

(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。

本年度は、mRNAアレイ解析などにより明らかとなったグリア細胞の発生各時期に特異的に発現している候補分子の絞り込みを行い、それらをターゲットとした遺伝子改変ノックアウトマウスを作製し、解析を進めた。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だし、それらがミエリン形成時の蛋白質輸送に深く関与す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 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、HLD11に焦点を絞り、病因遺伝子として明らかとなっているRNAポリメラーゼをコードす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観察した。

### 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。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 *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 *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。

当該年度は、mRNA アレイ解析などにより明らかとなったグリア細胞の発生各時期に特異的に発現している候補分子の絞り込みを行い、それらをターゲットとした遺伝子改変ノックアウトマウスを作製し、解析を進めた。また、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

昨年度までに、グリア細胞の発生時期特異的に発現している分子を mRNA アレイ解析な

どを用いて、探索を行った。その結果、これまでに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 BIG1 が高発現していることを見いだした。そこで、本年度は、その分子がグリア細胞の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った。

低分子量 GTP 結合タンパク質の Arf1 は、細胞内のタンパク質輸送に深く関与する分子である。たとえば、Arf1 は細胞質直下に局在するクラスリンアダプタータンパク質を集積させ、トランスゴルジネットワークからソーティングされてくるタンパク質の輸送を積極的に行っている。また、トランスゴルジネットワークとリソソーム間の小胞輸送にも関与する。さらに、ゴルジ体から小胞体への輸送を担う中心的なタンパク質の一つでもある。ミエリン形成時のグリア細胞内ではミエリン膜を構成するタンパク質の合成や輸送が活発に行われていることは、想像に難くない事象であったが、ミエリン形成時に Arf1 がどのような機能を果たしているかは長い間不明のままであった。

申請者らが昨年度までに明らかにしたミエリン形成時に高発現する BIG1 は、Arf1 の活性を制御するヌクレオチド交換因子である。そこで、はじめに申請者らはグリア細胞特異的な BIG1 のノックアウトマウスを作製した。BIG1 ノックアウトマウスは、野生型と比較してミエリン膜の厚さが薄くなっており、特にミエリン形成初期にその表現型が強く現れた。さらに、BIG1 ノックアウトマウスでは、ミエリン膜の材料となるタンパク質や脂質のゴルジ体から細胞膜近傍への輸送が著しく阻害されていた。次に、BIG1 によって活性制御を受けている Arf1 についても同様にノックアウトマウスを作製し、ミエリン形成時に及ぼす影響を解析した。その結果、BIG1 ノックアウトマウスで観察された薄いミエリン膜、

およびミエリン膜形成タンパク質の輸送阻害が確認された（宮本ら、**Sci. Adv.** (2018)）。

今後さらに BIG1 の上流、また Arf1 の下流に介在するシグナル分子を明らかにすることで、ミエリン形成時のシグナル経路の全貌が明らかとなり、それらの結果を応用することで、再ミエリン化や神経再生過程の分子基盤の解明へと発展させることが期待される。

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、HLD11 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。

*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、*Po1r1c* 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 *Po1r1c* (N32I)、および 74 番目の Asn を Ser に置換した *Po1r1c* (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)）。今後は、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。

また昨年度、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。