

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月30日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390103

研究課題名（和文）複合型神経堤症候群 PCWH の病態解明による SOX10 アレル親和性の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular basis for the complex neurocristopathy PCWH and mechanisms underlying SOX10 allelic affinity

研究代表者

井上 健（INOUE KEN）

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第二部

研究者番号：30392418

研究成果の概要（和文）：ある同一の遺伝子内の異なる変異が、異なる表現型を呈する別個の疾患の原因となる現象をアレル親和性と呼ぶ。アレル親和性の分子基盤の理解には、各疾患の分子病態の解明が必要である。我々は、転写因子SOX10の変異が、アレル親和性効果によりWS4とPCWHの2つの異なる疾患を引き起こすことを明らかにし、*in vitro*での分子病態解析により、SOX10におけるアレル親和性の分子基盤を明らかにしてきた。本申請では、さらにBACトランスジェニックマウスの手法を用いてPCWHの組織細胞レベルでの分子病態を明らかにし、*in vivo*でのSOX10アレル親和性の分子基盤を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：*SOX10* mutations cause either Waardenburg-Hirschsprung disease (WS4) or Peripheral demyelinating neuropathy, Central dysmyelinating leukodystrophy, Waardenburg syndrome, and Hirschsprung disease (PCWH). We have been studying the molecular mechanisms underlying allelic affinity observed in *SOX10* mutations by *in vitro* analyses. In this proposal, we sought to determine the cellular pathology of PCWH using BAC transgenic mice and to clarify the molecular basis for the allelic affinity *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：分子遺伝学、BAC トランスジェニックマウス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、多くの遺伝性疾患の原因遺伝子が同定され、それらの変異と疾患表現型との間の多様な関連性が明らかになってきている。すなわち、異なる遺伝子（座）の変異が同一の臨

床表現型を呈する場合（locus heterogeneity）や、逆に同じ遺伝子の異なる変異が、異なる疾患表現型を呈する場合（アレル親和性 allelic affinity）などが知られている。こういった現象の実例は、ヒト

遺伝性疾患において数多く報告されているが、なぜそのような多様性が生ずるのかという理由については、依然多くの場合が不明である。

アレル親和性は、ある遺伝子の異なる変異が細胞や臓器レベルでの発現過程の中で表出する変異の組織分子病態の相違により規定される。すなわち、アレル親和性の分子基盤の解明は、変異によって起こる疾患の病態の解明に他ならず、この理解は、例えば関連する疾患の治療法の開発研究において、何を標的分子とするべきかを決定するために、重要な知見となるはずである。

SOX10 は、神経堤と中枢神経系の髄鞘の発生と維持に重要な役割を果たす転写因子である。我々は、SOX10 変異がアレル親和性効果を呈し、異なる2つの疾患、すなわち Waardenburg-Hirschsprung 病 (WS4: OMIM 277580) と、より複合的かつ重症な PCWH (OMIM 609136) を引き起こすことを報告した。PCWH は、Peripheral demyelinating neuropathy、Central dysmyelinating leukodystrophy、Waardenburg 症候群、Hirschsprung 病の4つの異なる症候群を合併する特異的な疾患である。これまで報告された症例数が30に満たない稀な疾患ではあるが、我々が第1例の報告と原因遺伝子の同定を行い、その疾患概念を確立した後、現在まで症例を積み重ねてきている。

加えて我々は、WS4 と PCWH に関する *in vitro* での病態解明の研究を行っており、それらの結果、SOX10 のアレル親和性については、現在のところ下記のごとく理解されている。①WS4 の原因遺伝子変異は、SOX10 の上流コーディングエクソン内の早期終止コドンとなる変異が大多数で、これらはを含む mRNA はナンセンス介在分解機構 (NMD) により分解・消失するため、蛋白として翻訳されない。従って、これらのアレルは機能喪失 (LOF) となり、細胞レベルではハプロ不全が分子病態である。②PCWH 原因遺伝子変異の大多数を占める最終エクソン内の早期終止コドンとなる変異は、NMD を回避するため、C 末側が欠失した変異蛋白が安定に翻訳・発現される。この短い変異蛋白は、転写活性を持たないが、野生型より強い DNA 結合能をもつため、優性阻害 (DN) がその分子病態であると考えられる。③正常な終止コドンが破壊され、3' 端非翻訳領域からの翻訳が80残基以上延長する PCWH の変異は、前述の早期終止コドンとは全く別個の病態によるもので、翻訳延長領域内に存在する11残基のポリペプチドが新たな毒性機能を持つ機能獲得 (GOF) がその病態であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

上述の病態は単純化した *in vitro* で細胞実験系での所見をもとにしたものであり、必ずしも生体内での病態をすべて反映しているとは言えない。特に、PCWH の特徴である中枢および末梢神経系の髄鞘の異常がどのように起こるのかという理由は、全く解明されていない。従って、生体内でどのような病態を呈するのかを実証することは、SOX10 のアレル親和性の理解のために、必須の過程である。そこで我々は、髄鞘等のグリア系組織の解析に適し、遺伝子改変が容易なマウスを用いることにより、PCWH の病態解明と SOX10 のアレル親和性の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

BAC トランスジェニック (Tg) は、SOX10 の変異モデルの解析に最も有効な方法の一つである。SOX10 の変異に基づくヒトの疾患の病態は、WS4 については LOF、PCWH については DN と GOF と考えられている。しかし、実際の患者における PCWH の表現型は、LOF (ハプロ不全) に DN あるいは GOF が合わさった効果を観察していると考えられる。従って、DN あるいは GOF の効果のみ観察するためには、モデルから LOF の効果を取り除く、すなわち2つの野生型アレルに Tg として変異アレルを加えるという方法が適していると思われる。特に、GOF に関しては、その有用性は高い。また、遺伝的致死度が高い優性遺伝形式をとる PCWH のモデルマウスをノックイン等の方法で作成すると、LOF+GOF (もしくは DN) となり、ヘテロ接合体での生殖に至らず、その系統維持が困難になると思われる。これらの理由により、我々は Tg の実験系を用いるのが適当であると考えた。SOX10 はそのプロモーターおよびエンハンサー領域がゲノム広範囲に渡って存在しているため、コンベンショナルなプラスミドベースの Tg が使用できない。そこで我々は、大きなゲノム断片を含む bacterial artificial chromosome (BAC) に変異体を組み替え、これを用いて Tg モデルを作成することにした。本研究計画は、下記を目標に行われる。

- ① SOX10 の GOF および DN 変異を組み込んだ BAC クローンを作成し、これを用いて BAC Tg マウスモデルを作成することにより、PCWH の病態動物モデルを確立する。
  - ② BAC Tg マウスの解析により、組織レベルでの変異型 SOX10 の分子機構を明らかにし、特に PCWH に特異的である中枢および末梢神経系の髄鞘形成の異常についての病態を明らかにする。
- これらの結果より SOX10 遺伝子変異疾患で見られるアレル親和性の分子基盤を明らかにする。

#### 4. 研究成果

2009年度は、PCWH マウスモデルの作成および、PCWH マウスモデルの評価の2点について研究を行った。PCWH マウスモデルの作成については、これまでに開始している

1400de112 延長型変異導入マウスの作成を行った。その結果、解析用ラインとして2ラインを確立した。PCWH マウスモデルの評価については、トランスジーン発現パターンの評価を行なうとともに、PCWH に関与する表現型の評価、とくに中枢および末梢神経系の髄鞘における形態的な評価を中心に行なった。

2010年度は、引き続きPCWH マウスモデルの評価、およびPCWH マウスモデルの病態の解明の2点について研究を行った。PCWH マウスモデルの評価については、表現型がTgコピー数依存的に変化することを見いだした。PCWH マウスモデルの病態の解明については、胎生期の末梢神経系の発生期におけるシュワン細胞の分化の異常、生後の中枢神経系のオリゴデンドロサイトの成熟の遅延などの所見が得られ、本モデルマウスの神経学的な病態が明らかになった。

2011年度は、昨年度に引き続きPCWH マウスモデルの病態の解明について研究を行った。PCWH マウスモデルの病態の解明については、中枢神経系においては、Tgコピー数依存的にMBPの発現の低下が見られた。Oligo2陽性細胞数は変化ないことから、オリゴデンドロサイトの成熟の遅延が生じているものと思われた。また、末梢神経の髄鞘化の遅延も認められた。さらに脊髄からDRGへOligo2陽性細胞の異所性遊走を認め、中枢-末梢境界の破綻をきたしていることが示唆された。

#### 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9件)

1. 井上 健, 小坂 仁 Pelizaeus-Merzbacher 病-Double, Double...and Trouble- 2009 小児科 50 (7) 増刊号 小児疾患における臨床遺伝学の進歩 ; 881-887  
[http://www.kanehara-shuppan.co.jp/journal/detail.html?kubun=&code=047512009065&hakkou\\_nengetsu=200906](http://www.kanehara-shuppan.co.jp/journal/detail.html?kubun=&code=047512009065&hakkou_nengetsu=200906) 査読なし
2. Osaka H, Hamanoue H, Yamamoto R, Nezu A, Sasaki M, Saitsu H, Kurosawa K, Shimbo H, Matsumoto N, Inoue K. Disrupted SOX10 regulation of GJC2 transcription causes Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Ann Neurol*. 2010;68:250-4. DOI: 10.1002/ana.22022 査読あり
3. Miyahara K, Kato Y, Koga H, Lane G J, Inoue T, Akazawa C, Yamataka A. Abnormal enteric innervation identified without histopathologic staining in aganglionic colorectum from a mouse model of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*. 2010;45:2403-2407. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2010.08.039 査読あり
4. 井上 健 Low copy repeatとゲノム病 遺伝子診療学 2010 日本臨床 68増刊号8 ; 80-86.  
[http://www.nippon-rinsho.co.jp/bac/knum/z\\_mokuji/6808idensi.html](http://www.nippon-rinsho.co.jp/bac/knum/z_mokuji/6808idensi.html) 査読なし
5. Shibata S, Yasuda A, Renault-Mihara F, Suyama S, Katoh H, Inoue T, Inoue YU, Nagoshi N, Sato M, Nakamura M, Akazawa C, Okano H. Sox10-Venus mice: a new tool for real-time labeling of neural crest lineage cells and oligodendrocytes. *Mol Brain* 2010;3:31 DOI: 10.1186/1756-6606-3-31 査読あり
6. Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai K, Imoto Y, Sakashita M, Kurosaka F, Akasawa A, Yoshihara S, Kanno N, Yamada Y, Shimojo N, Kohno Y, Suzuki Y, Kang MJ, Kwon JW, Hong SJ, Inoue K, Goto Y, Yamashita F, Asada T, Hirose H, Saito I, Fujieda S, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Nakamura Y, Nomura I, Tamari M, Arinami T, Yoshida T, Saito H, Matsumoto K. Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. *PLoS Genet*. 2011;7(7):e1002170 DOI: 10.1371/journal.pgen.1002170 査読あり
7. Saitsu H, Osaka H, Sasaki M, Takanashi JI, Hamada K, Yamashita A, Shibayama H, Shiina M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Doi H, Ogata K, Inoue K, Matsumoto N. Mutations in POLR3A and POLR3B

- encoding RNA polymerase III subunits cause an autosomal-recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. *Am J Hum Genet.* 2011 89(5):644-51 DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.10.003 査読あり
8. Takanashi J, Saito S, Aoki I, Barkovich J, Itoh Y, Inoue K. Brain N-acetylaspartate is increased in mice with hypomyelination. *J Magn Reson Imaging.* 2012;35:418-425. 10.1002/jmri.22817 査読あり
  9. Yu L-H, Morimura T, Numata Y, Yamamoto R, Inoue N, Antalfy B, Goto Y, Deguchi K, Osaka H, Inoue K. Effect of curcumin in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Mol Genet Metab* 2012;106:108-114. DOI: 10.1016/j.ymgme.2012.02.016 査読あり
- [学会発表] (計 13 件)
1. 井上直子、井上 由紀子、松田 芳樹、稲垣 真澄、井上 高良、後藤 雄一、高坂 新一、井上 健、赤澤 智宏 変異 Sox10トランスジェニックマウスを用いた複合型神経堤症候群PCWHの病態解析第34回日本神経科学大会 名古屋 2009,9,17
  2. 西川智子、松浦公美、古旗美恵子、橋本啓典、古谷憲孝、小坂仁、井上健、黒澤健司 Pelizaeus-Merzbacher病の遺伝カウンセリング 第54回日本人類遺伝学会総会 2009年9月25日 品川
  3. 井上健、小坂仁、黒澤健司、高梨潤一、山本俊至、岩城明子 先天性大脳白質形成不全症の全国疫学調査および遺伝子解析研究の推進について 第54回日本人類遺伝学会総会 2009年9月24日 品川
  4. K. Inoue, L-H. Yu, T. Morimura, H. Iwashita, R. Yamamoto, K. Deguchi, B. Antalfy, N. Inoue, H. Osaka, M. Itoh, Y. Goto. Curcumin partially mitigated the phenotype of Pelizaeus-Merzbacher disease caused by *PLP1* point mutations in mouse. Oct 23, 2009. 59<sup>th</sup> Annual meeting of the American Society of Human Genetics, Honolulu, HI.
  5. K Inoue, N Aoyagi-Inoue, Y Itoh, Y Inoue, Y Matsuda, M Inagaki, T Inoue, Y Goto, S Kohsaka, C Akazawa. Modeling a complex neurocristopathy, PCWH, in a *Sox10* BAC transgenic mouse. 18th Biennial Meeting of the International Society for Development Neuroscience. 8 June 2010, Estoril, Portugal
  6. K Deguchi, K Kubo, DL Armstrong, K Nakajima, K Inoue. Abnormal neuronal migration with ischemic brain injuries may cause cognitive dysfunction in extremely preterm infants. 18th Biennial Meeting of the International Society for Development Neuroscience. 8 June 2010, Estoril, Portugal
  7. 伊藤亨子、井上直子、井上由紀子、松田芳樹、稲垣真澄、高坂新一、後藤雄一、井上高良、赤澤智宏、井上 健 変異型 Sox10BACトランスジェニックマウスによる複合型神経堤症候群PCWHのモデル動物の作成 第55回日本人類遺伝学会総会 2010年10月30日 大宮
  8. K. Inoue, N. Aoyagi-Inoue, Y. Itoh, Y. Inoue Y. Matsuda, M. Inagaki, T. Inoue, Y. Goto, S. Kohsaka, C. Akazawa. Sox10 BAC transgenic mouse modeling a complex neurocristopathy, PCWH. 4 Nov 2010, 60<sup>th</sup> Annual meeting of the American Society of Human Genetics, Washington DC, USA.
  9. 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の診断基準と疾患分類の作成 第53回日本小児神経学会 横浜 2011、5、26
  10. Osaka H, Nezu A, Saitsu H, Kurosawa K, Matsumoto N, Inoue K. A SOX10 binding site mutation in GJC2 promoter causes Pelizaeus-Merzbacher-like disease. 第53回日本小児神経学会 横浜 2011、5、26
  11. Inoue K, Numata Y, Ohkubo T, Arima E, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi J, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H. A comprehensive nation-wide epidemiological survey for Pelizaeus-Merzbacher disease and associated disorders in Japan. 2011.10.13 12<sup>th</sup> International

Congress of Human Genetics.  
Montreal, Canada

12. 後藤玲央、小坂 仁、新保裕子、後藤雄一、井上 健 Pelizaeus-Merzbacher-like-disease における *GJC2* プロモーター変異の分子病態解析 第56回日本人類遺伝学会総会 2011年11月10日 千葉
13. 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の統合的研究の推進 第56回日本人類遺伝学会総会 2011年11月12日 千葉

〔図書〕(計 1 件)

1. Y Terakawa, YU. Inoue, J Asami, T Inoue. Bacterial Artificial Chromosome-Based Experimental Strategies in the Field of Developmental Neuroscience. In: Bacterial Artificial Chromosomes Edited by P Chatterjee. InTech 2011, pp103-108.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：トランスジェニック非ヒト動物  
発明者：赤澤智宏、井上高良、井上健、高坂新一  
権利者：同上  
種類：  
番号：特願 2009-001082  
出願年月日：平成 21 年 1 月 6 日  
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 健 (INOUE, KEN)  
独立行政法人国立精神・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

### (2) 研究分担者

井上 高良 (INOUE, TAKAYOSHI)  
独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 病態生化学研究部・室長  
研究者番号：20370984

出口 貴美子 (DEGUCHI KIMIKO)  
独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第二部・研究生