

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08358

研究課題名(和文) グローバルな膜輸送障害に着目した先天性大脳白質形成不全症の新規細胞病態の解明

研究課題名(英文) The study of novel cell pathology of congenital dysplasia of cortical white matter focusing on globally impaired membrane trafficking

研究代表者

李 コウ (Li, Heng)

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・科研費研究員

研究者番号：70621994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Pelizaeus-Merzbacher病(PMD)は先天性大脳白質形成不全の代表的な疾患である。従来、変異体の髄鞘膜蛋白質PLP1蛋白質は、過剰な小胞体ストレスによって細胞に起こるunfolded protein response (UPR)により細胞死を誘導するものと考えられて来た。我々は変異体PLP1蛋白質が小胞体のカルシウム枯渇を介し、ER-Golgi体輸送を障害するという新規病態を解明した。本研究の成果は、PMDの新たな治療標的の同定につながるばかりでなく、同様の小胞体ストレス病態の関与が示唆される他の疾患の病態解明にも寄与すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的及び社会的意義は、これまで検証されていないPelizaeus-Merzbacher病の細胞カルシウム恒常性破綻と細胞内輸送障害に対して、生理機能と病態表現の面で検証することができるということである。新規細胞病態のメカニズムを解明することにより、当疾患の治療法開発のための基盤になる知見を得ることが出来る点である。本研究の成果は、新しい治療法の評価手段としても応用できる。

研究成果の概要(英文)：Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD) is an X linked recessive leukodystrophy characterized by diffuse hypomyelination in the central nervous system. Missense mutations in the proteolipid protein 1 (PLP1) gene cause misfolded protein accumulating in the ER, leading to ER stress, unfolded protein response (UPR) and apoptosis of oligodendrocytes. However, blockade of the UPR signal pathway cannot suppress apoptosis in mouse model of PMD, which potentially suggest other factors contributing to the pathology of this ER stress-related disease. Here we investigate the impairment of ER-Golgi trafficking as a cellular pathogenesis of PMD. The results of this study suggest that mutant PLP1 protein may alter ER calcium homeostasis to disturb the ER-Golgi transport or membrane trafficking. Elucidating the mechanism of this pathology may contribute to the identification of new therapeutic targets not only for PMD, but also for other diseases involving similar ER stress pathology.

研究分野：神経科学

キーワード：先天性大脳白質形成不全 カルシウム恒常性 細胞内輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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 PMD の原因となる。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 が小胞体に蓄積し、小胞体ストレスにより 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、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。

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。そこで、我々は PMD の新規細胞病態を解明する。細胞内のカルシウムイオンは細胞分裂、細胞死、細胞内輸送などさまざまな生命現象の second messenger として機能する重要な物質の 1 つで、小胞体は細胞内のカルシウム貯蔵庫として働き、小胞体膜上のカルシウムチャンネルがカルシウムの濃度の制御に関わっている。また小胞体ストレスは、細胞内カルシウム恒常性を攪乱することが報告され、細胞内物流システムを障害することが考えられる。我々はこれまでに得られた知見から、PMD における新規病態仮説として、小胞体ストレスと UPR 仮説に加え、変異体 PLP1 の小胞体への蓄積によって、小胞体のカルシウム濃度の制御機能が低下し、カルシウム依存的な細胞内物流システムに支障を来し、変異体 PLP1 以外の正常な分泌蛋白質や膜蛋白質のグローバルな輸送障害も起こり、正常な細胞機能を維持出来ず、破綻してしまうことが、PMD の主要な病態になっているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、カルシウム恒常性と細胞内輸送機能の変化に焦点を当て、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 PMD を引き起こす新規の細胞病態機序を解明することを目的とする。

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、マウス OLs の不死化細胞 (Oli-neu 細胞)、A243V 変異をもつ PMD モデルマウス (Msd マウス) を用いた細胞分子生物学的手法により、下記の 3 項目について、順次解析を進めてきた。

(1) 変異体 PLP1 による分泌蛋白質および膜蛋白質の輸送障害の検出

VSVG 追跡実験 : HeLa 細胞、Oli-neu 細胞に各種変異体 PLP1 を発現させ、変異体 PLP1 が分泌蛋白質、膜蛋白質の ER-Goligi 輸送に及ぼす影響を VSVG 追跡実験で定量的に解析した。mGFP の細胞内局在観察 : 形態的な観察に適した membrane linked cell surface GFP (mGFP) を搭載した AAV Vector を作成し、Msd マウスの oligodendrocyte に感染させ、in vivo で変異体 PLP1 発現した細胞の膜輸送を評価した。

(2) 変異体 PLP1 による細胞カルシウム恒常性破綻の検出

カルシウムイメージング実験 : 細胞質へのカルシウム放出は、小胞体膜に局在するカルシウムチャンネルタンパク質 IP_3 受容体 (IP_3) を介して行われている。HeLa 細胞、Oli-neu 細胞に変異体 PLP1 を発現させ、Fura2, Fura4-カルシウムイメージング法で細胞質内カルシウムの濃度変化及び IP_3R のカルシウム放出活性を評価した。小胞体カルシウムの検出 : 小胞体カルシウムインジケータ-G-CEPIA1er を安定発現する HeLa 細胞株 (CEPIA-HeLa) を樹立し、変異体 PLP1 を強制

発現させ、小胞体カルシウムの濃度変化を評価した。

(3) 変異体 PLP1 によるカルシウム依存的な分泌経路障害について分子機序の解明

ER-Golgi 分泌経路における輸送小胞を構築する分子の検出: COPII は ER-Golgi の順行輸送を担う輸送小胞であり、COPII 小胞被覆蛋白質 (Sec23/24, Sec13/31) は calcium sensor 蛋白質 ALG2 などの連携により形成される。変異体 PLP1 が細胞のカルシウム恒常性破綻を誘導し、calcium sensor 蛋白質を介して COPII 輸送小胞の形成と機能を障害することを証明するため、HeLa 細胞を用いて、変異体 PLP1 が Sec23/24, Sec13/31, ALG-2 の発現と細胞内局在に及ぼす影響を western blotting と免疫染色実験で評価した。小胞体のカルシウム・チャンネルの機能促進による、輸送障害のレスキューについての検証: 薬理的な手法で小胞体膜に局在するカルシウムチャンネル活性を調節することによって、小胞体カルシウム濃度と ER-Golgi 輸送の関連性を検証した。

4. 研究成果

(1) 変異体 PLP1 による分泌蛋白質および膜蛋白質の輸送障害の検出:

我々は定量的に ER-Golgi 輸送の評価が出来る VSV-G の実験系を確立し、変異体 PLP1 による分泌蛋白質および膜蛋白質の輸送障害を確認し、また変異による疾患重症度と輸送障害の程度との関連性があることを *in vitro* 実験で明らかにした。また、Msd マウスに oligodendrocyte 特異的に mGFP 発現できる AAV9.CNP. mGFP ウィルスベクターを感染させ、変異体 PLP1 が細胞の膜輸送を障害することを *in vivo* で証明した。

(2) 変異体 PLP1 によって生ずる細胞カルシウムの恒常性障害の検証:

カルシウムイメージング実験と小胞体 G-CEPIA シグナル解析のデータより、変異体 PLP1 誘発した小胞体ストレスは、小胞体から Ca^{2+} を過剰流出させ、小胞体「 Ca^{2+} 枯渇」及び細胞質カルシウム濃度の上昇を引き起こす現象を見出した。

(3) 変異体 PLP1 によるカルシウム依存的な分泌経路障害について分子機序の解明:

変異型 PLP1 を発現する HeLa 細胞では、COPII 小胞構造蛋白質 Sec24, Sec31 において通常見られる Puncta 状構造が消失することから、COPII 小胞の形成が障害されることが示唆された。また、変異体 PLP1 強制発現細胞に対する小胞体カルシウムイオンポンプ (SERCA) の促進剤 CDN1163 の投与は、小胞体カルシウム枯渇を改善すると共に、COPII 小胞の構造も改善した。

上記の結果より、変異体 PLP1 蛋白質が小胞体のカルシウム枯渇を介し、ER-Golgi 輸送を障害することを明らかにした。

本研究の成果は、PMD の新たな治療標的の同定につながるばかりでなく、同様の小胞体ストレス病態の関与が示唆される他の疾患の病態解明及び治療法開発のための基盤になる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hitoshi Kashiki, Heng Li, Sachiko Miyamoto, Hiroe Ueno, Yoshinori Tsurusaki, Chizuru Ikeda, Hirofumi Kurata, Takumi Okada, Tomoyuki Shimazu, Hoseki Imamura, Yumi Enomoto, Jun-ichi Takanashi, Kenji Kurosawa, Hiroto Saito, Ken Inoue	4. 巻 6
2. 論文標題 POLR1C variants dysregulate splicing and cause hypomyelinating leukodystrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurology Genetics	6. 最初と最後の頁 1, 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXG.0000000000000524	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Heng Li, Hironori Okada, Sadafumi Suzuki, Kazuhisa Sakai, Hitomi Izumi, Yukiko Matsushima, Noritaka Ichinohe, Yu-ichi Goto, Takashi Okada, and Ken Inoue	4. 巻 4
2. 論文標題 Gene suppressing therapy for Pelizaeus- Merzbacher disease using artificial microRNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCI insight	6. 最初と最後の頁 1, 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.125052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Heng Li, Yu-ichi Goto, Ken Inoue
2. 発表標題 Impairment ER-Golgi trafficking via ER calcium depletion as a cellular pathogenesis of Pelizaeus-Merzbacher Disease
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Heng Li, Yu-ichi Goto, Ken Inoue
2. 発表標題 Globally impaired ER-Golgi trafficking as a cellular pathogenesis of Pelizaeus-Merzbacher disease
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Heng Li, Hironori Okada, Sadafumi Suzuki, Kazuhisa Sakai, Hitomi Izumi, Yukiko Matsushima, Noritaka Ichinohe, Yu-ichi Goto, Takashi Okada, and Ken Inoue
2. 発表標題 Gene suppressing therapy for Pelizaeus Merzbacher disease using artificial miRNA
3. 学会等名 日本神経科学学会 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	井上 健 (Inoue Ken)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------