

201128097A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田上 昭人

平成 24 (2012) 年 5 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

## 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** 中枢の髄鞘（ミエリン）形成不全疾患の一つである Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) およびその類似疾患 (PMLD) は、中枢神経系グリア細胞に病変を持つ遺伝性疾患であり、脱髄の起こる部位によっては重篤な障害を来す。しかし、稀少疾病であるがゆえ、現在までのところ有効な根治療法が開発されていない。原因遺伝子として、PMD では中枢ミエリンの約 50% を構成する蛋白質の一つである Proteolipid Protein 1 (PLP1) が、PMLD では細胞間架橋蛋白質である GJC2 (別名 GJA12 または connexin47)、シャペロン蛋白質の HSPD1 (別名 HSP60) や機能未知の蛋白質である FAM126A などが報告されている。本研究では、これらの疾患に対する治療法を開発するため、脱髄による細胞変性を *in vitro* で忠実に再現できるグリア細胞と神経細胞の病態共培養系を構築した。その後、このモデル系を用いて、shRNA ライブラリーや化合物ライブラリーから治療薬標的候補分子を同定した。本年度は、スクリーニングによって明らかとなった候補分子の生体内での評価を行うための技術開発を行った。さらに、PMLD の病態モデル系の構築するため、Hyccin に焦点をあて、遺伝子改変動物の作製および細胞内における機能解析を行った。このように本研究では、*in vitro* のスクリーニングから生体内への評価を迅速に進めることができるため、遺伝性ミエリン形成不全疾患治療法開発に貢献するものと考えられる。

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

萎縮が起こる。髄鞘変性を呈する代表的な疾患として、多発性硬化症や糖尿病性神経障害、先天性の Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) およびその類似疾患 (PMLD) などが知られている。これらの疾患では、個人差があるものの、脱髄の起こる部位によって、運動障害、言語障害、視神経の萎縮、精神発達の退行などがみられ、進行性の症例が多くを認められている。現在まで、欧米を含めた各国において髄鞘変性に対する治療が試みられているが、その方法は神経保護薬物ないし蛋白質性増殖因子の投与という対症療法にと

### A. 研究目的

グリア細胞は、神経細胞の周囲を何重にも巻く髄鞘（ミエリン）とよばれる膜構造を形成し、神経細胞の軸索を物理的に保護し、また神経電気信号の伝導効率を上昇させる役割を持つ。髄鞘が変性すると、グリア細胞のみならず神経細胞を含む神経組織全体の変性、

どまり、創薬に成功した髄鞘変性に有効な根治薬はきわめて少ない。これは、治療の根本となる病態発症の分子機構に関する基盤不足によるところが大きいと考えられる。さらに、PMDに言及した場合、国内においては稀少疾病に属するため（欧米の統計学的数字によると20-30万人にひとりの頻度で病因を有しており、国内ではおよそ100家族いるという疫学的結果が出されている）、製薬企業による研究が敬遠されがちである。

PMDの約70-80%の患者では、中枢グリア細胞の主要なミエリン構造蛋白質であるProteolipid protein 1 (PLP1)蛋白質が原因遺伝子産物として報告されている。また近年、PMLDにおいても、GLC2(別名GJA12またはconnexin47)、HSPD1(別名HSP60)やFAM126Aなどの原因遺伝子の報告がなされ始めている。そこで、本研究ではPMDおよびPMLDの病態分子機構の解明とそれを基盤とした治療薬開発を目的とし、独自に構築した中枢グリア細胞と神経細胞の病態共培養系を用いて、治療標的分子の探索を行ってきた。

本年度は、これまでのスクリーニングによって明らかになった標的分子(キナーゼ)の生体内における検証を行うための技術開発に着手した。これに加え、PMLDにも焦点を広げ、なかでも原因遺伝子の一つとして同定されている、機能未知の蛋白質Hyccinに着目し、その遺伝子改変動物の作製および細胞生物学的の解析を行った。

## B. 研究方法

### (1) PMDを模倣する *in vitro* 病態共培養系

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単離した。単離後、0.25%トリプリンで処理し、細胞を分散させ、I型コラーゲン基質でコートした25mmカバーガラス上に神経細胞をまいた。神経細胞以外の繊維芽細胞などの除去を行うため、2、3日おきにフルオロウリジンを含む神経栄養因子入りの培養液で2、3週間ほど培養した。これによって、高純度の神経細胞が得られる。

中枢グリア細胞のオリゴデンドロサイトは、本研究の初年度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単離法を用いて精製した。胎生15日のラット大脳を摘出し、0.25%トリプシンで組織を分散させ、血清入りのMEM培養液で懸濁し、ポリリジン(PLL)でコートとした細胞培養皿にまいた。1週間後に一度継代し、さらに1週間培養後、0.05%トリプシンで細胞をはがし、ペトリ皿にまいた。この一連の培養・継代により、オリゴデンドロサイト前駆細胞が約90-95%まで精製される。ペトリ皿にまいた2日後、10ng/ml PDGF および 10ng/ml bFGFなどの増殖・栄養因子入りの培養液に変換し、さらに2日間培養した。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。これをオリゴデンドロサイト前駆細胞として用いた。

PMDを模倣する病態共培養系は、上記で得られたオリゴデンドロサイト前

駆細胞に、PLP1 をコードするレトロウイルスを感染させることから始まる。一定の MOI 値で調整したレトロウイルス懸濁液を 1 時間、増殖・栄養因子入りの培養液中でオリゴデンドロサイトに感染させた。その後、培地交換を行い、1 晩、増殖・栄養因子入りの培養液で培養した。このレトロウイルスは、PLP1 蛋白質と共に ZsGreen という緑色蛍光蛋白質を共発現するため、ウイルスに感染した細胞を蛍光顕微鏡下で容易に判別することができる。このようにして、PLP1 を多量発現したオリゴデンドロサイト前駆細胞を 0.05%トリプシンで細胞をはがし、2、3 週間培養して精製された神経節細胞の神経軸索上にまいた。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する。2-3 日間増殖させたのち、30 ng/ml T3 および 40 ng/ml T4 ホルモンを添加した栄養因子入りの培養液に変換することで分化誘導を行った。

## (2) PLP1 による細胞変性度の判定

(1) でオリゴデンドロサイトと神経細胞の共培養を 2-3 週間行ったのち、4%パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定し、界面活性剤入りの緩衝液で浸透させ、蛍光標識した抗ミエリン塩基性蛋白質 (MBP) 抗体を用いて染色を行った。ZsGreen を発現しているオリゴデンドロサイトの数を計測し、そのうちの MBP 陽性細胞をカウントした上で、統計学的処理を行った。

## (3) 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とその候補分子の同定

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、(1) の病態共培養系を用いて、化合物ライブラリーを PLP1 レトロウイルス感染時にオリゴデンドロサイト前駆細胞に同時に添加し、精製した神経軸索上でのせ、分化誘導を行った。ライブラリーの効果は(2)の方法により判定し、PLP1 によるミエリン形成不全を改善する効果の得られた共培養に関して、そのサンプルから total RNA を抽出し、ダイレクトシーケンスなどにより、標的分子候補を同定した。さらにその後、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、その効果を検証した。

## (4) 標的分子の機能が阻害された遺伝子改変動物の作製

(3) において、PMD 病態共培養系を用いて同定した治療薬候補のうち、細胞分化や生存に深く関わるキナーゼの効果を *in vivo* レベルで検証するために、キナーゼの機能が阻害されたマウスの作製に着手した。標的分子の機能を阻害することにより、ミエリン形成が促進されることが予測できるが、今回標的とするキナーゼはマウスの大部分の組織の発現しているため、機能阻害がマウスの生存に影響を与える可能性がある。そのため、髄鞘形成グリア細胞特異的に標的キナーゼを阻害できるト

ランスジェニックマウスを作製することとした。具体的なトランスジーンの配列は、グリア細胞に特異的に発現するプロモーター、機能欠失型キナーゼをコードする配列、蛍光蛋白質 GFP を発現するための配列、人工複合型プロモーター、EF1 転写終了シグナルと続く。

#### (5) PMLD 原因遺伝子の機能解析

PMLD では数個の病態原因遺伝子が同定されているに過ぎず、PMD と比較して研究が進んでいない。なかでも、Hyccin に関しては、患者における変異が報告されているに過ぎず、その生化学的特徴や細胞レベルでの性質でさえも不明のままである(2012年3月現在)。そこでまず、(4)で使用したグリア細胞特異的なプロモーター下流に、患者で報告されている変異を有する Hyccin 遺伝子を挿入したベクターを作製した。その後、そのトランスジーンをマウス受精卵へインジェクションした。

これと並行し、Hyccin を哺乳動物細胞内で発現する GFP 蛍光蛋白発現ベクターに挿入し、Hyccin の細胞内局在に焦点をあて、解析を進めた。細胞内に過剰発現させた野生型 Hyccin および変異型 Hyccin の局在を調べるため、前回まで用いた細胞内小器官マーカー抗体の種類を増やし、GFP との共染色を行うことで、判定を行った。また、それらの共局在の割合を数値化するために、画像を取り込み統計解析処理を行った。

(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

#### (1) PMD による細胞変性を改善する標的分子であるキナーゼの生体内での検証

現在までに標的分子の機能阻害型トランスジーンを作製を終え、今後マウス受精卵へのインジェクションを実施予定である。その後、PMD の原因遺伝子である PLP1 を過剰発現しているマウス (PMD を模倣する病態マウス、当研究所動物施設で飼育中) と交配を行うことにより、標的キナーゼの生体内での効果を検証していく予定である。

#### (2) PMLD 原因遺伝子の点変異型トランスジェニックマウスの作製

トランスジーンを作製を終了し、一般的なトランスジェニックマウスの作製法に従い、マウス受精卵へのインジェクションを行った。F0 世代でジェノタイプングを行ったところ、14 匹中 1 匹で外来性由来の Hyccin 遺伝子の過剰発現を確認することができた。しかし、F1 世代で Hyccin を過剰発現する

マウスを確認することができなかった。

### (3) PMLD 原因遺伝子の細胞内局在の解析

Hyccin 野生型および変異型の細胞内局在を観察した結果、野生型と比較し、変異型 Hyccin が主に小胞体に多量に蓄積していることが判明した。また、Hyccin 蛋白質をオリゴデンドロサイトに過剰発現させた結果、野生型、変異型共にミエリン形成能には影響を与えないことが明らかとなった。

### D. 考察

これまでに、独自の病態共培養系とオリジナルの shRNA ライブラリーや化合物ライブラリーを活用することにより、PLP1 によるミエリン形成不全を改善する数種の治療標的分子の同定に成功したが、今年度は、これらの分子の発現を生体内でノックダウンする新規遺伝子改変マウスの作製にも着手した。今後、この治療標的分子発現抑制マウスと PLP1 の過剰発現病態モデルマウスを交配させることなどにより、生体内においてスクリーニング結果を評価していく予定であり、*in vitro* から *in vivo* にわたる一連の試験系が確立される。

また、これらの結果に加えて、遺伝子そのものの機能が不明である PMLD 病因遺伝子の解析を進めた。今回作製した変異型 Hyccin のトランスジェニックマウスでは、F1 世代においてトランスジェーンの過剰発現を確認することができなかったことから、この変異蛋

白質が何らかの毒性効果を発揮したものと推測できる。今後、トランスジェーンの改変を行うと共に、Hyccin のノックアウトマウスの作製なども視野に入れていく。

さらに、Hyccin の細胞内局在の解析から、変異型 Hyccin が主に小胞体に蓄積することが明らかとなった。このことから、小胞体ストレスによる細胞内シグナル伝達経路の過剰な活性化が病態発症に関与していることも推測されるため、病態共培養系を用いてこれらの経路を抑制する化合物の効果を検証する予定である。

### E. 結論

本研究では、*in vitro* 病態共培養系を独自に開発し、それを用いて同定された治療標的因子候補の薬物効果を再び試験管内で実証することに成功し、現在、*in vivo* 遺伝子改変動物での検証までたどり着いている。病態共培養系から *in vivo* にわたる一連の試験系の有効性を示すことに成功しつつある、と考えている。今後、さらにこの系を応用し、PMLD を含む他のミエリン形成不全疾患を改善する薬物スクリーニング系の開発を行い、脱ミエリン疾患全般の病態機構解明に貢献したい。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) Junji Yamauchi, Yuki Miyamoto, Hajime Hamasaki, Atsushi Sanbe, Shinji Kusakawa, Akane Nakamura, Hideki Tsumura, Masahiro Maeda, Noriko Nemoto,

Katsumasa Kawahara, Tomohiro Torii, and Akito Tanoue (2011) The atypical guanine-nucleotide exchange factor, Dock7, negatively regulates Schwann cell differentiation and myelination. **J. Neurosci.** 31, 12579-12592

(2) Kazuaki Nakamura, Natsuko Kato, Kazuko Aizawa, Reiko Mizutani, Junji Yamauchi, and Akito Tanoue (2011) Expression of albumin and cytochrome P450 enzymes in HepG2 cells cultured with a nanotechnology-based culture plate with microfabricated scaffold. **J. Toxicol. Sci.** 36, 625-633

(3) Kazuaki Nakamura, Reiko Mizutani, Shigetoshi Yokoyama, Atsushi Sanbe, Shinji Kusakawa, Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Hiroshi Asahara, Haruo Okado, Junji Yamauchi, and Akito Tanoue (2011) Evaluation of drug toxicity with hepatocytes cultured in a micro-space cell culture system. **J. Biosci. Bioenz.** 111, 78-84

(4) Atsushi Sanbe, Tetsuro Marunouchi, Junji Yamauchi, Kouichi Tanonaka, Hideo Nishigori, and Akito Tanoue (2011) Cardioprotective effect of nicorandil, a mitochondrial ATP-sensitive potassium channel opener, prolongs survival in HSPB5 R120G transgenic mice. **PLoS One** 6, e18922.

(5) Kazuaki Nakamura, Tatsuya Yamashita, Hiroyuki Fujiki, Toshinori Aoyagi, Junji Yamauchi, Toyoki Mori, Akito Tanoue (2011) Enhanced glucose tolerance in the Brattleboro rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 405, 64-67

(6) Reiko Mizutani, Kazuaki Nakamura, Shigetoshi Yokoyama, Atsushi Sanbe, Shinji Kusakawa, Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Hiroshi Asahara, Haruo Okado, Junji Yamauchi, and Akito Tanoue (2011) Developmental expression of sorting nexin 3 in the mouse central nervous system. **Gene Expr. Patterns** 11, 33-40

## 2. 学会発表

(1) 宮本 幸、鳥居知宏、田上昭人、山内淳司：中枢神経の髄鞘形成不全は ERK 経路によって誘導される。日本薬学会（ポスター発表）2012年3月・札幌

(2) 宮本 幸、鳥居知宏、田上昭人、山内淳司：バルプロ酸は CMT2 型末梢神経変性病態を改善する治療薬候補である。日本薬学会（口頭発表）2012年3月・札幌

(3) 山内淳司：ダイナミックな形態変化を伴い、神経軸索のミエリン化を制御するマウス Rho 活性化因子 Dock7. 日本生化学会（シンポジウム）2011年9月・京都

(4) 宮本 幸、鳥居知宏、田上昭人、山内淳司：Ras/ERK 経路は中枢神経のミエリン形成不全を誘導する。日本生化学会（口頭発表）2011年9月・京都

(5) 鳥居知宏、宮本 幸、山盛奈月、江口貴大、濱崎 一、川口祥吾、西村浩二、田上昭人、山内淳司：サイトヘジン-2の塩基性領域はパキシリンとの会合の必要であり、細胞遊走を制御する。日本生化学会（口頭発表）2011年9月・京都

(6) 草川森士、宮本 幸、中村和昭、三部 篤、鳥居知宏、田上昭人、山内淳司：抗うつ剤フルオキセチンは

マウス ES 細胞をグリア系細胞系譜に誘導する. 日本生化学会(ポスター発表) 2011年9月・京都

(7) 鳥居知宏、宮本 幸、田上昭人、山内淳司: 新規シグナル伝達経路 Arl14D/Cytohesin-2/Arf6 が、気分障害薬バルプロ酸による神経伸張作用を仲介する. 日本神経科学会(ポスター発表) 2011年9月・横浜

(8) 鳥居知宏、宮本 幸、田上昭人、山内淳司: Mood-stabilizer, valproic acid, exhibits enhanced neuronal differentiation through Wrl14D/Cytohesin-2/Arf6. 日本分子生物学会(口頭発表) 2011年12月・横浜

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

山内淳司、田上昭人、宮本 幸、鳥居知宏、前田雅弘

センター発明委員会において出願許可され年内出願に向け協議中。

「中枢神経脱髄の再生剤及び再生方法」(仮称)



