

表 題 変異蛋白の細胞内局在変化に着目した薬剤
スクリーニング方法の開発

論文の区分 博士課程

著 者 名 甲賀 健史

担当指導教員
氏 名 小坂 仁 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系 専攻
生殖・発達医学 分野
成育医学

2019 年 1 月 10 日申請の学位論文

目次

1. はじめに	1
2. 方法	3
2.1 薬剤スクリーニング対象遺伝子の決定	3
2.2 PLP1 プラスミドの構築	4
2.3 PLP1-EGFP 安定発現細胞株の作製	5
2.4 細胞全体における PLP1 ^{A243V} -EGFP の蛍光強度解析	6
2.5 細胞膜における PLP1 ^{A243V} -EGFP 蛍光強度の解析	7
2.6 候補薬剤の添加による小胞体ストレスの解析	8
2.7 PLP1 蛋白と小胞体の共染色による piracetam の効果検証	9
2.8 piracetam による遺伝子発現変化の解析	10
2.9 <i>msd</i> マウスに対する piracetam の投与	11
2.10 CACNA1A、FOLR1、PEX16、POLG プラスミドの構築	12
2.11 CACNA1A、FOLR1、PEX16、POLG 発現細胞の画像解析	13
3. 結果	14
3.1 PLP1-EGFP 安定発現 MO3.13 細胞の画像評価	14
3.2 細胞全体の EGFP 蛍光強度解析	15
3.3 細胞膜の EGFP 蛍光強度解析	16
3.4 候補薬剤による <i>XBP1</i> 遺伝子スプライシングの変化	19
3.5 PLP1 ^{A243V} と小胞体の共染色による piracetam の効果検証	20
3.6 マイクロアレイによる遺伝子発現解析結果	21
3.7 piracetam 投与による <i>msd</i> マウスの生存解析	25
3.8 CACNA1A、FOLR1、PEX16、POLG の蛋白局在の比較	26
4. 考察	29
4.1 本研究の成果	29
4.2 piracetam の薬理作用と PLP1 変異蛋白に対する機序	30
4.3 PLP1 の変異型による細胞内局在と小胞体ストレスの関連	31
4.4 本研究の制約と利点	32

5. おわりに-----	33
6. 参考文献-----	35
7. 謝辞-----	40

略語

PMD: Pelizaeus-Merzbacher disease

PLP1: proteolipid protein 1

ER: endoplasmic reticulum

UPR: unfolded protein response

ERAD: ER-associated degradation

CACNA1A: Ca channel: α -1A subunit

FOLR1: folate receptor family 1

PEX16: peroxisome biogenesis factor 16

POLG: catalytic subunit of mt.DNA polymerase

EGFP: enhanced green fluorescent protein

msd: myelin synthesis deficient

IRE1 α : inositol requiring enzyme 1 α

IPA: ingenuity pathways analysis

1. はじめに

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の開発が可能である。このような化合物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、細胞内局在変化を指標としたスクリーニングも方法の一つとして考えられる [1]。

ペリツェウス・メルツバッハ病 (Pelizaeus-Merzbacher disease; PMD、Online Mendelian Inheritance in Man; OMIM#312080) は、原因遺伝子である proteolipid protein 1 (*PLP1*, OMIM*300401) 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]。

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 [3-5]。*PLP1* は、そのスプライシングバリエントである *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 [6]。*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 [7、8]。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 [9、10]。

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 [11、12]、*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 [13]。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、脱髄やニューロン欠損がもたらされる [14-16]。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 [17]。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。一般的にアミノ酸変異によって折れたたたみ不全が生じると、蛋白は小胞体に留まり、小胞体ストレスを惹起する。小胞体ストレス応答（unfolded protein response: UPR）には、新生蛋白質の翻訳抑制や、小胞体分子シャペロンタンパク質の転写誘導、折りたたみ不全蛋白自体を分解する小胞体関連分解（ER-associated degradation: ERAD）などがあるが、これらにより対応できない場合には、アポトーシスが生じる [18]。PMD は小胞体ストレスが病態と関連し、変異 PLP1 の多くは、小胞体関連分解により蛋白量が減少し、適切な局在に到達できない PLP1 蛋白は機能不全を生じ、ミエリン形成不全、神経障害につながる [19]。このように、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 [2]。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 [20]。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剤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 (小脳失調) を有する小児 25 名の患者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 [21]、主に細胞膜に局在する Ca channel: α -1A subunit (*CACNA1A*, OMIM*601011) [22] および folate receptor family 1 (*FOLR1*, OMIM*136430) [23]、ペルオキシソームに局在する peroxisome biogenesis factor 16 (*PEX16*, OMIM*603360) [24]、ミトコンドリアに局在する catalytic subunit of mt.DNA polymerase (*POLG*, OMIM*174763) [25] の 4 種における変異型蛋白の局在を解析し、正常型と比較した際の局在差異がみられるか検証し、細胞内局在を指標とした薬剤探索の応用可能性について検証した。

2. 方法

2.1 薬剤スクリーニング対象遺伝子の決定

薬剤スクリーニング対象遺伝子として、従来から研究を行ってきた *PLP1* に加えて、代表的な遺伝性神経疾患を取り上げた。脊髄小脳変性症 (小脳失調) を有する小児 25 名の患者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、*CACNA1A* (患者変異 1 種: p.S1799L)、*FOLR1* (患者変異 2 種: p.R125L、 p.W156G)、*PEX16* (患者変異 2 種: p.R227W、

p.R176*），および *POLG*（患者変異 2 種: p.Q53_Q55dup、 p.R964C）を対象とした（表 1）[21]。これらの正常型および変異型プラスミドを細胞に発現させ、得られた細胞内の局在を比較し、薬剤スクリーニングへの適応可能性を検証した。

	CACNA1A	FOLR1	PEX16	POLG
	(Ca channel: α -1A subunit)	(folate receptor family 1)	(peroxisomal membrane protein 16)	(catalytic subunit of mt.DNA polymerase)
Inheritance	AD	AR	AR	AR
Mutations	p.S1799L	p.R125L / p.W156G	p.R227W / p.R176* (truncation)	p.Q53_Q55dup / p.R964C
Localization	cytoplasm~membrane	cytoplasm~membrane	peroxisome	mitochondria
Phenotype	Developmental delay, Ataxia, Epileptic seizure	Ataxia, Epileptic seizure	Ataxia, Developmental delay	Hypotonia, Ataxia

<表 1> 脊髄小脳変性症を有する小児患者の全エクソーム解析から得られた変異遺伝子 4 種の細胞内局在、および患者にみられた症状。AD; 常染色体優性、AR; 常染色体劣性

2.2 PLP1 プラスミドの構築

緑色蛍光蛋白 (EGFP) を融合させた PLP1 蛋白の正常型 (pPLP1^{WT}-EGFP)、変異型 (pPLP1^{W163L}-EGFP, pPLP1^{A243V}-EGFP)、及び FLAG 配列 (3'-DYKDDDDK-5') を付加したプラスミド (pPLP1^{WT}-FLAG, pPLP1^{A243V}-FLAG) の構築を、文献 [26] を参照して行った。始めに、ヒト *PLP1* 遺伝子の全長 cDNA

を RT-PCR 法で増幅させ、pAcGFP-N1 ベクター (Clontech Laboratories, Inc., Santa Clara, CA, USA) における制限酵素反応域: EcoRI 及び BanHI 間に組み入れ、pPLP1-EGFP を作成した。pPLP1-FLAG の構築は pPLP1-EGFP を基に、FLAG 配列を PLP1 と EGFP 間に挿入することで合成した。pPLP1^{W163R}-EGFP と pPLP1^{I187T}-EGFP についても、同様の方法で作製した。変異合成に使用したプライマーは、W163R 変異合成については

5'-CCTGACCGTTGTGCGGCTCCTGGTG-3'、及び

5'-CACCAGGAGCCGCACAACGGTCAGG-3'で、I187T 変異合成については

5'-CCTGCCAGTCTACTGCCTTCCCCAGC-3'

及び 5'-GCTGGGGAAGGCAGTAGACTGGCAGG-3'である。それぞれのプラスミドのシーケンスは Biomek® 2000 (Beckman Coulter Inc., Tokyo, Japan) で脱塩処理後、3730 DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を用いて確認した。

2.3 PLP1-EGFP 安定発現細胞株の作製

Lipofectamine® 3000 Transfection Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて、アンピシリン耐性遺伝子及び EGFP を融合させた正常型プラスミド (PLP^{WT})、及び変異型プラスミド (PLP1^{A243V}、PLP1^{W163R}、PLP1^{I187T}、PLP1^{W163L}) をヒトオリゴデンドロサイト由来の MO3.13 細胞にトランスフェクションさせた後、アミノグリコシドである G418 (Geneticin®) を用いて安定細胞株を作製した。コロニーの選定は、コロニー

細胞の一部を 8 ウェルチャンバープレートに撒き直し、共焦点型顕微鏡 (LUOVIEW FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) で EGFP の存在を確認することで行った。各プラスミドの安定発現細胞のコロニーを 3 つずつ選択し、このうち最も発現の安定した細胞を解析に使用した。このうち、A243V 変異は PMD において重症型を示し、同変異の自然発症型マウス (*msd*) が存在すること [27] から、薬理学シャペロンスクリーニングに用いる変異として A243V 変異を選択した。

2.4 細胞全体における PLP1^{A243V}-EGFP の蛍光強度解析

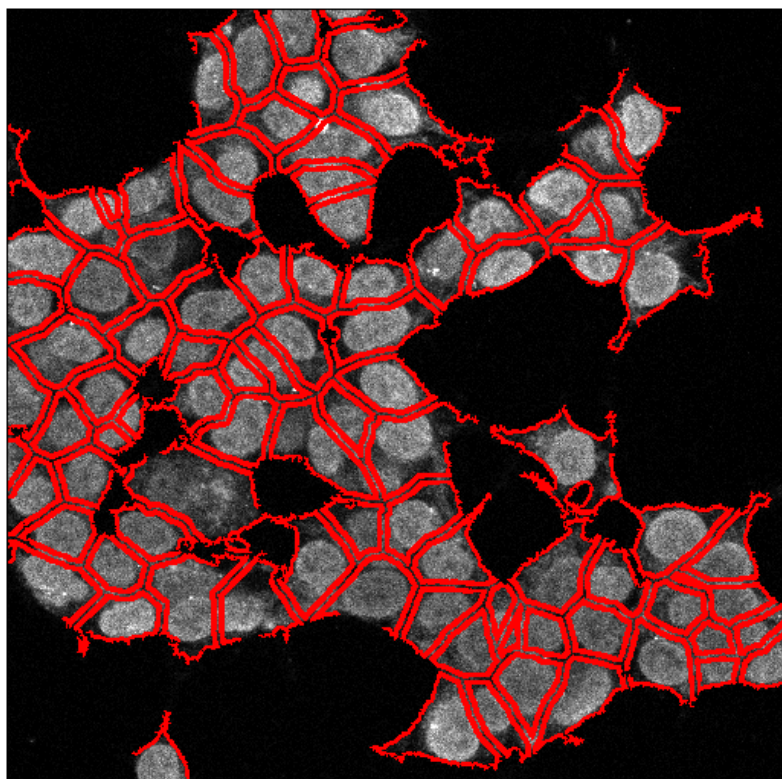
血液脳関門を透過する中枢神経作用薬剤ライブラリー (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA) を用いた薬理学シャペロンのスクリーニングを行った。この薬剤ライブラリーは、投与承認を受けた薬剤 275 種類からなる (Prestwick chemical library®) [28]。薬剤を加える前後で、PLP1^{A243V}-EGFP を安定発現させた MO3.13 細胞の蛍光強度を比較解析した。解析にはモジュール式細胞内イメージングシステムである In Cell Analyzer 1000® (GE Healthcare UK Ltd., Amersham, UK) を使用した。解析においては、一つの薬剤ウェルにつきおよそ 20 個の細胞を含むフィールドが、核 (Hoechst) および EGFP を標識として 5 フィールドずつ自動的に選定され、撮影されるプロトコールを用いた。それぞれのフィールド画像を、解析ソフトウェアである In Cell Analyzer 1000 Workstation 3.4 software program (GE Healthcare) に適用させ、蛍光強度を解析した [29]。始めに、PLP1^{A243V}-EGFP を安定発現させた MO3.13 細胞を 1

ウェルにつき 1×10^4 細胞ずつ、96 ウェルプレートに播種した。24 時間後、細胞全体の蛍光強度を測定するプロトコールで、In Cell Analyzer 1000®を用いて、それぞれのウェルにおける蛍光強度の基礎値を得た。その直後、275 種類の薬剤を 1 つずつ、それぞれのウェルに 10 μ M となるように加えた。それぞれの薬剤は溶解性に応じて、Phosphate buffered salts (PBS)、Dimethyl sulfoxide (DMSO)、あるいはエタノールで溶解した。更に 24 時間後、同様のプロトコールで細胞全体の蛍光強度を再解析した。同様の行程を 3 度繰り返し、薬剤添加後の蛍光強度/添加前の蛍光強度比の平均値が 1.5 以上となった薬剤を抽出した。それぞれの薬剤における蛍光強度比は、同時刻に撮影した、薬剤を加えないコントロール (MO3.13 細胞) の蛍光強度比で補正した。

2.5 細胞膜における PLP1^{A243V}-EGFP 蛍光強度の解析

蛋白の細胞内局在を反映する細胞膜の蛍光強度解析においては、より詳細な解析のため、共焦点レーザー顕微鏡 (FLUOVIEW FV1000) で撮影した画像を用いた。上述の、細胞全体の蛍光強度解析で蛍光強度比 1.5 以上を示した薬剤を、それぞれ PLP1^{A243V}-EGFP を安定発現させた MO3.13 細胞に 10 μ M となるように加え、24 時間後に 4%パラホルムアルデヒドで細胞固定した (室温、60 分間)。それぞれの薬剤に対して、共焦点レーザー顕微鏡で 5 枚ずつ画像を撮影し、これらの画像を細胞膜の蛍光強度を認識するプロトコールに適用させ、In Cell Analyzer 1000®で解析を行った。In Cell Analyzer 1000®で認識する細胞膜領域の例を示す (図 1)。細胞膜の蛍光強度が有意に上昇した薬剤に対して

は、他の変異（PLP1^{W163R}、PLP1^{I187T}、PLP1^{W163L}）についても同様の解析を行った。



<図 1> In Cell Analyzer 1000®で認識される細胞膜領域

MO3.13 細胞において、In Cell Analyzer 1000®で細胞膜として認識される領域が赤色で示されている（200 倍）。

2.6 候補薬剤の添加による小胞体ストレスの解析

上記 2 つの段階でいずれも蛍光強度を増加させた薬剤、すなわち蛋白発現量および局在の改善が得られた薬剤において、小胞体ストレスに対する効果を検証した。始めに、PLP1^{A243V}-EGFP を安定発現させた MO3.13 細胞を 2×10^4 細胞ずつ 96 ウェルプレートに播種した。抽出された piracetam と benserazide を、それぞれ 10 μM となるように加えた。24 時間後、これらの細胞に、ルシフェラ

ーゼを融合させた *XPB1* 遺伝子配列を含む小胞体ストレス検出試薬 (ERAI ER Stress Detector®, Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan) をリポフェクタミン法でトランスフェクションさせた。トランスフェクションから 24 時間後、Inositol-Requiring Enzyme 1 α (IRE1 α) 蛋白センサーを介した小胞体ストレスを惹起するツニカマイシン (5 μ g/ml) を含む培養液に交換した。IRE1 α は小胞体に存在し、小胞体ストレスの大きさに応じて *XPB1* 遺伝子のスプライシングをもたらす膜透過性蛋白であり [30]、*XPB1* 遺伝子のスプライシングによりルシフェラーゼが翻訳・検出される。培養液交換から 6 時間後に、ONE-Glo™ Luciferase Assay System® (Promega, Madison, WI, USA) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。同様に、PLP1^{WT}-EGFP を安定発現させた MO3.13 細胞に対してのルシフェラーゼ活性も行った。コントロール、および薬剤添加の細胞における活性解析は、それぞれ 7 well ずつ行い、平均値を算出した。

2.7 PLP1 蛋白と小胞体の共染色による piracetam の効果検証

EGFP 蛋白は、蛋白修飾の一種であるポリユビキチン化を阻害するという報告などから [31]、EGFP を融合させた PLP1 蛋白は PLP1 本来の挙動を反映しない可能性が考えられた。方法 2.6 で有意にルシフェラーゼ活性を低下させた piracetam によって、PLP1^{A243V} 蛋白が小胞体を越えた局在の改善を示すことを検証する目的で、PLP1^{A243V}-FLAG と抗 KDEL 抗体の共染色を行った。始めに、PLP1^{A243V}-FLAG を安定発現させた MO3.13 細胞を 8 ウェルチャンバープレートに、各ウェル 2×10^5 細胞ずつ播種した。piracetam を 10 μ M となるように加

え、37℃で 24 時間インキュベートした後、4%パラホルムアルデヒドを用いて室温で 60 分間、細胞固定を行った。PBS で 3 回洗浄し、ブロッキングバッファー（5% スキムミルク、0.1% triton X-100 を含む PBS）を用いて室温で 60 分間、ブロッキングを行った。次に一次抗体：マウスモノクローナル抗 FLAG 抗体（OriGene Technologies Inc., Rockville, MD, USA、200 倍）およびラビットポリクローナル抗 KDEL 抗体（Medical & Biological Laboratories CO., LTD, Nagoya, Japan、1000 倍）を加えて 4℃で一晩静置した。翌日、PBS-T（0.1% triton X-100 を含む）で 3 回洗浄後、二次抗体：ゴート抗マウス IgG 抗体（Alexa Fluor® 488, Thermo Fisher Scientific, 250 倍）およびゴート抗ラビット IgG 抗体（Alexa Fluor® 568, Thermo Fisher Scientific, 250 倍）を加えて室温で 60 分間反応させ、免疫複合体を検出した。最後に、Hoechst を用いて核染色を行った。また、piracetam を加えない PLP1^{A243V}-FLAG 及び PLP1^{WT}-FLAG についても同様の行程を行った。それぞれの蛍光染色を、共焦点レーザー顕微鏡（FLUOVIEW FV1000, 600 倍）を用いて観察した。

2.8 piracetam による遺伝子発現変化の解析

piracetam による MO3.13 細胞の遺伝子発現変化を検証するため、MO3.13 細胞から抽出した RNA を用いたマイクロアレイ解析を行った。始めに、同様の条件で培養した MO3.13 細胞の安定発現細胞株 3 種： 1) PLP1^{A243V}、2) PLP1^{A243V} に piracetam を 10 μ M で加えた 24 時間後、3) PLP1^{WT} から 1 つずつ細胞株を選択し、RNeasy® Mini kit（QIAGEN N.V., Venlo, Netherlands）

を用いて RNA を抽出した。これらの RNA を用いて、タカラバイオ株式会社 (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) にマイクロアレイ解析を依頼した。解析は、1) ラベリング、2) ハイブリダイゼーション、3) スキャニング、4) データ処理の 4 行程で行われた (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)。マイクロアレイの遺伝子プローブ (Platform: SurePrint G3 Human GE V3 8x60k, Agilent Technologies Inc., およそ 28,000 プローブ) から、piracetam を加えることで発現が 2 倍以上になった遺伝子群 (increased group) 及び半分以下になった遺伝子群 (decreased group) を抽出した。解析データは Gene Expression Omnibus (GEO) database に登録した (GEO Accession Number: GSE 124034)。次に、これらの遺伝子群を Ingenuity Pathways Analysis (IPA) software (version 44691306, QIAGEN N.V.) に適用し、これらの遺伝子群が発現変化に有意に寄与するパスウェイ上位 5 つを検出した。

2.9 *msd* マウスに対する piracetam の投与

piracetam の in vivo での治療効果検証のため、*msd* マウスを用いた生存解析を行った。マウスに投与する piracetam (CAS No. 7491-74-9) は Sigma-Aldrich Co. LLC (Saint Louis, MO, USA) から購入した。piracetam 投与群 (N=14) では、PBS に 60mg/ml で溶解させた piracetam を 200mg/kg で腹腔内投与した。投与は P3 から開始し、連続した週 5 日間の投与を継続した。コントロール群 (N=24) では、同量の PBS を同様の方法で投与した。piracetam の投与量は過去の文献を参考に決定した [32-34]。動物実験における動物の取り扱いお

よび薬剤投与は、国立精神・神経医療研究センター神経研究所の動物実験委員会の承認に基づいて行われた（承認番号: 2017010）。

2.10 CACNA1A、FOLR1、PEX16、POLG プラスミドの構築

EGFP を融合させた 4 種遺伝子のプラスミド（pCACNA1A^{WT}-EGFP: RG214314、pFOLR1^{WT}-EGFP: RG212291、pPEX16^{WT}-EGFP: RG201115、pPOLG^{WT}-EGFP: RG204456）を OriGene 社（OriGene Technologies Inc.）から入手し、変異型 7 種のプラスミド（CACNA1A^{S1799L}-EGFP、FOLR1^{R125L}-EGFP、FOLR1^{W156G}-EGFP、PEX16^{R227W}-EGFP、PEX16^{R176*}-EGFP、POLG^{Q53_Q55dup}-EGFP、POLG^{R964C}-EGFP）の変異導入をタカラバイオ株式会社（Takara Bio Inc.）に依頼した。EGFP は分子量が大きく、蛋白そのものの動態を反映しない可能性が考えられたため、制限酵素を用いて EGFP 配列を切断し、代わりに FLAG タグ（5'-GATTACAAGGATGACGACGATAAG-3'）を挿入した。具体的には、制限酵素として CACNA1A および POLG については Mlu I（5'側）と Pme I（3'側）、FOLR1 と PEX16 については Mlu I（5'側）と Sac II（3'側）を 37℃、6 時間反応させ、フェノール・クロロホルム処理を行い切断された EGFP 配列を除去した。そこに、制限酵素処理配列に合わせて作成した FLAG 配列プライマーを、DNA Ligation kit <Mighty Mix>® (Takara Bio Inc.)を用いて 16℃、30 分間反応させた。終止コドンを含む PEX16^{R176*}-EGFP については、PEX16 配列の終止コドンから 3'側～EGFP 配列を制限酵素で除去し、終止コドン直後

に FLAG 配列を挿入することで、PEX16R176*-FLAG を作製した。それぞれのプラスミドのシーケンスは Biomek® 2000 (Beckman Coulter Inc., Tokyo, Japan) で脱塩処理後、3730 DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を用いて確認した。

2.11 CACNA1A、FOLR1、PEX16、POLG 発現細胞の画像解析

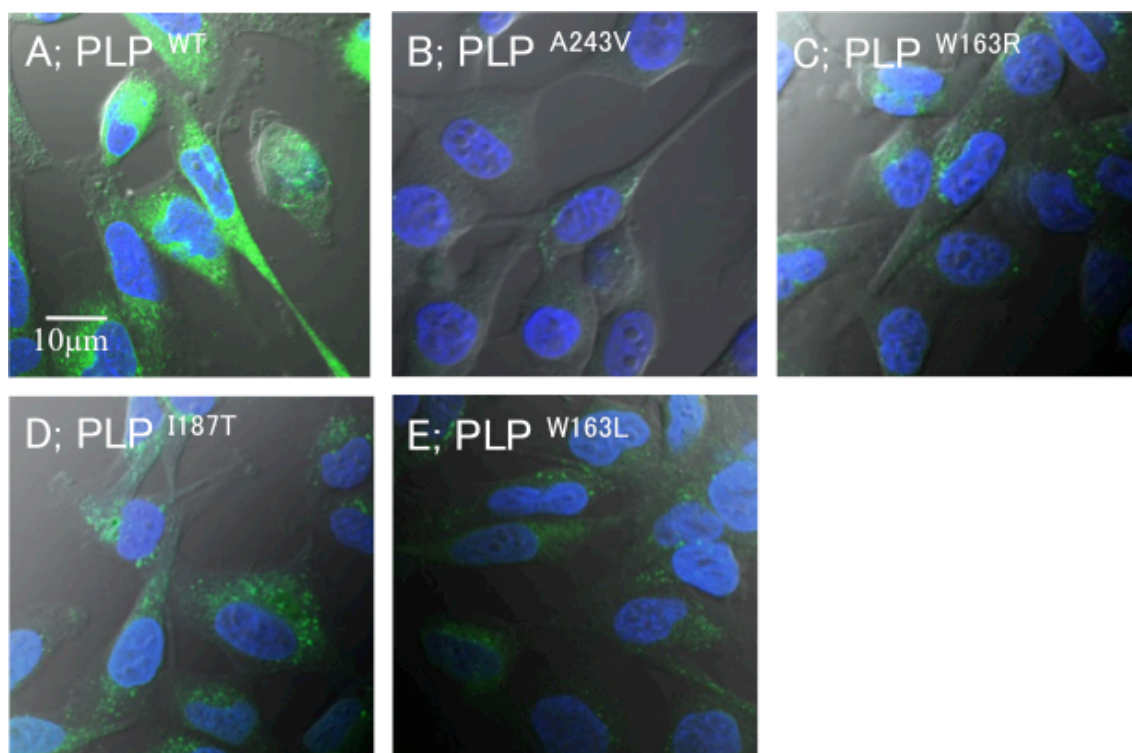
CACNA1A、FOLR1、PEX16 および POLG の 4 種の蛋白の画像評価については、細胞が大きく、局在解析が容易なヒト子宮頸癌由来の HELA 細胞を用いた。FLAG 配列を付加した正常型 (pCACNA1A^{WT}、pFOLR1^{WT}、pPEX16^{WT}、pPOLG^{WT}-FLAG)、及び変異型プラスミド 7 種 (pCACNA1A^{S1799L}、pFOLR1^{R125L}、pFOLR1^{W156G}、pPEX16^{R227W}、pPEX16^{R176*}、pPOLG^{Q53-Q55dup}、pPOLG^{R964C}-FLAG) を、それぞれのプラスミドの主要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., Mountain View, CA, USA)、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.)) と合わせて Lipofectamine® 3000 Transfection Kit (Thermo Fisher Scientific) で HELA 細胞に共トランスフェクションさせた。トランスフェクション後、37℃下で 48 時間インキュベートさせ、4 %パラホルムアルデヒドで細胞固定、PBS で洗浄後、ブロッキング液 (5% スキムミルク、0.1% triton X-100 を含む PBS) で 60 分間ブロッキングを行った。その後、FLAG

を染色する目的で、一次抗体 (mouse monoclonal anti-DDK, Origene, 200 倍) を加え、4 °Cで一晩保存した。翌日、PBS-T (PBS with 0.1% triton X-100) で洗浄し、二次抗体 (goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488, Thermo Fisher Scientific, 250 倍) を加え、室温で1時間静置した。PBS 洗浄を行った後、Hoechst で核染色を行い、それぞれの画像を共焦点レーザー顕微鏡 (FLUOVIEW FV1000) で撮影し、正常型と変異型それぞれにおける、蛋白と局在マーカーの細胞内局在を比較した。

3. 結果

3.1 PLP1-EGFP 安定発現 MO3.13 細胞の画像評価

PLP1^{WT}-EGFP、PLP1^{A243V}-EGFP、PLP1^{W163R}-EGFP、PLP1^{I187T}-EGFP、及び PLP1^{W163L}-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を共焦点レーザー顕微鏡で撮影した図を示す (図 2、600 倍)。PLP1^{WT}-EGFP は細胞質および細胞膜に広く局在した (図 2 A) のに対し、重症型を示す PLP1^{A243V}-EGFP 及び PLP1^{W163R}-EGFP は殆どが核周囲に留まっていた (図 2 B、C)。軽症型を示す PLP1^{I187T}-EGFP と PLP1^{W163L}-EGFP は重症型より広い範囲に局在を示した (図 2 D、E)。



<図 2> PLP1-EGFP を安定発現させた MO3.13 細胞

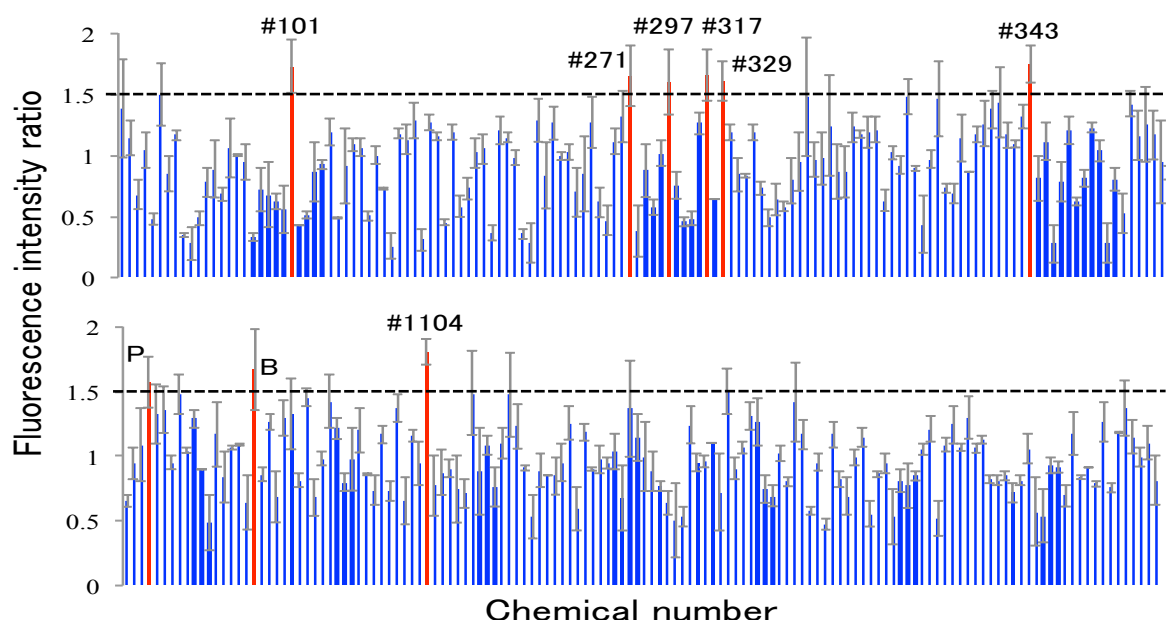
EGFP を融合した正常型及び変異型 PLP1 蛋白（4 種）を安定発現させた MO3.13 細胞を示す。融合 EGFP 蛋白は緑色で、細胞核は青色（Hoechst）で示されている。それぞれの画像は共焦点レーザー顕微鏡で撮影した（600 倍）。正常型では細胞質、細胞膜に PLP1 が分布するのに対して、変異型では重症型であるほど核周囲に留まり、発現が弱い。

3.2 細胞全体の EGFP 蛍光強度解析

MO3.13 細胞に発現させた PLP1^{A243V}-EGFP について、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。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)。



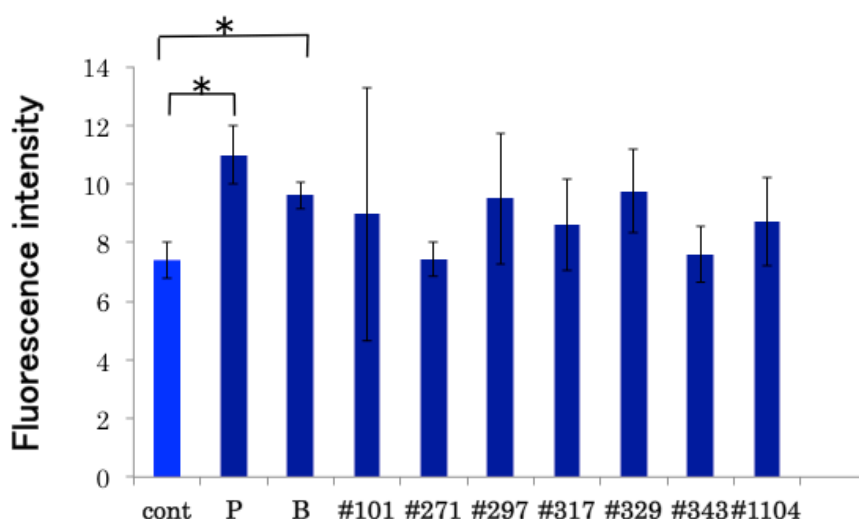
< 図 3 > 275 種類の薬剤添加後/添加前の細胞全体の EGFP 蛍光強度比

PLP1^{A243V} 蛋白を安定発現させた MO3.13 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

3.3 細胞膜の EGFP 蛍光強度解析

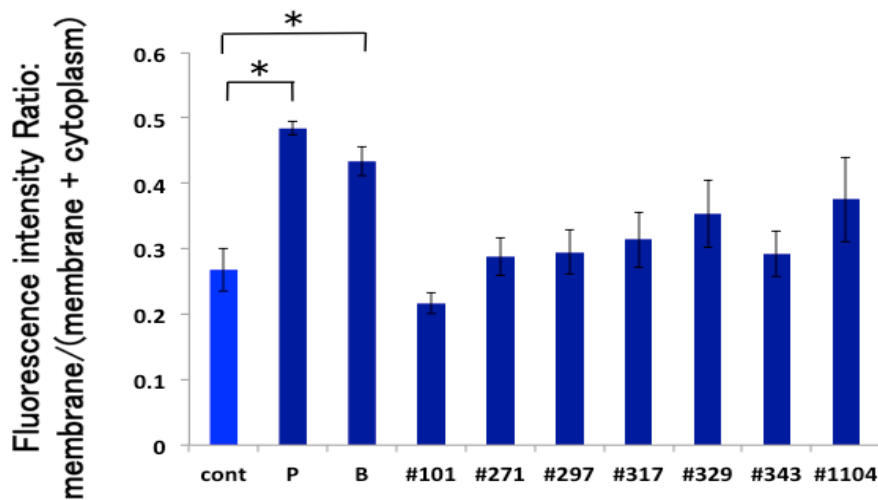
結果 3.2 で蛍光強度比 1.5 以上を示した 9 種類の薬剤を、PLP1^{A243V}-EGFP 安定発現 MO3.13 細胞にそれぞれ 10 μ M となるように添加し、24 時間後にそれぞれの細胞の画像を 5 枚ずつ共焦点レーザー顕微鏡で撮影し、In Cell Analyzer 1000®で細胞膜の EGFP 蛍光強度を解析した結果を示す (図 4)。9 種類の薬剤のうち、piracetam と benserazide において、統計学的有意に細胞

膜の蛍光強度が増加した（図 4A、student-t test）。また、同解析で得られた細胞膜の蛍光強度 / （細胞膜＋細胞質）比を示す（図 4B）。細胞膜と細胞膜＋細胞質）の比においても、piracetam および benserazide を投与した場合に、コントロールと比較して有意に上昇がみられた。また、この 2 つは PLP1^{W163R} においても細胞膜の蛍光強度が有意に増加したが、PLP1^{I187T} 及び PLP1^{W163L} については有意差を認めなかった（図 4C）。

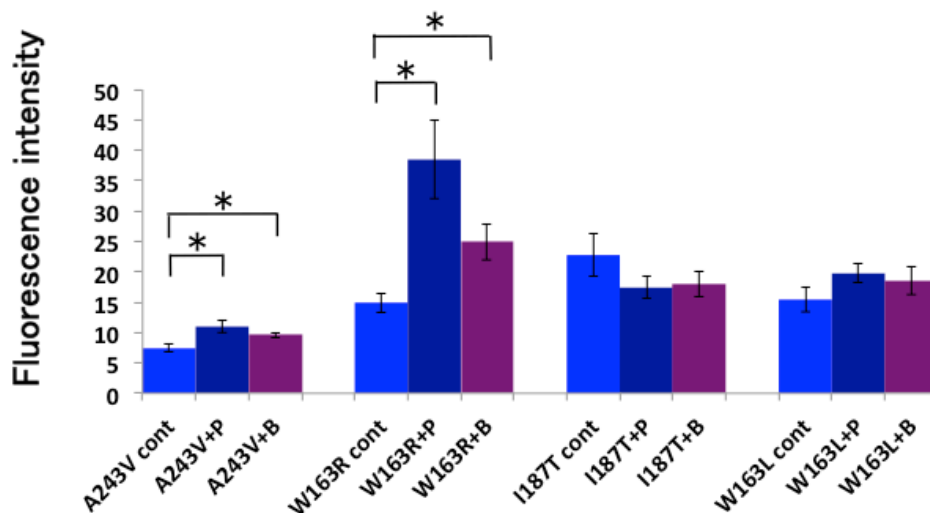


<図 4 A> 9 種類の薬剤添加による細胞膜の EGFP 蛍光強度の比較

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^{A243V} 蛋白を安定発現させた MO3.13 細胞に添加した際の、細胞膜における EGFP 蛍光強度を示す。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 B> 9 種類の薬剤添加による細胞膜 / (細胞膜 + 細胞質) の蛍光強度比
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^{A243V} 蛋白を安定発現させた M03.13 細胞に添加した際の、細胞膜 / (細胞膜 + 細胞質) の蛍光強度比を示す。
piracetam (P=0.0005) と benserazide (P=0.005) において、細胞膜 / (細胞膜 + 細胞質) の蛍光強度比の有意な上昇がみられた。*P<0.05, student-t test



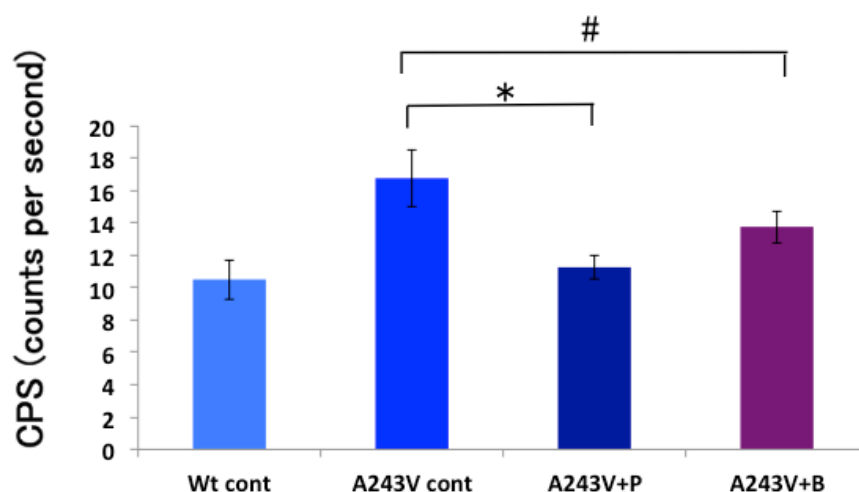
<図 4 C> piracetam と benserazide を添加した際の各変異における細胞膜の蛍光強度変化

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^{A243V} および PLP1^{W163R} 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

3.4 候補薬剤による *XPB1* 遺伝子スプライシングの変化

PLP1 蛋白の発現量及び細胞内局在の改善が、PMD の病態の一つである小胞体ストレスの軽減 [35]と関連するか検証した。小胞体ストレスの程度に応じて生じる、*XPB1* 遺伝子スプライシングにより得られるルシフェラーゼ活性解析において、piracetam は PLP1^{A243V} 安定発現 MO3.13 細胞のルシフェラーゼ活性を統計学的有意に減少：小胞体ストレスを減少させた (student-t test)。また、benserazide も小胞体ストレスを減少させる傾向を示したが、統計学的有意差はなかった (図 5 A)。そのため、この先の解析は piracetam につき行った。



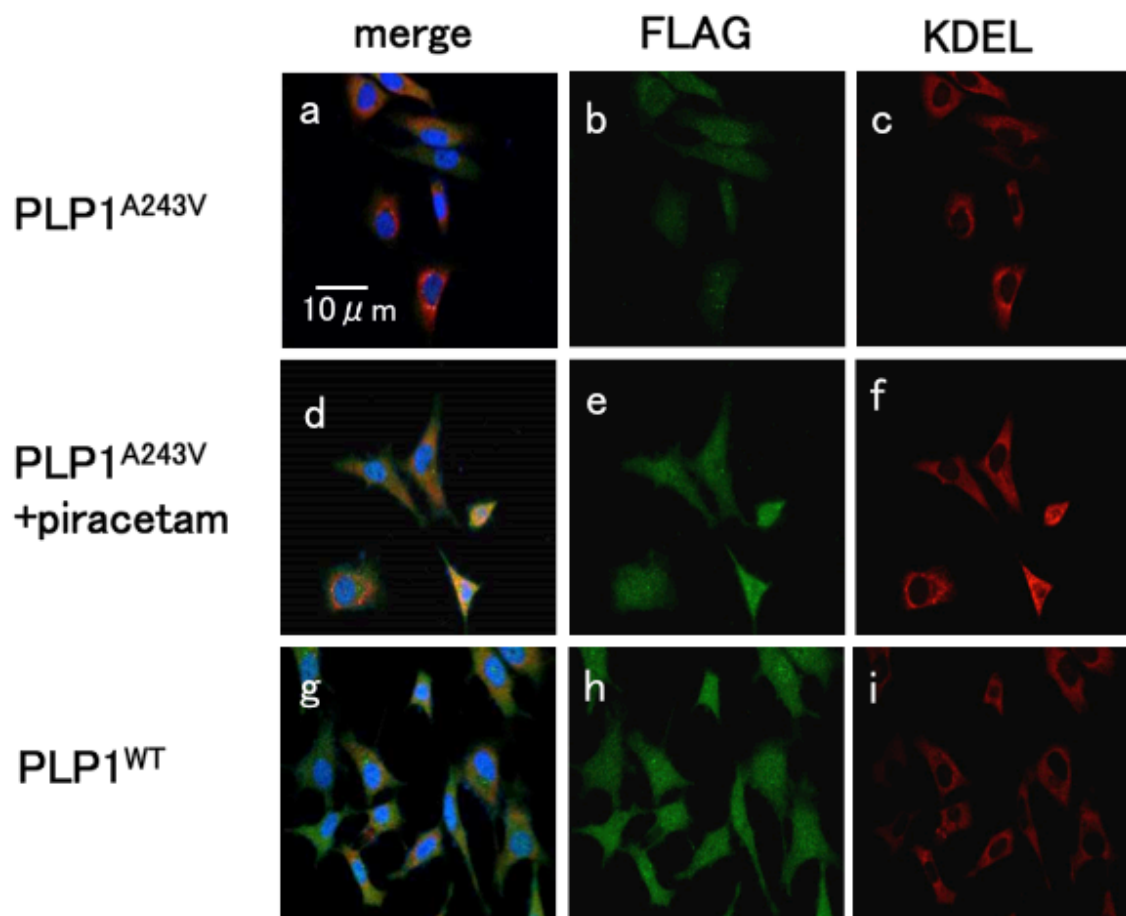
<図 5 A> piracetam および benserazide による小胞体ストレスの変化

PLP1^{Wt} および PLP1^{A243V} 蛋白を安定発現させた MO3.13 細胞、また PLP1^{A243V} 蛋白を安定発現させた MO3.13 細胞に piracetam 及び benserazide を加えた際のルシフェラーゼ活性：小胞体ストレスの変化を示す。CPS は *XPB1* 遺伝子スプライシングによって生じたルシフェラーゼ活性の指標である。piracetam は小胞体ストレス活性を統計学的有意に減少させた (P=0.04)。また、benserazide も小胞体ストレスを減少させる傾

向がみられたが、統計学的有意差はなかった ($P=0.22$)。* $P<0.05$. # $P=0.22$, student-t test

3.5 PLP1^{A243V} と小胞体の共染色による piracetam の効果検証

piracetam による PLP1^{A243V} の細胞内局在の改善を画像で検証する目的で、PLP1^{A243V}-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^{A243V}-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^{A243V}-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^{A243V}-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^{A243V} 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 B> piracetam による PLP1^{A243V}-FLAG の局在変化

PLP1^{A243V}-FLAG を安定発現させた MO3.13 細胞、これに piracetam を 10 μ M で添加し 24 時間経過した細胞、及び PLP1^{WT}-FLAG を安定発現させた MO3.13 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^{A243V}-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^{A243V}、d-f: PLP1^{A243V} with piracetam、g-i: PLP1^{WT}

3.6 マイクロアレイによる遺伝子発現解析結果

piracetam を加えた際の、PLP1^{A243V} 発現 MO3.13 細胞における遺伝子発現の変化を調べる目的で、RNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。始めに、PLP1^{WT} 安定発現 MO3.13 細胞と PLP1^{A243V} 安定発現 MO3.13 細胞における遺伝子発現を、発現強度の log 2 比を用いて比較した (表 2; log2=4 であ

れば 16 倍の上昇、 $\log_2=-4$ であれば 1/16 の減少に相当する) (表 2)。次に、PLP1^{A243V} 安定発現 MO3.13 細胞に piracetam (10 μ M) を添加した際の遺伝子発現を、添加しない細胞と比較した (表 3)。結果、PLP1^{A243V} 変異において発現低下がみられた遺伝子の多くが、piracetam によって発現増加した (表 3、左、下線部)。一方で、PLP1^{A243V} 変異によって発現上昇がみられた遺伝子のいくつかは、piracetam によって発現減少した (表 3、右、下線部)。すなわち、PLP1^{WT} と比較した PLP1^{A243V} における遺伝子発現の動きを逆転させる遺伝子変化が piracetam によってもたらされ、このような変化は piracetam によって変動した遺伝子 3890 種中 1549 種 (39%) にみられた。また、IPA では piracetam によって発現上昇した遺伝子群、あるいは発現低下した遺伝子群が、その発現変化に有意に寄与したパスウェイ上位 5 つを抽出した (表 4)。

Lower amount genes		Higher amount genes	
Gene symbol	Log2 ratio	Gene symbol	Log2 ratio
<i>CXCL14</i>	-8.42	<i>MGST1</i>	9.18
<i>TSPAN11</i>	-8.38	<i>AGMO</i>	7.35
<i>PCDHB5</i>	-7.72	<i>BST2</i>	6.90
<i>CAPN6</i>	-7.55	<i>TLR4</i>	6.42
<i>RNF182</i>	-7.36	<i>TM4SF1</i>	6.36
<i>CPE</i>	-7.35	<i>SLC15A3</i>	5.81
<i>B3GNT5</i>	-7.29	<i>SDPR</i>	5.68
<i>NELL2</i>	-7.14	<i>MILR1</i>	5.53
<i>FRAS1</i>	-7.11	<i>SERPINB9</i>	5.47
<i>HENMT1</i>	-6.91	<i>ECSCR</i>	5.44
<i>LAMA1</i>	-6.85	<i>MT1H</i>	5.38
<i>HOXD-AS2</i>	-6.82	<i>SEPP1</i>	5.34
<i>RASEF</i>	-6.61	<i>CD69</i>	5.24
<i>HOXD8</i>	-6.61	<i>NTNG2</i>	5.21
<i>SETBP1</i>	-6.57	<i>SLC7A8</i>	5.18
<i>DCN</i>	-6.56	<i>DDO</i>	5.07
<i>TRIM58</i>	-6.55	<i>INSL5</i>	5.02
<i>PCSK1</i>	-6.50	<i>WSCD2</i>	5.00
<i>SLIT2</i>	-6.50	<i>HTT-AS</i>	4.99
<i>ANKRD35</i>	-6.38	<i>PMP2</i>	4.93

＜表 2＞ PLP1^{A243V} 安定発現 MO3.13 細胞における発現遺伝子で、PLP1^{WT} と比較して発現量が少ない、あるいは発現量が多い上位 20 種の遺伝子を示す。左側が発現量の少ない遺伝子群、右側が発現量の多い遺伝子群である。

Decreased genes		Increased genes	
Gene symbol	Log2 ratio	Gene symbol	Log2 ratio
<u>MT1H</u>	-5.51	<i>SOX1</i>	4.94
<u>CD69</u>	-5.39	<i>HIGD2B</i>	4.84
<u>NAV2-AS5</u>	-5.18	<i>PSMA8</i>	4.74
<u>INSL5</u>	-5.15	<i>CABP2</i>	4.70
<u>WSCD2</u>	-5.08	<u>SPARCL1</u>	4.59
<u>KIF19</u>	-5.00	<i>TSPAN8</i>	4.56
<i>TNMD</i>	-4.98	<u>GRIA3</u>	4.53
<u>DKFZP434A062</u>	-4.78	<i>RTP2</i>	4.53
<u>DNAJB5-AS1</u>	-4.60	<i>MMP26</i>	4.45
<i>HOTAIR</i>	-4.60	<i>PDZK1IP1</i>	4.43
<u>F13A1</u>	-4.57	<i>PLA2G12B</i>	4.39
<u>RNF222</u>	-4.56	<i>SNORA35</i>	4.36
<u>OR10J1</u>	-4.51	<i>DNMBP-AS1</i>	4.30
<u>GPR45</u>	-4.48	<i>MIR7515HG</i>	4.21
<u>SPATA13-AS1</u>	-4.38	<i>CRP</i>	4.13
<u>DNASE1</u>	-4.34	<i>PLA2G10</i>	4.11
<u>TSRM</u>	-4.32	<i>HLA-DRB6</i>	4.10
<u>RBM3AP</u>	-4.29	<i>AADACL3</i>	4.10
<u>SPOPL</u>	-4.29	<u>MUC19</u>	4.10
<u>OR5P3</u>	-4.24	<i>SERPINC1</i>	4.04

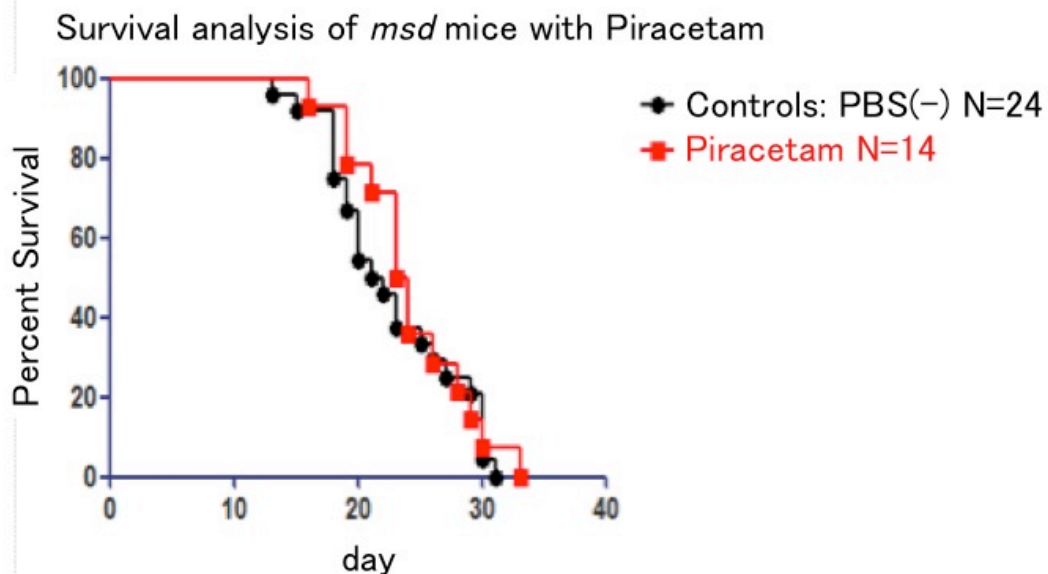
<表 3> PLP1A^{243V} 安定発現 MO3.13 細胞において、piracetam を加えた場合に発現増加、あるいは発現減少した上位 20 種の遺伝子を示す。左側が増加を示した遺伝子群、右側が減少を示した遺伝子群である。下線を引いた遺伝子は、PLP1^{WT} と比較した PLP1A^{243V}における遺伝子発現の差異と逆方向に増加あるいは減少を示した遺伝子である。

Decreased group	Increased group
Asparagine Degradation (0.01)	Phospholipases (0.003)
Alanine Degradation (0.01)	Polyamine Regulation in Colon Cancer (0.005)
Alanine Biosynthesis (0.01)	Synaptic Long Term Depression (0.009)
Coagulation System (0.01)	Macrophage migration inhibitory factor (MIF)- mediated Glucocorticoid Regulation (0.01)
Proline Degradation (0.01)	Antioxidant Action of Vitamin C (0.01)

<表 4> Ingenuity Pathways Analysis (IPA) において、piracetam による発現増加遺伝子、及び発現減少遺伝子が発現に寄与するパスウェイのそれぞれ上位 5 つを示す。ここでの発現増加遺伝子、及び減少遺伝子とは、piracetam によって発現が 2 倍以上あるいは 1/2 以下に変化した遺伝子である。()内の数値は、発現変化を示した遺伝子が、パスウェイの発現変化に対する寄与度において control との比較で得られた P 値である (IPA software, version 44691306, QIAGEN N.V. で算出)。

3.7 piracetam 投与による *msd* マウスの生存解析

piracetam によって *msd* マウスの生存期間に改善が得られるか検証した。*msd* マウスの生存解析結果を示す (図 6)。結果、piracetam 投与群とコントロール群で生存期間に統計学的な有意差はなかった。平均生存期間は、投与群で 23.5 日、コントロール群で 21.5 日 (P=0.38, Gehan-Breslow-Wilcoxin test) だった。



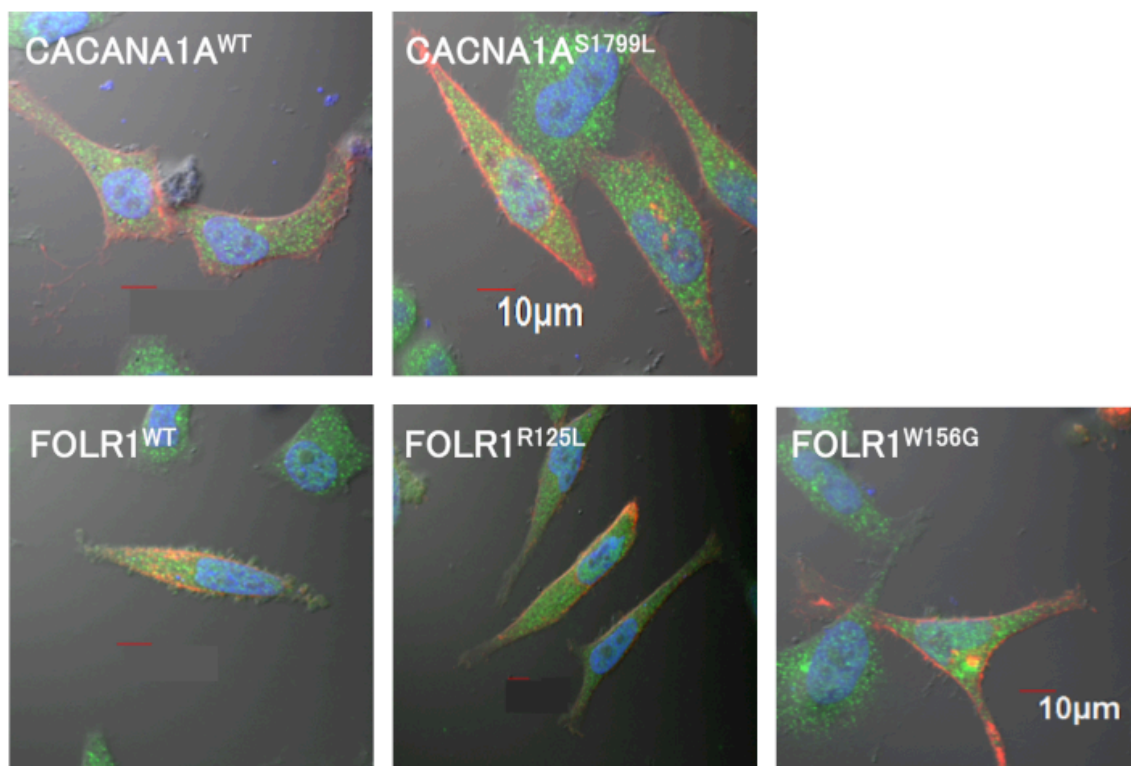
<図 6> piracetam による *msd* マウスに対する生存解析

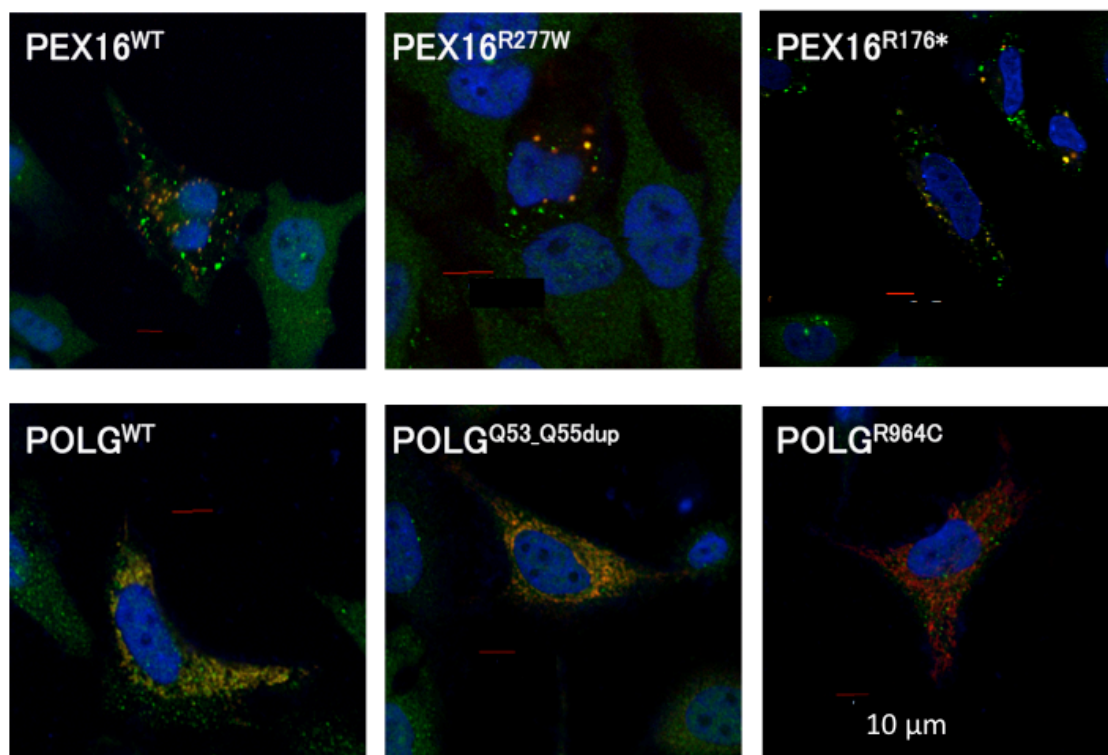
piracetam を投与した *msd* マウスの生存解析結果を示した。piracetam 投与群 (N=14) とコントロール群 (N=24) との間に、生存期間の統計学的な有意差はなかった ($P=0.38$, Gehan-Breslow-Wilcoxon test)。平均生存期間は、投与群で 23.5 日、コントロール群で 21.5 日だった。

3.8 CACNA1A、FOLR1、PEX16、POLG の蛋白局在の比較

FLAG 配列を付加した正常型プラスミド 4 種 (pCACNA1A^{WT}、pFOLR1^{WT}、pPEX16^{WT}、pPOLG^{WT}-FLAG)、及び変異型プラスミド 7 種 (pCACNA1A^{S1799L}、pFOLE1^{R125L}、pFOLR1^{W156G}、pPEX16^{R227W}、pPEX16^{R176*}、pPOLG^{Q53_Q55dup}、pPOLG^{R964C}-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、

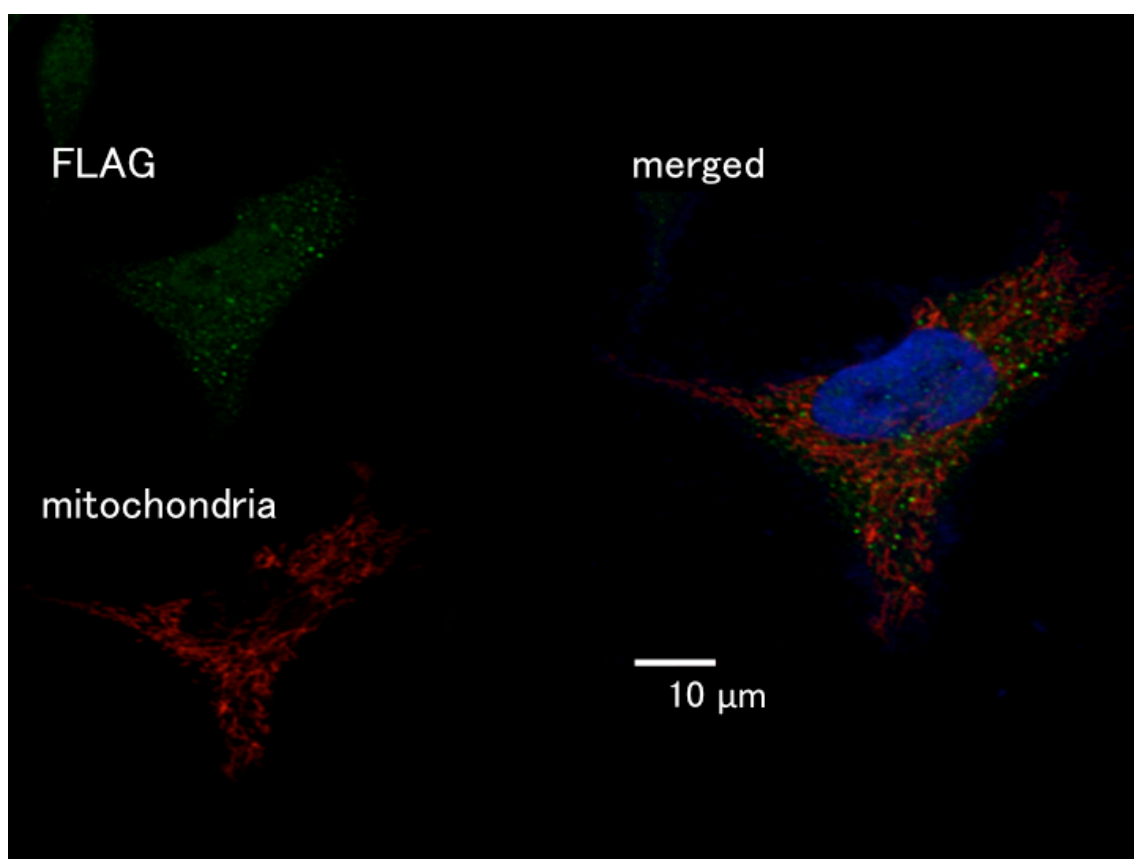
pDsRed-Monomer-Mem-vector , Takara Bio USA Inc., PEX16 : ペルオキシソーム、peroxisomal membrane protein 2-RFP , Origene Techonologies Inc., POLG : ミトコンドリア、pDsRed-Mito vector , Takara Bio USA Inc.) と共に発現させた HELA 細胞の画像を示す (図 7 A)。殆どのプラスミドは、FLAG (緑色) と局在マーカー (赤色) が重なって観察され、正常型と変異型の局在差異がなかったが、POLG において、POLG^{R964C} は、正常型および pPOLG^{Q53-Q55dup} 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 7B)。





<図 7A> 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^{WT}、pFOLR1^{WT}、pPEX16^{WT}、pPOLG^{WT}-FLAG）、及び変異型プラスミド 7 種（pCACNA1A^{S1799L}、pFOLR1^{R125L}、pFOLR1^{W156G}、pPEX16^{R227W}、pPEX16^{R176*}、pPOLG^{Q53_Q55dup}、pPOLG^{R964C}-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 7B＞ R964C 変異における FLAG とミトコンドリアマーカの局在
POLG の R964C 変異では、POLG^{R964C} 蛋白の局在を反映する FLAG（緑色）とミトコンドリアマーカ（赤色）の局在に乖離がみられた。

4. 考察

4. 1 本研究の成果

現在、PMD に対しては、UPR を減少させる化合物のスクリーニングによる治療研究が進められている [40]。われわれは今回、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^{A243V} 及び PLP1^{W163R} 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。また、脊髄小脳変性症の小児患者から得られた変異遺伝子 4 種 7 変異に対して、蛋白の主要局在と一致する局在マーカを用い

て正常型および変異型蛋白の細胞内局在を比較した結果、ミトコンドリアに主要局在をもつ POLG の R963C 変異において、蛋白と局在マーカーの乖離がみられた。

4. 2 piracetam の薬理作用と PLP1 変異蛋白に対する機序

piracetam は GABA (gamma-Aminobutyric acid)の派生構造物であり、コリン作動性、グルタミン酸作動性を含む伝達システムにおいて、神経伝達の調整、神経保護、抗痙攣作用を有する [38]。臨床上的効果は様々な神経疾患で報告され、皮質ミオクローヌスの薬剤として承認されている [39]。その他、piracetam はリン脂質 2 重膜に作用し、細胞膜の流動性を改善させ、膜融合を減少させる役割（流動特性）があるとの報告がある [40]。加齢脳組織では、飽和脂肪酸の増加によってコレステロール/リン脂質比が上昇した結果、細胞膜の流動性 (fluidity) が低下しており [41]、加齢マウスに piracetam を長期投与すると、もともと低下していた細胞膜の流動性が改善した [42]。変異 PLP1 を有する細胞では、変異 PLP1 蛋白に結合したコレステロールが蓄積した結果、小胞体およびゴルジ体の膜における流動性の低下が予想される。以上により、piracetam は流動性の改善により、PLP1 変異蛋白の細胞膜への輸送の改善と、小胞体関連分解の抑制効果を示した可能性があると考えられた。

遺伝子発現レベルでは、piracetam は正常型から PLP1^{A243V} への変化に伴う遺伝子発現変化を逆転させる遺伝子変化（特に、変異によって発現増加を示した遺伝子に対して）を示した（表 3）。特に、変異によって発現増加する遺伝子を

抑制する方向に発現変化をきたし、これらは変異蛋白による、局在変化や小胞体ストレスへの抑制効果をもたらした可能性がある。IPA では、piracetam によって発現が変化した経路のいくつかは、小胞体ストレスに関連していた (表 4)。

第一に、piracetam はプロリン分解経路の活性を下げたことから、結果として細胞内プロリンの増加をもたらすと考えられた。遺伝学的にプロリン合成能が喪失した場合、小胞体ストレス活性に対する耐性低下を示し、プロリンが小胞体ストレス下における細胞内の酸化還元環境の維持に重要な役割を担うことが報告されている [43]。第二に、細胞質ホスホリパーゼ A2 α が小胞体ストレス誘導の調整機能を有するという報告があり [44]、piracetam によって活性が上昇したホスホリパーゼ経路も小胞体ストレス調節に関わると考えられる。第三に、piracetam によってビタミン C による抗酸化作用経路の活性が増加した。ビタミン C は、IRE1 α 関連の小胞体ストレスを阻害することでカドミウムに侵されたマウス生殖細胞のアポトーシスを減少させたことが報告されている [45]。以上より piracetam による小胞体ストレスの軽減にはこれらの経路が関係している可能性がある。

4.3 PLP1 の変異型による細胞内局在と小胞体ストレスの関連

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 [35、37]、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 [46]。変異型 PLP1 のうち、

重症型を示す PLP1^{A243V} 蛋白は小胞体に蓄積し、強い UPR を引き起こす [35]。また、この変異は代謝回転が遅く、小胞体ストレスに加えて小胞体シャペロンの持続的な輸送障害を起こすことが報告されている [36]。一方で、軽症型変異である PLP1^{I187T}、PLP1^{W163L} は、蛋白構造不全も軽微でより広い範囲に蛋白が分布し惹起される小胞体ストレスが軽度である [26]。これが今回、piracetam による細胞内局在の有意な改善が軽症型変異で得られなかったことに関連すると考えられた。

小児期発症の脊髄小脳変性症の原因蛋白の検討では、POLG の R964C 変異で蛋白とミトコンドリアマーカに局在の乖離がみられたことから、変異によるミトコンドリアへの蛋白輸送障害が示唆された。遺伝子変異による蛋白局在の変化は病原性を示す根拠の一つであり [47]、R964C 変異の病原性を裏付けるとともに、この蛋白局在の変化を指標にした薬剤スクリーニングが可能と考えられた。このように、局在変化により病原性を証明でき、それを利用して薬剤スクリーニングが適応可能な遺伝子変異は、PMD のみならず遺伝性神経疾患において相当数存在すると考えられる。

4.4 本研究の制約と利点

本研究の制約の一つとして、スクリーニング解析に EGFP 融合蛋白を用いたことが挙げられる。上述したように、EGFP 融合蛋白は本来の蛋白と異なる挙動を示す可能性がある [31]。今回は薬剤添加前後の評価から、未固定細胞における蛋白発現のライブイメージングでの比較が必要であり、EGFP の融合蛋白を

用いた。しかし、分子量が少なく、蛋白の挙動に影響が少ないと考えられる FLAG 付加蛋白を用いた解析においても、EGFP を用いたスクリーニングで得られた piracetam は PLP1^{A243V} 蛋白の局在改善を示した。モデルマウスを用いた生存解析では、piracetam は生存期間の改善を示すことはできなかったが、piracetam の投与による神経学的所見および脳の組織学的評価、また piracetam が標的とする分子の解明や、piracetam の誘導体化によって PMD へ有効な効果を示すことが期待できると考えられる。第二に、本研究で扱った PLP1 の変異蛋白は多くのうちの数種類のみであった。また null mutation、重複といった他の病因に対しては、薬剤スクリーニングにおいて異なる方法が必要である。例えば重複変異については、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 及び MAP kinase 1/2 (MEK1/2) を含むパスウェイを阻害することにより、PLP1 遺伝子の過剰発現によるミエリン分化異常の改善が得られるかも知れない [48]。本研究の利点としては、PLP1 蛋白の解析にオリゴデンドロサイト由来の MO3.13 細胞を用いたことである。ヒトの研究においては患者脳組織のオリゴデンドロサイトを用いることは困難であるが [49]、MO3.13 細胞は PMD において主な病態の場であるオリゴデンドロサイトの生態を反映すると考えられる。

5. おわりに

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 に対する薬剤スクリーニングを行った。結果、PLP1^{A243V} 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^{A243V} 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^{R964C} 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。

6. 参考文献

- [1]. Quan Li, Kai Wang. InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *Am J Hum Genet.* 100:267-280, 2017
- [2]. Swanton E, Holland A, High S, Woodman P. Disease-associated mutations cause premature oligomerization of myelin proteolipid protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 102: 4342-7, 2005.
- [3]. Klugmann M, Schwab MH, Pühlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, Nave KA. Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* 18: 59-70, 1997.
- [4]. Kitagawa K, Sinoway MP, Yang C, Gould RM, Colman DR. A proteolipid protein gene family: expression in sharks and rays and possible evolution from an ancestral gene encoding a pore-forming polypeptide. *Neuron* 11: 433-48, 1993.
- [5]. Yan Y, Lagenaur C, Narayanan V. Molecular cloning of M6: identification of a PLP/DM20 gene family. *Neuron* 11: 423-31, 1993.
- [6]. Eng LF, Chao FC, Gerstl B, Pratt D, Tavaststjerna MG. The maturation of human white matter myelin. Fractionation of the myelin membrane proteins. *Biochemistry* 7: 4455-65, 1968.
- [7]. Simons M, Kramer EM, Thiele C, Stoffel W, Trotter J. Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J Cell Biol.* 151: 143-54, 2000.
- [8]. Garbern JY. Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 64: 50-65, 2007.
- [9]. Woodward KJ. The molecular and cellular defects underlying Pelizaeus-Merzbacher disease. *Expert Rev Mol Med.* 10: e14, 2008.

- [10]. Wight PA, Dobretsova A. Where, when and how much: regulation of myelin proteolipid protein gene expression. *Cell Mol Life Sci.* 61: 810-21, 2004.
- [11]. Inoue K. PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. *Neurogenetics* 6: 1-16, 2005.
- [12]. Garbern JY. Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 64: 50-65, 2007.
- [13]. Willard HF, Riordan JR. Assignment of the gene for myelin proteolipid protein to the X chromosome: implications for X-linked myelin disorders. *Science* 230: 940-2, 1985.
- [14]. Simons M, Kramer EM, Macchi P, Rathke-Hartlieb S, Trotter J, Nave KA, Schulz JB. Overexpression of the myelin proteolipid protein leads to accumulation of cholesterol and proteolipid protein in endosomes/lysosomes: implications for Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Cell Biol.* 157: 327-36, 2002.
- [15]. Karim SA, Barrie JA, McCulloch MC, Montague P, Edgar JM, Iden DL, Anderson TJ, Nave KA, Griffiths IR, McLaughlin M. PLP/DM20 expression and turnover in a transgenic mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Glia* 58: 1727-38, 2010.
- [16]. Karim SA, Barrie JA, McCulloch MC, Montague P, Edgar JM, Kirkham D, Anderson TJ, Nave KA, Griffiths IR, McLaughlin M. PLP overexpression perturbs myelin protein composition and myelination in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Glia* 55: 341-51, 2007.
- [17]. Garbern JY, Cambi F, Tang XM, Sima AA, Vallat JM, Bosch EP, Lewis R, Shy M, Sohi J, Kraft G, Chen KL, Joshi I, Leonard DG, Johnson W, Raskind W, Dlouhy SR, Pratt V, Hodes ME, Bird T, Kamholz J. Proteolipid protein is necessary in peripheral as well as central myelin. *Neuron* 19: 205-18, 1997.
- [18]. Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. A review of the mammalian

- unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng.* 108:2777-93, 2011
- [19]. Inoue K. Cellular Pathology of Pelizaeus-Merzbacher Disease Involving Chaperones Associated with Endoplasmic Reticulum Stress. *Front Mol Biosci.* 4:7, 2017.
- [20]. Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. Involvement of ER stress in dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1 missense mutations shown by iPSC-derived oligodendrocytes. *Stem Cell Reports* 2: 648-61, 2014.
- [21]. Ohba C, Osaka H, Iai M, Yamashita S, Suzuki Y, Aida N, Shimozawa N, Takamura A, Doi H, Tomita-Katsumoto A, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Eto Y, Tanaka F, Matsumoto N, Saitsu H. Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood. *Neurogenetics.* 14: 225-32, 2013
- [22]. Damaj L, Lupien-Meilleur A, Lortie A, Riou É, Ospina LH, Gagnon L, Vanasse C, Rossignol E. CACNA1A haploinsufficiency causes cognitive impairment, autism and epileptic encephalopathy with mild cerebellar symptoms. *Eur J Hum Genet.* 23:1505-12, 2015
- [23]. Grapp M, Just IA, Linnankivi T, Wolf P, Lücke T, Häusler M, Gärtner J, Steinfeld R. Molecular characterization of folate receptor 1 mutations delineates cerebral folate transport deficiency. *Brain.*135:2022-31, 2012
- [24]. Honsho M, Tamura S, Shimozawa N, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki Y. Mutation in PEX16 is causal in the peroxisome-deficient Zellweger syndrome of complementation group D. *Am J Hum Genet.* 63: 1622-30, 1998.
- [25]. Yamanaka H, Gatanaga H, Kosalaraksa P, Matsuoka-Aizawa S, Takahashi T, Kimura S, Oka S. Novel mutation of human DNA

- polymerase gamma associated with mitochondrial toxicity induced by anti-HIV treatment. *J Infect Dis.* 195:1419-25, 2007
- [26]. Koizume S, Takizawa S, Fujita K, Aida N, Yamashita S, Miyagi Y, Osaka H. Aberrant trafficking of a proteolipid protein in a mild Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neuroscience* 141: 1861-9, 2006.
- [27]. Yamamoto T, Shimojima K. Pelizaeus-Merzbacher disease as a chromosomal disorder. *Congenit Anom. (Kyoto)* 53: 3-8, 2013.
- [28]. Siles SA, Srinivasan A, Pierce CG, Lopez-Ribot JL, Ramasubramanian AK. High-throughput screening of a collection of known pharmacologically active small compounds for identification of *Candida albicans* biofilm inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 3681-7, 2013.
- [29]. Anderl JL, Redpath S, Ball AJ. A neuronal and astrocyte co-culture assay for high content analysis of neurotoxicity. *J Vis Exp.* 5, pii: 1173, 2009.
- [30]. Iwawaki T, Akai R, Yamanaka S, Kohno K. Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 106: 16657-62, 2009.
- [31]. Baens M, Noels H, Broeckx V, Hagens S, Fevery S, Billiau AD, Vankelecom H, Marynen P. The dark side of EGFP: defective polyubiquitination. *PLoS One* 1: e54, 2006.
- [32]. Keil U, Scherping I, Hauptmann S, Schuessel K, Eckert A, Müller WE. Piracetam improves mitochondrial dysfunction following oxidative stress. *Br J Pharmacol.* 147: 199-208, 2006.
- [33]. Abdel Salam OM. Vinpocetine and piracetam exert antinociceptive effect in visceral pain model in mice. *Pharmacol Rep.* 58: 680-91, 2006.
- [34]. Kale PP, Addepalli V, Sarkar A, Patel S, Savai J. The Combination of Antidepressant Duloxetine with Piracetam in Mice does not Produce Enhancement of Nootropic Activity. *Exp Neurobiol.* 23: 224-30, 2014.
- [35]. Roboti P, Swanton E, High S. Differences in endoplasmic-reticulum

- quality control determine the cellular response to disease-associated mutants of proteolipid protein. *J Cell Sci.* 122: 3942-53, 2009.
- [36]. Numata Y, Morimura T, Nakamura S, et al. Depletion of molecular chaperones from the endoplasmic reticulum and fragmentation of the Golgi apparatus associated with pathogenesis in Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Biol Chem.* 288: 7451-66, 2013.
- [37]. Osaka H, Inoue K. Pathophysiology and emerging therapeutic strategies in Pelizaeus–Merzbacher disease. *Expert Opinion on Orphan Drugs* 3: 1447-59, 2015. Winblad B. Piracetam: a review of pharmacological properties and clinical uses. *CNS Drug Rev.* 11:169-82, 2005.
- [38]. Brown P, Steiger MJ, Thompson PD, Rothwell JC, Day BL, Salama M, Waegemans T, Marsden CD. Effectiveness of piracetam in cortical myoclonus. *Mov Disord.* 8:63-8, 1993.
- [39]. Müller WE, Eckert GP, Eckert A. Piracetam: novelty in a unique mode of action. *Pharmacopsychiatry.* 32:2-9, 1999.
- [40]. Winnicka K, Tomasiak M, Bielawska A. Piracetam-an old drug with novel properties? *Acta Pol Pharm* 62:405-9, 2005.
- [41]. Müller WE, Koch S, Scheuer K, Rostock A, Bartsch R. Effects of piracetam on membrane fluidity in the aged mouse, rat, and human brain. *Biochem Pharmacol* 53:135-40, 1997. Liang X, Dickman MB, Becker DF. Proline biosynthesis is required for endoplasmic reticulum stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 289: 27794-806, 2014.
- [42]. Ren G, Takano T, Papillon J, Cybulsky AV. Cytosolic phospholipase A (2)-alpha enhances induction of endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta.* 1803: 468-81, 2010.
- [43]. Ji YL, Wang Z, Wang H, Zhang C, Zhang Y, Zhao M, Chen YH, Meng XH, Xu DX. Ascorbic acid protects against cadmium-induced endoplasmic reticulum stress and germ cell apoptosis in testes. *Reprod*

Toxicol. 34: 357-63, 2012.

- [44]. Gow A, Sharma R. The unfolded protein response in protein aggregating diseases. Neuromolecular Med. 4: 73-94, 2003.
- [45]. Quan Li, Kai Wang. InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. Am J Hum Genet. 100: 267-280, 2017.
- [46]. Torii T, Miyamoto Y, Yamauchi J, Tanoue A. Pelizaeus-Merzbacher disease: cellular pathogenesis and pharmacologic therapy. Pediatr Int. 56: 659-66, 2014.
- [47]. Nevin ZS, Factor DC, Karl RT, Douvaras P, Laukka J, Windrem MS, Goldman SA, Fossati V, Hobson GM, Tesar PJ. Modeling the Mutational and Phenotypic Landscapes of Pelizaeus-Merzbacher Disease with Human iPSC-Derived Oligodendrocytes. Am J Hum Genet. 100: 617-34, 2017.

7. 謝辞

本研究の遂行、論文作成にあたり自治医科大学小児科学教授 小坂 仁先生、小児科学教授 山形崇倫先生、小児科学講師 神保恵理子先生にご指導いただきました。また、小児科学研究補助員 青木志保様には研究全般を補助していただきました。

msd マウスの実験にあたっては、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 井上 健先生にご尽力いただきました。

多くの先生方にご指導ご尽力いただき、本研究が遂行できたことを、ここに感謝申し上げます。

本研究の一部は、平成 29 年度自治医科大学大学院若手スタートアップ研究費および平成 30 年度自治医科大学大学院研究奨励賞により遂行しました。