

200936151A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服事業

Pelizaeus-Merzbacher (PMD) 病の  
診断及び治療法の開発

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田上 昭人

平成 22 (2010) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括・分担研究報告書

Pelizaeus-Merzbacher (PMD) 病の診断及び治療法の開発

研究代表者 田上昭人 国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部 部長

研究要旨 Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) は中枢神経系のグリア細胞（オリゴデンドロサイト）におけるミエリン形成不全による先天性白質脳症をきたす遺伝性進行性神経変性疾患である。疾患の原因としてミエリン形成に関与する Proteolipid Protein 1 (PLP1) 等の遺伝子変異により発症することが明らかとなっている。

本研究では、慢性特定疾患研究事業に登録されている患者数より日本での発症頻度について解析したところ 50-60 万人（出生）に一人と推定された。

次に、Proteolipid Protein 1 (PLP1) の遺伝子異常による PMD 患者に対する薬物療法を開発するために、中枢神経系のオリゴデンドロサイトの培養法を開発し、PLP1 遺伝子導入による PMD 病態モデル系を構築し、in vitro における薬物スクリーニング評価系を開発した。この薬物スクリーニング評価系を用いて PLP1 遺伝子発現過剰によるオリゴデンドロサイトのミエリン形成障害を修復する薬物のスクリーニングを行ったところ、ERK 抑制剤である U0126、PD98059 がミエリン形成障害を修復することが明らかとなった。この結果より U0126、PD98059 等の ERK 抑制剤は PMD におけるミエリン形成障害を改善する可能性が期待できる。

研究分担者

山内淳司 国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部 室長

宮本幸 国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部 研究員

A. 研究目的

Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD) は、中枢神経系におけるミエリン形成

不全による先天性白質脳症をきたす遺伝性疾患である。病型として Classic タイプと Connatal タイプの二つが知られ、Classic PMD は、乳幼児期より発症し幼小児期に死亡するタイプで、Connatal PMD は、より重症で出生時または新生時期より発症し乳幼児期に死亡するタイプである。欧米での頻度は 20-50 万人出生に 1 人の

割合で発症と報告され、症状は、早期より始まる筋緊張低下、眼振、運動発達の遅滞等の神経症状である。原因として PMD 患者の 80-95% は、ミエリンを構成する proteolipid protein (PLP)1 遺伝子異常が原因、その他 GJC2/GJA12、HSP60、Hyccin 等が報告されている。診断は、神経症状（筋緊張低下、眼振、運動発達の遅滞等）、MRI（頭部 MRI の T2 強調画像で、白質にびまん性の高信号領域の存在）、遺伝子診断（FISH 法による PLP 遺伝子の欠失や重複例等）で可能となっている。治療としては、対症療法のみで有効な根治療法はないと報告されている。これまでの PMD に関する研究では、① 株化細胞（Cos-7 など）を用いた研究が多く、初代細胞を用いた解析は少ない。② PLP1 の点変異体モデルでの解析が多いが、重複型モデルでの解析は少ない。③ 有効な薬物療法は開発されていないため、本研究では、日本における患者の発症頻度の調査解析、in vitro PMD 病態モデルの構築、PMD の発症メカニズムの解析、さらに PMD の治療ターゲットのスクリーニングを行った。

## B. 研究方法

### 1) 発症頻度の調査

日本における PMD 患者の発症頻度について 1998-2008 年の 11 年間に小児慢

性特定疾患に登録されている患者について解析を行った。

2) オリゴデンドロサイトの分離・培養法の開発、in vitro 病態モデルおよび薬物スクリーニング評価系の構築  
PMD は中枢神経系におけるオリゴデンドロサイトのミエリン形成障害が病因である。これまでオリゴデンドロサイト初代培養系を用いたモデルが報告されていなかったため、PMD の病因である中枢神経系におけるミエリン形成異常症の in vitro のモデル系を構築した。胎生 15 日のラット大脳よりオリゴデンドロサイト前駆細胞の分離精製を行い、培養を行った。精製したオリゴデンドロサイト前駆細胞をさらに 10 ng/ml PDGF 及び 10 ng/ml bFGF の入った Raff 培地（Nature 1983 Vol. 303 pp390-396）に換え、2 日間培養を行い、オリゴデンドロサイト前駆細胞を増殖させた。その後 10 ng/ml PDGF を抜き、10 ng/ml bFGF と 30 ng/ml T3 および 40 ng/ml T4 ホルモンを添加した Raff 培地に換え、分化誘導をかけ、さらに 1-7 日間培養することにより in vitro でオリゴデンドロサイトの培養を行った。

次に、PMD 患者の大部分の占める *plp1* の重複異常型を模倣する in vitro 病態モデル系の構築を行うために、高純度に精製されたオリゴデンドロサイト初代培養系に、*plp1* と蛍光物質

(ZsGreen) を同時にコードするレトロウイルス (multiplicities of infection (MOI)=0-2) を感染させた後、分化誘導を行い、ミエリン鞘のマーカーである myelin basic protein (MBP) に対する抗体を用いた免疫染色やウエスタンブロットおよび RT-PCR などにより、ミエリン形成能力に及ぼす影響を検討した。

さらに、この病態モデル系を使用して、PLP1 によるミエリン形成不全を改善する薬物のスクリーニングを行った。

(倫理面への配慮)

国立成育医療研究センター研究所の動物実験指針に沿い、研究を遂行している。また、3R に則り、最小限の匹数の動物を使用し実験を遂行している。

### C. 研究結果

日本における PMD 患者数の調査に関しては、PMD が小児慢性特定疾患に指定されていることより、1998-2008 年の間に登録されたデータベースについて解析を行った。1998-2008 年の間における登録患者数は、49 人 (男 46 人、女 3 人) で 11 年間の間に新規登録された患者数は、27 人であった。年度別登録件数は、2002 年以降 20 名前後であった。登録されている患者での病気の発症年齢は 1 歳未満が 38 人、1-10 歳が 2 人、10 歳以上が 2 人であっ

た。年平均出生数は、1982-2008 年が 1.8148、登録が行われた期間の 1998-2008 年で 1.909、発症頻度は年間出生数を約 110 万人とすると、50-60 万出生に一人の割合であった。

PMD は、中枢神経系におけるミエリン形成の異常が原因により起こる疾患である。ミエリンを構成するタンパク質の中で Proteolipid protein 1 (PLP1) は、中枢ミエリンを構成するタンパク質の約 50% を占め、PMD 患者の 80-95% は、ミエリンを構成する proteolipid protein (PLP) 1 遺伝子異常が原因、PLP1 遺伝子異常は、遺伝子重複が 50-70% を占めると報告されている。その為 PMD 患者の約半数は、PLP1 遺伝子の重複異常が原因と考えられる。本研究では、In vitro における Oligodendrocyte Precursor Cell (OPC), Oligodendrocyte (OL) の培養系の確立、PLP1 遺伝子導入 (過剰発現) による PMD 病態モデルの開発、PMD 病態モデルを利用した薬物スクリーニングを行った。

本研究で用いたオリゴデンドロサイトの分離・培養法により、80-90% の高純度オリゴデンドロサイト前駆細胞およびオリゴデンドロサイトが得られた。

得られたオリゴデンドロサイトを用いて PMD の PLP1 重複型モデルの作製を行った。OPC にマーカー遺伝子であ

る ZsGreen 単独または、PLP1 遺伝子と ZsGreen をもつレトロウイルスを感染させ、成熟した Oligodendrocyte でのミエリン形成について成熟ミエリンのマーカである MBP で染色を行い、判定を行った。PLP1 遺伝子を持たず ZsGreen のみを持つレトロウイルスを感染させたときの Oligodendrocyte では、MBP が発現しミエリンを形成しているのに対して、ZsGreen とともに PLP1 遺伝子をもつウイルスを感染させた細胞では、PLP1 を発現しているオリゴデンドロサイトでは MBP を発現が抑制されていた。発現を定量的に解析した結果、感染させるウイルス量を増やすに従って MBP 発現細胞の減少と MBP 発現量が低下していた。この結果より、PLP1 の発現量依存的に、成熟ミエリンの形成が抑制されることよりこの培養系は *in vitro* PMD モデルとして有用であると考えられた。以上のように本研究で確立した培養系のモデルは PMD の病態モデルとして有効であることが考えられたので、このモデルを用いて分化抑制を改善する薬物のスクリーニングに応用を図った。*In vitro* PMD (PLP1 重複型) モデルで約 50 化合物を含むライブラリー(The Screening-well™ library) のスクリーニングを行って見たところ、化合物の中で ERK inhibitor の一つである U0126 という化合物が、PLP1

過剰発現によるミエリン形成の抑制を抑制する、つまりミエリンを形成することができることが明らかとなった。つまり、U0126 により PLP1 過剰発現による MBP 形成障害が回復しミエリンの形成が観察された。同様に ERK inhibitor の一つである PD98059 でも同様の効果が得られた。

この結果より過剰発現した PLP1 が、ERK を介する pathway を刺激・活性化することによりミエリン形成不全を引き起こし、PMD を発症し、U0126、PD98059 はこの活性化された ERK の pathway を抑制することによりミエリン形成不全を改善しているものと考えられた。

#### D. 考察

小児慢性特定疾患登録患者数からの日本における PMD の発症頻度は、50-60 万出生に一人の割合と推定された。この数値は欧米での発症頻度が 20-50 万人に一人という数値よりも少なく、また日本における患者数の実態については、平成 21 年 7 月に開催された患者の会への参加人数が約 30 名程度であったことより、実際の数値よりも少ないと考えられる。

オリゴデンドロサイトの精製に関しては、本研究方法により、きわめて精製純度が高いオリゴデンドロサイトが得られ、*in vitro* での培養やスクリ

ーニング系に応用できたことより非常に有用な方法と考えられた。また、この初代オリゴデンドロサイト培養系に PLP1 を過剰発現した結果、PMD の病態であるミエリン形成障害がみられたことより、*in vitro* における病態モデル系及び薬物スクリーニングに適した病態モデル系と考えられた。

次に、この病態モデル系を用いてミエリン形成不全を改善する薬物のスクリーニングを行った結果、ERK 阻害剤が PLP1 のミエリン形成不全に改善効果を発揮すること示された。今後、この効果がどのようなメカニズムによって発揮されているかを詳細に検討し、治療標的分子候補を絞っていく予定である。また、中枢神経系では難しいとされているニューロンーオリゴデンドロサイト共培養系構築にも着手し、より *in vivo* に近い条件下で病態の再現を試み、その後、本研究で同定された薬物の効果を検証する予定である。現在まで、PMD の治療法は対症療法にとどまっているため、これらの知見は、PMD のみならず、オリゴデンドロサイトで病因が報告されている他の脱ミエリン病の発症過程を明らかにする上で、重要な手掛かりを与えるものと期待される。

#### E. 結論

日本における PMD 患者の発症頻度は数

十万人に一人という非常にまれな疾患であるが、遺伝性の進行性神経変性疾患であり、有効な根治療法がない現状を鑑みれば、対処療法とともに薬物療法の開発が必要と考えられる。

オリゴデンドロサイトの精製に関しては、齧歯類オリゴデンドロサイト前駆細胞およびオリゴデンドロサイトを高純度で精製する技術を確立した。さらに、PMD を模倣する *in vitro* の病態モデル系の確立に成功し、この系を用いて、PMD で観察されるミエリン形成不全を改善する薬物のスクリーニングを行い、薬物の同定に成功した。今後さらにこのモデルを用いることによりさらに有効な治療薬のスクリーニングが可能になるものと期待できる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

Junji Yamauchi

(Invited by Karl Herrup and Shin-ichi Hisanaga)

Cdk5 regulation of oligodendrocyte myelination

The 2<sup>nd</sup> Cdk5 international symposium

June 2009, Tokyo Metropolitan

University, Tokyo, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

