

令和元年8月29日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04878

研究課題名(和文) 蛋白寿命タイマーによる小児期遺伝性疾患の治療薬開発

研究課題名(英文) Drug screening for childhood genetic disease by visualizing proteins.

研究代表者

小坂 仁 (Osaka, Hitoshi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90426320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：PLP1 (proteolipid protein 1) 蛋白の発現量、細胞内局在、および小胞体ストレスを指標とした、PMDに対する薬理学シャペロンのスクリーニングを行った。結果、PLP1変異蛋白発現および細胞内局在を改善させるpiracetamを見出した。piracetamはまた、PLP1変異体の小胞体ストレスを軽減させた。また、脊髄小脳変性症のスクリーニングにおいて、ミトコンドリアマーカーとの局在乖離がみられたPOLG (catalytic subunit of mt.DNA polymerase) の変異体については、局在の改善を指標とした薬剤スクリーニングが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児期難治性遺伝性疾患の多くは、アミノ酸変異による蛋白構造不全が原因となる。正常な高次構造が獲得されないため、細胞膜や、ライソゾームなどの細胞内小器官に到達でき無いために、蛋白が機能を失い発症する疾患が多いことがわかっている。遺伝子変異によるアミノ酸変化による構造変化それ自体を可視化することは困難であるが、構造異常による輸送障害による局在変化に着目した定性的な解析と蛋白量低下を指標とした定量的な組み合わせにより、薬物スクリーニングを行うことにより、代表的な大脳遺伝性疾患を対象として治療薬の開発を行い、更にはミトコンドリア病など他疾患に応用可能なスクリーニング系として一般化させることができた。

研究成果の概要(英文)：Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD) is caused by point mutations or copy number changes in the proteolipid protein 1 gene (PLP1). Amino acid-substituted PLP1 protein is unable to fold properly and is subsequently degraded and/or restrictedly translated, resulting in a decrease in the PLP1 protein level and a failure to localize to the membrane. Furthermore, misfolded proteins increase the burden on the intracellular quality control system and trafficking, finally resulting in cell apoptosis. We established a cell line stably expressing PLP1A243V fused with green fluorescent protein in oligodendrocyte-derived MO3.13 cells. We screened a chemical library that increased both the total intensity of PLP1-A243V in the whole cell and the cell membrane localization. We analyzed the change in the endoplasmic reticulum stress and the gene expression of candidate chemicals. Piracetam significantly increased the PLP1A243V intensity and membrane localization and decreased the ER stress.

研究分野：小児科学

キーワード：遺伝性疾患 蛋白構造不全 薬物スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子変異により、アミノ酸変異によりコードされる蛋白が構造不全(折れたたみ不全)を生じ小胞体分解を受け、細胞内の適切な部位にターゲットできないために病原性を発揮する場合がある。その場合には、折れたたみ不全の解消により蛋白機能を改善させる化合物(薬理的シャペロン)の開発が可能である。シャペロン分子のスクリーニング法としては受容体や酵素の場合には、受容体活性や、酵素活性上昇などの機能評価を指標に用いることが可能である。しかし多くの疾患の原因蛋白では簡便な機能評価系がなく、対応する薬理的シャペロンスクリーニング法も確立していない。折れたたみ不全による変異蛋白の中には本来局在する細胞膜や細胞内小器官に到達できないものがあり、細胞内局在変化蛋白寿命等を指標にシャペロン分子をスクリーニングすることを考えた(1)。

その方法を、検証するためにペリツェウス・メルツバツハ病(Pelizaesus-Merzbacher disease; PMD)を選定した。この疾患は、原因遺伝子である proteolipid protein 1 (PLP1) のアミノ酸変異によって生じる蛋白の局在変化が病態に関連する代表的な遺伝性神経疾患である。

## 2. 研究の目的

PLP1 は 276 のアミノ酸塩基から構成され、中枢神経のミエリンを構成する主要蛋白である。PLP1 は、そのスプライシングバリエーションである DM20 と共にオリゴデンドロサイト、及び末梢神経におけるシュワン細胞に発現する。PLP1 蛋白は小胞体およびゴルジ体における合成・輸送を経て、適切な蛋白の折れたたみ処理を受けた後にミエリン膜へ運ばれる。また、その役割として、ミエリン層密度の調節やオリゴデンドロサイト・軸索間の相互作用を介した軸索の統合作用が報告されている。PMD は、主に中枢神経のミエリン形成不全に関連した X 連鎖性遺伝の神経疾患であり、PLP1 遺伝子の過剰発現(重複、三重化)や欠失・ヌル変異あるいはミスセンス変異によって生じる(2)。およそ半数を占める過剰発現によるタイプでは、過剰な PLP1 蛋白がコレステロールや脂質とともに後期エンドソーム及びリソソームに蓄積する結果、膜ラフトの構築が障害され、脱随やニューロン欠損がもたらされる。およそ 10%を占める機能喪失タイプは、中枢神経の軸索における Waller 変性によって、神経機能障害が生じる(1)。ミスセンス変異によるタイプはおよそ 30%を占め、重症度は PLP1 蛋白変異に応じて様々である。ミスセンス変異によって生じる PLP1 蛋白の発現量や細胞内局在の変化は、PMD の病態と関連することが知られる。近年報告された、異なるミスセンス変異を有する 2 名の PMD 患者の iPS 細胞由来のオリゴデンドロサイトでは、PLP1 蛋白は細胞核周囲に留まり、蛋白量が低下する一方で、ミエリン構成蛋白の一つであるミエリン塩基性蛋白(myelin basic protein)は細胞全体に発現していた。本研究の主な目的は、変異 PLP1 蛋白の発現量及び細胞内局在を指標とした薬理学的シャペロンのスクリーニングを行うことである。また、PLP1 以外に、脊髄小脳変性症を有する小児の全エクソームシーケンスによって変異を認め、病原性を確認した遺伝子のうち、主に細胞膜に局在する Ca channel: -1A subunit (CACNA1A, OMIM\*601011)および folate receptor family 1 (FOLR1, OMIM\*136430)、ペルオキシソームに局在する peroxisome biogenesis factor 16 (PEX16, OMIM\*603360)、ミトコンドリアに局在する catalytic subunit of mt.DNA polymerase (POLG, OMIM\*174763) の 4 種における変異型蛋白の局在を解析し、細胞内局在を指標としたシャペロン蛋白探索の応用可能性について検証した(3)。

## 3. 研究の方法

PLP1WT-EGFP、PLP1A243V-EGFP、PLP1W163R-EGFP、PLP1I187T-EGFP、及び PLP1W163L-EGFP プラスミドを MO3.13 細胞にトランスフェクションさせ、作製した安定発現細胞株に 275 種類の薬剤それぞれを加えた後/加える前の細胞全体の蛍光強度比(薬剤を加えないコントロール細胞の蛍光強度比により補正)を In Cell Analyzer 1000®で解析した。また FLAG 配列を付加した正常型プラスミド 4 種(pCACNA1AWT、pFOLR1WT、pPEX16WT、pPOLGWT-FLAG)及び変異型プラスミド 7 種(pCACNA1AS1799L、pFOLE1R125L、pFOLR1W156G、pPEX16R227W、pPEX16R176\*、pPOLGQ53\_Q55dup、pPOLGR964C-FLAG)を、それぞれのプラスミドの主な局在と一致する局在マーカー(CACNA1A および FOLR1: 細胞膜、pDsRed-Monomer-Mem-vector, Takara Bio USA Inc.、PEX16: ペルオキシソーム、peroxisomal membrane protein 2-RFP, Origene Technologies

Inc.、 POLG : ミトコンドリア、 pDsRed-Mito vector , Takara Bio USA Inc.) と共に HELA 細胞に一過性発現させ、共焦点顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PLP1-EGFP 安定発現 M03.13 細胞の画像評価

PLP1<sup>WT</sup>-EGFP は細胞質および細胞膜に広く局在した ( 図 1 ) のに対し、重症型を示す PLP1<sup>A243V</sup>-EGFP 及び PLP1<sup>W163R</sup>-EGFP は殆どが核周囲に留まっていた ( 図 1B、C )。軽症型を示す PLP1<sup>I187T</sup>-EGFP と PLP1<sup>W163L</sup>-EGFP は重症型より広い範囲に局在を示した ( 図 2D、E )。

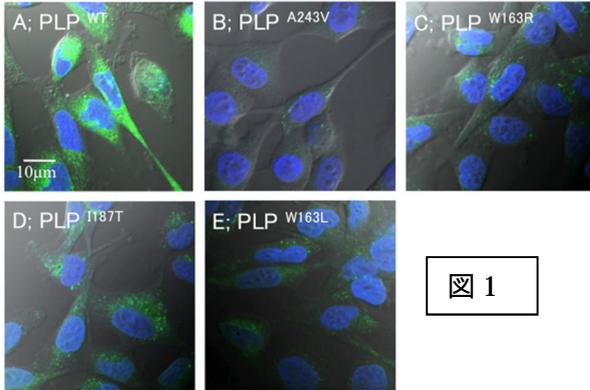


図 1

##### < 図 1 > PLP1-EGFP を安定発現させた M03.13 細胞

EGFP を融合した正常型及び変異型 PLP1 蛋白 ( 4 種 ) を安定発現させた M03.13 細胞を示す。融合 EGFP 蛋白は緑色で、細胞核は青色 ( Hoechst ) で示されている。それぞれの画像は共焦点レーザー顕微鏡で撮影した ( 600 倍 )。正常型では細胞質、細胞膜に PLP1 が分布するのに対して、変異型では重症型であるほど核周囲に留まり、発現が弱い。

##### (2) EGFP 蛍光強度解析

M03.13 細胞に発現させた PLP1<sup>A243V</sup>-EGFP について、同様の解析を 3 度繰り返し、蛍光強度比の平均値を算出した結果、9 種類の薬剤 ; #101, apomorphine; #271, vincamine; #297, benzydamine; #317, guanethidine; #329, tacrine; #343, desipramine; P, piracetam; B, benserazide; #1104, clonixin lysinate が添加後/添加前の蛍光強度比 1.5 以上を示した ( 図 3 )

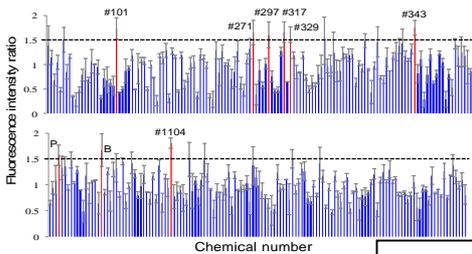


図 2

##### < 図 2 > 275 種類の薬剤添加後/添加前の細胞全体の EGFP 蛍光強度比

PLP1<sup>A243V</sup> 蛋白を安定発現させた M03.13 細胞における、275 種類の薬剤添加後/添加前の細胞全体の EGFP 蛍光強度比を示す。3 度の解析の平均値において、蛍光強度比が 1.5 以上を示した薬剤を赤色で示す。#101, Apomorphine; #271, Vincamine; #297, Benzydamine; #317, Guanethidine; #329, Tacrine; #343, Desipramine; P, Piracetam; B, Benserazide; #1104, Clonixin Lysinate

##### (3) 細胞膜の EGFP 蛍光強度解析

蛍光強度比 1.5 以上を示した 9 種類の薬剤を、PLP1<sup>A243V</sup>-EGFP 安定発現 M03.13 細胞にそれぞれ 10 μM となるように添加し、24 時間後にそれぞれの細胞の画像を 5 枚ずつ共焦点レーザー顕微鏡で撮影し、In Cell Analyzer 1000®で細胞膜の EGFP 蛍光強度を解析した結果を示す ( 図 3 )。9 種類の薬剤のうち、piracetam と benserazide において、統計学的有意に細胞膜の蛍光強度が

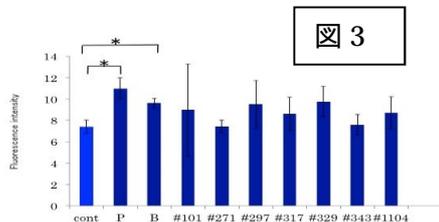


図 3

増加した ( 図 4, student-t test )。この 2 つは PLP1<sup>W163R</sup> においても細胞膜の蛍光強度が有意に増加したが、PLP1<sup>I187T</sup> 及び PLP1<sup>W163L</sup> については有意差を認めなかった ( 図 4 )。

##### < 図 3 > 薬剤添加による細胞膜の EGFP 蛍光強度の比較

細胞全体の蛍光強度比 1.5 以上を示した 9 種類の薬剤を、PLP1<sup>A243V</sup> 蛋白を安定発現させた M03.13 細胞に添加した際の、細胞膜における EGFP 蛍光強度を示す。

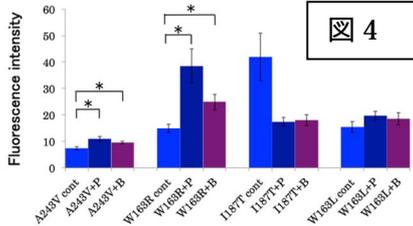


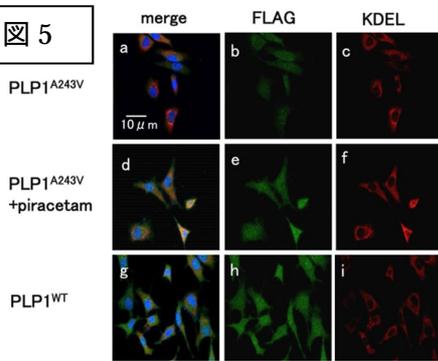
図 4

piracetam (P=0.01) と benserazide (P=0.009) において、EGFP 蛍光強度が統計学的有意に上昇した。\*P<0.05, student-t test <図 4> piracetam と benserazide を添加した際の各変異における細胞膜の蛍光強度変化それぞれの PLP1 変異型において piracetam と benserazide を加えた際の、細胞膜の EGFP 蛍光強度を示す。PLP1<sup>A243V</sup> および PLP1<sup>W163R</sup> において、いずれの薬剤も有意に細胞膜の蛍光強度が上昇したが、他の変異では差がなかった。\*P<0.05, student-t test

#### (4) PLP1<sup>A243V</sup> と小胞体の共染色による piracetam の効果検証

piracetam による PLP1<sup>A243V</sup> の細胞内局在の改善を画像で検証する目的で、PLP1<sup>A243V</sup>-FLAG プラスミドを用いた細胞内局在を検証した。PLP1 変異蛋白は小胞体に留まることが報告されていることから [36]、PLP1<sup>A243V</sup>-FLAG と小胞体の共染色における評価を行った (図 5 B)。抗 KDEL 抗体を用いた画像解析では、PLP1<sup>A243V</sup>-FLAG は正常型と比較して発現が弱く、主に小胞体に留まっていたが (a-c vs. g-i) piracetam を加えた場合、PLP1<sup>A243V</sup>-FLAG は小胞体のみならず広く細胞質内に局在した (d-f)。

図 5



したが (a-c vs. g-i) piracetam を加えた場合、PLP1<sup>A243V</sup>-FLAG は小胞体のみならず広く細胞質内に局在した (d-f)。この結果から、piracetam は PLP1<sup>A243V</sup> 蛋白を正常の局在に近づける効果を有すると考えられた。

#### <図 5> piracetam による PLP1<sup>A243V</sup>-FLAG の局在変化

PLP1<sup>A243V</sup>-FLAG を安定発現させた M03.13 細胞、これに piracetam を 10 μM で添加し 24 時間経過した細胞、及び PLP1<sup>WT</sup>-FLAG を安定発現させた M03.13 細胞に対する抗 FLAG 抗体及び抗 KDEL 抗体の共染色画像を示す。PLP1<sup>A243V</sup>-FLAG は緑色 (b, e, h)、小胞体局在を反映する KDEL は赤色 (c, f, i)、細胞核は青色 (Hoechst) で示す。a-c: PLP1<sup>A243V</sup>、d-f: PLP1<sup>A243V</sup> with piracetam、g-i: PLP1<sup>WT</sup>

#### (5) CACNA1A、FOLR1、PEX16、POLG の蛋白局在の比較

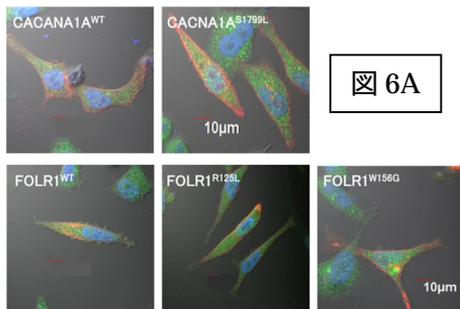


図 6A

殆どのプラスミドは、FLAG (緑色) と局在マーカー (赤色) が重なって観察され、正常型と変異型の局在に差異がなかった (図 6A) POLG において、POLG<sup>R964C</sup> は、正常型および pPOLG<sup>Q53-Q55dup</sup> と異なり、FLAG とミトコンドリアマーカーの局在に乖離がみられた (図 6B)

#### <図 6A> HELA 細胞における CACNA1A、FOLR1、PEX16、POLG の蛋白局在

正常型プラスミド 4 種 (pCACNA1A<sup>WT</sup>、pFOLR1<sup>WT</sup>、pPEX16<sup>WT</sup>、pPOLG<sup>WT</sup>-FLAG) 及び変異型プラスミド 7 種 (pCACNA1A<sup>S1799L</sup>、pFOLR1<sup>R125L</sup>、pFOLR1<sup>W156G</sup>、pPEX16<sup>R227W</sup>、pPEX16<sup>R176\*</sup>、pPOLG<sup>Q53-Q55dup</sup>、pPOLG<sup>R964C</sup>-FLAG) を HELA 細胞で発現させた画像を示す (600 倍)。核 (青色)、FLAG (緑色)、局在マーカー (CACNA1A および FOLR1: pDsRed-Monomer-Mem-vector、PEX16: peroxisomal membrane protein 2-RFP、POLG: pDsRed-Mito vector、赤色)

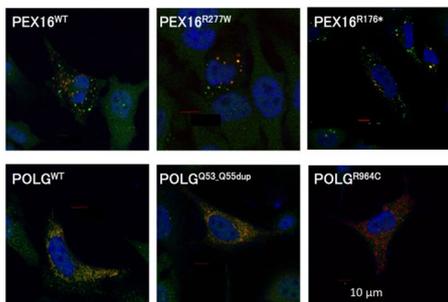


図 6B

#### <図 6B> R964C 変異における FLAG とミトコンドリアマーカーの局在

POLG の R964C 変異では、POLG<sup>R964C</sup> 蛋白の局在を反映する FLAG (緑色) とミトコンドリアマーカー (赤色) の局在に乖離がみられた。

#### (6) 考察

今回、PLP1 蛋白の細胞内局在を可視化した薬剤スクリーニングで piracetam を見出した。piracetam は、PMD で重症型を示す PLP1<sup>A243V</sup> 及び PLP1<sup>W163R</sup> において、蛋白

発現の増加および細胞内局在改善効果を示した。小胞体ストレス及び、引き続き生じるUPRは嚢胞性線維症、網膜色素変性症、シャルコー・マリー・トゥース病、ファブリー病、そしてPMDなど、ヒトにおける多くの遺伝性疾患での関連が報告されており、PMDはUPRの程度と重症度の相関が報告された最初の疾患である。本研究では、PLP1蛋白の発現量、細胞内局在、および小胞体ストレスを指標とした、PMDに対する薬理学シャペロンのスクリーニングを行った。結果、PLP1<sup>A243V</sup>の蛋白発現および細胞内局在を改善させるpiracetamを見出した。piracetamはまた、PLP1<sup>A243V</sup>の小胞体ストレスを軽減させたが、in vivo解析での効果は示せなかったため、標的とする分子の解明や誘導体化等、更なる検討が必要である。また、ミトコンドリアマーカ-との局在乖離がみられたPOLG<sup>R964C</sup>については、局在の改善を指標とした薬剤スクリーニングが可能であり、細胞内局在を指標とした薬物スクリーニングの他疾患への適応可能性を示すことができた。

#### 引用文献

1. Osaka H, Inoue K. Pathophysiology and emerging therapeutic strategies in Pelizaeus–Merzbacher disease. *Expert Opinion on Orphan Drugs*. 2015;3(12):1447-59.
2. Inoue K, Osaka H, Sugiyama N, Kawanishi C, Onishi H, Nezu A, et al. A duplicated PLP gene causing Pelizaeus-Merzbacher disease detected by comparative multiplex PCR. *American journal of human genetics*. 1996;59(1):32-9.
3. Ohba C, Osaka H, Iai M, Yamashita S, Suzuki Y, Aida N, et al. Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood. *Neurogenetics*. 2013;14(3-4):225-32.

## 5. 主な発表論文等

### 雑誌論文（合計4件）

Kouga T, Koizume S, Aoki S, Jimbo E, Yamagata T, Inoue K, et al. Osaka H. Drug screening for Pelizaeus-Merzbacher disease by quantifying the total levels and membrane localization of PLP1. *Mol Genet Metab Rep*. 2019;20:100474 (査読あり).

Matsumoto A, Tulyeu J, Furukawa R, Watanabe C, Monden Y, Nozaki Y, et al. Osaka H. A case of severe Alexander disease with de novo c. 239T>C, p.(F80S), in GFAP. *Brain Dev*. 2018;40(7):587-91. (査読あり).

Kouga T, Takagi M, Miyauchi A, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, et al. Osaka H. Japanese Leigh syndrome case treated with EPI-743. *Brain Dev*. 2018;40(2):145-9. (査読あり).

Lu, Y., Ondo, Y., Shimojima, K., Osaka, H., and Yamamoto, T. (2017). A novel TUBB4A mutation G96R identified in a patient with hypomyelinating leukodystrophy onset beyond adolescence. *Hum Genome Var* 4, 17035. (査読あり).

### 学会発表（合計3件）

小坂 仁、中村幸恵、神保恵理子、村松慎一、山形崇倫

小児神経疾患に対する治療法開発研究戦略と臨床応用の展望学術集会シンポジウム小児神経疾患への遺伝子細胞治療臨床応用第58回日本小児神経学会 2018.5.30-6.2 幕張

遺伝性白質疾患の診断・治療・研究システムの構築

小坂 仁、井上 健、他第59回日本小児神経学会セミナー 2018.6.15 大阪

大脳白質形成不全を呈する疾患原因の解明 Congenital cerebral hypomyelination

小坂 仁、井上 健、エキスパートに聞く第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 2018.6.15 大阪

[産業財産権] 特願 17-23 プロテオリピドタンパク質1の構造不全の改善剤

特願 2018-094878 出願日平成30年5月16日発明者小坂仁、山形崇倫、神保恵理子、甲賀健史

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者；井上健 ローマ字氏名；(INOUE, ken) 機関名および部局；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

(2) 研究協力者；甲賀健史 ローマ字氏名；(KOUGA, takeshi)