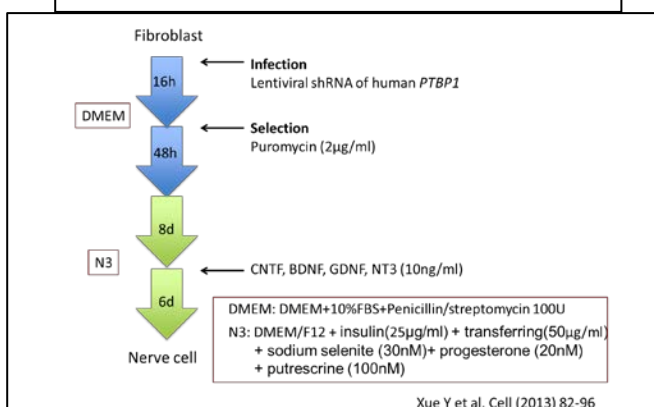
った。iPS 細胞による解析も検討したが、神経細胞への分化には多くの時間とコストが必要である。そこで本研究では、①簡便な Direct reprogramming 法により PNPT1 遺伝子異常症例の線維芽細胞から、神経細胞に加えてオリゴデンドロサイトなどへの分化誘導する系を確立しその病態解析を行う、②ラットやマウスの中樞神経や末梢神経の培養組織において PNPT1 や POLR3B などの遺伝子をノックダウンして病態解析を行う、③ ①の系を用いた簡便な治療薬スクリーニングの系を確立する、ことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 患者由来線維芽細胞から神経細胞

やオリゴデンドロサイトなどへの分化誘導する系を確立し病態解析を行う。図2のように既報(Xue Y et al. 2013)に従い PTBP1 遺伝子を shRNA を用いてノックダウンして培養することで、線維芽細胞から神経細胞への分化誘導系を確立する。そして正常コントロールと比して神経細胞の形態や生存率などに異常があるかどうか、解析を行う。

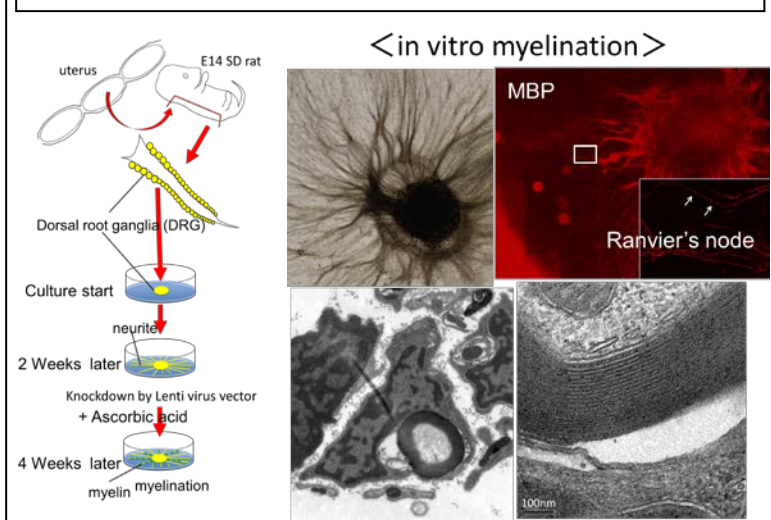
図2 線維芽細胞から神経細胞への分化



#### (2) in vitro myelination

の手法を用いて、ラットの末梢神経の培養組織において PNPT1 や POLR3B などの遺伝子をノックダウンして髄鞘化や軸索の成長障害について解析する。髄鞘化はオリゴデンドロサイトが神経細胞の軸索にコンパクトな髄鞘を形成することで完成するため、その過程の解析

図3 In vitro myelination の方法と結果 (正常の場合)



が必要である。このために、ラットの胎児由来の後根神経節を用いた末梢神経髄鞘化培養モデル(図3)を用いて、目的の遺伝子をshRNAを用いてノックダウンする。この方法では、PNPT1遺伝子の影響だけでなく、POLR3B遺伝子など低分子RNAの輸送に関連する遺伝子の機能喪失による影響も解析可能となる。

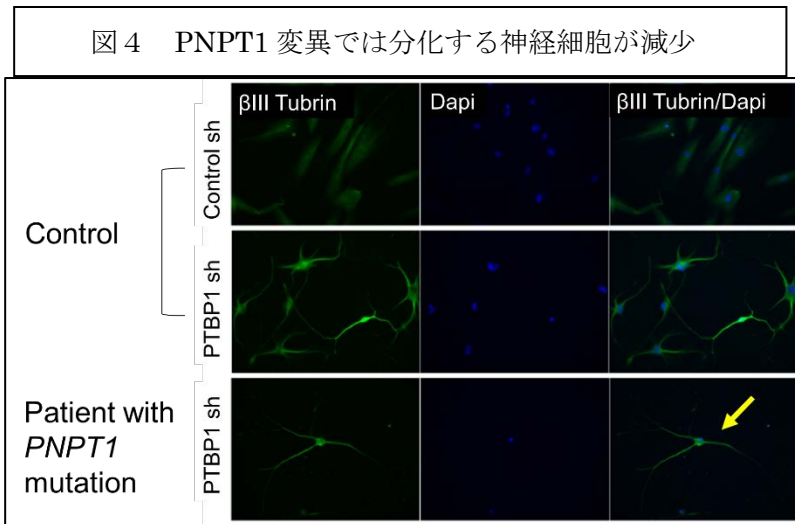
#### (3) 簡便な治療薬スクリーニングの系を確立する。1)、2)で各細胞や髄鞘化に障害が確認さ

れた場合には、その回復を期待できる治療薬をスクリーニングし、治療薬の候補を見出すことを目指す。具体的には、1)の培養細胞系に薬剤を添加し、神経細胞死に導かれない薬剤や、オリゴデンドロサイトの分化が促進される薬剤をスクリーニングする。

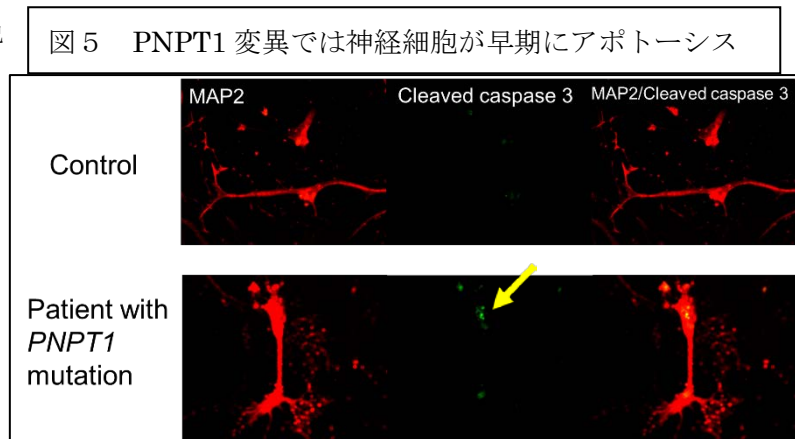
#### 4. 研究成果

##### (1) Direct reprogramming 法による線維芽細胞から神経細胞へ分化する系の確立

患者由来線維芽細胞から神経細胞へ Direct reprogramming 法を用いて分化誘導する系の確立に成功した。解析した結果、コントロールの患者の線維芽細胞からは、順調に神経細胞へ分化し、各種解析が可能な系を確立できた一方、患者由来の線維芽細胞はおそらくミトコンドリア機能障害のために増殖が非常に遅く、神経細胞への分化もわずかとなった (図4)。



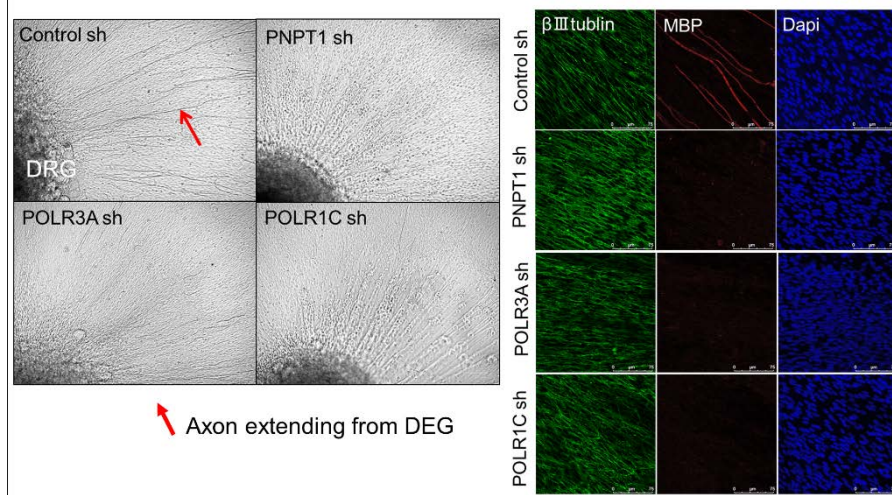
さらに Direct reprogramming 法で神経細胞に分化すると、早期にアポトーシスに陥ることが分かった (図5)。病態を説明する重要な知見を得ることができた一方、早期に神経細胞が死んでしまうため、さらなる病態解析に必要な免疫染色やタンパク定量などの解析が困難であった。



##### (2) in vitro myelination による低分子 RNA 関連遺伝子の髄鞘化への影響

ラットの脊髄後根神経節細胞を培養し、末梢神経の培養組織において低分子 RNA に関連する遺伝子をノックダウンして解析を行った。その結果、PNPT1 や POLR3A, POLR1C を shRNA でノックダウンして培養すると、後根神経節からの神経軸索の成長が障害され (赤矢印)、さらに髄鞘も形成されない (MBP 発現の低下) ことを、免疫染色にて確認した (図6)。同様の解析を中枢神経でも行うため、ラットの脳から採取した脳細胞の培養でオリゴデンドロサイトの観察を試みたが、系の確立が困難であった。

図6 低分子 RNA 遺伝子変異で髄鞘化・軸索成長が障害



今後、上記の系を用いて低分子 RNA 輸送を改善するような薬物スクリーニングを行う予定である。また、最近 Direct reprogramming 法をさらに改良して神経細胞のみならず白質を形成するオリゴデンドロサイトなど他の脳細胞への分化を行った報告がなされた (Xiao et al. Nature Communication 2018 ; 9: 2865)。疾患の解析に最適な系を更に検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mitsugu Uematsu, Yurika Numata-Uematsu
2. 発表標題 Impairment of small RNAs into mitochondria can cause abnormal myelination and neuronal cell death
3. 学会等名 Neuroscience 2019(Chicago) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植松有里佳、植松貢、井上健、呉繁夫
2. 発表標題 先天性大脳白質形成不全症における末梢神経障害の病態解析
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会（名古屋）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	植松 有里佳 (沼田有里佳)  (Uematsu Yurika)  (70735779)	東北大学・大学病院・助教    (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------