

令和元年6月17日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05361

研究課題名(和文)先天性大脳白質形成不全症の新規細胞病態：ER-Golgi体輸送障害

研究課題名(英文) Impaired ER-Golgi trafficking as a novel cellular pathology for Pelizaeus-Merzbacher disease

研究代表者

井上 健 (INOUE, KEN)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第二部・室長

研究者番号：30392418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、髄鞘膜蛋白質PLP1のアミノ酸置換変異により中枢神経系の髄鞘形成不全を呈するPelizaeus-Merzbacher病を引き起す細胞病態機序を解明することである。従来知られて来た unfolded protein responseに加え、我々は変異体PLP1がER-Golgi体輸送経路を担うCOPII小胞の形成を障害することにより、細胞で産生される他の正常な膜蛋白質や分泌蛋白質の輸送を障害することを明らかにした。またこの細胞病態には、細胞内カルシウム濃度の調整障害が関与している可能性が示唆されたので、今後この分子機序をさらに明らかにしていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Pelizaeus-Merzbacher病は、生涯にわたって重度の障害を伴う小児の遺伝性神経難病であり、現在治療法はない。原因遺伝子であるPLP1のアミノ酸置換変異がオリゴデンドロサイトに引き起こす細胞毒性が著明な中枢神経系の髄鞘化不全を引き起こすことが疾患の本態と考えられているが、この細胞毒性の分子機序はこれまで不明であった。今回、ER-Golgi体輸送経路の障害が明らかになり、さらにCOPII小胞の形成が障害されることを明らかにしたので、今後これを分子標的とした治療法開発を行うことが可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to delineate the cellular pathogenesis of a hypomyelinating leukodystrophy, Pelizaeus-Merzbacher disease caused by amino-acid substitution in the PLP1, which a myelin membrane protein in the central nervous system. In addition to the unfolded protein response, we identified that the mutant PLP1 disturb the transport of normal membrane and secretory proteins by impairing the formation of COPII vesicle that serve as transporting vehicles from ER to Golgi apparatus.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：細胞病態 ペリツェウス・メルツバッハー病 小胞体 分泌経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 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を遮断しても OLs の細胞死を抑制できないことから⁽²⁾、変異体 PLP1 に起因する PMD の細胞病態は、UPR 以外に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。

(2) 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 の小胞体 (ER) への蓄積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 体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。**

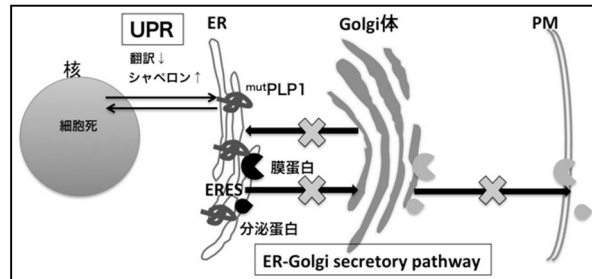


図 1. ER-Golgi 体分泌経路の輸送障害モデル。変異体 PLP1 は UPR を活性化するとともに、細胞内の膜蛋白や分泌蛋白の正常な輸送を障害し、細胞の機能と恒常性維持に支障を来す。

2. 研究の目的

変異体 PLP1 蛋白質の分泌経路障害モデルを実証し、その PMD の新規分子病態機序を明らかにする。

3. 研究の方法

PMD の新規病態機序を明らかにするために、PLP1 のアミノ酸置換変異体を用いて、HeLa 細胞などの不死化細胞、マウスオリゴデンドロサイト (OLs) 初代培養細胞、PMD モデルマウス、ヒト PMD 患者由来 iPS 細胞を用いた細胞生物学的手法により、以下の 4 点について明らかにする。

- (1) 変異体 PLP1 は OLs において ER-Golgi 分泌経路を通る蛋白質の輸送を障害するのか
- (2) 変異体 PLP1 の分泌経路障害作用はどのような分子機序を介するのか
- (3) ER-Golgi 分泌経路の輸送障害は生体や患者細胞の病態を反映しているのか
- (4) ER-Golgi 分泌経路の輸送障害は PMD に対する治療標的の病態になるのか

4. 研究成果

(1) VSVG を用いた ER から Golgi 体までの輸送機能評価

VSVG は、40 °C では ER に蓄積するが、32 °C で ER から細胞膜に向かって移動を開始するため、この特性を利用して継時的に ER から Golgi 体を経て細胞膜への移動をトレースすることができる。そこで、HeLa 細胞に蛍光蛋白質 YFP と融合した VSVG と変異体あるいは野生型の PLP1 を共発現させ、継時的にその局在部位を細胞免疫染色およびウェスタンブロットにより観察した。変異体 PLP1 は重症型 PMD の原因となる A243V に加え、軽症型 PMD となる I187T および W163L を用いた。その結果、Golgi 体マーカーの GM130 の免疫染色において、野生型 PLP1 は VSVG の分泌経路での移動速度にほとんど影響を与えず、1 時間後にはほとんどの VSVG が細胞膜に到達したのに対し、A243V 変異では VSVG は ER に局在したまま、1 時間後にも全く Golgi 体に移動していなかった。同様に endoglycosylaseH を用いた翻訳後修飾の酵素感受性による分離を用いたウェスタンブロットによる局在部位の定量的解析でも、野生型 PLP1 は継時的な局在部位に影響を与えない一方で、A243V 変異 PLP1 共発現は Golgi 体に移動した VSVG の割合は 1/3 にすぎなかったことから、ER から Golgi 体への輸送が障害されていることが明らかになった。興味深いことに、軽症型 PMD となる I187T および W163L は両者の中間の値となり、この ER-Golgi 輸送障害と細胞病態と関連する可能性のみならず、疾患の重症度にも関与する可能性が示唆された。

(2) GFP 癒合合成膜タンパクを用いた輸送機能評価

変異体 PLP1 が VSVG の ER から Golgi 体への輸送を障害することが(1)で明らかになったが、我々は以前 HeLa 細胞を用いた解析で同様の現象が他の分泌蛋白質や膜蛋白質でも生ずることを明らかにしている。一方で、オリゴデンドロサイトでも同様に変異体 PLP1 が他の分泌蛋白質や膜蛋白質の輸送を障害するのかが不明である。そこで、オリゴデンドロサイト細胞株 OliNeu 細胞を用いて、細胞膜局在型 GFP および GFP 融合 MOG を用い、変異体 PLP1 共発現によるこれらの輸送に対する影響について細胞免疫染色により行なった。その結果、HeLa 細胞と同様に変異体 PLP1 は、本来細胞膜に局在するこれらの蛋白質を ER に局在変化させることが明らかになった。従って、内在性 PLP1 が発現するオリゴデンドロサイトにおいても変異型 PLP1 が ER-Golgi 分泌経路を障害することが示唆され、PMD の細胞病態に関与していることが示唆された。

(3) COPII 小胞の形成に対する影響

変異型 PLP1 が ER から Golgi 体への蛋白質の輸送を障害する分子機序は不明である。細胞内分泌系輸送には、ER、Golgi 体を経て細胞膜に至る各経路で異なる小胞輸送が役割を担うことが

知られており、ER から Golgi 体への順方向の輸送は COPII 小胞が、Golgi 体から ER への逆方向の輸送は COPI 小胞が担う。これまでの解析から変異体 PLP1 が ER から Golgi 体への順方向の輸送を障害することが明らかになっているので、まず COPII 小胞による輸送の各段階について、変異型 PLP1 が及ぼす影響の有無を HeLa 細胞で検索した。COPII 小胞は、ER の特定の部位に形成されるが、この部位は ER exit site (ERES) と呼ばれ、スキャフォールド分子として Sec16 が知られている。ERES に COPII 小胞を形成する最初のステップとして、ERES にあるそのアクセソリーファクター Sec12 に Sar1 がリクルートされる。その後、COPII 小胞の内膜を形成するコート蛋白質として、Sec23/Sec24 が小胞を形成し、その後、外膜形成コート蛋白質 Sec30/Sec31 がリクルートされ、COPII 小胞が完成する。野生型 PLP1 あるいは A243V 変異 PLP1 共発現による影響を、これらの各段階で重要な役割を果たす蛋白質の発現量と細胞内局在についてウェスタンブロット (Sec16A, Sec12, Sar1, Sec23, Sec24C, Sec31A) と細胞免疫染色 (Sec16A, Sec24C, Sec31A) にて検証した。発現量に関しては、どの蛋白質についても野生型と変異型 PLP1 の共発現による相違は見られなかった。一方で、局在については Sec16A による ERES の構築に相違は見られなかったが、COPII 小胞を構成する Sec24C、Sec31A の ERES への集束が全く見られないことから、変異型 PLP1 COPII 小胞の形成が阻害されていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Sumida K, Inoue K, Takanashi J, Sasaki M, Watanabe K, Suzuki M, Kurahashi H, Omata T, Tanaka M, Yokochi K, Iio J, Iyoda K, Kurokawa T, Matsuo M, Sato T, Iwaki A, Osaka H, Kurosawa K, Yamamoto T, Matsumoto N, Maikusa N, Mastuda H, Sato N. The magnetic resonance imaging spectrum of Pelizaeus-Merzbacher disease: A multicenter study of 19 patients. *Brain Dev.* 2016;38(6):571-80. doi: 10.1016/j.braindev.2015.12.007 査読有
2. Omata T, Nagai J, Shimbo H, Koizume S, Miyagi Y, Kurosawa K, Yamashita S, Osaka H, Inoue K. A splicing mutation of proteolipid protein 1 in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain Dev.* 2016;38(6):581-4. doi: 10.1016/j.braindev.2015.12.002. 査読有
3. Fujita A, Waga C, Hachiya Y, Kurihara E, Kumada S, Takeshita E, Nakagawa E, Inoue K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitu H, Goto YI, Miyake N, Matsumoto N. Different X-linked KDM5C Mutations in Affected Male Siblings: Is Maternal Reversion Error Involved? *Clin Genet.* 2016; 90(3):276-81. doi:10.1111/cge.12767. 査読有
4. Shimojima K, Maruyama K, Kikuchi M, Imai A, Inoue K, Yamamoto T. Novel SLC16A2 mutations in patients with Allan-Herndon-Dudley syndrome. *Intractable Rare Dis Res* 5; 214-217, 2016. doi: 10.5582/irdr.2016.01051 査読有
5. Kubo K, Deguchi K, Nagai T, Ito Y, Yoshida K, Endo T, Benner S, Shan W, Kitazawa A, Aramaki M, Ishii K, Shin M, Matsunaga Y, Hayashi K, Kakeyama M, Tohyama C, Tanaka KF, Tanaka K, Takashima S, Nakayama M, Itoh M, Hirata Y, Antalffy B, Armstrong DD, Yamada K, Inoue K, Nakajima K. Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants. *JCI Insight* 2017;2(10):e88609. doi: 10.1172/jci.insight.88609. 査読有
6. Akutsu Y, Shirai K, Takei A, Goto Y, Aoyama T, Watanabe A, Imamura M, Enokizono T, Oto T, Hori T, Suzuki K, Hayashi M, Masumoto K, Inoue K. A patient with peripheral demyelinating neuropathy, central dysmyelinating leukodystrophy, Waardenburg syndrome, and severe hypoganglionosis associated with a novel SOX10 mutation. *Am J Med Genet Part A.* 2018;176(5):1195-1199. doi: 10.1002/ajmg.a.38657. 査読有
7. Iida A, Takeshita E, Kosugi S, Kamatani Y, Momozawa Y, Kubo M, Nakagawa E, Kurosawa K, Inoue K, Goto YI. A novel intragenic deletion in OPHN1 in a Japanese patient with Dandy-Walker malformation. *Hum Genome Var.* 2018 Dec 5;6:1. doi: 10.1038/s41439-018-0032-8. eCollection 2019. PubMed PMID: 30534410; PubMed Central PMCID: PMC6281661. 査読有
8. Iwama K, Mizuguchi T, Takeshita E, Nakagawa E, Okazaki T, Nomura Y, Iijima Y, Kajiura I, Sugai K, Saito T, Sasaki M, Yuge K, Saikusa T, Okamoto N, Takahashi S, Amamoto M, Tomita I, Kumada S, Anzai Y, Hoshino K, Fattal-Valevski A, Shiroma N, Ohfu M, Moroto M, Tanda K, Nakagawa T, Sakakibara T, Nabatame S, Matsuo M, Yamamoto A, Yukishita S, Inoue K, Waga C, Nakamura Y, Watanabe S, Ohba C, Sengoku T, Fujita A, Mitsuhashi S, Miyatake S, Takata A, Miyake N, Ogata K, Ito S, Saitu H, Matsuishi T, Goto YI, Matsumoto N. Genetic landscape of Rett syndrome-like phenotypes revealed by whole exome sequencing. *J Med Genet.* 2019 Mar 6. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105775. PubMed PMID: 30842224. 査読有
9. Takizawa H, Hara Y, Mizobe Y, Ohno T, Suzuki S, Inoue K, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Ishiyama A, Hoshino M, Komaki H, Takeda S, Aoki Y. Modelling

- Duchenne muscular dystrophy in MYOD1-converted urine-derived cells treated with 3-deazaneplanocin A hydrochloride. *Sci Rep.* 2019 Mar 7;9(1):3807. doi: 10.1038/s41598-019-40421-z. PubMed PMID: 30846748; PubMed Central PMCID: PMC6405839. 査読有
10. Yamamoto-Shimajima K, Imaizumi T, Aoki Y, Inoue K, Kaname T, Okuno Y, Muramatsu H, Kato K, Yamamoto T. Elucidation of the pathogenic mechanism and potential treatment strategy for a female patient with spastic paraplegia derived from a single-nucleotide deletion in PLP1. *J Hum Genet.* 2019 Apr 19. doi: 10.1038/s10038-019-0600-x. 査読有
 11. Li H, Okada H, Suzuki S, Sakai K, Izumi H, Matsushima Y, Ichinohe N, Goto Y, Okada T, Inoue K. Gene suppressing therapy for Pelizaeus-Merzbacher disease using artificial miRNA. *JCI Insight.* 2019 May 16; 4(10): e125052 doi: 10.1172/jci.insight.125052 査読有
 12. Kouga T, Koizume S, Aoki S, Jimbo E, Yamagata T, Inoue K, Osaka H. Drug screening for Pelizaeus-Merzbacher disease by quantifying the total levels and membrane localization of PLP1. *Mol Genet Metab Rep.* 2019 May 7;20:100474. doi:10.1016/j.ymgmr.2019.100474. eCollection 2019 Sep. PubMed PMID: 31110947; PubMed Central PMCID: PMC6510973. 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

1. K Inoue, H Li, P.R. Mangalika, A Nishizawa, Y Numata, S Nakamura, T Morimura, H Saya, Y Goto. ER-Golgi transport may serve as a novel drug target for Pelizaeus-Merzbacher disease caused by PLP1 amino acid substitutions. 13th International Congress of Human Genetics. 2016.4.3-7. Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.
2. K. Inoue, Y. Ito, N. Inoue, Y.U. Inoue, S. Nakamura, Y. Matsuda, M. Inagaki, T. Ohkubo, J. Asami, Y.W. Terakawa, S. Kohsaka, Y. Goto, C. Akazawa, T. Inoue. Additive dominant effect of a SOX10 mutation underlying the complex phenotypes of PCWH. 21st Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience.2016.5.11-14. Palais des Congres d'Antibes Juan les Pins, France
3. 井上 健、マンガリイ・プリアンティ、西澤絢子、李珩、中村祥子、佐谷秀行、後藤雄一 新規細胞病態を標的とした Pelizaeus-Merzbacher 病の治療薬の探索 第 58 回日本小児神経学会 2016 年 6 月 3-5 日 東京(京王プラザホテル)6 月 3 日
4. K Inoue, H Li, P.R. Mangalika, A Nishizawa, H Saya, Y Goto. Impaired ER-Golgi trafficking as a novel therapeutic target for Pelizaeus-Merzbacher disease caused by PLP1 amino acid substitutions. 2016.10.18-22. The American Society of Human Genetics Annual Meeting 2016. The Vancouver Convention Centre, Vancouver, Canada
5. K Inoue, H Li, Y Numata, H Saya, Y Goto. Development of treatment for Pelizaeus-Merzbacher disease: drug-repositioning approach targeting a novel cellular pathology. (Oral) 12th European Pediatric Neurology Society Congress. 2017.6.20-24. Cite Internationale, Lyon, France.
6. 井上 健、住田 薫、高梨潤一、松田博史、佐々木征行、佐藤典子 統合脳画像収集システム IBISS を利用した Pelizaeus-Merzbacher 病の臨床画像解析と疾患レジストリへの展開 第 59 回日本小児神経学会 2017 年 6 月 15 日-17 日 大阪国際会議場 大阪
7. 小坂 仁、井上 健、三重野 牧子、吉田 誠克、久保田 雅也、佐々木 征行、松井 大、才津 浩智、高梨 潤一、黒澤 健司、山本 俊至. 遺伝性白質疾患の診断・治療・研究システムの構築. 第 59 回日本小児神経学会学術集会共同研究支援委員会主催セミナー, 2017/6/15, 国内(大阪)
8. 小坂 仁、井上 健 大脳白質形成不全を呈する疾患原因の解明 Congenital cerebral hypomyelination. 「エクスパートに聞く」第 59 回日本小児神経学会学術集会共同研究支援委員会企画, 2017/6/15, 国内(大阪)
9. Inoue K, Sumida K, Takanashi J, Matsuda H, Sasaki M, Sato N. Genetic, clinical, and imaging study of Pelizaeus-Merzbacher disease using the Integrative Brain Imaging Support System (IBISS). The American Society of Human Genetics Annual Meeting 2017. 2017.10.17-21 (10.19) Orange County Convention Center, Orlando, FL, USA
10. 井上健、李コウ、植松有里佳、後藤雄一 小胞体-ゴルジ体輸送障害: Pelizaeus-Merzbacher 病の新規細胞分子病態 第 62 回日本人類遺伝学会 2017 年 11 月 15 日-18 日 神戸国際会議場 神戸
11. 井上 健、黒澤健司、才津浩智、山本俊至、小坂 仁、高梨潤一 先天性大脳白質形成不全症の診断サポートのためのコンサルテーションボード 第 60 回日本小児神経学会 2018 年 5 月 31 日-6 月 2 日(5 月 31 日) 幕張メッセ 千葉
12. 植松有里佳、植松貢、佐藤亮、井上 健、呉繁夫 線維芽細胞から神経細胞への direct conversion による疾患原因遺伝子変異の機能解析 第 60 回日本小児神経学会 2018 年 5 月 31 日-6 月 2 日(6 月 1 日) 幕張メッセ 千葉

13. Inoue K, Li, H Okada H, Goto Y, Okada T. Development of AAV enabling oligodendrocyte-specific gene suppression: implication for the treatment of Pelizaeus-Merzbacher disease. 11th FENS, Forum of Neuroscience. 2018. 7 7-11 (7.8). (Poster) Berlin ExpoCenter City, Berlin, Germany.
14. 井上健、李コウ、岡田浩典、後藤雄一、岡田尚巳 Artificial miRNA システムを用いた AAV 遺伝子発現抑制治療法の開発: Pelizaeus-Merzbacher 病の治療法開発を目指して 第 63 回日本人類遺伝学会 2018 年 10 月 10 日-13 日 (10.13) パシフィコ横浜 横浜
15. Inoue K, Li H, Okada H, Goto Y, Okada T. AAV gene therapy with artificial miRNA-mediated oligodendrocyte-specific gene suppression: implication for the treatment of Pelizaeus-Merzbacher disease with PLP1 duplication. The American Society of Human Genetics Annual Meeting 2018. 2018.10.16-20. (10.17) Oral. San Diego Convention Center, San Diego USA.
16. T. Kouga, S. Koizume, E. Jimbo, T. Yamagata, K. Inoue, H. Osaka. Chemical chaperone screening for Pelizaeus-Merzbacher disease. The American Society of Human Genetics Annual Meeting 2018. 2018.10.16-20. (10.19) Poster. San Diego Convention Center, San Diego USA.
17. 李 コウ、岡田 浩典、境 和久、岡田 尚巳、一戸 紀孝、後藤 雄一、井上 健 Pelizaeus-Merzbacher 病における PLP1 遺伝子重複を標的とした AAV による artificial miRNA 遺伝子治療 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 28 日-30 日 (11 月 28 日) パシフィコ横浜 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~pmd/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 小坂 仁

ローマ字氏名: OSAKA, Hitoshi

所属研究機関名: 自治医科大学

部局名: 小児科学

職名: 教授

研究者番号(8桁): 90426320

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 李 コウ

ローマ字氏名: LI, Heng

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。