

201442023A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患実用化研究事業

遺伝性髄鞘形成不全の病態に基づく革新的な治療法の開発

のための研究

(H26-委託(難)-一般-023)

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 井上 健

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所

平成27(2015)年 3 月

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患実用化研究事業

遺伝性髄鞘形成不全の病態に基づく革新的な治療法の開発

のための研究

(H26-委託(難)-一般-023)

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 井上 健

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所

平成27(2015)年 3 月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

遺伝性髄鞘形成不全の病態に基づく革新的な治療法の開発のための研究 井上 健	1
------------------------------------------	---

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. ドラッグ・リポジショニングによる病態標的治療薬の探索 井上 健、西澤絢子、李コウ、沼田有里佳、プリアンティ・マンガリカ、 佐谷秀行	12
2. 遺伝子重複を標的とした AAV による shRNA 遺伝子治療 岡田尚巳、岡田浩典	19
3. 遺伝子重複を標的とした AAV による shRNA 遺伝子治療 井上 健、岡田尚巳、李コウ、岡田浩典	22
4. 幹細胞移植による髄鞘の再生治療 井上 健、小坂 仁、中村祥子、新保裕子	27
5. 臨床応用にむけた治療評価尺度の作成と実効性の検証 小坂 仁、出口貴美子、青木志保	33
6. 基盤研究が終了した機能性食品化合物の臨床試験 井上 健、小坂 仁	39
7. 臨床治験に向けた患者データベースの確立と患者家族との情報共有 先天性大脳白質形成不全症の脳画像研究 高梨潤一、多田弘子	43
8. 臨床治験に向けた患者データベースの確立と患者家族との情報共有 患者家族を対象とした第6回および第7回市民公開セミナーの実施 出口貴美子、井上 健、小坂 仁、黒澤健司、高梨潤一	46
9. 臨床治験に向けた患者データベースの確立と患者家族との情報共有	

先天性大脳白質形成不全症の遺伝子診断 黒澤健司	-----	52
10. 臨床治験に向けた患者データベースの確立と患者家族との情報共有 新規遺伝子変異の同定による遺伝子変異の情報の集積 山本俊至	-----	55
III. 資料		
平成26年度班会議資料	-----	65
第6回公開セミナーお知らせ	-----	67
第7回公開セミナーお知らせ	-----	68
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	69
V. 研究成果の刊行物・別刷	-----	85

厚生労働省科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）

遺伝性髄鞘形成不全の病態に基づく革新的な治療法の開発のための研究
業務主任者 井上 健 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第二部

研究要旨

先天性大脳白質形成不全症は、遺伝性の中枢神経系髄鞘の形成不全を本態とする重篤かつ稀な神経疾患の一群である。代表的疾患の Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) 以外に Pelizaeus-Merzbacher-like 病、基底核および小脳萎縮を伴う髄鞘形成不全症、18q 欠失症候群、Allan-Herndon-Dudleys 症候群、Hsp60 シャペロン病、Salla 病、小脳萎縮と脳梁低形成を伴うび慢性大脳白質形成不全症、先天性白内障を伴う髄鞘形成不全症、失調、歯牙低形成を伴う髄鞘形成不全症、脱髄型ニューロパチー・中枢性髄鞘形成不全症・ワーデンバーグ症候群・ヒルシュスプルング病をあわせた 11 疾患が本疾患群に含まれ、すべての原因遺伝子が同定されている。しかし、現在までにこれらに疾患については、対症療法以外の治療法はない。そこで本研究は、その代表的疾患である PMD を主要な対象として、これらの疾患の細胞分子病態を標的とした治療法の開発を目指した基盤および臨床研究を実施する。異なる病態ごとに特異的な手法を用いた多様なアプローチからの治療法開発を行う基盤研究と、臨床試験を実施するための基盤整備を行う臨床研究を 2 本の柱として実施し、基盤研究、臨床研究の両面から本疾患群の克服を目指す。

研究組織

研究代表者

井上 健 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第二部 室長

研究分担者

小坂 仁 自治医科大学小児科 教授

黒澤健司 神奈川県立こども医療センター 遺伝科 部長

岡田尚巳 日本医科大学生化学・分子生物学 教授

高梨潤一 東京女子医科大学八千代総合医療センター小児科

山本俊至 東京女子医科大学 統合医科学研究所 准教授

出口貴美子 出口小児科 慶應義塾大学解剖学 非常勤講師

1. 研究目的

先天性大脳白質形成不全症は、遺伝性の中枢神経系髄鞘の形成不全を本態とする重篤かつ稀な神経疾患の一群で、代表的疾患として Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) が知られている。PMD 以外に疾患概念が確立された疾患が、少なくとも 10 疾患ある。2013 年に「基底核および小脳萎縮を伴う髄鞘形成不全症」の疾患原因遺伝子が同定され、11 疾患すべての原因遺伝子が同定された。しかしながら、臨床的には先天性大脳白質形成不全症が疑われながらも、遺伝子変異同定できない症例が数多く存在することも知られている。実際に平成 21 年度に本研究班の前身の厚生労働科研費研究班が実施した全国疫学調査によると、

本疾患群の患者のうち約3割で原因遺伝子変異が見つからず、確定診断に至っていないことが明らかになった。これは未だに原因遺伝子が未同定の患者が多く存在するためと考えられる。すなわち先天性大脳白質形成不全症は、まだ十分に解明が進んでいない疾患群である。また、これまで本疾患の診断基準や分類も十分に行われなかったため、これらについても前研究班である程度整備されて来たところである。一方で、これらの疾患についてもどれも対症療法以外の根治療法は存在しない。すなわち、本疾患を取巻く状況には、今後解決せねばならない課題が数多く存在する。

本疾患に限らず、治療法がある遺伝性難治性疾患はほとんど無く、多くは対症療法を受けながら、生涯にわたって重度の障害を持ち続けることになる。本疾患はその発症が出生直後であることが多く、運動および認知能力の障害の程度も重く、多くの患児は車いすでの生活・移動を余儀なくされる。平均寿命も近年の医療の発達に伴って伸びてはいるが、健常人と比較すればずっと短いと思われる。こういった状況から、本疾患の治療法の研究開発が強く望まれている。

そこで本研究では、その代表的疾患である PMD を主要な対象として、先天性大脳白質形成不全症の細胞分子病態を標的とした治療法の開発を目指した基盤および臨床研究を実施する。異なる病態ごとに特異的な手法を用いた多様なアプローチからの治療法開発を行う基盤研究と、臨床試験を実施するための基盤整備を行う臨床研究を2本の柱とする。そのために本申請では、多岐にわたる研究者のネットワークを構築し、下記の研究課題を実施する。

● 基盤研究

- (1) ドラッグ・リポジショニングによる病態標的治療薬の探索 (H26~28)
- (2) 遺伝子重複を標的とした AAV による shRNA 遺伝子治療 (H26~28)
- (3) 幹細胞移植による髄鞘の再生治療 (H26~28)

● 臨床研究

- (4) 臨床応用にむけた治療評価尺度の作成と実効性の検証 (H26~27)
- (5) 基盤研究が終了した機能性食品化合物の臨床試験 (H26~28)
- (6) 臨床治験に向けた患者データベースの確立と患者家族との情報共有 (H26~28)

本研究班の特徴は、基礎から臨床まで連続的に本疾患に精通する研究者チームを構築している点である。研究代表者は、これまで本疾患の原因遺伝子の同定、遺伝子診断法の確立と実用化、変異の分子機構、画像解析、臨床疫学、治療法開発など連続的にこの疾患の克服に関する研究に携わっている。分担研究者は臨床、画像、病理、遺伝子、遺伝子治療などの領域における専門家であり、本疾患に関する多面的な研究を推進するための体制になっている。治療法開発に関する基礎研究の実績があり、モデル動物や線維芽細胞など患者試料、治療効果の検証などの解析手法も確立している。また患者家族会とも連携体制にあるため、速やかに計画を実行し、臨床応用へ移行するためのシステムが構築されている。各分担研究者は、様々な専門的な立場から、本疾患あるいは本研究課題の実施に必要な基盤技術に通じており、それぞれの有機的かつ密接な連携のもと、研究代表者を中心に研究課題を実行していく体制を構築している。従って、本研究班は、病態解明と治療法開発研究から得られた知見を連続的に臨床試験へ

応用していくことができる研究体制を整え、「ベッドからベンチへ、ベンチからベッドへ」をスムーズに行うトランスレーショナルな研究を行うことを念頭におき、実際にこの疾患の研究に携わる研究者や医師からなる小回りのきく研究班になっている。

2 研究方法

基盤研究では、先天性大脳白質形成不全症の分子細胞病態を標的とした治療法の開発を行い、細胞およびモデル動物レベルでの治療効果の検証を行い、前臨床レベルでの基盤的技術開発を行うことを目標とする。

A. ドラッグ・リポジショニングによる病態標的治療薬の探索 (H26~28)

既存薬の新しい適応による治療は、開発コストや安全性、実用化の面で大きな利点を有する。*PLP1* 点変異による PMD を標的疾患とし、小胞体—ゴルジ体膜輸送障害を治療標的細胞分子病態として、ルシフェラーゼ・レポーターアッセイを用い、既存薬ライブラリー (1400 種。研究協力者：慶應義塾大学 佐谷秀行教授より供与) を検索し、新たな PMD 治療薬を見出す。見出された候補化合物は、初代培養、患者由来 iPS 細胞、疾患モデルマウス *Msd* にて治療効果を検証し、将来は臨床試験につなげる。

B. 遺伝子重複を標的とした AAV による shRNA 遺伝子治療 (H26~28)

PLP1 重複による PMD は最も頻度の高いので、特に治療法開発が急務である。*PLP1* 遺伝子重複による過剰発現を標的病態とし、アデノ随伴ウイルス (AAV) に組み込んだ *PLP1* 特異的 shRNA を用いた発現抑制による治療法の確立を目指す。初代培養を含む培養細胞系でその効果を確認した後、*Plp1* トランスジェニックマウス

(*Plp1-Tg*) 脳内局所投与あるいは血管内投与し、治療効果を分子遺伝学、組織学的に検証する。次に患者由来 iPS (研究協力者 慶應義塾大学 岡野英之教授らと既に樹立済み) を用いた治療効果の検証を行う。

C. 幹細胞移植による髄鞘の再生治療 (H26~28)

先天性大脳白質形成不全症の共通組織病態である成熟オリゴデンドロサイトの消滅に対し、幹細胞移植による髄鞘再生治療を試みる。移植に用いる幹細胞の選択と移植手法の検討が主要な検討事項である。免疫不全 *NodScid* と掛け合わせた髄鞘形成不全マウス MBP 欠損 *shiverer*、*Msd*、*Plp1-Tg* に対して、マウス神経幹細胞で実験系の妥当性を確認した後、ヒト歯髄由来間葉系幹細胞、ヒト iPS 由来神経幹細胞を用いて髄鞘への分化・形成、分化特異性、移植細胞の分散範囲と速度などの要因について検討する。

臨床研究では、基盤研究で得られた成果を速やかに臨床現場で活用することができるように、臨床研究を開始するために必要な体制の基盤の確立を目指す。

D. 臨床応用にむけた治療評価尺度の作成と実効性の検証 (H26~27)

天性大脳白質形成不全症に対する臨床試験の治療効果評価に適切な疾患の自然歴を考慮した評価尺度が確立されていない。そこで、既存の神経疾患評価尺度を参考に、本疾患群の臨床評価尺度を作成し、その臨床的妥当性・再現性等について定量的な評価を行う。国際的に統一した評価尺度であることが重要であるので、米国および欧州の研究者と連携して、作成・評価を各国で実施する。

E. 基盤研究が終了した機能性食品化

化合物の臨床試験（H26～28）

これまでPMDモデルマウスで有効性が確認された食品化合物クルクミンの臨床試験を実施する。クルクミンは、既にガンや認知症を対象とした臨床試験が国内外で実施されており、人における体内薬物動態や安全投与量も確立されている。まず評価尺度の作成と並行して、試験プロトコルの作成と倫理承認を行った後、小規模の臨床試験を実施する。参加患者（5名程度）は疫学調査への協力医師や患者家族会を通じて要請する。これらの過程は、基盤研究の成果を臨床応用していく過程での重要な実績となる。

F. 臨床試験に向けた患者データベースの確立と患者家族との情報共有（H26～28）

小坂班（厚労科研費補助金 難治性疾患政策研究）により実施される患者登録データベースの構築に、前研究班で蓄積した疫学研究、脳画像バンク研究によって得られた臨床・画像・遺伝情報を新データベースに統合して、臨床試験実施のための基盤情報として確立する。同時に5年間実施している市民公開講座を継続し、治療研究の成果を積極的に患者家族会と共有し、運営している研究班ウェブサイト（kcmc.jp/pmd）と合わせて、双方性の情報共有をさらに推進し、スムーズな臨床研究への参加協力を可能にする基盤体制を作る。

【倫理面への配慮】

患者皮膚線維芽細胞からのiPS樹立に関する倫理審査は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（H17年6月改正）に基づき、検体を採取する神奈川県立こども医療センターとiPSを樹立する慶應義塾大学および国立精神・神経医療研究センター

にて既に倫理審査され、承認を受けている。食品化合物クルクミンの臨床試験研究に関しては、「臨床研究に関する倫理指針」（平成20年）に十分配慮し、臨床研究を行うために臨床研究登録を行い、国立精神・神経医療研究センターにて倫理承認を受けた上で研究を実施する。本研究の成果により、臨床試験を行い得る候補薬が見いだされた場合には、治療効果の評価等に関する臨床研究を行うために臨床研究登録を行い、臨床試験を行うための体制を整える。また、遺伝子治療およびヒト幹細胞を用いる臨床研究に関しては、本研究期間内での実施は計画していないが、本研究によりその有効性・安全性等が確認できた場合は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」および「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に準じた研究計画を立案し、正規の手続きを経た上で実施する。

また、本研究では、動物（マウス）を用いた研究を行うため、倫理的な配慮が必要である。動物実験に関しては国立精神・神経医療研究センターの施設内の倫理指針に準拠した計画書で承認を得ており、実験動物に対して基本的に遵守すべき「動物の愛護及び管理に関する法律」（平成18年6月）や「動物の愛護及び管理に関する法律施行令」（平成17年12月）、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」（平成18年6月）に準じて、動物処置や処分の配慮を注意深く行う。また実験動物について疼痛緩和をおこない、苦痛を与えない方法をもって行うといった法第41条に記載されている3R（Replacement, Reduction, Refinement）の原則を忠実に履行する。

3 研究結果

A. ドラッグ・リポジショニングによる病態標的治療薬の探索

1400種の既存薬ライブラリーから変異型 PLP1 の細胞病態（小胞体-ゴルジ体膜輸送障害）を改善する薬剤を探索した。一次スクリーニングとして、分泌型ルシフェラーゼを用いたハイスループット・アッセイ系を開発し、これを用いて1400種の化合物について検討した結果、53個の化合物を同定した。これらについて、重複、細胞毒性、ルシフェラーゼ安定化作用による擬陽性、再現性の検討を行った結果、31種の化合物に絞り込むことができた。次に膜蛋白細胞内局在の改善効果を指標にした HeLa 細胞の KDELR 免疫染色による二次スクリーニングを実施した結果、22個の化合物に絞り込むことができた。これらのうち、実際に患者に長期間投与した場合の安全性や副作用の問題を考慮し、10個の化合物を第1群候補薬として選択し、残りを第2群候補薬とした。

B. PLP1 遺伝子重複を標的とした AAV による shRNA 遺伝子治療

HeLa 細胞を用いた一過性発現培養細胞系でマウスおよびヒトの PLP1 遺伝子を 80%以上の効率で発現抑制する shRNA 配列をそれぞれ3個確定した。さらにこれらを PolIII プロモーター下に発現を誘導する miRNA システムに適応させるために、miRNA 型に設計変更した。この配列を合成しクローニングベクターに組み込んだ後に、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターに組換えた。この AAV ベクターを用いて、今後 AAV の大量精製を実施する予定である。

また、感染実験に用いるウイルスの血清型が構築およびオリゴデンドロサ

イトへの導入のための血清型決定を実施中である。

C. 幹細胞移植による髄鞘の再生治療
被移植マウスとして PLP1 点変異マウス Msd および MBP 欠損マウス Shiverer を用いて幹細胞移植によるオリゴデンドロサイト (OL) 再生技術を確立した。移植する幹細胞として、ヒト歯髄幹細胞を選択した。歯髄幹細胞は多分化能を有し、特に OL へ分化誘導される事が知られている。また、非侵襲的に採取可能であり、倫理面での問題が少ない。さらに腫瘍形成がほとんどなく、移植安全性が高い点も特徴的である。さらに増殖能が高く、培養が簡便で低コストである。我々は、まず4~5週齢の若年成体マウスの大脳実質に細胞を移植する技術を確立した。次に4~5週齢 NodScid-Shiverer マウスにヒト歯髄幹細胞を移植し、4-6週後に Oligo2 免疫染色を用いた組織学的解析を行ったところ、移植細胞された細胞が OL 系譜へ分化している事を確認した。

また、慶應義塾大学岡野英之博士らとの共同研究により、ヒト iPS を培養下に OL に誘導する技術を開発した。

D. 臨床応用にむけた治療評価尺度の作成と実効性の検証

臨床試験を想定した治療効果評価尺度の探索を行った。臨床使用を前提に、患者での実用性を検討した後、4つの評価尺度の併用を決定した。今後、患者登録への導入を目指す。

E. 基盤研究が終了した機能性食品化合物の臨床試験

家族会を通じて臨床試験への協力要請と治療効果の評価尺度の決定（上記）を実施した。これを元に機能性食品化

合物クルクミンの小規模臨床試験の実施に向けた倫理審査をすすめる。

F. 臨床治験に向けた患者データベースの確立と患者家族との情報共有

国立精神・神経医療研究センター脳病態統合イメージングセンターの画像登録プラットフォームIBISSを用いて患者データベースの確立を進めた。これまでに約 50 症例の患者登録（臨床症状、頭部 MRI 画像を含む検査所見）を行った。特に新たに疾患遺伝子 TUBB4A 変異が見いだされた 6 例を集積することが出来た。また患者家族を対象とした市民公開講座を東京と大阪で 2 回開催し、合計 36 家族、約 150 名の参加を得た。なお、当初予定していた新データベースへの統合は小坂班が不採択となったため延期となった。

4 考察

これまで本研究班の前身となる厚生労働科学研究費（難治性疾患克服研究事業）研究班は、稀少性難病である先天性大脳白質形成不全症の臨床や研究に関わってきた臨床医と研究者を取りまとめ、臨床・基礎研究一体型の研究組織を構築し、先天性大脳白質形成不全症の患者の身近なサポートから診断、治療に関する研究までを一体的に推進するものであった。本研究班もその流れを引き継ぎ、基礎研究から臨床研究まで幅広い視点から本疾患の克服に向けた研究体制をとることを大きな特徴として実施された。

本研究における研究テーマは、平成 21～23 年度および平成 24～25 年度まで実施した難治性疾患克服研究事業での研究班での成果をさらに発展させる形で、特に本疾患の治療に向けた研究を主軸とし、基盤技術開発と臨床的体制作りの両輪のテーマとして実施

している。

基盤研究は、これまで研究者代表者を始めとする研究者の病態解明研究から明らかになって来た先天性大脳白質形成不全症の代表疾患 PMD の細胞分子病態を標的として、革新的な治療法開発を目指した技術開発を目指した基礎的研究を実施するものである。本研究ではその戦略として、3つの主体となる分子細胞病態に対してそれぞれ異なる研究テーマと手法を用いて、その克服を目指している。

ドラッグ・リポジショニングによる病態標的治療薬の探索は、PLP1 遺伝子点変異による PMD の分子病態を標的とした治療法の開発のための研究である。PLP1 遺伝子点変異は、多くの場合アミノ酸置換を引き起す。アミノ酸置換を伴った変異型 PLP1 蛋白質は、小胞体ストレスを引き起こすことが知られており、これが OL の細胞死を引き起す大きな原因であると考えられて来た。小胞体ストレスに対しては、細胞を守るために unfolded protein response (UPR) という細胞反応が発動されるが、過剰なストレスから回避できない場合に、細胞死を誘導するシグナル経路に誘導されることが、PMD における OL 脱落の細胞病態であると考えられている。しかしながら、近年、UPR の破綻のみが PLP1 点変異の細胞病態ではないことが示唆されてきた。我々も最近、変異体 PLP1 が正常な膜蛋白質や分泌蛋白質の分泌経路輸送を障害するという事を見出し、これを報告している (Numata et al. 2013 JBC)。本研究では、この細胞内輸送障害を治療のための分子標的として注目し、この細胞病態を改善させる薬剤を同定することによって、本疾患の治療薬を見出すことができるのではないかと考えた。

本研究課題のもう一つの特徴は、治療薬候補をスクリーニングするためのライブラリーとして、既存薬ライブラリーを用いている点である。小児の稀少性難病の治療薬の実用化を念頭に置いた場合、小児での安全性の確立や開発コストを考慮した場合に、新規化合物は様々な困難を伴うことが予想される。一方、既に市販され、安全性と臨床現場での供給体制が整っている既存薬を使用できれば、実用化が非常に容易になる。そこで、我々は慶應義塾大学先端医科学研究所の佐谷秀行教授が確立した1400種の市販薬を含む既存薬ライブラリーの供与を受けて本研究を実施した。

本年度は、まず一次スクリーニングのための技術開発を行った。これは以前の病態解明研究で使用した系を応用したもので、Renilla Luciferase レポーター蛋白質のN末に Igk の分泌シグナルを結合することにより、分泌型ルシフェラーゼとし、細胞内（分泌前）および培養中（分泌後）の活性を測定することにより、分泌経路の定量的な測定を可能にするものである。

この系を用いて1400種の薬剤について、変異体 PLP1 による細胞内分泌経路障害を改善させる効果を持つ薬剤を探索したところ、53個の化合物を同定した。これらについて、重複、細胞毒性、ルシフェラーゼ安定化作用による擬陽性、再現性の検討を行った結果、31種の化合物に絞り込むことができた。

次に二次スクリーニングとして、これらの薬剤による改善効果が、外来性の分泌蛋白質のみならず、他の内在性の蛋白質についても確認できるかどうかについて、同じく HeLa 細胞を用いた KDEL 受容体(KDEL R)の免疫染色にて検証した。KDEL R は Golgi 体

局在する膜蛋白質で、KDEL 配列を持つ小胞体シャペロン蛋白質などを Golgi 体から小胞体に輸送する機能を有する蛋白質である。以前、我々は変異体 PLP1 を一過性発現した HeLa 細胞では、KDEL R の局在が Golgi 体から小胞体に変わることを確認している。本解析では、候補薬剤によってこの小胞体への局在が Golgi 体に戻るかどうかを検証した。現在、実験を継続中ではあるが、変異体 PLP1 を発現する HeLa 細胞では、未治療では ER 局在型のパターンを示す細胞の割合が20%を超えるが、おおく薬剤を加えた細胞では、その割合が低下することが明らかになった。今後、統計学的有意差の検証を行うために、Nを増やしていく予定であるが、現段階では一次スクリーニングで選択された多くの薬剤が、標的となる病態を改善させる薬理効果を持つことが HeLa 細胞を用いた in vitro の系で実証された。

今後は Msd マウスの胎仔脳から樹立したオリゴデンドロサイト初代培養を用いて、その治療効果を検証していく予定である。

PLP1 遺伝子重複を標的とした AAV による shRNA 遺伝子治療プロジェクトは、本年度より開始されたものである。初年度は、今後の研究に用いられる資材の作成を中心に実施された。マウスおよびヒト PLP1 を標的とした shRNA 配列の設計を行い、実際にその効果を HeLa 細胞への PLP1 一過性発現の系を用いて実施した。その結果、高効率にマウスおよびヒト PLP1 の発現を抑制する shRNA 配列を少なくとも3種同定することができた。次にこれらを AAV ウィルスに組み込んで発現させるためのカセットの構築を行った。shRNA を高効率に発現させるためには、これまでよく使われて来

たシステムは、PolIII によって転写される U6 プロモーター下に shRNA 配列を組み込むものである。しかし、近年より高い発現を可能にするシステムとして、CAG プロモーターを用いた PolIII による転写システムを用いる系が開発されており、今回もこの系を用いることとした。これは GFPcDNA の下流の 3'UTR から siRNA の形で設計した shRNA を発現させるもので、高効率な発現を得ることができるのみならず、用いるプロモーターによって、組織特異的あるいは時期特異的な発現を誘導することも可能である。この特性は、先天性大脳白質形成不全症のように、標的細胞でのみ shRNA を発現させることがメリットになる疾患については、特に副作用の可能性を減らすという意味で、治療的なメリットが大きいと考えている。例えば、PLP1 プロモーターを用いることにより、オリゴデンドロサイト特異的に shRNA の発現を誘導できる。

実際の治療実験を開始する前に、いくつか解決しなければならない課題が残っている。その 1 つが血清型の決定である。本研究課題では、オリゴデンドロサイトが標的細胞となるため、オリゴデンドロサイトへの感染効率が高い血清型の AAV を選択する必要がある。これまでの知見より、マウス脳への AAV 投与において、オリゴデンドロサイトへの感染効率は AAV8 と AAV9 で比較的高いことが知られている。そこで、我々は今回用いる出生直後のマウスにおいて、この 2 つの血清型について検証することにした。今後、これらの血清型のコントロール AAV を感染させた後に、オリゴデンドロサイトマーカーを用いた免疫染色により、感染効率の検証を実施していく予定である。

幹細胞移植による髄鞘の再生治療は、すべての先天性大脳白質形成不全症の共通病態である髄鞘形成不全を標的的病態とするため、実用化されれば最も適応範囲が広がると考えられる。また、薬剤や AAV による治療が残存オリゴデンドロサイトを標的とすることから、その治療効果は残存オリゴデンドロサイトの数やその状態に大きく左右されることが予想されるのと異なり、幹細胞移植治療は、残存オリゴデンドロサイトの状態によらず、移植細胞による再髄鞘化が可能になると思われる点で、ある程度発症から年月が経っている患者でも治療効果が得られる可能性があり、非常に実用化が期待される。

本研究課題では、移植細胞として歯髄幹細胞に焦点を当て、その有用性を検討している。歯髄幹細胞は、医療廃棄物である智歯や乳歯から簡便に得ることができる。ES と比較して、倫理面での問題がない。また、遺伝子導入を行う必要がないため、ガン化のリスクが少ない。培養が容易で、低コストである。また多能性を有しており、特にオリゴデンドロサイトへの分化が報告されており、本研究課題で対象としている先天性大脳白質形成不全症には非常に適した細胞リソースと考え、この細胞を移植に用いることを検討している。

現段階でいくつかの問題点に直面している。第 1 にマウスへの移植技術の難しさ、である。PMD モデルマウスである Msd や Tg マウスは、生後 1 ヶ月ほどで死亡することから、出生直後での移植治療が必要になる。これは成体マウス脳への移植に比べ、はるかに難しい。我々は様々な手法を用いて、安定的に移植する技術を確認しようと試みたが、移植部位の正確なマッピング、低温麻酔による移植後の蘇生、移

植後の母親による食殺など多くの問題が生じ、現段階では残念ながら、この技術を確認できていない。今後、更なる技術の改善により、生直後のマウスへの移植を可能にしたい。

生直後のマウスへ移植が極めて困難であったため、我々は移植を MBP 変異による Shiverer (Shi) マウスに変更した。Shi は生後 90 日程度の寿命であるため、若年成体での移植と、より長期間に渡る観察が可能になる。一方、脳病理は Msd などと同様に、重度の髄鞘形成不全を呈する。我々は生後 4-5 週齢の Shi に歯髄幹細胞を移植し、4-6 週間の飼育の後、抗 Oligo2 および human nuclei 抗体を用いた神経病理学的解析によって、移植細胞の fate を観察することができた。この結果、まだ十分な個体数の観察ができていないものの、移植された歯髄幹細胞が 4-6 週後でも生き残っていること、それらがすべからく Oligo2 陽性であることを見出した。これらの知見は、歯髄幹細胞移植が先天性大脳白質形成不全症に対する有望な幹細胞移植治療の細胞リソースとなりうることを示唆し、今後の本研究課題の推進が期待されると考えている。

臨床研究は、基盤研究による前臨床試験で有望な治療候補となった治療技術をスムーズに臨床試験につなげていくために重要な臨床的基盤体制を確立することを目標としている。これらは大きく 3 つのテーマに分かれており、重症度評価を主体とする臨床評価尺度の確立、対象患者の把握に必要な患者データベースの確立、そして患者家族との情報交換を含めた情報発信の場の確立である。そのために、本研究は 3 つの研究課題について、研究を実施している。

臨床応用にむけた治療評価尺度の作成と実効性の検証では、実際に臨床試験を実施することを想定した臨床評価尺度の選定と有効性の検証を行うことを目指している。これは、これまでの PMD では大雑把な重症度分類しかなく、これはむしろ病型分類に近いもので、わずかな臨床症状の変化を検出することは全くできないものであった。近年、同様の考えに基づいた重症度臨床評価尺度の必要性が臨床家の間で言われており、米国のデトロイトの研究グループによって開発された PMD 機能障害評価スコアが最近、論文報告されている。我々は臨床現場で用いることを前提に、比較的簡便で、特に心理士などの専門職の介入を必要としない複数の既存の評価尺度を組み合わせることにより、PMD を始めとする先天性大脳白質形成不全症の重症度臨床評価尺度を選択した。これらについての詳細は、分担研究報告書に記載されている。

基盤研究が終了した機能性食品化合物の臨床試験に関しては、第 1 の目的が、以前前臨床試験をマウスレベルで実施したクルクミンについての小規模臨床試験を実施し、その有効性に関する検討を行うこと、そして第 2 に上記の臨床評価尺度を含め、PMD を対象とした本邦初の治療を目指した臨床試験を行い、その実効性を検証することである。初年度は、臨床評価尺度に関する評価が終了しておらず、従ってクルクミンの臨床試験の詳細な計画内容を決定するに至っていない。この課題に関しては、来年度以降の進展が期待される。

臨床治験に向けた患者データベースの確立と患者家族との情報共有に関しては、大きく 3 つのテーマが含有される。1 つは MRI 画像を中心とする患

者臨床像の評価についての研究である。本疾患の診断、鑑別、重症度の評価に、MRIは必須である。加えてMRIの所見を的確に判断するには、遺伝子解析による遺伝学的診断の有無が重要である。従って、MRI画像研究および遺伝子解析研究を並行して実施していくことが重要となっている。分担研究報告では、これらについて、各分担研究者が行った研究が報告されているが、重要な点は、これらの研究がすべて有機的な臨床情報として、データベース化されることである。

第2のテーマが、その患者データベースの確立である。これまで、本研究班の前身となる班で、国立精神・神経医療研究センターIBICに設置されている脳画像データベースIBISを用いて、患者のMRI画像データおよび臨床情報を収集・管理してきた。現在までに40例以上の先天性大脳白質形成不全症の患者情報が蓄積されており、これは非常に貴重なデータベースであると考えられる。来年度より、IBISが新しいシステムに移行することになっており、本研究班でもその新システムを用いて新たなデータベースの高知を行っていく予定である。具体的にはクラウド方式によるデータベースとなり、多数検体の画像をより簡便に収集・管理・閲覧が可能になる。さらに臨床情報のデータベースも検索可能となり、より高度なデータベースプラットフォームが構築される予定であり、来年度以降の発展が期待される。

第3のテーマが、市民公開セミナーの開催を基盤とする患者家族との情報共有である。本市民公開セミナーは、本年度で6年目を迎え、恒例行事として定着した。毎回、25家族ほどの参加があり、また託児を実施していることから家族での参加が多く、ボラン

ティアのスタッフも毎回充実しており、全体の参加者は約100名に上る大きなセミナーになっている。本年度は初めて、関西地区でも開催し、年2回の実施となった。関西地区での開催は、これまでの東京での開催時に、家族から要望が出ていたもので、今年関西在住の家族会メンバーが会場手配などを運営参加して頂くことにより、初めて開催となった。今後も研究班からの一方的な情報提供の場、という形ではなく、患者家族会とのネットワークの中での行事として、開催することにより、より意義深いセミナーを継続することができると考えている。

5 結論

中枢神経系の髄鞘の形成不全を共通病態とする疾患群で、重度の運動発達障害を来す稀少性遺伝性疾患である先天性大脳白質形成不全症を対象とした研究を実施した。その代表疾患であるPMDを標的とした治療法開発のための基盤技術開発研究を進めるとともに、その成果を臨床現場で速やかに実践するための環境づくりという両輪で研究を進めている。

基盤研究による治療技術開発は、ドラッグリポジショニングにより分子細胞病態票的治療薬の同定、shRNA-AAVを用いた遺伝子発現抑制によるPLP1重複変異の治療、歯髄幹細胞移植による髄鞘再生治療と3つの異なるテーマについての研究を行っている。それぞれが非常に大きなテーマであり、推進に当たり困難も数多くあるため、必ずしも順調とは言い切れない部分もあるが、それぞれの担当者が工夫してそれらの問題点を克服しつつ、順調に成果は上がって来ている。来年度以降、さらに知見を重ね、一步でも臨床での実用に近づけるようにしたいと考えて

いる。

臨床研究では、これまで治療法が無かった本疾患の治療法が産まれることを想定して、その実用化のために何が必要か、ということ常を念頭に置いた上で、臨床研究を進めるための基盤となる体制を作り上げることを目標に、本疾患に長く関わっている各方面の臨床研究者のチームによって進められている。臨床評価尺度の選定と実効性の評価は、臨床試験の実用化のために最も重要なことの1つである。また患者データベースの確立は、今後の臨床試験への協力の要請を含め、様々な臨床研究のためのリソースとして、そして患者家族への情報のフィードバックのために重要である。いかに治療研究に供する情報を収集管理できるかという点を重点的に考えて、今後一層充実したデータベースの構築を行っていく。実際に臨床試験の実施に際しては、患者家族から信頼されている医療チームであることが、試験成功の重要な要素となると考えられる。そういう意味で、人間対人間の良好な関係性を研究班としてきちんと構築していくことを目標にしている。稀少性疾患であるからこそ、より親密で細やかな協力体制が必要になり、それが本疾患の克服のための大きな力を産むと考えている。

6 健康危険情報

特記事項無し

7 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働省科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

ドラッグ・リポジショニングによる病態標的治療薬の探索

業務主任者 井上 健¹

研究協力者 西澤絢子¹、李コウ¹、沼田有里佳¹、プリアンティ・マンガリカ¹、
佐谷秀行²

1 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第二部

2 慶應義塾大学 先端医科学研究所

研究要旨

小児の稀少性遺伝性疾患の新薬の開発は、製薬企業の採算ベースや小児での安全性の確認の問題により困難と言われている。従って安全性が確立され、コストも安い既存薬の適応外臨床応用が期待されている。Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) は先天性大脳白質形成不全症の代表的疾患である。原因遺伝子 PLP1 の変異のうち、2 番目に頻度が高い点変異は、アミノ酸置換変異を伴うことが多い。PMD では、生直後から始まる大脳の髄鞘化に伴って発現が急上昇する変異体 PLP1 が小胞体 (ER) に蓄積し、これが UPR を誘導し、最終的にオリゴデンドロサイト (OLs) の細胞死を引き起こすことが主たる病態と考えられて来た。しかし unfolded protein response (UPR) の CHOP 経路など細胞死シグナル経路の遮断が必ずしも細胞死を抑制しないことから、これらの変異蛋白質によってもたらされる細胞病態は、UPR 以外にも別の機序が存在することが示唆されている。我々は以前、本疾患における新規病態仮説として、変異体 PLP1 によって他の正常な分泌蛋白質や膜蛋白質の輸送障害が起こり、正常な細胞機能を維持出来ず、破綻してしまうこと、すなわち ER-Golgi 分泌経路の輸送障害が、PMD の主要な病態である可能性を示した。本研究では、この病態を標的とし、これを改善させる治療候補薬を既存薬ライブラリーの中から同定し、革新的な本疾患の治療薬を見出すことを目的とする。

1. 研究目的

遺伝子コード領域に起こるアミノ酸置換は、最も頻度の高い疾患原因変異である。しかし、各遺伝子のアミノ酸置換変異が細胞に及ぼす影響には、いくつかの異なる分子機序が関与する。これらの変異は大きく機能喪失型、優性阻害型、機能獲得型の 3 型に分類される。機能獲得型変異は、さらに 2 種に分かれ、蛋白質が本来持つ機能を修飾するもの(受容体の過剰活性化など)と全く新規の毒性を獲得するもの(蓄

積性変異蛋白質など)があり、後者は多くの神経変性疾患における病態への関与が示唆されている。アミノ酸置換から折畳み異常を来した変異体蛋白質の小胞体 (ER) への蓄積によって誘導される ER ストレスは、多くの疾患における細胞病態として近年注目されている。ER ストレスに晒された細胞は、unfolded protein response (UPR) を起動し、ER シャペロンの誘導や翻訳の抑制により細胞を守ろうとする。しかし、これらの反応で ER ストレス

を回避できない場合は、UPRがCHOPシグナルを活性化し、細胞死を誘導してストレス下にある細胞を除去する。この細胞死が疾患の表現型に関連すると考えられて来た。

しかし、このUPRの破綻による細胞死のみでは必ずしも病態を説明出来ないことが最近明らかになった。中枢神経系の髄鞘膜蛋白質PLP1のアミノ酸置換変異は、重篤な先天性大脳白質形成不全症であるPelizaeus-Merzbacher病(PMD)の原因となる(1)。PMDでは、生直後から始まる大脳の髄鞘化に伴って発現が急上昇する変異体PLP1がERに蓄積し、これがUPRを誘導し、最終的にオリゴデンドロサイト(OLs)の細胞死を引き起こすことが主たる病態と考えられて来た。しかしUPRのCHOP経路など細胞死シグナル経路の遮断が必ずしも細胞死を抑制しないことから(2)、これらの変異蛋白質によってもたらされる細胞病態は、UPR以外にも別の機序が存在することが示唆されているが、その詳細は全く不明である。

変異体PLP1による細胞障害機序の解明は、現在有効な根治療法がないPMDの治療法の開発のために重要である。我々はこれまで得られた知見から、本疾患における新規病態仮説として、ERストレスとUPR仮説に加え、変異体PLP1によって他の正常な分泌蛋白質や膜蛋白質の輸送障害が起こり、正常な細胞機能を維持出来ず、破綻してしまうこと、すなわちER-Golgi分泌経路の輸送障害が、PMDの主要な病態になっているのではないかと考えた。本仮説は、以下に示す我々の研究から得られた知見によって支持されている。

① 変異体PLP1を一過性発現したHeLa細胞およびPLP1点変異モデ

ルマウス*Msd*から作成したOLs初代培養細胞において、本来ERストレスにより上昇すべきERシャペロンの発現が、逆に低下する現象を見出した。これはこれらシャペロン分子をGolgi体からERに逆輸送する際に必要なKDEL受容体が変異体PLP1によってER内に局在変化してしまうためと考えられた(3)。

- ② 変異体PLP1は、SDS不添加PAGEを用いたウェスタンブロットで、約400kDの巨大な複合体を形成していること、しかしながら免疫染色でERの網目状構造に局在することから、変異体PLP1は凝集体を構築しないが、巨大な複合体を構築することが示唆された(未発表データ)。
- ③ 変異体PLP1の一過性発現により、細胞内のGFP-PDGF膜貫通部位融合蛋白質やオリゴデンドロサイト特異的膜蛋白質MOG、分泌型ルシフェラーゼ蛋白質の輸送が障害され、すべてERに局在が変化した(3)。
- ④ 折畳み異常変異蛋白質が蓄積し、ERストレスを惹起する疾患(嚢胞性線維症、網膜色素変性症など)で有効と報告されたクルクミンをPMDモデルマウス*Msd*に投与した治療研究では、有意な細胞死の抑制効果を観察しながらも、ERストレスそのものの抑制効果は見られず、UPR以外の病態の存在を示唆する所見と考えられた(4)。

また、他の研究者による報告として、UPRのapoptosis経路下流のATF3とcaspase12を遮断しても変異体PLP1による表現型に変化を来さなかったことから(5,6)、これらのUPR経路がPMDの表現型に及ぼす影響は限定的であることが示唆され、これも

UPR 以外の細胞病態の存在を示唆する知見と言える。これらの結果は、変異体 PLP1 は自らが ER に蓄積して ER ストレスを惹起するのみならず、細胞の分泌経路を経由する他の多くの膜蛋白質および分泌蛋白質の輸送を障害し、これが少なからず PMD の表現型に影響することを強く示唆する。すなわち変異体 PLP1 はグローバルに分泌系蛋白質の輸送を障害し、正常な細胞の恒常性の維持を障害すると考えられる。

そこで本研究では、この細胞内の分泌系輸送障害を標的とし、これを改善する薬剤を見出し、PLP1 点変異による PMD の新たな革新的治療薬を同定することを目的とする。

2. 研究方法

A. HeLa 細胞とルシフェラーゼアッセイ系を用いた一次スクリーニング

以前我々は、アミノ酸置換を伴う変異体 PLP1 は ER に蓄積して ER ストレスを惹起するのみならず、細胞の分泌経路を経由する他の多くの膜蛋白質および分泌蛋白質の輸送を障害することを明らかにした。その際に用いたルシフェラーゼアッセイ系を薬剤一次スクリーニングに用いる。この系では、Igk 分泌シグナルをレニラルシフェラーゼ遺伝子に結合 (Igk-Rluc) することにより、細胞内 (細胞溶解物) から細胞外 (培養液) へ分泌蛋白質の輸送を定量的にモニターすることが出来る。HeLa 細胞に野生型あるいは A243V 変異体 PLP1 とこのルシフェラーゼレポーター-Igk-Rluc (および内部コントロールとして細胞質に発現する通常型ホタルルシフェラーゼ Cluc) を一過性発現し、24 時間後に細胞溶解物および培養上清のルシフェラーゼ活性を測定し、Rluc の分泌効率を計算する。この系を用いて、各 PLP1 変異体が分泌輸送経

路に及ぼす影響を定量的に解析する。次にこの系に慶應義塾大学先端医科学研究所の佐谷秀行教授より供与を受けた既存薬ライブラリー1400種を投与し、その中から、変異体 PLP1 による分泌効率低下を改善させる薬剤を探索する。測定 18 時間前に培養液中に薬剤を 1ug/ml の濃度で投与し、DMSO 投与群と比較する。

B. 内在性膜蛋白質 KDELR の細胞内局在変化の解析を用いた二次スクリーニング

内在性膜蛋白質 KDELR 受容体 (KDELR) は、主に Golgi 体に局在する膜受容体蛋白質で、ER で合成され、Golgi 体に輸送されて来た蛋白質のうち、小胞体で機能する蛋白質 (PDI、GRP78、Calnexin などの ER シャペロンなど) を再び ER に戻すために、修飾されて成熟したそれらの蛋白質に結合し、ER へ戻る Cargo システムに運び込む働きをする。

以前、我々は変異体 PLP1 を一過性発現した HeLa 細胞では、KDELR の細胞内局在が Golgi 体から ER に変化している細胞の割合が増加していることを報告した。この KDELR の ER への局在変化も、変異体 PLP1 による ER-Golgi 体分泌経路の障害によるものと考えられている。そこで、この KDELR の ER へ局在変化している細胞の割合を指標として、一次スクリーニングによって選択された化合物についての二次スクリーニングを行う。

HeLa 細胞に野生型あるいは A243V 変異体 PLP1 を一過性発現し、上記と同様に固定の 18 時間前に薬剤を投与し、抗 KDELR 抗体による免疫染色を行う。トランスフェクションされた細胞は、FLAG での二重免疫染色にて同定する。細胞 75 個を無作為に選択し、

KDEL_R の細胞内局在像を Golgi 体(正常形態)、Golgi 体(軽度断片化を伴う)、Golgi 体(重度断片化を伴う)、ER の 4 つに分類し、それぞれの割合を算出する。DMSO 投与群と薬剤投与群の間の ER 局在細胞の割合を比較する。

3. 研究結果

A. HeLa 細胞とルシフェラーゼアッセイ系を用いた一次スクリーニング

ルシフェラーゼ活性測定による分泌効率は、ベクターのみを 100% とすると、野生型 PLP1 は 60% 前後、A243V 変異型 PLP1 では 25% にまで低下することが分かった。そこで、変異体 PLP1 の分泌効率をベクターのみの 50% 以上に改善する薬剤を 1400 種の既存薬ライブラリーから抽出し、これを変異型 PLP1 の細胞病態(小胞体-ゴルジ体膜輸送障害)を改善する候補薬剤とした。この一次スクリーニングにより、53 個の化合物を同定した。これらについて、ライブラリーの中での重複登録、HeLa 細胞への細胞毒性による擬陽性、ルシフェラーゼ安定化作用による擬陽性を検証し、これらが疑われる薬剤を除外した。さらに、残った薬剤に関しては再実験を行い、再現性の検討を行った。これらの結果、31 種の化合物に絞り込むことができた。これらを一次スクリーニングの候補薬剤とした。

B. 内在性膜蛋白質 KDEL_R の細胞内局在変化の解析を用いた二次スクリーニング

一次スクリーニングによって選択された 31 種の化合物について、HeLa 細胞処理時に細胞の脱落等の形態変化を来した薬剤、外用薬など実用化が困難なものを除外した 26 種について、膜蛋白質細胞内局在の改善効果を指標にした HeLa 細胞の KDEL_R 免疫染色による二次スクリーニングを実施した。

DMSO (対照) 投与 HeLa 細胞では約 20% の細胞で、KDEL_R が ER に局在していたが、22 個の化合物について、明らかにその割合が約 10% 程度あるいはそれ以下に低下していた。野生型 PLP1 を発現させた細胞では、KDEL_R が ER に局在している細胞の割合は 5% 以下であった。現在、検体数を増やし、今後、統計学的解析を実施する予定であるが、暫定的にこれらの結果から、これら 22 個の薬剤を二次スクリーニングの候補薬剤とした。

これら 22 種の薬剤のうち、実際に患者に長期間投与した場合の安全性や副作用の問題を考慮し、10 個の化合物を第 1 候補薬群として選択し、残りを第 2 候補薬群とした。

4. 考察

本研究課題は、PLP1 遺伝子点変異による PMD の分子病態を標的とした治療法の開発のための研究である。PLP1 遺伝子点変異は、多くの場合アミノ酸置換を引き起す。アミノ酸置換を伴った変異型 PLP1 蛋白質は、ER ストレスを引き起こすことが知られており、これが OL の細胞死を引き起す大きな原因であると考えられて来た。ER ストレスに対しては、細胞を守るために unfolded protein response (UPR) というシグナル経路が発動されるが、過剰なストレスから回避できない場合に、細胞死を誘導するシグナル経路が誘導されることが、その細胞病態であると考えられている。しかしながら、近年、UPR の破綻のみが PLP1 点変異の細胞病態ではないことが示唆されてきた。我々も最近、変異体 PLP1 が正常な膜蛋白質や分泌蛋白質の分泌経路輸送を障害するという事を見出し、これを報告している(Numata et al. 2013 JBC)。本研究では、この細胞内輸送障

害を治療のための分子標的として注目し、この細胞病態を改善させる薬剤を同定することによって、本疾患の治療薬を見出すことができるのではないかと考えた。

本研究課題のもう一つの特徴は、治療薬候補をスクリーニングするためのライブラリーとして、既存薬ライブラリーを用いている点である。小児の稀少性難病の治療薬の実用化を念頭に置いた場合、小児での安全性の確立や開発コストを考慮した場合に、新規化合物は様々な困難を伴うことが予想される。一方、既に市販され、安全性と臨床現場での供給体制が整っている既存薬を使用できれば、実用化が非常に容易になる。そこで、我々は慶應義塾大学先端医科学研究所の佐谷秀行教授が確立した1400種の市販薬を含む既存薬ライブラリーの供与を受けて本研究を実施した。

本年度は、まず一次スクリーニングのための技術開発を行った。これは以前の病態解明研究で使用した系を応用したもので、Renilla Luciferase レポーター蛋白質のN末にIgkの分泌シグナルを結合することにより、分泌型ルシフェラーゼとし、細胞内（分泌前）および培養中（分泌後）の活性を測定することにより、分泌経路の定量的な測定を可能にするものである。

この系を用いて1400種の薬剤について、変異体 PLP1 による細胞内分泌経路障害を改善させる効果を持つ薬剤を探索したところ、53個の化合物を同定した。これらについて、重複、細胞毒性、ルシフェラーゼ安定化作用による擬陽性、再現性の検討を行った結果、31種の化合物に絞り込むことができた。

次に二次スクリーニングとして、これらの薬剤による改善効果が、外来性

の分泌蛋白質のみならず、他の内在性の蛋白質についても確認できるかどうかについて、同じく HeLa 細胞を用いた KDEL 受容体(KDEL)の免疫染色にて検証した。KDEL は Golgi 体に局在する膜蛋白質で、KDEL 配列を持つ小胞体シャペロン蛋白質などを Golgi 体から小胞体に輸送する機能を有する蛋白質である。以前、我々は変異体 PLP1 を一過性発現した HeLa 細胞では、KDEL の局在が Golgi 体から小胞体が変わることを確認している。本解析では、候補薬剤によってこの小胞体への局在が Golgi 体に戻るかどうかを検証した。現在、実験を継続中ではあるが、変異体 PLP1 を発現する HeLa 細胞では、未治療では ER 局在型のパターンを示す細胞の割合が20%を超えるが、おおく薬剤を加えた細胞では、その割合が低下することが明らかになった。今後、統計学的有意差の検証を行うために、Nを増やしていく予定であるが、現段階では一次スクリーニングで選択された多くの薬剤が、標的となる病態を改善させる薬理効果を持つことが HeLa 細胞を用いた *in vitro* の系で実証された。

今後は Msd マウスの胎仔脳から樹立したオリゴデンドロサイト初代培養を用いて、その治療効果を検証していく予定である。

5. 結論

PLP1 アミノ酸置換が原因となる PMD の治療候補薬の探索を、既存薬ライブラリーを用いて行っている。変異体 PLP1 による細胞内分泌経路輸送障害を標的分子細胞病態とし、これを改善させる治療候補薬剤を22種見出すことができた。今後、さらに治療効果の検証を進めていく予定である。