



札幌医科大学学術機関リポジトリ *ikor*

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title	髄鞘形成期における初代培養ラット後根神経節細胞への組換えアデノウイルスを用いた変異 MPZ cDNA の 導入
Author(s)	菊池, 真; 小塚, 直樹; 二宮, 孝文; 山下, 利春; 武田, 秀勝; 舘, 延忠
Citation	札幌医科大学保健医療学部紀要,第 13 号: 13-20
Issue Date	2011 年
DOI	10.15114/bshs.13.13
Doc URL	http://ir.cc.sapmed.ac.jp/dspace/handle/123456789/6361
Type	Journal Article
Additional Information	
File Information	

- コンテンツの著作権は、執筆者、出版社等が有します。
- 利用については、著作権法に規定されている私的使用や引用等の範囲内で行ってください。
- 著作権法に規定されている私的使用や引用等の範囲を越える利用を行う場合には、著作権者の許諾を得てください。

髄鞘形成期における初代培養ラット後根神経節細胞への組換えアデノウイルスを用いた変異MPZ cDNAの導入

菊池 真¹⁾, 小塚直樹²⁾, 二宮孝文¹⁾, 山下利春³⁾, 武田秀勝²⁾, 舘 延忠⁴⁾

¹⁾ 札幌医科大学医学部解剖学第一講座

²⁾ 札幌医科大学保健医療学部理学療法学科

³⁾ 札幌医科大学医学部皮膚科学講座

⁴⁾ 札幌医科大学保健医療学部作業療法学科

Myelin Protein Zero (MPZ)遺伝子の変異はCharcot-Marie-Tooth病を引き起こす。今回、我々は、ラット後根神経節細胞由来の培養細胞に389A>G (130Lys>Arg)の点変異を有するMPZ cDNAを導入し、その形態学的観察を行った。培養後、2週間の時点で、アデノウイルスベクターを用い、野生型MPZ cDNA (Wild)、点変異MPZ cDNA (Mt)、LacZ cDNA (LacZ) のそれぞれを導入した。同時に、何も導入しない群(NC)も作成した。cDNA導入後、さらに2週間の培養を継続し、合計4週間の培養を行った。解析は免疫組織化学染色法と髄鞘長の計測、および電子顕微鏡による微細構造の観察を行った。結果、アデノウイルスベクターを用いて、培養細胞にMPZ cDNAの導入が可能であった。また、全ての群間において髄鞘長に違いはみられなかった。また、電子顕微鏡による観察でも違いはみられなかった。これらのことから、389A>G (130Lys>Arg)の点変異をもつMPZ遺伝子は2週間の培養では髄鞘の形態に作用しないことが考えられた。しかし、今後、髄鞘の病理学的変化がいつの時点であらわれるかについて、DRGの長期培養も含めた更なる実験が必要であると考えられた。

キーワード : Myelin Protein Zero (MPZ), Charcot-Marie-Tooth, 髄鞘, 後根神経節, 初代培養

A study of cultured rat dorsal root ganglia cells infected with a recombinant adenovirus containing mutant MPZ cDNA in myelination

Shin KIKUCHI¹⁾, Naoki KOZUKA²⁾, Takafumi NINOMIYA¹⁾,
Toshiaru YAMASHITA³⁾, Hidekatsu TAKEDA²⁾, Nobutada TACHI⁴⁾

¹⁾ Department of Anatomy 1, Sapporo Medical University School of Medicine

²⁾ Department of Physical Therapy, School of Health Sciences, Sapporo Medical University

³⁾ Department of Dermatology, Sapporo Medical University School of Medicine

⁴⁾ Department of Occupational Therapy, School of Health Sciences, Sapporo Medical University

The mutations of the Myelin Protein Zero (MPZ) gene cause Charcot-Marie-Tooth disease (CMT). In this study, cultured rat dorsal root ganglia (DRG) cells infected with 389A>G (130Lys>Arg) point mutation MPZ cDNA was observed. The two-week cultured rat DRG cells were injected with wild type MPZ cDNA (Wild), mutation MPZ cDNA (Mt) and LacZ cDNA (LacZ). Non-injected cultured cells were used as normal control (NC). The injected cultures were cultured two-week more. The samples were analyzed through immunohistochemistry and each length of myelin was estimated. The micro structure in each myelin was observed by electron microscopy (EM). It was possible to transfer MPZ cDNA into peripheral myelin in culture through an adenovirus vector. The lengths of myelin of Wild, Mt, LacZ and NC had no significant differences. There were no pathological observations or abnormalities accounting for demyelination in the Schwann cell or axon. The MPZ gene could be introduced into peripheral myelin in culture by adenovirus vector. This result may be useful in analysis of the mechanism of the disease with MPZ gene mutations. The results of lengths of myelin and EM observation showed no differences between each group during two-week culture period following injection. It can be suggested that the dominant-negative effect was minimal in early-stage CMT patients with 389 A>G point mutation, and a longer term DRG culture will be needed to analyze the effect of the MPZ mutation.

Key words : Myelin Protein Zero (MPZ), Charcot-Marie-Tooth, myelin, dorsal root ganglia (DRG), primary culture

Bull. Sch.Hlth.Sci.Sapporo Med. Univ 13:13-20(2011)

I. はじめに

Charcot-Marie-Tooth病(以下, CMT)は10万人に1.5-4人の罹患率を示す遺伝性の末梢神経疾患であり, 臨床症状は, 緩徐進行性の四肢遠位部における特徴的な筋萎縮, 筋力低下と知覚障害, 足関節の変形拘縮である¹⁾. CMTは, その病型からいくつかに分類される. CMT I型は末梢神経の髄鞘形成不全, または脱髄を示し, CMT II型は軸索そのものの変性を示す¹⁾. CMT I型は高度の脱髄性ニューロパチー (neuropathy) と神経伝達速度の低下 (38m/sec以下) を示し, CMT II型は軸索型ニューロパチーであり, 神経伝達速度は正常あるいは極軽度の低下を示す. その他にも, I型の重症型であるDejerine-Sottas syndrome (以下, CMT III型), I型の軽症型であるhereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP), CMT III型の1つであるCongenital hypomyelination (CH) がある²⁾.

近年では, 遺伝子解析がすすみ, このタイプの違いが変異する遺伝子の違いや変異の程度によることが明らかとなった^{3,4)}. 髄鞘に関係する遺伝子としては膜貫通蛋白であるperipheral myelin protein 22 (PMP22)^{5,6)}, myelin protein zero (以下, MPZ)⁷⁾, Connexin32 (Cx32)⁸⁾などが明らかになっている. 中でもMPZは末梢髄鞘の中で最も多く存在し⁹⁾, 末梢髄鞘形成において細胞膜の接着機能を担い, 末梢髄鞘における多層構造の形成および維持に関与していることが, MPZノックアウトマウスなどの実験から明らかになっている¹⁰⁻¹³⁾.

しかし, CMTの病態は同じMPZ遺伝子に変異があったとしても, その変異部位により著しく異なっている¹⁴⁾. MPZ遺伝子ノックアウトマウスのようにMPZ遺伝子全ての発現を抑制してしまう方法では, MPZ遺伝子に点変異を有する患者個々人の末梢髄鞘の形成や形態, 病態に言及することはできない. MPZ遺伝子に点変異を有し, 発症したCMTの脱髄の程度を, 点変異のそれぞれについて可視化することは, ポストゲノム時代のオーダーメイド医療を考えた場合, 意義のあることだと考える.

今回, 我々はラット後根神経節初代培養を用いて, MPZ遺伝子変異が短期間で末梢髄鞘形成過程に影響を及ぼすかどうかを検討した. 変異遺伝子は, 過去にMPZ遺伝子の389番目のアルギニン (A) がグアニン (G) へ点変異 (以下, 389A>G) をおこし, 130番目のリジン (K) がアルギニン (R) に変異 (以下, 133K>R) した変異MPZ遺伝子¹⁵⁾を用いた. 野生型MPZと変異型MPZの遺伝情報をもとに, MPZ組換えcomplementary DNA (以下, cDNA) を作製し, アデノウイルスベクターに構築した. これを, ラット後根神経節初代培養に導入し, MPZ組換えcDNAが末梢髄鞘に与える影響を, 免疫組織化学染色し光学顕微鏡を用いて観察および解析を行うとともに, 電子顕微鏡を用いて微細構造の観察を行った.

II. 方 法

II-i. 研究対象

胎生20日目のSprague-Dawleyラット (以下, SDラット) 胎仔5-7匹のDRGを用いた. また, 389A>G (130K>R) の点変異を有するMPZ cDNA遺伝子を作製し, アデノウイルスに構築し, 実験に用いた. ラットとヒトにおけるMPZアミノ酸の相同性は94%であり, 非常に高い.

II-ii. 動物実験および組み換えDNA使用に関する倫理および規定

動物実験ならびに, 組換えDNAの使用に関しては, 札幌医科大学動物実験委員会並びにDNA安全委員会の承認を得た. また, 札幌医科大学における組換えDNA実験指針¹⁶⁾および, 文部科学省の組換えDNA実験指針^{17,18)}を遵守し実施し, 動物の使用に関しては札幌医科大学動物実験指針¹⁹⁾を遵守し実験を行った.

II-iii. 正常MPZ cDNAと変異MPZ cDNAライブラリーの作製

野生型MPZ cDNAは, 山形大学医学部早坂教授より供与されたものを使用した²⁰⁾. ベクターはpUC19(TAKARA)を用いた. まず, 遺伝子導入部位はpUC19の5'側に存在するHindIIIと3'側に存在するXba Iの間とした. 供与された野生型MPZ cDNAはこの制限酵素認識部位を持たないため, HindIII認識部位を有するprimer1 (5'-GCCAAGCTTCTATGGCTCCTGGGGCT-3')と, Xba I認識部位を有するprimer2 (5'-GCGTCTAGACCGCTATTTCTTATCCTT-3')を用いてPCRを行い, 5'側にHindIII認識部位および3'側にXba I認識部位を有する野生型MPZ cDNAを得た. 反応液は以下の組成とした. Ex TaqTM Polymerase (TaKaRa); 0.5 μ l, 10 \times Ex Taq Buffer™ (TaKaRa); 10 μ l, dNTPs Mixture (TaKaRa); 8 μ l, right primer; 0.5 μ l, left primer; 0.5 μ l, Template DNA; 500ng, 超純水; up to 100 μ l. 増幅にはDNA Thermal Cycler 480 (PERKIN-ELMER/CETUS Co.)を使用した. 反応手順は94°C 5minにて5分間加熱後, ①94°Cにて1分間, ②55°Cにて1分間, ③72°Cにて1分間の過程を35サイクル繰り返し, 最後は72°Cにて5分間反応させた後, 4°Cにて保存した. このcDNAを, 制限酵素HindIIIとXba Iで消化し, Low-melt agaroseゲルを用いて精製し, 制限酵素Hind IIIとXba Iで消化したpUC19にT4 DNA Ligase (TAKARA)を用いてligationを行った.

389A>Gの変異を有する変異MPZ cDNAは, PCR法による変異導入法であるsite-directed mutagenesis法²¹⁾を用い, 正常MPZ cDNA 389A近傍にあるAat II認識部位を利用した. まず, primer1とAat II認識部位を有するprimer3 (5'-TTTGACGTCACAAGTGAA-3')を用いて増幅し, このPCR産物を制限酵素HindIIIとAat IIにて消化, 精製し, 両端

にHindIIIおよびAat II 認識部位をもつMPZ cDNAを得た。次に制限酵素Aat II 認識部位を持ち、変異389A>Gを含むprimer4 (5'-TGTGACAGAAACCCTCCA-3') と primer2を用いて増幅し、制限酵素Aat II と、Xba I で切断、精製して両端にAat II とXba I の認識部位と変異389A>Gを含むMPZ cDNAを得た。この2つをAat II の切断部位でライゲーションし、pUC19を制限酵素HindIIIとXba I にて切断、精製し、389A>Gの変異を有するMPZ cDNAをpUC19のHind IIIとXba I の切断部位にライゲーションした。

野生型MPZ cDNAと389A>Gの変異を含む変異型MPZ cDNAが組み込まれたpUC19をcompetent cellに導入し、クローンをx-gal染色によるカラーセレクション(color selection)法により選択し、シークエンシングにて確認して野生型MPZ cDNAと389A>Gの変異を含む変異型MPZ cDNAを得た。

実際に、pUC19に組み込まれたcDNAの塩基配列は直接塩基配列決定法にて確認した。直接塩基配列決定法は、Big Dye (ABI™)を用いた。得られたプラスミドDNAを、Microcon(AMICON)を用いて精製した。精製したDNA500ngに対してM13 primer (TAKARA)を3.5pmol、超純水を8μl、Premix(ABITM)7μlを混合した。DNA Thermal Cycler 480 (PERKIN-ELMER/CETUS Co.)にて、96°Cで4分間加熱後、①96°Cにて10秒間、②50°Cにて5秒間、③60°Cにて4分間の過程を25サイクル繰り返した後、エタノール沈殿法を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAを template suppression reagent(TSR)(ABI™)25μlに溶解し、95°Cにて2分間加熱後に急冷して2本鎖DNAを1本鎖にした。1本鎖にしたDNAをABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer(ABI™)を用いて電気泳動し、塩基配列を決定した。同時に野生型MPZ cDNAの塩基配列も確認した。

II-iv. 組換えアデノウイルスの作製

最終分化したアデノウイルスベクターを用い、組換えアデノウイルスの作製はGrahamらの系を用いた。まず、野生型MPZ遺伝子と変異MPZ遺伝子を組換えアデノウイルスの作製の為のベクター(pAd-Bgl II)のLacZ発現部位へサブクローニングした。このプラスミドとE1を欠如したアデノウイルスゲノム(pJM17)を293細胞へリポフェクタミンを用いて同時導入して組換えアデノウイルスを得た。野生型MPZ遺伝子または、変異MPZ遺伝子を含む組換えアデノウイルスが導入された293細胞はx-gal染色によるカラーセレクションにて確認した後に、破壊され、遠沈し、その培養上清をラットDRG細胞に感染させた。また、同時にMPZ cDNAをサブクローニングしないベクターを用いてLacZを発現する組換えアデノウイルスを作製した。

得られた組換えアデノウイルスの力価(1mlあたりのアデノウイルスの数)は野生型MPZc DNAを含んだ組換えアデノウイルスが8.8 plaque forming unit(プラーク形成単位; 以下, pfu)/ml, 変異型MPZ cDNAを含んだ組換えアデノウ

イルスが7.9pfu/ml, LacZを含んだ組換えアデノウイルスが7.5pfu/mlであった。

II-v. 培養液の組成

培養液はα MEM (powder α minimum essential medium (GIBCO); 1g, 超純水; 100ml, 炭酸水素ナトリウム; 0.22g, 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperadiny] ethansulfonic acid (HEPES); 0.38g, β グルコース; 0.5g, nerve growth factor (GIBCO); 1,000ng, ペニシリン; 10,000units, ストレプトマイシン; 10,000units)を用いた。

II-vi. 細胞の分離と培養

実体顕微鏡下でDRGを摘出し、周囲の結合組織をできるだけ除去した後、0.25%トリプシン処理した。処理後、10%ウシ胎仔血清を加えたα MEMを加え、0.1% poly-L-lysineでコーティングした培養ガラス上に静置後、インキュベーター(36.5°C, 5%CO₂+95%air)にて培養した。24時間後に5%FCSを含むα MEMを2ml添加し、その後2-3日おきに、新しい5%FCSを含むα MEMと入れ替えた。

II-vii. 培養細胞へのcDNA導入

培養2週間を経過した培養細胞にアデノウイルスを用いて、正常MPZ cDNAを導入したもの(以下, Wild)と、389A>Gの変異を含む点変異MPZ cDNAを導入したもの(以下, Mt)を作製した。アデノウイルスは、先行研究に従い200,000cellに対して 2.5×10^7 pfu/mlとなるように感染させた²³⁾。その後2週間、5%FCSを含むα MEMを交換しながら培養を続けた。また、アデノウイルスの影響を調べるためにLacZを発現するcDNAを同様の手順で導入したもの(以下, LacZ)を作製し、同様に培養した。対象群としてアデノウイルスを感染させない群(以下, NC)を作製し、同様の条件下で培養した。

II-viii. 導入cDNAの確認および直接塩基配列決定法

cDNAの導入の有無はアデノウイルスを感染させた培養細胞の一部をトリプシンを用いて、培養皿から遊離、採集し、セパジーン®(三光製薬)を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAをPCRにより目的部位を増幅し、導入遺伝子の塩基配列を決定した。

PCR産物は1%アガロースゲル中で100based pair DNA Ladder(TaKaRa)をサイズマーカーとして100Vで20分間の電気泳動、およびエチジウムブロマイド染色を施し、紫外線照射下でバンドを確認し、写真撮影を行った。泳動バッファーにはTris-acetate, EDTA(TAE)を用いた。その後、直接塩基配列法を用いて感染の有無を観察した。

II-ix. 培養細胞の染色

染色法は、免疫組織化学染色法であるSAB法²³⁾を用いた。一次抗体はラビット抗MPZポリクローナル抗体(慶応大学、

植村教授より供与)を用いた。試料を4%パラホルムアルデヒド溶液 (pH7.4) で90分間固定後、0.01M phosphate-buffered saline (PBS) に浸して洗浄し、5% ヤギ血清で20分間ブロッキングした。その後、0.2% Triton Xを加えた0.01M PBS(0.2%Triton PBS)で希釈した抗MPZ抗体を切片が完全に被われるだけ滴下して、4℃にて一晚、反応させた。反応後、0.2% Triton PBSで5分間洗浄を5回行い、抗ラビットビオチン化第二次抗体 (ニチレイ) を滴下し、室温で90分間反応させた後、PBSで2回洗浄した。発色のために、0.2% H₂O₂ と0.1% 3,3'-diaminobenzidine(DAB)の混合液で5分間反応し、PBSで洗浄後、80%グリセロールにて封入した。

以上の染色法により得られた培養末梢神経組織を、光学顕微鏡下にて4群 (Wild, Mt, LacZ, NC) の末梢髄鞘を選択して写真撮影を行った。撮影した写真をコンピューターに取り込み、画像解析システムSION imageを用いて紋輪間の距離 (以下、髄節長) (μ m) を計測した、

II-x. 解析

4群 (Wild, Mt, LacZ, NC) のそれぞれにおける200箇所 の髄節長を計測し、それぞれの平均値を求め、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行った。危険率(α)は0.05とした。

II-x i. 電子顕微鏡による観察

微細構造はWild, Mt, NCについて、電子顕微鏡を用いて観察した。固定は1%酸化オスミウムと1.5%フェロシアン化カリウムの混合液で固定し、脱水後Epon樹脂 (Epon Resin 812 (TAAB) ; 4.6ml, Dodecyl Succinyl Anhydride (TAAB) ; 2.0ml, Methyl Nadic Anhydride (TAAB) ; 3.5ml, 2,4,6-tric (Dimethylaminomethyl) Phenol (TAAB) ; 0.2ml) にて包埋した。包埋した各試料をナノトームMT6000 (DUPONT) を用いて約60nmの超薄切片を作成し、酢酸ウラン液と鉛染色液を用いて電子染色を行った。電子顕微鏡はH7500 (HITACHI) を用いた。

III. 結 果

III-i. MPZ cDNAの塩基配列

ヒトのMPZ遺伝子とラットのMPZ遺伝子は相同性が高く、本研究で点変異のみられた130番目のリジン (K) はマウスとラットでも相同性がみられる (図1)。Wildより抽出したDNAは389番目のAが確認された。また、Mtより抽出したDNAは389番目のAがGに置換しており、389A>Gの点変異が起きており、130番目のリジン (K) がアルギニン (R) に変異していることを確認した (図2)。それぞれの試料から抽出したDNAを用いてPCRを行った結果、WildとMtにはMPZ cDNAの導入が観察されたがLac ZおよびNCではMPZ cDNAの導入はみられなかった (図3)。



図1 MPZのアミノ酸配列

上段にラットのアミノ酸配列(Rat), 下段にヒトのアミノ酸配列(H.S.), 中段に両方に共通するアミノ酸を示した。ラットおよびヒトのアミノ酸配列の相同性は96%であった。今回、変異アミノ酸R(Arg)を導入した部分もK (Lys) であり、ヒトとラットで一致していた。

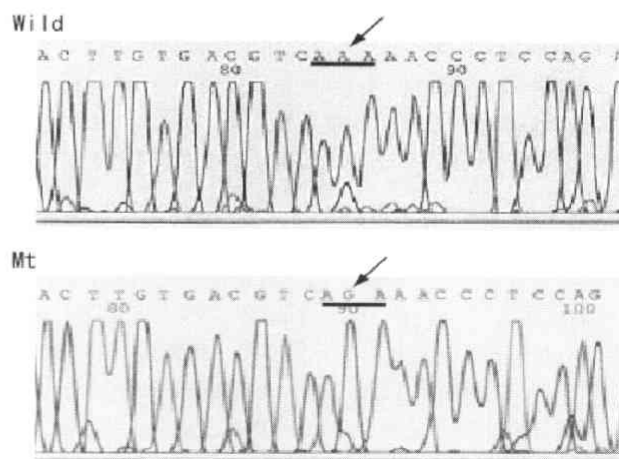


図2 MPZ cDNAの塩基配列

矢印はMPZ cDNAの389番目の塩基を示す。WildではAとなっているが、MtではGに変異している。その結果、アミノ酸がWildではAAA (リジン) であるのに対しMtではAGA (アルギニン) となっている。

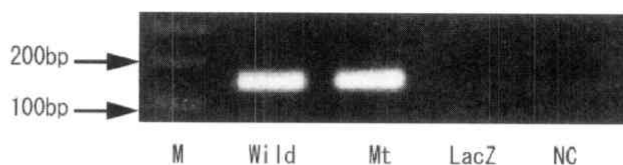


図3 PCRによる目的部位の増幅

1.5%アガロースゲル, 20分間泳動, エチジウムブロマイド染色。WildおよびMtにおいては160bp付近に増幅されたフラグメントが観察できる。LacZとNCに関してはMPZ cDNAが導入されていないため、PCRによる目的部位の増幅がみられなかった。M, マーカー。bp, based pair

III-ii. 抗MPZ抗体免疫組織化学染色および髄節長

抗MPZ抗体を用いた免疫組織化学染色では髄鞘のみが染色された。Wild, Mt, LacZ, NCそれぞれの髄節長の平均値±標準偏差は97.0±24.9 μ m, 99.5±27.4 μ m, 94.9±29.3 μ m, 98.6±27.1 μ mであった (図4, 5)。ANOVAによる統計処理ではp<0.05で4群間に有意な差を認めなかった。

III-iii. 電子顕微鏡による微細構造の観察

Wild, Mt, NCの電子顕微鏡におけるそれぞれの微細構造の観察では脱髄およびオニオンバルブなどの病理所見はみられなかった。また、髄鞘の層構造およびシュワン細胞

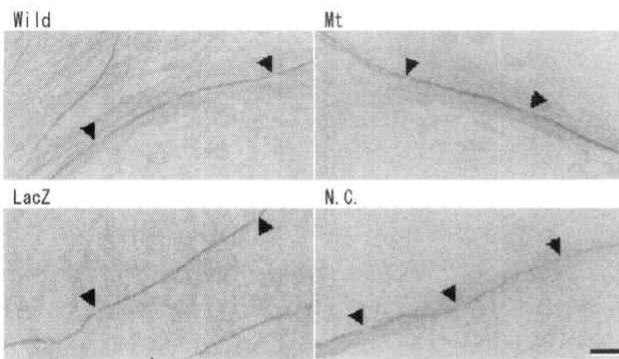


図4 抗MPZ抗体を用いた髄鞘の免疫組織化学染色
矢印は絞輪を示す。髄鞘部分が濃染された。絞輪部分の異常伸張などの病理所見はみられなかった。スケール、50 μ m

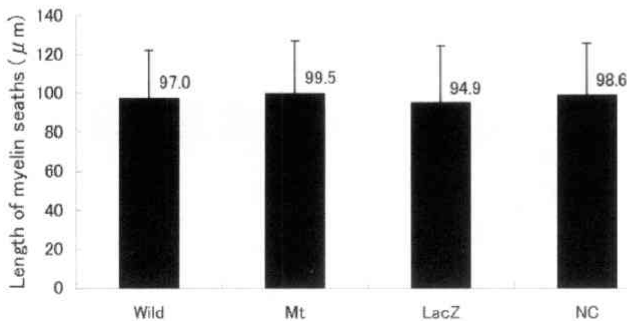


図5 各群の髄鞘長

図内の数字は各群の髄鞘長の平均値を示す。ANOVAの結果、4群間において有意な差はみられなかった。

にも3群で差はみられなかった。軸索野観察では微小管、神経細糸などの細胞骨格蛋白、および軸索そのものにおける変性はみられなかった(図6)。

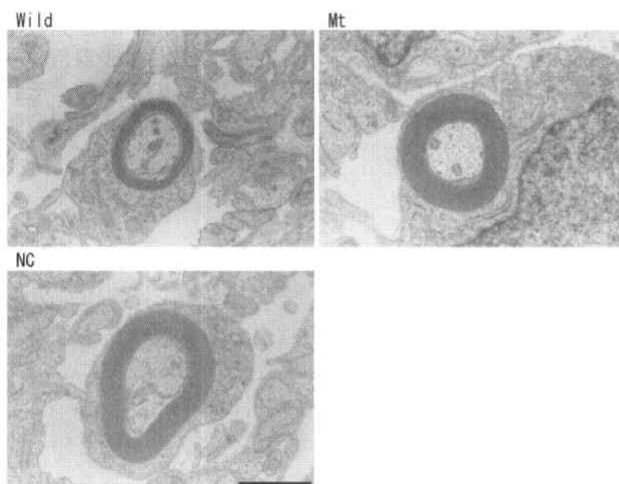


図6 電子顕微鏡による微細構造の解析

電子顕微鏡を用いて200箇所の髄鞘を観察したが、オニオンバルブなどの病理変化は観察されなかった。また、軸索、シュワン細胞についても、3群間で違いはみられなかった。スケール、1 μ m

IV. 考 察

CMTの病態は様々であり、その臨床症状の違いの1要因として種々の遺伝子の関与が考えられる。MPZ遺伝子もCMTの原因遺伝子の1つであり、そのMPZ遺伝子の変異のおきる部位によっても臨床症状は異なってくる。臨床症状の原因の一部を可視化し、ポストゲノム時代のオーダーメイド医療の基礎実験として、389A>Gの遺伝子変異により、130K>Rの点変異を有するCMT患者の変異MPZ遺伝子をラット後根神経節初代培養系に導入し、その形態を解析した。

末梢髄鞘へのMPZ遺伝子導入

MtおよびWildより回収した培養細胞からDNAを抽出し、PCRを行った結果、WildおよびMtより回収した細胞のみ増幅されたバンドが観察され、LacZおよびNCより回収した培養細胞から抽出したDNAはPCRによる増幅はみられなかった。これはWildとMtより回収した細胞にはアデノウイルスによって導入されたヒト由来MPZ cDNAが導入されていたため、PCRによる目的遺伝子の増幅が可能であり、LacZとNCから得た培養細胞にはヒト由来MPZ cDNAが導入されていないために、PCRによる目的部位の増幅がみられなかったと考えられる。アデノウイルスの培養末梢神経細胞への感染率はほぼ100%であり、抗MPZ抗体を用いた免疫組織化学染色においても末梢髄鞘以外のfibroblastなどの部分は染色されていなかったため、MPZ cDNAは主として末梢髄鞘に導入されたものと考えられた。

ラット海馬を用いた初代海馬中枢神経細胞培養におけるアデノウイルスを用いた遺伝子導入に関してはastrocyteに対し特に遺伝子を導入することが報告されている²⁰⁾。また、in vivoにおける研究ではグリア細胞の他に直接的に導入した周囲の神経細胞に遺伝子の導入が行われるという報告もある²⁵⁾。末梢神経におけるアデノウイルスを用いた遺伝子導入に関しても、主として末梢髄鞘に導入されることが報告されている。しかし、いずれの報告もLacZ遺伝子を導入したものであり、MPZ遺伝子などの末梢髄鞘を構成する蛋白を実際の末梢髄鞘形成するシュワン細胞に導入した報告はみられない。本研究では、髄鞘を構成する蛋白であるMPZ遺伝子を、末梢髄鞘を形成するシュワン細胞に導入したことに伴って新規性のある結果と考えられ、MPZ遺伝子に変異を有する患者への遺伝子治療および末梢髄鞘の形成や構造を解析するうえで将来性のある結果であることが考えられた。

遺伝子導入された末梢髄鞘の髄鞘長と微細構造

生体内における、ヒトの髄鞘長は80-600 μ m²⁶⁾であり、ラットの坐骨神経と脛骨神経の髄鞘長は2-4週齢で260-480 μ m、成熟ラットで190-1,400 μ mである²⁷⁾。培養末梢神経細胞における約12週間培養後の髄鞘長の平均は128 μ mで、54-246 μ mの範囲にあることを報告している^{28,29)}。本研究の髄鞘長の平均値は、Wild, Mt, LacZ, NCそれぞれ97.0

±24.9 μm, 99.5±27.4 μm, 94.9±29.3 μm, 98.6±27.1 μmであり、過去の報告と比較すると短い傾向にあるが、培養期間が4週間と短いためと考えられた。

脱髄あるいはオニオンバルブのような病理所見がみられる場合、髄節長は短くなると報告されている²⁹⁾が、本研究では4群間に有意な差を認めなかった。

電子顕微鏡による微細構造の観察の結果、Wild, Mt, NCの3群のいずれも病理学的変化は観察されなかった。しかし、MPZ遺伝子に389A>Gの点変異を有する患者の末梢神経生検では、電子顕微鏡による観察の結果、髄鞘においてオニオンバルブがみられたと報告されている¹⁵⁾。

MartiniはMPZ遺伝子ノックアウトマウスのホモ接合体では早期に髄鞘の形成異常がみられ、その後髄鞘の崩壊やオニオンバルブがおこると報告している³⁰⁾。また、MPZ遺伝子ノックアウトマウスのヘテロ接合体では発症はみられないが、髄鞘の変成が観察されると報告している³⁰⁾。Schererらはノックアウトマウスのヘテロ接合体よりも、点変異を有するMPZ遺伝子と正常MPZ遺伝子をヘテロで有する方が、重症度が高いと報告しており、MPZ遺伝子の発症原因を考えた場合、単純な機能喪失 (loss of function) ではなく、毒性の機能獲得 (toxic gain of function) と考える必要があるとしている³¹⁾。

今回、研究に用いた389A>G (130K>R) の変異を有するCMT 1Bと診断された対象者の神経伝達速度は7歳時で7.3 m/secであり、運動発達の遅延、筋力の低下が見られたと報告されている¹⁵⁾。また、同じ変異を有した伯父の生検腓腹神経の所見は有髄神経の減少、オニオンバルブ形成、MPZ蛋白の発現量の減少が観察されており、対象者の母親もCMTの症候が見られたと報告している¹⁵⁾。過去のMPZ遺伝子における点変異により、CMTが発症した報告では、immunoglobulin 領域 (Ig領域) が最も多かった (図7)³²⁾。Ig領域は接着機能を有すると報告されており³²⁾、本症例の変異もIg領域に該当するため、何らかの接着機能の不全が予想される。

今回の研究では、末梢髄鞘の変性を確認するまでには至らなかった。MPZ遺伝子の点変異による臨床症状や病理所見は不完全なMPZ蛋白が蓄積されることにより末梢髄鞘の変性を引き起こすと考えられている。今回、培養末梢神経細胞のシュワン細胞にアデノウイルスによる遺伝子導入の結果2週間は遺伝子の発現量が変化しないと報告されている²²⁾。今回の研究はこの報告を参考にアデノウイルスによる389A>Gの変異を有するMPZ cDNAを導入後2週間の培養を行ったが、この変異では脱髄などの病理学的影響はこの発現期間では観察されなかった。この結果、本変異はごく初期の段階では脱髄などの病理学的所見はみられない可能性が示唆されるが、これを明確にするためには、今後、本変異によって病理学的変化が起きる時期がいつなのかを同定する必要がある。

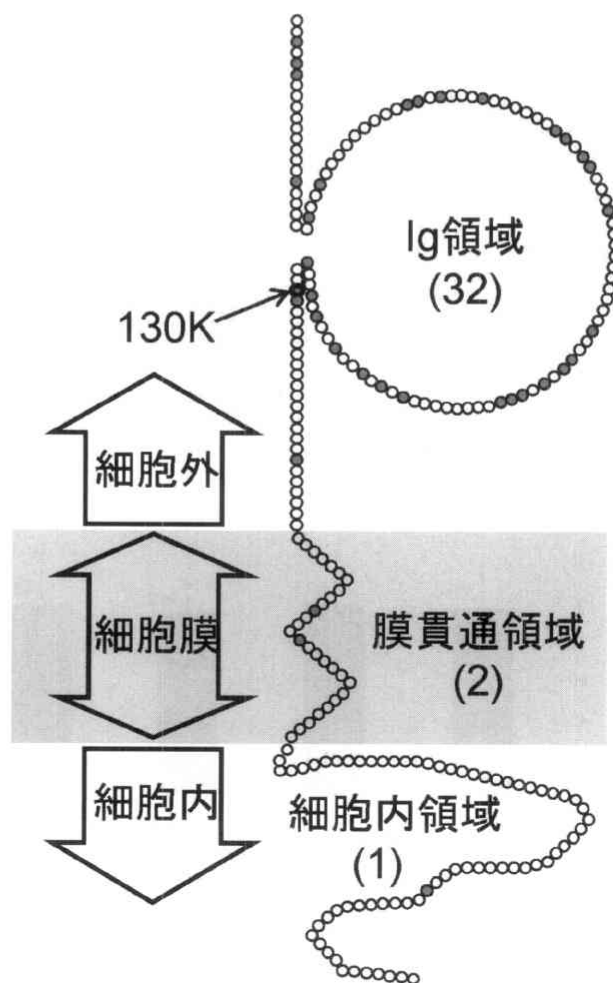


図7 MPZ蛋白の模式図と点変異CMTが報告されている部位

MPZ蛋白の中で細胞外のimmunoglobulin領域 (Ig領域)、細胞膜貫通領域 (膜貫通領域)、細胞内領域を示す。○はMPZを構成するアミノ酸を、●は点変異によりCMTが発症した部位を示している。今回、研究対象とした130番目のリジン (130K) を矢印で示している。()の数字は、それぞれの領域で点変異によりCMTが発症したアミノ酸の数を示している。(文献32) 参照)

今後の課題

本研究の結果より、変異MPZ cDNAを導入後、2週間の培養では髄節長および、末梢髄鞘の微細構造においてWild, Mt, LacZ, NCの4群間に差異はみられなかった。このことと症例報告を考えると、MPZ遺伝子の389A>Gに点変異を有する極初期の段階では比較的脱髄の影響が少ないことが推察される。しかし、培養期間が合計で4週間と短く、389A>Gの点変異を有するCMT患者への臨床応用を、本研究結果から論ずることはできない。今後、長期培養の方法も模索しながら、対象者自身のオーダーメイド医療を想定した患者個々人のActivity Daily Living (ADL) の維持とQuality of Life (QOL) の向上に貢献できる研究につなげていきたい。

V. ま と め

本研究は、アデノウイルスを用いて野生型MPZ cDNA, 389A>Gの点変異を有するMPZ cDNA, LacZを発現するcDNAのそれぞれを培養ラット末梢髄鞘に導入したもの（それぞれWild, Mt, LacZ）と遺伝子を導入しない培養ラット末梢髄鞘（NC）を作製し、その髄鞘の微細構造を比較、観察した。その結果、アデノウイルスを用いて髄鞘へMPZ cDNAが導入されることを確認した。遺伝子導入後、2週間を経過したWild, Mt, LacZ, NCの4群間における髄鞘長の比較では有意な差がみられなかった。また、Wild, Mt, NC電子顕微鏡を用いた微細構造の観察においても3群間に違いはみられなかった。本研究の結果より、髄鞘にMPZ遺伝子を導入が可能であった点は、今後MPZ遺伝子に変異を有する患者への遺伝子治療に有用であると考えられた。また、培養ラット末梢髄鞘へ変異MPZ cDNAの遺伝子導入後、2週間という極初期の段階では変異MPZ遺伝子が脱髄をひきおこす等の影響が少ないことが推察された。今後は長期培養の方法を模索しながら、患者のADLの維持とQOLの向上に貢献できる研究を展開する必要性が考えられた。

VI. 参 考 文 献

- 1) Chance P.F.: Genetic studies in polyneuropathy. in Peripheral neuropathy -a practical approach to diagnosis and management- (Cros D) Cros D. ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p280-293
- 2) Berger P., Young P., Suter U.: Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease. Neurogenet. 4: 1-15, 2002
- 3) Warner L.E., Garcia C.A., Lupski J.R.: Hereditary peripheral neuropathies: clinical forms, genetics, and molecular mechanisms. Annu. Rev. Med. 50: 263-275, 1999
- 4) Young P., Suter U.: Disease mechanisms and potential therapeutic strategies in Charcot-Marie-Tooth disease. Brain Res. Brain Res. Rev. 36: 213-221, 2001
- 5) Taylor V., Zraggen C., Naef R., et al.: Membrane topology of peripheral myelin protein 22. J. Neurosci. Res. 62: 15-27, 2000
- 6) Kozuka N., Tachi N., Ohya K., et al.: Molecular and pathological studies in Charcot-Marie-Tooth disease 1A. Brain Dev. 19: 464-468, 1997
- 7) Warner L.E., Hilz M.J., Appel S.H., et al.: Clinical phenotypes of different P0 (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. Neuron 17: 451-460, 1996
- 8) Bergoffen J., Scherer S.S., Wang S., et al.: Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. Science 262: 2039-2042, 1993
- 9) Lemke G., Axel R.: Isolation and sequence of cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin. Cell 40: 501-508, 1985
- 10) Filbin M.T., Walsh F.S., Trapp B.D., et al.: Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule. Nature 344: 871-872, 1990
- 11) Hayasaka K., Himoro M., Sato W., et al.: Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of myelin P0 gene. Nature Genet. 5: 31-34, 1993
- 12) Shapiro L., Doyle J.P., Hensley P., et al.: Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin. Neuron 17: 435-449, 1996
- 13) Giese K.P., Martini R., Lemke G., et al.: Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. Cell 71: 565-576, 1992
- 14) 小塚直樹, 館延忠: 遺伝子ニューロパチー(Charcot-Marie-Tooth病)の遺伝子解析-P0遺伝子を中心に-. 札幌医誌 67: 39-49, 1998
- 15) Tachi N., Kozuka N., Ohya K., et al.: Expression of peripheral myelin protein zero in sural nerve of patients with Charcot-Marie-Tooth disease 1B. Pediatr. Neurol. 24: 33-35, 2001
- 16) 文部科学省: 大学等における組換えDNA実験指針. 1998. <2005. 10. 31アクセス>
<http://web.sapmed.ac.jp/anim/dnazikkenn.PDF>
- 17) 文部科学省: 組換えDNA実験指針. 2002. <2003. 10. 31アクセス>
http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/dna-a.pdf
- 18) 文部科学省, 厚生労働省, 経済産業省: ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針. 2001. <2003. 10. 31アクセス>
http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/genomeshishin/05062701.htm
- 19) 札幌医科大学: 札幌医科大学動物実験指針. 1993. <2003. 10. 31アクセス>
<http://web.sapmed.ac.jp/anim/zikkennshishinn.PDF>
- 20) Hayasaka K., Nanao K., Tahara M., et al.: Isolation and sequence determination of cDNA encoding the major structural protein of human peripheral myelin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 180: 515-518, 1991
- 21) 山下利春, 西川武志, 河村正朋, 他: PCRによる変異

- の導入—site-directed mutagenesis—. 蛋白核酸酵素
41 : 534-538, 1996
- 22) Shy M.E., Tani M., Shi Y., et al.: An adenoviral vector can transfer lacZ expression into schwann cells in culture and in sciatic nerve. *Ann. Neurol.* 38: 429-436, 1995
 - 23) Hsu S.M., Raine L., Fanger H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 93-100, 1981
 - 24) Le Gal La Salle G., Robert J.J., Berrard S., et al.: An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* 259: 998-990, 1993
 - 25) Davidson B.L., Allen E.D., Kozarsky K.F., et al.: A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nat. Genet.* 3: 219-223, 1993
 - 26) 藤田尚男, 藤田恒夫 : 標準組織学 (各論) (第3版) : 医学書院, 東京, 1992 p492-545
 - 27) Hiscoe H.B.: Distribution of nodes and incisures in normal and regenerated nerve fibers. *Anat. Record* 99: 447-475, 1947
 - 28) Bunge M.B., Bunge R.P., Peterson E.R., et al.: A light and electron microscope study of long-term organized cultures of rat dorsal root ganglia. *J. Cell Biol.* 32: 439-466, 1967
 - 29) Bunge R., Bunge M.: An evaluation of some determinants of neuronal size and internode length in peripheral nerve. *Anat. Record* 154: 324, 1966
 - 30) Martini R.: P0-deficient knockout mice as tools to understand pathomechanisms in Charcot-Marie-Tooth 1B and P0-related Dejerine-Sottas syndrome. *Ann. New York Acad. Sci.* 883: 273-280, 1999
 - 31) Scherer S.S., Chance P.E.: Myelin genes: getting the dosage right. *Nature Genet.* 11: 226-228, 1995
 - 32) Shy M.E.: Peripheral neuropathies caused by mutations in the myelin protein zero. *J. Neurol. Sci.* 242: 55-66, 2006