

201024192A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服事業

ペリツェウス・メルツバッハー病の診断  
及び治療法の開発

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田上 昭人

平成 23 (2011) 年 4 月

ペリツェウス・メルツバッハー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) は中枢神経系グリア細胞における遺伝性のミエリン形成不全疾患である。原因としてミエリンを構成する主な蛋白質の一つである Proteolipid Protein 1 (PLP1) が同定されている。しかし、現在までのところ、特異的治療薬は開発されていない。本研究では、PMD に対する薬物療法を開発するために、オリゴデンドロサイトへの PLP1 遺伝子導入による *in vitro* PMD 病態モデル系を構築した。本年度はこの薬物スクリーニング評価系を用いて、shRNA ライブラリーなどによる薬物のスクリーニングを行ったところ、いくつかの治療標的分子を明らかにすることができたので、ここに報告する。

**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  
鳥居知宏 国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部 研究員

ーゲン基質でコートした 25 mm カバーガラス上に神経細胞をまき、2、3 日おきにフルオリジンを含む神経栄養因子入りの培養液で 2、3 週間ほど培養する。これによって、神経細胞以外の線維芽細胞などが除去され、高純度の神経細胞が得られる。

**A. 研究目的**

Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) は、中枢ミエリン（髄鞘）形成不全疾患であり、現在国内におよそ 100 家系の患者がいると言われている、その主要な原因遺伝子産物は四回膜貫通型構造を有する Proteolipid protein 1 (PLP1) 蛋白質である。このように、原因遺伝子は同定されているものの、PMD の特異的治療薬が開発されていない。

本研究では PMD 治療薬開発を目的とし、特に分担研究として、PMD 治療の標的分子を明らかにすることを目標に分子探索を行った。さらに、細胞レベルの実験と並行して、それらの標的分子が動物実験レベルで有効か否かを判定するために、遺伝子改変技術の開発も試みている。

本年度は、昨年度までに我々が独自に開発してきた、*in vitro* の病態発症培養系を利用して、shRNA ライブラリーや化合物ライブラリーによる PMD 治療薬標的候補分子のスクリーニングシステムの構築、さらには標的分子の同定をすべく、研究を行った。

**B. 研究方法**

(1) 共培養に用いる神経細胞の単離

神経細胞は、胎生 15 日目のラットおよびマウスの後根神経節から実体顕微鏡を用いて単離する。単離後、0.25%トリプリンで処理し、細胞を分散させる。その後、I 型コラ

(2) 共培養に用いるグリア細胞の単離

オリゴデンドロサイトは、昨年までに我々のグループが独自に開発・改変した、胎児ラット大脳からのオリゴデンドロサイトの単離法を用いて精製している。

胎生 15 日のラット大脳数個を摘出し、0.25%トリプリンで組織を分解する。遠心し、沈殿した細胞を懸濁、ポリリジン (PLL) でコートとした細胞培養皿にまく。1 週間後、0.05%トリプリンで細胞をはがし、再び PLL でコートとした細胞培養皿にまく。さらに 1 週間後、0.05%トリプリンで細胞をはがし、ペトリ皿にまく。この過程で、オリゴデンドロサイト前駆細胞が 95%まで精製される。2 日後、10 ng/ml PDGF 及び 10 ng/ml bFGF の入った培地に変換し、2 日間培養する。この過程で、オリゴデンドロサイト前駆細胞が特異的に増殖する。さらに 2 日後、10 ng/ml PDGF を抜き、30 ng/ml T3 および 40 ng/ml T4 ホルモンを添加した培地に換え、オリゴデンドロサイトへの分化誘導をかける。

(3) PMD を模倣する *in vitro* 共培養

(1) で精製され、神経軸索を伸ばした神経節細胞上に、(2) で得たオリゴデンドロサイト前駆細胞をまく。この状態で共培養すると、次第にオリゴデンドロサイト前駆細胞が神経軸索に沿って増殖し、ミエリンを有するオリゴデンドロサイトに分化した後、神経軸索の周囲にミエリン組織が形成される。成熟ミ

エリンが構築されるまで、約3週間を要する。この共培養系を応用し、PLP1をコードするレトロウイルスを感染させたオリゴデンドロサイト前駆細胞をまいて、神経軸索と培養することにより、PMDで観察される髄鞘形成不全が *in vitro* で再現される。

#### (4) ShRNA および化合物ライブラリーを用いた治療薬標的分子のスクリーニング

PLP1 過剰発現により誘導されたミエリン形成不全を改善する標的分子を明らかにするために、我々が作成した線状型 RNA (shRNA) ライブラリーを、レトロウイルスにパッケージングしたもの、あるいは市販の化合物ライブラリーを、PLP1 と同時に、オリゴデンドロサイト前駆細胞に添加し、精製した神経軸索上で、2-3 週間共培養を行った。

#### (5) (4) で得られた候補分子の細胞レベルにおける効果の判定

PLP1 によるミエリン形成不全を改善する効果の見られた共培養に関して、そのカルチャーから total RNA を抽出し、RT-PCR およびダイレクトシーケンスを行うことで、標的となる分子候補を同定した。その後、標的候補分子に対する shRNA をコードする発現ベクターを作製し、病態共培養モデルに還元することで、その効果を実証した。

#### (倫理面への配慮)

組換え DNA 実験や *in vitro* での非増殖性ウイルスの感染実験に関しては、独立行政法人国立成育医療研究センター研究所組換え 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。

また、実験動物及び遺伝子改変動物の取り扱いに関しては、同研究センター研究所動物実験委員会で承認を得ており、3R を遵守し実験を行っている。

### C. 研究結果

現在もスクリーニングが進行中であるが、昨年までに同定した ERK キナーゼに加えて、神経の分化や生存に深く関わる、別種のキナーゼ、さらにはキナーゼ型受容体なども同定している。さらに、これらのノックダウンが PLP1 の誘導する不完全ミエリン形成を改善する効果も観察できており、引き続き慎重に判定を行っているところである。

### D. 考察

独自の培養系とオリジナルの shRNA ライブラリーを組み合わせることで、PLP1 によるミエリン形成不全を改善する数種の標的分子を同定した。これらは、これまで治療候補として挙げられていない新規の分子であるため、PMD 以外のミエリン形成不全疾患に

も適用できる可能性が考えられる。

標的分子の探索研究から得られるこれらの成果は、さらに動物レベルで実証することも必要であるため、現在、その準備を進めている。これによって、より有効な標的分子を絞り込めるはずである。さらに、ライブラリーを変える、共培養日数を変える、ミエリン形成不全の判定に用いるマーカを変える、など実験条件に工夫を加えてスクリーニングを続けることで、別経路の分子なども治療候補としてあがってくる可能性が期待できる。

### E. 結論

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スクリーニングを行い、標的分子候補の同定に成功した。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. 研究発表

#### 1. 論文発表

(1) Junji Yamauchi, Tomohiro Torii, Shinji Kusakawa, Atsushi Sanbe, Kazuaki Nakamura, Shou Takashima, Hajime Hamasaki, Shogo Kawaguchi, Yuki Miyamoto, and Akito Tanoue (2010) The mood stabilizer

valproic acid improves defective neurite formation caused by Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant Rab7 through the JNK signaling pathway. *J. Neurosci. Res.* 88, 3189-3197

(2) Shinji Kusakawa, Kazuaki Nakamura, Yuki Miyamoto, Atsushi Sanbe, Tomohiro Torii, Junji Yamauchi, and Akito Tanoue (2010) Fluoxetine promotes gliogenesis during neural differentiation in mouse ES cells. *J. Neurosci. Res.* 88, 3479-3487

(3) Reiko Mizutani, Kazuaki Nakamura, Shigetoshi Yokoyama, Atsushi Sanbe, Shinji Kusakawa, Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Hiroshi Asahara, Haruo Okado, Junji Yamauchi, and Akito Tanoue (2010) Developmental expression of sorting nexin 3 in the mouse central nervous system. *Gene Expr. Patterns* 11, 33-40

(4) Yuki Miyamoto, and Junji Yamauchi (2010) Cellular signaling of Dock family proteins in neural functions. *Cell. Signal. (Review Article)* 22, 175-182

(5) 宮本 幸、鳥居知宏、草川森士、中村和昭、三部 篤、山内淳司、田上昭人: パルプロ酸は Arf/cytohesin 経路を介して神経分

化過程を制御している 日本小児臨床薬理学  
雑誌 印刷中

## 2. 学会発表

(1) Junji Yamauchi, Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, and Akito Tanoue: The mood stabilizer valproic acid improves defective neurite formation caused by Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant Rab7. **Society for Neuroscience Annual Meeting**. November 2010, San Diego, USA

(2) Yuki Miyamoto, Tomohiro Totii, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi: Cdk5 regulation of oligodendrocyte precursor cell migration. **Society for Neuroscience Annual Meeting**. November 2010, San Diego, USA

(3) 山内淳司、宮本 幸、鳥居知宏、田上昭人: The mood stabilizer valproic acid activates the cytohesin-2-Arf6 signaling unit and induces abnormal neuritogenesis. **日本神経科学会・日本神経化学会・日本神経回路学会合同年会** 2010年9月・神戸

(4) 草川森士、宮本 幸、三部 篤、中村和昭、鳥居知宏、田上昭人、阿久津英憲、梅澤明弘、山内淳司: Fluoxetine promotes gliogenesis during neural differentiation in mouse ES cells. **日本神経科学会・日本神経化学会・日本神経回路学会合同年会** 2010年9月・神戸

(5) 宮本 幸、鳥居知宏、草川森士、田上昭人、山内淳司: Establishment of a retrovirus-mediated PLP1-expression system in primary oligodendrocyte precursor cell provides the new *in vitro* model for Pelizaeus-Merzbacher disease. **日本神経科学会・日本神経化学会・日本神経回路学会合同年会** 2010年9月・神戸

(6) 鳥居知宏、宮本 幸、山内淳司、田上昭人: The mood stabilizer valproic acid upregulates neurofibromatosis 2 (merlin) and JNK to induce aberrant neurite extension. **日本神経科学会・日本神経化学会・日本神経回路学会合同年会** 2010年9月・神戸

(7) 山内淳司、宮本 幸、山盛奈月、濱崎 一、鳥居知宏、田上昭人: The mood stabilizer valproic acid upregulates neurofibromatosis 2 tumor suppressor to induce aberrant neuronal differentiation. **日本生化学会・日本分子生物学会合同年会** 2010年12月・神戸

(8) 宮本 幸、鳥居知宏、田上昭人、山内淳司: Establishment of a PLP1-expression system in oligodendrocyte precursor cells provides the new *in vitro* model for

demyelinating disorder. **日本生化学会・日本分子生物学会合同年会** 2010年12月・神戸  
(9) 鳥居知宏、宮本 幸、川口祥吾、濱崎 一、西村浩二、山内淳司、田上昭人: The focal adhesion scaffold protein paxillin binds to the Arf6 activator cytohesin-2/ARNO and controls cell migration. **日本生化学会・日本分子生物学会合同年会** 2010年12月・神戸

## F. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 山内淳司、田上昭人、宮本 幸、鳥居知宏: 末梢神経軸索の再生剤及び再生方法  
**特願 2010-209899** 出願日 2010年10月4日

(2) 山内淳司、田上昭人、宮本 幸、鳥居知宏、友岡康弘: 中枢神経髄鞘形成不全の治療用組成物及び治療剤 **特願 2010-281777**  
出願日 2010年12月17日

