

# 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。

本年度は、中枢ミエリン形成過程の分子メカニズムを解明するため、オリゴデンドロサイトの発生期に特異的に発現している分子のmRNAアレイ解析を行い、候補分子の絞り込みを行った。その結果、これまで報告のなかった細胞内シグナル伝達経路の中心で働くヌクレオチド交換因子活性依存性のタンパク質が特異的に高発現していることを見いだした

一方、先天性中枢ミエリン変性症であるPelizeus-Merzbacher病の原因遺伝子として、近年 plp1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、HLD4およびHLD6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。さらに、HLDを模倣するインビボマウスモデル作製のため、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、当該マウスにおける脳梁や嗅球などの髄鞘形成率の減少を確認した。

## 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。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 *in vitro*

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 *in vitro* における中枢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、*in vitro* 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いる。不明な点が多く残されているオリゴデンドロサイトの、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、オリゴデンドロサイト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 *in vivo* 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。そこで、先述のオリゴデンドロサイトの発生各時期の mRNA のマイクロアレイ解析により明らかになった接着分子受容体（発生初期から中期に機能する）下流のシグナル機構を解明するため、受容体に FLAG などのタグをコードする塩基配列を付加し、これをオリゴデンドロサイトに発現させる。その後、タグ抗体で免疫沈降し、結合蛋白質の MS 解析を行う。

当該年度は、オリゴデンドロサイトの発生各時期に特異的に発現している分子を明らかにするため、mRNA アレイ解析や miRNA アレイ解析などを行い、候補分子の絞り込みを行った。また、ミエリン変性症のインビトロ病態モデルの構築に着手することと並行し、モデルマウスが存在しない HLD のインビボマウスの作出に成功した。

## 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

### 3. 研究成果

本年度は、中枢ミエリン形成過程の分子メカニズムを解明するため、オリゴデンドロサイトの発生期に特異的に発現している分子の mRNA アレイ解析を行い、候補分子の絞り込みを行った。その結果、これまで報告のなかった細胞内シグナル伝達経路の中心で働くヌクレオチド交換因子活性依存性のタンパク質が特異的に高発現していることを見いだした

(未発表)。現在、その分子が中枢ミエリン発生過程の制御にどのように関与しているか、*in vivo*、*in vitro*の両面から解析を行う準備をしている。さらに、そのシグナルタンパク質の周辺分子を明らかにするため、タグをコードする塩基配列を付加し、これをオリゴデンドロサイト内に発現させ、タグ抗体で免疫沈降したのち、結合タンパク質の MS 解析を行った。現在も引き続き解析を継続している。

また、中枢神経脱髄疾患全般の治療薬のスクリーニングを加速するため、最近注目を浴びている人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた、より簡便な新規共培養システム開発を共同研究として開始した。現在までに、より短期間で取り扱い易い iPS グリア細胞の作製に成功している (山下、宮本ら **PLoS One (2017)**)。今後、基礎研究の分野から治療標的分子候補を提示することを目指し、スクリーニング系の構築に力を注ぐ予定である。

一方、先天性中枢ミエリン変性症である Pelizeus-Merzbacher 病 (PMD) 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 HLD13 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、HLD4 および

HLD6 に焦点をしばり、そのモデル作製などに着手した。現在までのところ、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、共培養システムにおいて、オリゴデンドロサイトに特異的に感染するレトロウィルスを用いた。疾患変異の多くが機能低下を伴った優性抑制点変異であると考えられるため、目的とする原因遺伝子の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ている (宮本ら、**Data Brief (2017)**)。

さらに、HLD を模倣するインビボマウスモデルの作製のため、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。まず、目的とするものを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配置した。点変異体としては、HSPD1 の 29 番目の Asp を Gly に置換した HSPD1 (D29G) を用いた。これを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した。疾患モデルマウスの評価は、第一に免疫染色法を用いた。独自に作製した髄鞘塩基性蛋白質抗体に蛍光標識を施し、脱髄の程度を蛍光強度の減少によって数値的に評価した。第二に、電子顕微鏡を用いた病態組織の検定である。この方法により、より詳細な脱髄状態の検定が可能となる。作製したトランスジェニックマウスの新生児の脳を固定後、前後軸に沿った切片を作製し、抗 MBP 抗体で免疫染色を行った。その結果、同腹の野生型マウスと比較し、トランスジェニックマウスの脳梁や嗅球などの領域において髄鞘形成率の減少が観察された (宮本ら、**Mol. Genet. Metab. Rep. (2017)**)。今後、病態共培養系と新たに作製されるモデルマウスを駆使し、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発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。