

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：29-16

課題名：グリア細胞側から神経疾患の病態メカニズムを解く

宮本 幸 (所属施設) 独立行政法人 国立成育医療研究センター 研究所
(所属・職名) 薬剤治療研究部 上級研究員

(研究成果の要約) 近年、神経細胞が病態の主体であると考えられた疾患においてもグリア細胞の関与が報告され始めているものの、国内製薬企業の創薬研究や各省庁の競争的資金は、未だ神経細胞をターゲットとした研究に偏っている傾向を否めない。Pelizeus-Merzbacher 病などの小児の先天性神経疾患に限って言うと、その多くが希少疾患であるため、その研究障壁はさらに高い。したがって、たとえ小規模でも地道かつ着実に基礎研究の分野から治療標的分子候補を提示する必要がある。

先天性中枢ミエリン変性症であるペリツェウス・メルツバッヘル病の原因遺伝子として、近年p1p1以外にも複数の遺伝子が明らかにされ、総称としてHypomyelinating leukodystrophy (HLD) と呼ばれるようになってきた。本年度は、11型HLD (HLD11) および15型HLD (HLD15) に焦点を絞り、病因遺伝子として明らかとなっている遺伝子のアミノ酸点変異体を作製し、インビトロにおいて細胞形態や細胞内小胞輸送などに及ぼす影響を検討した。並行して、インビボにおいて、病因遺伝子の点変異体のトランスジェニックマウスを作製し、解析を進めた。

1. 研究目的

近年、神経細胞が病態の主体であると考えられた疾患においてもグリア細胞の関与が報告され始めている。しかし、国内製薬企業の創薬研究や各省庁の競争的資金は、未だ神経細胞をターゲットとした研究に偏っている傾向を否めない。ペリツェウス・メルツバッヘル病などの小児の先天性神経疾患に限って言うと、その多くが希少疾患であるため、その研究障壁はさらに高い。また、ペリツェウス・メルツバッヘル病を例に挙げると、最近注目を浴びている人工多能性幹細胞等を用いた再生医療の治験が国外で行われたが、数年後有効性を確認できることなく、治験が終了した。したがって、たとえ小規模でも地道かつ着実に基礎研究の分野から治療標的分子候補を提示する必要がある。

申請者らは、「ミエリンの発生過程をシグナ

ル分子の挙動で説明する」ユニークな研究分野を開拓し、独自に開発したシュワン細胞と神経細胞の共培養技術を適用することで末梢ミエリンの初期から成熟期にわたる新規シグナル経路を明らかにしてきており、当該分野において非常に独創的な研究を行っている。その研究で培った技術や知識を応用し、近年中枢ミエリンの分野にも参入し、初代オリゴデンドロサイトと神経細胞共培養系の構築に成功した。この簡便なシステムは、化合物やshRNAによるスクリーニングに汎用でき、さらに中枢ミエリンの発生過程をインビトロで忠実に再現しているため、遺伝子改変動物を使用する研究の前段階に非常に有用な系である。

申請者らはミエリン発生の研究と並行してインビトロにおけるミエリン変性症の病態解析システムの開発も進めてきた。これにより、

治療薬探索研究を推し進める第一段階のスクリーニングを可能にするのみならず、動物への薬剤投与のみを用いた実験系では得にくい、発生過程における脱ミエリン現象の解析を可能にする。このように、国内外問わずに体系的な研究が行われていないミエリン発生という分野で、インビトロから始まるアプローチにより、他にない独創的な研究を行っており、不明な点が多く残されているグリア細胞の、特にミエリン形成過程を司る分子ネットワークの全容解明に貢献できることが期待される。また、そこから導き出される知見を軸に、ミエリン変性を呈する小児の先天性神経疾患（ペリツェウス・メルツバッヘル病など）、多発性硬化症、ギランバレー症候群、糖尿病性神経障害などの病態機構解明に向け、グリア細胞側からアプローチを行うことで、新たな知見を得られる可能性が非常に高い。

ペリツェウス・メルツバッヘル病を例に挙げると、主要原因遺伝子が同定され数十年が経過したが、病的な脱髄発症の分子機構に焦点を当てた研究は国内外で皆無である。その原因として、創薬を目的とした探索研究の手法そのものが存在しなかったことが挙げられる。そのため、特異的な治療薬の同定はされておらず、病態発症機構の解明も今後の研究にかかっていると見える。申請者らは、ミエリン発生の研究で得られる結果や技術を応用することで、治療薬探索研究を推し進める第一段階のスクリーニングを可能にするのみならず、動物への薬剤投与のみを用いた実験系では得にくい、発症過程における脱髄現象の解析を可能にする。これを応用することによって、脱髄疾患全般の根本的な分子病態メカニズムの解明に貢献できると考えている。

申請者らがこれまでの中枢ミエリン発生研

究の際に使用している初代オリゴデンドロサイトはペトリディッシュを用いた独自の方法で精製しており、胎生15日目のラット1匹から6cmディッシュ約15枚分のオリゴデンドロサイト前駆細胞を80-90%の純度で得ることができる。このオリゴデンドロサイトを胎児神経節から単離した神経細胞と共培養する。これにより形成されるミエリンは、電子顕微鏡下による観察でほぼ生体と同様の構造を示し、その成熟過程もインビボに近い経過をたどることが確かめられている。この高純度で精製したラットのオリゴデンドロサイトは増殖期において、レトロウイルスによる遺伝子導入が可能で、その効率も低くない。

当該年度は、ミエリン変性症のインビトロ病態モデルの構築し、細胞形態などに及ぼす影響を検討した。

2. 研究組織

研究者 所属施設

宮本 幸 (独) 国立成育医療研究センター
川崎智恵 (独) 国立成育医療研究センター

3. 研究成果

先天性中枢ミエリン変性症であるペリツェウス・メルツバッヘル病の原因遺伝子として、近年*p1p1*以外にも複数の遺伝子が明らかにされ、総称としてHypomyelinating leukodystrophy (HLD) と呼ばれるようになってきた。各々の遺伝子により、HLD1からHLD19と命名されている。これらは希少疾病であるがゆえ、現在までのところ有効な根治療法が開発されていない。本年度は、HLD11およびHLD15に焦点を絞り、そのインビトロモデル作製などに着手した。

HLD11の責任遺伝子産物である*Po1r1c*遺伝子は、RNAポリメラーゼのサブユニットの一つをコードし、リボゾームRNAやトランスファーRNAなどの転写に関与している。これまでに

HLD11において、*Polr1c*の2種類の点変異体が報告されている。HLDの病変の原因は神経細胞ではなく、主にオリゴデンドロサイトにあると考えられている。そこで、点変異体として報告されている、32番目のAsnをIleに置換した*Polr1c*(N32I)、および74番目のAsnをSerに置換した*Polr1c*(N74S)変異体を作製し、細胞内におけるPOLR1C蛋白質の挙動について検討を行った。結果として、野生型のPOLR1Cは核内に局在するのに対し、両点変異体はリソソーム小胞に凝集して点在していることが明らかとなった。さらに、点変異体を発現しているオリゴデンドロサイトでは、細胞分化が著しく阻害されていた（平岡ら、*Mol. Genet. Metab. Rep.* (2019)）。

一方、HLD15の責任遺伝子産物である*EPRS*遺伝子は、グルタミン酸—プロリンtRNA合成酵素をコードしており、他の7種類のtRNA合成酵素および3種類の足場タンパク質とともに、マルチサブユニットを形成することが知られている。そこで、*EPRS*変異体（R339X）をマウスオリゴデンドロサイト前駆細胞株FBD-102b細胞に導入し、野生型と変異型の細胞内局在を比較したところ、野生型は細胞質に局在するが、変異体はリソソームにおけるタンパク質分解経路の一部であるRab7に凝集して局在することが明らかとなった。また、変異によるオリゴデンドロサイトの分化への影響を調べたところ、野生型では通常の分化形態を示したのに対し、変異体遺伝子をステータブルに発現する細胞では、オリゴデンドロサイトの分化が阻害されることがわかった。

今後は、*Polr1c*および*EPRS*点変異体をコードするレトロウィルスを作製し、オリゴデンドロサイトに感染後、神経細胞との共培養を開始することで、インビトロ病態モデルを作製することを試みる。さらにそれらを利用して、病態を改善する効果を有する薬剤のスクリーニングへと進めていく予定である。

さらに、昨年度、HLD4の原因遺伝子であるHSPD1の点変異体のトランスジェニックマウスを作製したが、それらの技術と知見を応用する。すなわち、主要な病変細胞であるオリゴデンドロサイトに特異的に発現させるプロモーター下流にHLD11およびHLD15の責任遺伝子産物点変異体を配置し、通常のトランスジェニックマウス作製と同様に、マウス受精卵にインジェクションして、目的とするマウスを作製する。マウスの評価としては、免疫染色法や電子顕微鏡を用いた病態組織の検定などにより行う。今後、病態共培養系と新たに作製するモデルマウスを駆使することによって、中枢髄鞘形成不全疾患の新たな病態経路を明らかにすると共に、それに治療効果を示す臨床応用可能な生理活性物質の検出へと研究を進展させていく予定である。

4. 研究内容の倫理面への配慮

すべての実験動物及び遺伝子改変動物の取り扱いに関しては（独）国立成育医療研究センターの動物実験委員会で承認を得ており、3Rsを遵守し実験を行っている。

また、すべての組換えDNA実験に関しては（独）国立成育医療研究センターの組換えDNA実験委員会を通して承認を得ており、その規則を遵守し実験を行っている。