

称号及び氏名	博士（獣医学）	田中 美有
学位授与の日付	平成27年3月31日	
論文名	Pathological and genetical studies on the novel myelin mutant VF rat (新規ミエリン異常ミュータント VF ラットの病理学的・遺伝学的研究)	
論文審査委員	主査	山手 丈至
	副査	松尾 三郎
	副査	中村 洋一
	副査	桑村 充

論文要旨

緒言

ミエリン（髄鞘）は、神経細胞の軸索を取り巻いて絶縁体として働き、神経系の情報伝達速度と精度を決定付ける非常に重要な組織である。中枢神経系ではオリゴデンドロサイト（OL）により形成されるが、その形成・維持機構の詳細については未だ不明な点が多く残されている。中枢神経系のミエリン疾患は難治性疾患であり、ヒトでは、日本で特定疾患に指定されている多発性硬化症などが知られている。ミエリン疾患の原因は、遺伝性、免疫介在性、栄養性など様々で、同一疾患であっても患者によって臨床病型は異なる。そのため、ミエリン疾患の病理発生には不明点が多く、根本的な治療法も確立されていない。神経疾患の病態解析には、遺伝的・環境的要因を制御できる疾患モデル動物が不可欠である。ミエリンに異常を有するミュータント動物がラットやマウスにおいて確立されており、ミエリンの形成や維持の機構、ミエリン疾患のメカニズムを解明する上で有用なモデル動物となっている。

VF (vacuole formation) ラットは、全身の振戦症状を示す常染色体劣性ミュータントラットであり、振戦症状は生後4~8週齢をピークとしてその後は軽減するというユニークな発症パターンを特徴とする。病理組織学的には、中枢神経系における軸索周囲の異常な空胞形成とミエリン低形成を特徴とするが、その詳細な病理発生は不明である。また、原因遺伝子 *vf* は

劣性遺伝し、ラット第 8 番染色体上に位置することが判明していたが、未だ同定されていなかった。ヒトやマウスの *vf* 遺伝子の相同領域には、振戦症状やミエリン疾患と関連する遺伝子は報告されておらず、VF ラットは新規のミエリン異常ミュータントであることが示唆されている。

本研究では、VF ラットにおけるミエリン病変の詳細な病態解析を行うとともに、VF ラットの原因遺伝子を同定し、その機能を明らかにすることを目的とした。

第 1 章 VF ラットの中樞神経系病変

第 1 節：VF ラットのみエリン病変

2、4、10、20 週齢のホモ型ラットおよび非発症の対照ラットの脊髄を採材し、HE 染色と電顕観察により、経時的な推移を含めた中樞神経系病変の検討を行った。ホモ型ラットの脊髄白質では、ミエリン低形成と軸索周囲の異常な空胞形成が観察された。空胞病変は腹索において顕著であり、2 週齢から形成され始め、4 週齢において最も顕著となったが、その後は減少し、20 週齢頃には消失した。空胞病変の減少と振戦症状の改善時期が一致していた。一方、ミエリン低形成は、観察を行った 80 週齢時まで認められた。

第 2 節：ミエリン構成蛋白の発現解析

ミエリンは複数のドメインにわかれ、各ドメインには、ミエリンの主要成分である proteolipid protein (PLP) や myelin basic protein (MBP)、軸索との接着に重要な myelin associated glycoprotein (MAG) など、様々な機能を有するミエリン構成蛋白が特異的に局在している。ミエリン形成には、ミエリン構成蛋白の合成が適切な時期に行われ、それらが正しく輸送されることが重要である。そこで、これらミエリン構成蛋白の発現分布の解析のために、ミエリン構成蛋白に対する免疫染色を行った。対照ラットでは、PLP と MAG は主にミエリンに発現していた。一方、ホモ型ラットでは、これらミエリン構成蛋白が OL の細胞体、特にゴルジ装置に異常蓄積し、ゴルジ装置が著しく拡張していた。ミエリン構成蛋白が異常蓄積した OL は、ミエリン形成期において最も多く認められた。また、リアルタイム PCR およびウエスタンブロッティングの結果、ミエリン形成期の VF ラットの脊髄白質では、PLP、MBP、MAG の mRNA および蛋白発現が著しく低下していることが明らかとなった。

以上の結果から、VF ラットでは、OL の細胞内の物質輸送に異常が生じている可能性が示唆された。MAG はミエリンと軸索との接着に、PLP はミエリン構造の安定化に働く蛋白であることから、MAG 発現低下は軸索周囲の空胞形成に、PLP の発現低下はミエリン低形成に関与していると考えられた。また、空胞病変が振戦症状に関与している可能性を示した。

第2章 VF ラットにおける OL の分化・成熟異常

成熟 OL マーカーである PLP に対するプローブを用いた *in situ hybridization* 法により、OL の動態を解析した。4 週齢では対照ラットとホモ型ラット間で PLP 陽性 OL の形態に差は認められなかった。一方、10 週齢以降のホモ型ラットでは、小型で細胞突起の乏しい未分化な OL が認められ、OL の成熟異常が示唆された。また、ホモ型ラットの PLP 陽性細胞密度は有意に増加していた。

OL の分化・成熟には、*Pdgfr α* (初期前駆細胞)、*Olig2* (初期前駆細胞から長期間発現)、*Nkx2.2* (後期前駆細胞) などの各種転写因子による制御が重要である。そこで、これら転写因子に対するリアルタイム PCR 法と免疫染色により、4、10、20 週齢の脊髄白質における OPC の動態を経時的に解析した。ホモ型ラットの *Olig2* mRNA 発現量は、10 週齢で有意な上昇が、*Nkx2.2* mRNA 発現量は全週齢において低下傾向を示した。*Pdgfr α* mRNA 発現量は、4 週齢で増加、10 週齢以降で低下した。*Olig2* に強陽性を示す OPC 数は、10 週齢以降で明らかに増加した。

以上の結果から、OL の成熟異常が示唆され、それがミエリン低形成に関与していると考えられた。また、ミエリン再生に向けた OPC 数、OL の分化に関わる各種転写因子の発現変動が認められ、OL の成熟異常によるミエリン再生障害が示唆された。

第3章 VF ラットの原因遺伝子解析

遺伝子解析の結果、ラット第 8 番染色体上の候補遺伝子のうち、ホモ型ラットにおいて顕著な発現低下が認められた *Dopey1* において、ナンセンス変異を発見した。ホモ型ラットの脊髄では、白質・灰白質において *Dopey1* の mRNA の有意な発現低下が認められた。*Dopey1* 変異と、振戦症状や空胞形成といった表現型は完全に一致しており、*Dopey1* が VF ラットの原因遺伝子であると考えられた。また、ホモ型ラットでは、脊髄白質・灰白質ともに DOPEY1 蛋白の発現は認められなかった。

高等生物における *Dopey1* に関する詳細な報告はこれまでに全くなく、*Dopey1* および DOPEY1 蛋白の詳細な局在や機能については不明である。そこで、DOPEY1 蛋白に対する抗体を用いて、免疫組織化学法、免疫電子顕微鏡法を行い、中枢神経系における DOPEY1 蛋白発現細胞・細胞内局在を同定した。正常ラットでは、DOPEY1 蛋白が、主に神経細胞、OPC と成熟 OL の細胞質に発現していることを明らかにした。また、DOPEY1 がゴルジ装置とエンドソームに局在することを示した。一方、ホモ型ラットでは DOPEY1 発現細胞は認められなかった。

以上の結果から、VF ラットでは、*Dopey1* でのナンセンス変異により DOPEY1 蛋白の発現が欠失していることを明らかにした。また、*Dopey1* が、ミエリン形成時の細胞内輸送や、神経細胞・軸索と OL 間の相互作用において重要な役割を持つ可能性を示した。

総括

未だ不明点の多いミエリン形成・維持機構やミエリン疾患の病理発生の解析には、ミエリン疾患モデルは非常に有用である。本研究では、新規のミエリン異常ミュータントである VF ラットの病態解析および原因遺伝子解析により、以下の結論を得た。

1. VF ラットは、振戦症状と、中枢神経系白質における軸索周囲の異常な空胞形成、ミエリン低形成を特徴とし、空胞病変が振戦症状に関与している可能性を示した。
2. VF ラットでは、ミエリン構成蛋白が OL の細胞内に蓄積しており、OL の細胞内輸送異常が示唆された。
3. VF ラットでは、小型で細胞突起の乏しい未分化な OL が認められ、OL の成熟異常が示唆された。
4. VF ラットにおいて、ラット第 8 番染色体上の *Dopey1* でのナンセンス変異を同定し、DOPEY1 蛋白の発現が欠失していることを明らかにした。さらに、DOPEY1 蛋白が、神経細胞や OPC、成熟 OL で発現していることを示した。
5. 本研究によって、*Dopey1* がミエリン低形成に関わることを明らかにし、VF ラットがミエリンの形成・維持に関わるグリア細胞の役割を調べる上で有用なモデル動物となることを示した。

審査結果の要旨

中枢神経系のミエリン疾患は、根本的な治療法の確立されていない難治性疾患で、その病態解明には疾患モデル動物が不可欠である。ミエリンに異常を有するミュータント動物がラットやマウスでいくつか確立されており、ミエリン形成・維持の機構やミエリン疾患のメカニズムを解明する上で非常に有用なモデル動物となっている。新規のミエリン異常ミュータントである VF (**vacuole formation**) ラットは、生後 4~8 週齢をピークとする全身の振戦症状、中枢神経系における軸索周囲の異常な空胞形成およびミエリン低形成を特徴とする常染色体劣性ミュータントであり、その詳細な病理発生や原因遺伝子はこれまで不明であった。本研究では、VF ラットにおけるミエリン病変の詳細な病態解析を行うとともに、VF ラットの原因遺伝子を同定し、その機能を明らかにすることを目的とした解析を行っている。

第 1 章では、VF ラットの中枢神経系病変を詳細に検討している。脊髄の病理組織学的解析

の結果、空胞病変は 2 週齢から形成され始め、4 週齢において最も顕著となった後に減少し、20 週齢頃には消失するという動態を示し、振戦症状と関連性を示すことが明らかとなった。一方で、ミエリン低形成は改善が認められないことも示された。また、ミエリン構成蛋白のウェスタンブロットイングおよびリアルタイム PCR の結果、ホモ型ラットの脊髄白質では、ミエリン形成期において、各種ミエリン構成蛋白の mRNA と蛋白の著しい発現低下が認められた。さらに、ミエリン構成蛋白の発現分布解析により、ホモ型ラットでは、ミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイト (OL) の細胞体、特にゴルジ装置におけるミエリン構成蛋白の異常蓄積が認められ、VF ラットでは、OL の細胞内の物質輸送に異常が生じている可能性が示唆された。

OL の分化・成熟には、*Pdgfra* や、転写因子である *Olig2* および *Nkx2.2* などの各種因子による制御が重要である。第 2 章では、OL の分化・成熟異常やオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の動態に着目した解析を行っている。成熟 OL マーカーである **proteolipid protein (PLP)** に対するプローブを用いた *in situ hybridization* 法により、10 週齢以降のホモ型ラットでは、小型で細胞突起の乏しい未分化な OL が認められ、OL の成熟異常が示唆された。さらに、OL の分化・成熟に関わる各種因子に対するリアルタイム PCR 法と免疫染色により、OPC の動態を経時的に解析している。その結果、ホモ型ラットでは、OL の分化・成熟に関わる各種因子の異常な発現変動と、10 週齢以降での OPC 数の明らかな増加が認められ、OL の成熟異常によるミエリン再生障害が示唆された。

第 3 章では、VF ラットの原因遺伝子解析を行っている。ラット第 8 番染色体上の候補遺伝子のうち、ホモ型ラットにおいて顕著な発現低下が認められた *Dopey1* において、ナンセンス変異を発見した。同定した遺伝子変異と、振戦症状や空胞形成といった表現型は完全に一致しており、*Dopey1* が VF ラットの原因遺伝子であると考えられた。ホモ型ラットでは、脊髄白質・灰白質ともに **DOPEY1** 蛋白の発現は認められなかった。*Dopey1* および **DOPEY1** 蛋白の詳細な局在や機能については不明であるため、次に、**DOPEY1** 蛋白に対する抗体を用いて、中枢神経系における **DOPEY1** 蛋白発現細胞・細胞内局在を検討している。**DOPEY1** 蛋白は、主に神経細胞、OPC と成熟 OL の細胞質に発現し、ゴルジ装置とエンドソームに局在することを示した。第 1・2 章の結果も合わせると、ミエリン形成時の細胞内輸送や神経細胞・軸索と OL 間の相互作用において *Dopey1* が重要な役割を持つ可能性が示された。

本研究成果は、VF ラットでは、*Dopey1* でのナンセンス変異により **DOPEY1** 蛋白の発現が欠失していること、さらにミエリン形成時の *Dopey1* の機能的な役割を初めて明らかにしたものである。また、未だ不明点の多いミエリン形成・維持機構やミエリン疾患の病理発生機序の解明において、この疾患モデル動物は非常に有用であることを提示している。これらの成果は、医学・獣医学、さらには実験動物学の新たな展開に資するものであり、最終試験の結果と併せて、博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。