

「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく
診断・治療へ向けた新技術の創出」
平成 21 年度採択研究代表者

平成 21 年度 実績報告

貫名 信行

(独)理化学研究所構造神経病理研究チーム・チームリーダー

ポリグルタミン病の包括的治療法の開発

§ 1. 研究実施の概要

本研究では「神経難病のポリグルタミン(PolyQ)病についてその病態カスケード、すなわち、病因遺伝子産物のミスフォールディング、凝集からその下流で起こる細胞機能障害までを治療ターゲットとし、これらを抑制する方向性の治療とともに、病態カスケードを制御する生体の持つ蛋白質の品質管理、分解過程を利用する治療の実現を目指し、多面的・包括的な治療開発を推進する。このような包括的治療開発によって、まだ具体的に十分な成果が上がっていない細胞内封入体を伴う神経変性疾患の治療開発戦略を確立する。この治療法、治療開発戦略の確立によってポリグルタミン病研究・医療のみならず神経変性疾患研究・医療全般に対して、大きなインパクトをもたらす。」ことをねらいとした。

まだ開始後半年であるが、申請段階から進行していた研究が、CREST 開始によって加速し、シャペロン介在性オートファジーをもちいて異常蛋白質を分解するという新たなコンセプトによる遺伝子治療の開発に成功し、Nat Biotech に報告した。本研究はチーム内の貫名、永井グループの共同研究による成果である。また各グループの研究も順調に進行しており、岡澤グループはポリグルタミン病における DNA 損傷修復障害に関わる Ku70 について J Cell Biol in press であり、勝野グループはポリグルタミン病における新たに見出した TGF- β シグナルの異常について J Neurosci in press である。どちらもポリグルタミン病の治療標的につながる重要な発見であり、今後の治療開発にとってこれらの分子標的が重要であることが明らかとなった。

全体としてまずは順調な出だしであり、このペースを維持し、さらなる展開をめざしたいと考えている。

§ 2. 研究実施体制

(1)「貫名」グループ

① 研究分担グループ長:貫名 信行((独)理化学研究所、チームリーダー)

② 研究項目

異常蛋白質分解制御による治療法開発

- 1) 天然物由来抗ポリグルタミン病薬の解析とその分子標的の同定
- 2) シャペロン介在オートファジー(Chaperone-mediated autophagy:CMA)を用いた異常蛋白質分解促進治療法開発
- 3) p62 をターゲットとした治療法の開発

(2)「永井」グループ

① 研究分担グループ長:永井 義隆 (国立精神・神経センター、室長)

② 研究項目

- 1) ポリグルタミン鎖結合ペプチド QBP1 由来化合物アナログの設計
- 2) ポリグルタミン凝集阻害化合物のスクリーニング

(3)「岡澤」グループ

① 研究分担グループ長:岡澤 均 (東京医科歯科大学、教授)

② 研究項目

- 1) レンチウィルスベクターによる DNA 修復障害治療開発
- 2) DNA 修復蛋白質とポリグルタミン蛋白質との結合による病態の解析

(4)「勝野」グループ

① 研究分担グループ長:勝野 雅央 (名古屋大学、特任講師)

② 研究項目

- 1) ポリグルタミン病に共通する病態因子の探索・同定
- 2) ポリグルタミン病に対するトランスレーショナルリサーチ

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(1)「貫名」グループ

1) 天然物由来抗ポリグルタミン病薬の解析とその分子標的の同定

本年度は天然物由来の抗ポリグルタミン凝集効果のある drug x について R6/2 ハンチントン病モデルを用いた再検討と最適濃度、副作用の検討を行っている。マウスにおける結果が不安定なためその原因を検討中である。In vitro の抗凝集作用機序の検討として分解系の亢進を

引き起こしていることの可能性が強い結果を得ている。分子標的の同定のために可能性のある分子の siRNA による凝集抑制効果を検討している。また、凝集体結合蛋白質から分子標的候補を深索している^{2), 3), 5)}。

2) シャペロン介在オートファジー(Chaperone-mediated autophagy:CMA)を用いた異常蛋白質分解促進治療法開発

QBP1 と Hsc70 結合モチーフの融合ペプチドを発現することにより、伸長ポリグルタミンのシャペロン介在性オートファジーによる分解を引き起こすことを *in vitro*、およびハンチントン病モデルマウス2系統で確認し、Nat Biotech に発表した⁴⁾。今後の展開について予備実験を行っている最中である。

3) P62 をターゲットとした治療法の開発

P62 ノックアウトマウスと R6/2 マウスの掛け合わせの影響を寿命、体重、ロタロッドテストなどで評価し、その脳病理の解析、生化学的解析を行っている。一通りの検討において P62 ノックアウトによって R6/2 の寿命が延長されることを確認しているが、このマウスの検討ではリポート数の変動などの影響が認めることがあるため2回目の検討を行っている。病理学的変化の概要も判明しつつあるが、さらに生化学的検討を行っている。

(2)「永井」グループ

1) ポリグルタミン鎖結合ペプチド QBP1 由来化合物アナログの設計

これまでに QBP1 配列(SNWKWWPGIFD)のアラニン・スキャン体、D アミノ酸・スキャン体、欠失ミュータントなど合計 31 種類の解析から、W3、W5、W6、I9、F10 の 5 アミノ酸がポリグルタミン凝集阻害活性に必須であり、最小活性配列を WKWWPGIF の 8 アミノ酸に絞り込んだ(Tomita et al. Bioorg Med Chem, 2009)。引き続き CREST 開始後、QBP1 配列のさらなる低分子化をめざして、活性必須アミノ酸を含む 5-6 アミノ酸以下の低分子量ペプチドのデザイン・合成を行った。また、これらの QBP1 配列由来低分子ペプチドのより詳細な活性評価のために、より高感度なポリグルタミン凝集評価システムを構築中である。

2) ポリグルタミン凝集阻害化合物のスクリーニング

一方、これまでの大規模スクリーニング(約 46,000 個)により同定した新規抗ポリグルタミン凝集化合物約 100 種類のうち、活性が強かつ入手可能な化合物約 30 種類に絞り込んで、培養細胞、ショウジョウバエモデルを用いた2次・3次スクリーニングに必要な量の化合物を購入した。そして、より簡便な蛍光相関分光(FCS)装置を用いて、細胞内のポリグルタミン蛋白質オリゴマーの迅速評価システムを構築した。

(3)「岡澤」グループ

1) レンチウィルスベクターによる DNA 修復障害治療開発

ターゲットタンパクを適切な脳部位に発現させるウィルスベクターを作成して遺伝子治療を目的としている。ターゲットタンパクである HMGB および Ku70 を発現するためのレンチウィルス

ベクター： pLenti6-Flag-Ku70 (CMV promoter)、pLenti6-Flag-HMGB1 (CMV promoter)、pLentiGsbs-Ku70 (Gsbs promoter)を作成した。さらに、プルキンエ細胞特異的、線条体 medium spiny neuron 特異的に発現するレンチウイルスベクターを作成中である。ウイルスの発現活性を確認の上、22年度から動物モデルでの感染実験を行う。

2) DNA 修復蛋白質とポリグルタミン蛋白質との結合による病態の解析

DNA 修復蛋白質及び関連核蛋白質のポリグルタミン病病態との関連を検討した^{1), 6), 9)}。

一方、ポリグルタミン異常タンパクとターゲットタンパクの結合阻害活性を持つ低分子化合物のスクリーニングを計画していたが、必要な機器の購入は国際入札のため、22年11月ごろに導入される予定である。導入後、機器調整、実験条件確認を行い、スクリーニングを早期に開始したい。

(4)「勝野」グループ

1) ポリグルタミン病に共通する病態因子の探索・同定

ポリグルタミン病の病因となる細胞内シグナルの異常を解明するため、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) の運動ニューロン変性における TGF- β シグナルの役割について検討した。SBMA モデルマウス脊髄の免疫組織化学およびウエスタンブロットを解析したところ、核内へのリン酸化 Smad2 の移行は、正常マウスに比べ発症前から有意に低下していた。TGF- β 受容体 (TBR1) の発現を免疫組織化学およびウエスタンブロットにより解析したところ、SBMA モデルマウスの脊髄運動ニューロンでは発症前から発現が低下しており、その傾向はとくに変異 AR の核内集積を認める細胞において顕著にみられた。次に、AR の N 末断片を培養細胞に強制発現させ、ルシフェラーゼによるレポーターアッセイを行ったところ、変異 AR による TBR1 のプロモーター活性の低下が示された。培養細胞への変異 AR の強制発現による細胞死は TBR1 の強制発現により抑制された。同様の変化は、脊髄小脳失調症 3 型 (SCA3) の病因蛋白質である変異 ataxin-3 を培養細胞に強制発現させた際にも観察された。さらに、患者組織でも TBR1 の発現が低下し、核内へのリン酸化 Smad2 の移行が低下していることが明らかとなった⁸⁾。

2) ポリグルタミン病に対するトランスレーショナルリサーチ

トランスレーショナルリサーチに必要なバイオマーカーについては、電気生理学的検査による推定運動ニューロン数 (MUNE) が、SBMA 患者の経過年数や握力と相関し、経過とともに減少することを見出し、本指標が SBMA の病態の重症度を反映することを明らかにした⁷⁾。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Ito, H., Yoshimura, N., Kurosawa, M., Ishii, S., Nukina, N. & Okazawa, H. Knock down of PQBP1 impairs anxiety-related cognition in mouse. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4239-4254 (2010).

doi:10.1093/hmg/ddp378

2. Doi, H., Koyano, S., Suzuki, Y., Nukina, N. & Kuroiwa, Y. The RNA-binding protein FUS/TLS is a common aggregate-interacting protein in polyglutamine diseases. *Neurosci. Res.* **66**, 131-133 (2010). doi:10.1016/j.neures.2009.10.004
3. Tateishi, T., Hokonohara, T., Yamasaki, R., Miura, S., Kikuchi, H., Iwaki, A., Tashiro, H., Furuya, H., Nagara, Y., Ohyagi, Y., Nukina, N., Iwaki, T., Fukumaki, Y. & Kira, J.I. Multiple system degeneration with basophilic inclusions in Japanese ALS patients with FUS mutation. *Acta Neuropathol.* **119**, 355-364 (2010). doi: 10.1007/s00401-009-0621-1
4. Bauer, P.O., Goswami, A., Wong, H.K., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Matsumoto, G., Kino, Y., Nagai, Y. & Nukina, N. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat. Biotechnol.* **28**, 256-263 (2010). doi:10.1038/nbt.1608
5. Yamanaka, T., Tosaki, A., Miyazaki, H., Kurosawa, M., Furukawa, Y., Yamada, M. & Nukina, N. Mutant huntingtin fragment selectively suppresses Brn-2 POU domain transcription factor to mediate hypothalamic cell dysfunction. *Hum. Mol. Genet.* (2010). doi:10.1093/hmg/ddq087
6. Takahashi, M., Mizuguchi, M., Shinoda, H., Aizawa, T., Demura, M., Okazawa, H. & Kawano, K. Polyglutamine tract-binding protein-1 binds to U5-15kD via a continuous 23-residue segment of the C-terminal domain. *Biochim. Biophys. Acta* (2010). doi:10.1016/j.bbapap.2010.03.007
7. Suzuki, K., Katsuno, M., Banno, H., Takeuchi, Y., Kawashima, M., Suga, N., Hashizume, A., Hama, T., Uchida, K., Yamashita, F., Nakamura, T., Hirayama, M., Tanaka, F. & Sobue, G. The profile of motor unit number estimation (MUNE) in spinal and bulbar muscular atrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* (2010). doi: 10.1136/jnnp.2009.190462
8. Katsuno, M., Adachi, H., Minamiyama, M., Waza, M., Doi, H., Kondo, N., Mizoguchi, H., Nitta, A., Yamada, K., Banno, H., Suzuki, K., Tanaka, F. & Sobue, G. Disrupted TGF-beta signaling in spinal and bulbar muscular atrophy. *J. Neurosci.* (2010) in press.
9. Enokido, Y., Tamura, T., Ito, H., Arumughan, A., Komuro, A., Shiwaku, H., Sone, M., Foulle, R., Sawada, H., Ishiguro, H., Ono, T., Murata, M., Kanazawa, I., Tomilin, N., Tagawa, K., E.E., W. & Okazawa, H. Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. *J. Cell Biol.* (2010) in press.