

氏 名	甲 賀 健 史
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 564 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	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 審 査 委 員	(委員長) 教 授 今 井 靖 (委 員) 教 授 興 水 崇 鏡 准教授 森 田 光 哉

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

小児期の遺伝性疾患には、アミノ酸変異により蛋白構造不全（折れたたみ不全）が生じ、生成蛋白が細胞膜を含めた細胞内小器官に到達できないために発症する疾患が存在する。変異がペリツェウス・メルツバッハ病（PMD）の原因となり、主に細胞膜に局在する proteolipid protein 1（*PLP1*）について、正常型と変異型とで蛋白発現量および細胞内局在の変化を指標とした薬剤のスクリーニングを行うこと、および脊髄小脳変性症（小脳失調）を有する 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た遺伝子のうち、主に細胞膜に局在する Ca channel:  $\alpha$ -1A subunit（*CACNA1A*）、folate receptor family 1（*FOLR1*）、ペルオキシソームに局在する peroxisome biogenesis factor 16（*PEX16*）、およびミトコンドリアに局在する catalytic subunit of mt. DNA polymerase（*POLG*）の 4 種について、薬剤スクリーニングへの応用可能性について検証することを目的とする。

### 2 研究方法

*PLP1* については、緑色蛍光蛋白（EGFP）を融合した *PLP1* の正常型及び変異型（A243V 変異、重症型）プラスミドを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、安定細胞株を樹立した。これらに、神経疾患の治療薬として認可されている 275 種類の薬剤をそれぞれ添加し、細胞全体の EGFP 蛍光強度を増加させる薬剤を抽出した。次に蛋白の細胞内局在変化の解析として、これらの薬剤が細胞膜における EGFP 蛍光強度を増加させるか、共焦点レーザー顕微鏡の画像を用いた解析を行った。この解析は、他の変異型（W163R：重症型、I187T、W163L：軽症型）についても行った。2 段階の解析で抽出された薬剤に対し、薬剤添加による小胞体ストレスの変化及びマイクロレイ解析を用いた細胞内遺伝子発現の変化を解析した。また、A243V 変異の疾患モデルマウスである *msd* マウスを用いて、候補薬剤の投与による生存解析を行った。また、脊髄小脳変性症（小脳失調）を有する患者において変異を認めた遺伝子のうち、*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）について、FLAG 配列を付加した正常型および変異型プラスミドを、それぞれの局在マーカーと同時にヒト子宮頸部癌細胞由来の HELA 細胞にトランスフェクションさせた。それぞれの画像を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて

撮影し、正常型と変異型において細胞内局在に差異が生じるかを検証した。

### 3 研究成果

PLP1 の A243V 変異について、蛋白の発現量および細胞内局在の改善を示した薬剤を 2 種類 (piracetam と benserazide) 抽出した。これらの薬剤は、W163R 変異に対しても蛋白の細胞内局在を改善させた。更に、piracetam は小胞体ストレスの軽減を示したため、piracetam による遺伝子発現の変化を調べる目的で行ったマイクロアレイ解析では、A243V 変異で現れる遺伝子発現の変化を補う働きを認めた。更に、piracetam によって発現が変化する遺伝子群が寄与する代謝パスウェイを調べたところ、そのいくつかは小胞体ストレスの軽減に関与していた。脊髄小脳変性症の遺伝子については、殆どのプラスミドは、FLAG で標識した蛋白と細胞内局在マーカーが重なって観察され、正常型と変異型の差異がなかったが、POLG<sup>R964C</sup>-FLAG については、FLAG と細胞内局在マーカーに乖離がみられた。

### 4 考察

PLP1 の薬剤スクリーニングで得られた piracetam は皮質ミオクローヌスに対する治療薬として複数の国で承認されている。piracetam は脂質に関わる流動特性を有し、小胞体やゴルジ体などの膜リン脂質の流動性を変化させることが考えられた。また piracetam は正常型と比較して A243V 変異によって増加する遺伝子発現を抑制することが示唆された。また、piracetam は小胞体ストレスの軽減作用を認めたことから、蛋白の局在改善と小胞体ストレス軽減の関連が示唆された。本研究で扱った PLP1 の変異蛋白は多くのうちの数種類であり、アミノ酸変異以外にも null mutation、重複等の病因があり、異なるスクリーニング方法の開発が必要である。また、POLG の R964C 変異では蛋白と細胞内局在マーカーに乖離がみられたことから、変異による蛋白輸送障害が示唆された。

### 5 結論

変異蛋白の発現量、および細胞内局在の変化に着目した薬剤スクリーニングによって、PLP1 の重症型変異である PLP1<sup>A243V</sup> に対する治療薬の候補となる piracetam を見出した。今回用いたスクリーニング方法は、変異蛋白の細胞内局在変化が病態に関連する他の疾患にも応用できると考えられた。また、ミトコンドリアマーカー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。

## 論文審査の結果の要旨

甲賀氏は小児神経難病に焦点を当てその治療薬を探索する細胞実験系を確立することを目指し多面的に研究を進めてこられた。

氏はペリツェウス・メルツバッハ病に関して原因遺伝子である PLP-1 のミスセンス変異に着目、変異により蛋白の折りたたみ不全を生じると考えられるが、PLP 遺伝子の野生型あるいは変異型遺伝子の tag 蛋白を接続した融合蛋白を発現させるベクターを作成しヒトオリゴデンドロサイト

由来 MO3.13 細胞に導入、PLP 蛋白の細胞内局在について解析し野生型・変異型に相違が生じることを確認した上で 275 種類の薬剤ライブラリーを添加することにより変異型遺伝子を導入した場合の PLP-1 蛋白の細胞内分布を改善するものをスクリーニングし、有効な候補薬として piracetam および benserazide を選出した。特に前者に注目しその薬剤投与を実施、細胞内局在の改善、小胞体ストレスの軽減、網羅的遺伝子発現解析における複数の遺伝子についてその発現様式を変異型から野生型に近づけることを示している。in vivo の検証として本疾患のモデルマウスに piracetam を投与、残念ながら生存率改善効果が得られていなかったとのことであるが、今後神経学的所見および神経病理の解析が将来追加されることが期待される。

後半、関連するプロジェクトとして脊髄小脳変性症を呈した小児のける全エクソーム解析で検出された遺伝子変異について、その遺伝子変異導入しかつ tag 蛋白との融合蛋白を作成するための発現ベクターを作成し細胞に導入、その中で POLG R964C 変異では正常型と変異型で細胞内局在に相違が生じることを示しており、これも上述の疾患と同様に治療薬スクリーニングに応用出来る可能性が考えられると報告した。

神経難病で治療法が未確立でありその新たな治療法の確立が急務であるが、その薬剤スクリーニング法が殆どなく、そのアッセイ系を確立することの意義は大変大きく、今後稀少難病への新しいアプローチ法になりうると考える。その点で氏の研究は新規性・独創性に富み、かつ科学的価値が非常に高いものと考え。博士論文として合格に値する素晴らしい研究であると判断するが、審査の過程で取り上げられたポイントについて加筆または修正を検討して頂きたい。

以下それを掲げる。

#### 指摘事項

- 1 細胞に遺伝子導入を行って共焦点蛍光顕微鏡により取得した代表的画像が多く提示されているが、複数回たとえば duplicate, triplicate という具合に実験を実施した上での代表的な画像のみの提示となっている。提示されているデータにおいて複数実験を行ったとすれば数や回数といった情報の記載、および代表的なデータについては、可能であれば代表画像のみならず定量的なデータを示す表またはグラフを示して頂きたい。
- 2 p26 に示す図表について蛍光画像のみが出されているが蛍光強度の観点から明視野の写真を付すことで細胞の形態を示し、それを見ながら蛍光画像を把握することが出来るためデータの提示について工夫を頂きたい。
- 3 プラスミドベクターを作成する際に遺伝子配列などを確認する作業が行われている筈であり、その行った手順について論文の中に追記すること。またベクター名などの記載に誤記があり修正を行うこと。
- 4 分子シャペロンを開発するための手法構築ということであるが分子シャペロンについての表現について現段階での研究での到達度に従い表現を修正すること。
- 5 マウスでの実験は in vitro での細胞実験で得られた成果を in vivo で確認する大変重要な実験であり今回は生存曲線の解析のみが提示されているが、今後、神経学的所見や神経病理についての解析を行う必要があると考えられる。マウスにおける実験で今後評価、検討を行うべき項目について論文の考察に加筆することが望ましい。

加えて、動物実験について自治医科大学に届け出ている動物実験に関する申請、許可番号の記載、および動物実験に関するガイドラインに従って適切に実験が行われたことについて記載

を加えること。

- 6 本論文はペリツェウス・メルツバッハ病に関して原因遺伝子である **PLP-1** に関する研究が根幹をなす一方、後半に記載された脊髄小脳変性症について遺伝子解析で得られた変異を導入しその細胞内局在を評価した研究は今後多くの検討が行われるべき初期段階にあると考えられ、この項目については内容をコンパクトにする方が論文全体の構成が明瞭化されると思われる。

## 最終試験の結果の要旨

甲賀氏は小児神経難病に焦点を当てその治療薬を探索する細胞実験系を確立することを目指し多面的に研究を進められ、その成果を学位論文にまとめられた。審査の折に指摘された事項についても的確に対応されており博士として合格に値すると判断する。