

論文の内容の要旨

論文題目 大脳型副腎白質ジストロフィーの病態機序の解明

氏名 羽尾 暁人

副腎白質ジストロフィー(ALD)は、ペルオキシソーム膜に発現する adrenoleukodystrophy protein (ALDP) 蛋白をコードする ATP Binding Cassette Subfamily D Member 1(*ABCD1*)遺伝子変異による X 連鎖性遺伝性疾患である。中枢神経の白質や副腎に障害を来し、その臨床病型は多彩である。その中で、大脳型 ALD は、脳の炎症性脱髄を来し、比較的急速に進行して数年で植物状態に至る予後不良の病型だが、発症早期の症例に対して造血幹細胞移植(HSCT)が症状停止に有効とされている。治療のためには早期診断が重要であり、特に大脳型と関連のある因子を同定することで発症リスクを予測することができ、より迅速に HSCT を行うことが可能となる。

前述の通り、ALD は多彩な臨床病型を呈しうるが、同一家系内でも様々な表現型が見られ、*ABCD1* 遺伝子変異の種類との genotype-phenotype correlation は存在しないとされる。現時点では、重症病型の大脳型がどのような機序で発症するのか不明である。

一方で、近親度が高いと臨床病型が近くなる傾向にあり、環境因子だけでなく、遺伝的な修飾因子が存在するものと考えられている。本検討では、大脳型 ALD の発症を既定する遺伝的要因とその病態機序を解明することを目的とした。

病態を考える手がかりとして、ALD 症例では血液や組織において、極長鎖脂肪酸(VLCFA)高値を取ることが挙げられる。*ABCD1* 発現産物の ALDP は、ペルオキシソーム膜に局在し、*ABCD1* 遺伝子変異によって VLCFA 蓄積を来すことから、膜輸送体として内部への VLCFA 輸送を担うことで、ペルオキシソームにおける β 酸化に関与すると考えられている。

また、*ABCD2,3* 発現産物の adrenoleukodystrophy-related protein(ALDR), 70-kDa peroxisomal membrane protein(PMP70)は ALDP と相同性が高く、ALDP と heterodimer を形成して、VLCFA 輸送に関与する。ALD 症例においても、VLCFA の酸化活性が 30%程度残存しているとされ(Wiesinger et al, J Biol Chem. 2013; 288: 19269–19279)、同様に VLCFA 膜輸送を担う ALDR, PMP70 の関与が考えられている。そのため、ペルオキシソーム内での β 酸化が intact であれば、VLCFA 輸送機能の一部を代償してしまう可能性が考えられる。

今日までに、ALD のモデル動物として、複数の系統の *Abcd1* knockout(KO) mice が作出されており、その表現型について報告が成されている。

Pujol らの報告では、月齢 15,20 か月の *Abcd1* KO mice を *Wt* mice と比較したところ、行動解析における有意差、神経伝導検査における伝導速度遅延、脊髄・末梢神経での非炎症性軸索変性を認めたが、大脳白質における炎症性脱髄の病理所見は認めなかったとしている(Pujol et al. Hum Mol Genet 2002; 11: 499-505)。

Kobayashi らの報告では、45-50 日齢の *Wt*, *Abcd1* KO mouse の脳・脊髄における脂質解析において、後者の C26:0/C22:0 値が有意な高値を取り、生化学的な異常は再現できたが、月齢 12 か月

の *Abcd1* KO mouse の脳・脊髄・末梢神経における病理学的解析では、異常所見は認めなかったとしている(Kobayashi et al, *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 232: 631-6)。

現在でも、大脳型 ALD のモデルマウスは作出されておらず、モデル動物の作成が達成できていないことが最大の課題となっており、大脳における炎症性脱髄を来たすためには、*Abcd1* 変異に加えて更なる因子が加わる必要があるものと推察される。そこで、大脳型 ALD の病態を再現するために何が必要なのか、ペルオキシソーム異常に関連付けて、改めて考察することとした。遺伝子変異によるペルオキシソームの機能異常に起因した疾患群をペルオキシソーム病と呼ぶ。ペルオキシソーム病は、大きく分けて、ALD を含むペルオキシソームに局在する蛋白の単独欠損症と peroxin(*PEX*)遺伝子変異によってそれらの蛋白が局在できず、ペルオキシソームの形成にも異常を来たすペルオキシソーム形成異常症に分類される。

ペルオキシソーム形成異常症に分類される Zellweger 症候群では、12 種類の *PEX* 遺伝子が原因遺伝子として知られ、そのホモ接合性変異によって中枢神経系を中心とした臓器障害を来たし、生後数か月から 1 年前後で死亡する。*PEX* 遺伝子は、遺伝子産物が互いに協働してペルオキシソーム内に酵素・蛋白を局在させ、その形成にも関わる。*PEX* 遺伝子変異により、 β 酸化に関与する酵素・蛋白も正常に局在できなくなるため、VLCFA 代謝にも異常を来たし、ALD 同様、血液・組織に VLCFA が蓄積する。尚、Zellweger 症候群と比較すると、ALD における VLCFA 上昇は軽度となる傾向にある(*Neurosci Lett.* 1998 Jul 10;250(3):145-8)。

今日までに数多くの *Pex* 遺伝子改変マウスが作成されている中で、2007 年に Kassmann らが oligodendrocyte specific *Pex5*^{-/-} mice が大脳の炎症性脱髄を来たしたとの報告をしている(Kassmann et al. *Nat Genet.* 2007; 39: 969-76)。行動解析では、数か月で神経症状が進行して、早期の死亡が目立ち、13 か月の時点で全てのマウスが死亡した。病理学的解析では、大脳型 ALD に類似した脳の炎症性脱髄を認め、症状を説明しうる所見であると考えられている。

一方で、*Pex5* 以外の *Pex* 遺伝子や neuron, astrocyte 等の他系統の神経系細胞に特異的な conditional knockout で同様の变化を来たしたとする報告は成されていない。

前述の通り、ALD における VLCFA 高値は Zellweger 症候群と比較して軽度であり、ALD では VLCFA の代謝を補完する経路が存在しているために生化学的変化が軽度で、大脳病変を生じにくいのではないかと考えた。そうであれば、ペルオキシソーム内への VLCFA 輸送を補完する他の transporter の存在や内部の β 酸化が intact であることが要因として考えられる。そこで、Kassmann らの報告を受け、oligodendrocyte-specific conditional KO に *Abcd1* KO を重ねることで病勢の増悪が再現できれば、*Abcd1* 遺伝子欠損が大脳型病変の出現につながる機序について手がかりが得られるのではないかと考えた。具体的には、*Abcd1* KO mice に *Pex5* KO mice (①全身性ヘテロ欠損、②オリゴデンドロサイト特異的ホモ欠損) をそれぞれ掛け合わせることで、*Abcd1* 遺伝子単独 KO で実現できなかった大脳型 ALD の病態モデルを作成することを目的とした。

まずは、*Pex5* 全身性ヘテロ接合性欠損マウスと *Abcd1* KO mice を掛け合わせることで *Abcd1*^{-/-}*Pex5*^{+/-} mice を得て、*Abcd1*^{-/-} mice との表現型の比較を行うこととした。

Wt, *Abcd1*^{-/-}, *Abcd1*^{-/-}*Pex5*^{+/-} 群の各 30 匹で、生後 3 か月時点から Rotarod test による評価を開始

して、既報の評価方法に倣って3か月毎の解析を施行した。生後12か月時点から、*Pex5*^{+/+} mice 30匹の解析も加えている。結果として、*Abcd1*^{-Y}, *Abcd1*^{-Y}*xPex5*^{+/+}群間のみならず、既報で報告されていた *Wt*, *Abcd1*^{-Y}群間の顕著な所見差も認めなかった。一点、生存曲線を描くと、*Abcd1*^{-Y}, *Abcd1*^{-Y}*xPex5*^{+/+} mice は他群よりも生存期間がやや短かった。また、生後24か月時点での各群マウス脳の病理学的解析では、*Abcd1*^{-Y}, *Abcd1*^{-Y}*xPex5*^{+/+} mice においてミクログリアの増殖と形態変化が疑われたが、炎症性脱髄の所見は認めなかった。

結論として、*Abcd1* KO mice に *Pex5* 全身性ヘテロ接合性欠損を加えることでは、行動解析における有意差や病理学的解析における炎症性脱髄の所見は得られず、目標としていた大脳型 ALD モデルを作成するには至らなかった。

次に、*Pex5* オリゴデンドロサイト特異的ホモ接合性欠損に *Abcd1* knockout を加えた *Pex5*^{flx/flx}*xMbp-Cre/WtxAbcd1*^{-Y} mice を得て、*Pex5*^{flx/flx}*xMbp-Cre/Wt* mice との表現型の比較を行った。結果として、前者が後者よりも重症化することを示すことができれば、これまで実現できなかった *Abcd1* 遺伝子変異が脳の炎症性脱髄の病勢に寄与するモデルが作成できるものと考えた。尚、最初は conditional KO mice 作成のため、新たに作出した *Cnp-Cre* マウスを用いる予定であったが、X-gal 染色で *Cre* 遺伝子の正常な機能が確認できず、初の試みとして *Mbp-Cre* マウスを使用することとした。

体外受精(IVF)・胚移植(ET)による交配を3回行って、解析に用いる4系統のマウス(*Wt*, *Abcd1*^{-Y}, *Pex5*^{flx/flx}*xMbp-Cre/Wt*, *Pex5*^{flx/flx}*xMbp-Cre/WtxAbcd1*^{-Y})を作出したが、後者2群については十分な数が得られなかった。そのため、得られたマウスは全て行動解析に回し、*Pex5*^{flx/flx}*xMbp-Cre/WtxAbcd1*^{-Y} 13匹, *Pex5*^{flx/flx}*xMbp-Cre*♂ 9匹, *Abcd1*^{-Y} 11匹, *Wt*♂ 12匹で評価を行う方針として、当初予定していた病理・脂質・発現解析を追加施行するため、今回と同様の方法で不足分のマウスを得ることとした。

行動解析として、前述の4群で1か月おきに Kassmann らの既報に従った staging を施行しており、現時点で生後2-10か月の評価が終了している。また、生後6か月時点からは、より客観的に運動機能を評価する指標として、Rotarod test を追加することとした。

Pex5^{flx/flx}*xMbp-Cre/Wt*, *Pex5*^{flx/flx}*xMbp-Cre/WtxAbcd1*^{-Y} の2群では、生後3か月時点から一部のマウスが発症して、その後も病勢は進行した。既報の *Pex5*^{flx/flx}*xCnp-Cre/Wt* mice と比較すると、両群の進行はより緩徐であった。また、*Pex5*^{flx/flx}*xMbp-Cre/Wt*, *Pex5*^{flx/flx}*xMbp-Cre/WtxAbcd1*^{-Y} 群を比較すると、全経過の中で後者の Clinical Stage がやや進んでおり、生後9か月時点から Rotarod test における所見差が目立つようになった。後者でのみ、24,27,33週齢で1匹ずつの死亡が確認されたことも併せ、前者よりも進行が早いものと考えられた。

尚、進行期の *Pex5*^{flx/flx}*xMbp-Cre/Wt* ♀ mouse の脳検体を用いた病理学的解析では、炎症性脱髄の所見が確認できている。

本検討の意義は、oligodendrocyte-specific *Pex5* knockout mice に *Abcd1* knockout を加えることで病勢の増悪を再現でき、脳の炎症性脱髄に対する同変異の関与を検討しうるモデルが作出できたことである。ただし、現時点では *Pex5*^{flx/flx}*xMbp-Cre/WtxAbcd1*^{-Y} 群で *Pex5*^{flx/flx}*xMbp-Cre/Wt*

群よりも病勢の進行が早いものと評価したが、行動解析は完結しておらず、個体数も少ない。また、新たにマウスを得て、病理・脂質・発現解析を施行して、多角的な評価を行う必要もある。今後は、予定通りに解析を継続して、慎重な評価を行っていく方針である。

次に、両群間で行動解析における差異を来たした原因を VLCFA 蓄積と関連付けて考察する。Hein らは、oligodendrocyte の培地に C22:0, C24:0, C26:0 を加えると、C16:0 と比較して cell toxicity が明らかに高く、他の神経系細胞よりも脆弱性が目立ったと報告している (Hein et al. Hum Mol Genet. 2008; 17: 1750-61)。その機序として、VLCFA による直接的な傷害の他、代謝物が作用した可能性も考え得る。脂肪酸は様々な脂質分画に組み込まれて、その生理作用を発揮する。例えば、lyso-phosphatidylcholine(LPC)は炎症促進や脱髄に関与し、その機能が脂肪酸の鎖長や不飽和度によって変化する可能性が示唆されている。VLCFA が細胞質に蓄積することで、LPC 分画に組み込まれるものが増え、その生理活性の変化が病勢増悪に寄与するという仮説は成り立つ。その他の脂質分画においても、VLCFA が取り込まれることで生理活性が変化して、大脳型 ALD の病態に関与する可能性も考えられ、今後の更なる検討を要する。

以上を踏まえ、両群の VLCFA 代謝経路を比較する。*Pex5^{flx/flx}xMbp-Cre/Wt mice* の oligodendrocyte では、VLCFA はペルオキシソーム内に輸送されるものの、内部でβ酸化を受けることができない。一方で、*Pex5^{flx/flx}xMbp-Cre/WtxAbcd1^{-Y} mice* では、VLCFA 膜輸送とペルオキシソーム内でのβ酸化が共に障害されている。後者を前者と比較すると、ペルオキシソーム内への輸送障害が加わっており、細胞質における VLCFA 蓄積量が増加して、細胞傷害に関与するのではないかと考えた。

今後の課題として、まずは oligodendrocyte の培地に VLCFA を加えて、細胞死を生じるまでの time course で各分画における脂質分析を行って、そこに至るまでに生じる細胞内の代謝を評価する in vitro での解析を施行することが望ましいと考えている。

また、今回は *Abcd1*, *Pex5* 遺伝子の double knockout mice を作成したが、*Pex5* KO によって多くの蛋白が正常に局在できなくなるため、ペルオキシソームの持つβ酸化以外の機能も障害しうるので、ALD の病態を再現した純度の高いモデルとは言い難い。そこで、VLCFA のβ酸化に関与する酵素をコードする acyl-coenzyme A oxidase 1(*Acox1*)等の遺伝子をターゲットとして、*Abcd1* 遺伝子との double knockout mice を作成することが検討される。

その他、*Abcd1* 遺伝子と同様に VLCFA の輸送に関与している *Abcd2*, *Abcd3* 等の遺伝子との double knockout mice を作成することで大脳型 ALD のモデル作成を目指すということも選択肢には挙がるが、単独欠損に上乗せされる量的変化は比較的小さいものと考えられる。既に、Pujol らが *Abcd1^{-Y}xAbcd2^{-/-} mice* を作出して、その phenotype について報告をしているが、脳の炎症性脱髄を来たすには至っていない(Pujol et al. Hum Mol Genet 2004; 13: 2997-3006)。一方で、*Abcd1^{-Y} mice* に *Abcd2* 遺伝子の過剰発現を加えることで、行動解析の結果や生化学的所見の改善が得られたとしており、この結果は *Abcd2* 遺伝子が部分的には *Abcd1* 遺伝子の機能を代替していることを示唆している。複数の物質が *Abcd2* induction を来たすことが知られ、治療介入に用いることも検討される。