

「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

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。

H22年度は岡澤グループがポリグルタミン病におけるDNA損傷修復障害に関わるKu70についてそのハンチンチンとの結合からDNA修復を障害することを示し、*J Cell Biol* に報告した。また変異アタキシン1がMaxerに結合することでバグマングリアの増殖が抑制され、結果としてプルキンエ細胞への保護作用が低下することを示し、non-cell autonomousな神経変性機序の一つを見出した(*EMBO J* 2010)。勝野グループはSBMAにおいてTGF- $\beta$ 受容体(TbetaRII)の発現異常を介してTGF- $\beta$ シグナルの抑制が認められることを*J Neurosci* に報告した。これらの分子が治療標的となり得ることが示された。トランスレーショナルリサーチとして勝野らによってSBMAにおけるリユプロレリンの治験の効果が204例の患者を対象として検討され、発症10年未満の患者で効果が確認された(*Lancet Neurol*2010)。

## § 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)理化学研究所構造神経病理研究チーム、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

- ・ 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
- ・ 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
- ・ 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 ((独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所、室長)

#### ② 研究項目

- ・ 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
- ・ 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 (東京医科歯科大学難治疾患研究所、教授)

#### ② 研究項目

- ・ レンチウイルスベクターによる DNA 修復障害治療開発
- ・ 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 (名古屋大学高等研究院、特任講師)

#### ② 研究項目

- ・ 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薬剤(DHC)について R6/2 ハンチントン病モデルマウスを用いて治療効果の再検討を行った。R6/2 に加え SBMA マウス、SOD1 マウスにおいて効果を検討したが *in vivo* の明確な効果は確認できなかった。初期に認められた効果は DHC のロットが変わってしまったことに原因がある可能性を否定は出来ないが、*in vitro* の結果は変更前後で安定しているため、不明であった。一方 *in vitro* の抗凝集作用機序についてプロテアソーム系に作用していることが示唆されているが、さらに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、候補を絞っている。

また、凝集体結合蛋白質から分子標的候補を深索し、凝集体結合蛋白質の TLS についてその細胞内分布制御機序について報告した<sup>7)</sup>。

##### 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

昨年度 QBP1 と Hsc70 結合モチーフの融合ペプチドを発見することにより、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 に発表したため、SCA3 マウスについても若干の検討を行った。病理学的に効果が示唆されたが、モデルマウスの症状が軽いため評価が困難と考え、さらにレポートの伸長したものを得ようとしている。

##### 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レポート数の変動などの影響が認めることがあるため2回目の検討を行い、ほぼその効果を確認した。病理学的変化についてその機序を解明しようとしている。さらにオートファジーの直接の影響を見るため ATG5 ノックアウトマウスとハンチントン病モデルマウスの掛け合わせを行い、その影響を検討している。

P62 のリン酸化が選択的オートファジー促進と関連していることを見出し、異常ハンチンチンの分解も促進することを確認し、その制御機構を明らかにした。

#### (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

本年度は、5-6 アミノ酸以下の QBP1 部分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の構築を行った。直接的な評価系として、蛍光タンパク質 CFP/YFP とポリグルタミン鎖との融合タンパク質を用いた FRET によるポリグルタミン凝集の高感度評価システムを構築した。また、間接的な評価系として、ポリグルタミン凝集体による人工リポソーム膜内からの蛍光色素流出の評価システムを構築中である。

一方、QBP1 由来化合物アナログのデザインのためには、ポリグルタミン鎖との結合に関わるアミノ酸とその立体配位などの結合様式情報が不可欠であるため、NMR を用いたポリグルタミン鎖-QBP1 複合体の構造生物学的解析を開始した。

## 2) ポリグルタミン凝集阻害化合物のスクリーニング

本年度は、HTS により同定した新規ポリグルタミン凝集化合物のうち、活性が強かつ入手可能な化合物約 20 種類について、培養細胞、ショウジョウバエモデルを用いた2次・3次スクリーニングを行った。その結果、ショウジョウバエモデルに対する *in vivo* での治療効果を認める治療薬候補化合物をいくつか同定した。また、これらの治療薬候補のマウスモデルでの薬効評価のために、ポリグルタミン病の中で世界的にも最も患者数が多い脊髄小脳失調症3型 (SCA3) について、ヒト患者での遺伝子異常を忠実に再現したノックインマウスモデルの作製を開始した。

## (3)「岡澤」グループ

### 1) レンチウイ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イルスベクターを作成して遺伝子治療を目的としている。昨年度に作成した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 レンチウイルスベクター： pLenti6-Flag-Ku70 (CMV promoter)、pLenti6-Flag-HMGB1 (CMV promoter)、pLenti6-Ku70 (Gsbs promoter, Calbindin1 promoter)、pLenti6-HMGB1 (Gsbs promoter, Calbindin1 promoter) について、ウイルスのタンパク質発現活性を初代培養神経細胞に対する感染実験により確認したところ、予想外に低いことが分かった。これはベクター特異的な減少ではなく、本プロジェクトと平行して行っている他のプロジェクトの pLenti6 ベクターでも同様であったことから、ベクター自体に問題があるものと考えられた。したがって、さらに高発現が期待出来るレンチウイルスベクター pLVSIN (CMV promoter)への組み替え体を作成した。これにより、プルキンエ細胞特異的調節領域を持つレンチウイルスベクターを作成できた。線条体 medium spiny neuron 特異的発現については継続中である。動物モデルでの感染実験については GFP-レンチウイルスベクターを用いて小脳表面および大脳表面に注入し、大脳ニューロンおよび小脳ニューロンにおける感染および GFP 遺伝子発現を、2光子顕微鏡の観察により確認出来た。次の段階として Ku70 と HMGB の発現を確認しているところである。

### 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

22 年次計画書に記載した『変異ハンチンチンと Ku70 の結合に基づく病態のマウスモデル

を用いた解析』については、この成果を論文発表し<sup>2)</sup>、後述のプレスリリースを行った。結合面の解析については、点変異体は蛋白構造全体に及ぼす影響が大きく、解析に適さなかった。そこで、本来的な目的である変異ハンチンチンと Ku70 の結合面に入り込み、結合を阻害する低分子化合物の発見に向けて、以下の二つの手法を用いて研究を進めた。

1分子蛍光解析システム MF20 が 22 年 10 月に導入された。これを用いて GST-Ku70 および GST-HttExon1 の結合を測定した。蛍光偏光解析 (FIDA-PO) 法においては結合を示す有為な変化が認められたが、蛍光相関分光 (FCS) 法では測定数値に有為な変化は認められなかった。分子回転に対応する FIDA-PO 法で得られた変化が両者の結合を示すことはほぼ確実であるが、ブラウン運動に対応する FCS 法で変化が得られなかったことは必ずしも結合を否定するものではない。また、両者の結合強度には Htt の精製方法が影響することも明らかに成って来た。以上の知見から条件を決定して、FIDA-PO 法を指標に化合物スクリーニングを開始した。これにより、変異 Htt が Ku70 に結合することを阻害できる低分子化合物の同定を目指す。

次に(ドッキングシュミレーションプロトコール(Proteins(2001)43,113-124))を用いたコンピューターソフト(LibDock/Discovery Studio)を用いて、Htt 結合領域中に存在する Ku70 分子表面の小さくくぼみに結合する低分子化合物を予測した。これにより、(約 46 万個の化合物よりドッキングシュミレーションのスコア値)の高い化合物(100 種類)をリストアップした。今後さらに別なアルゴリズムを加えて検討し、候補化合物を購入して、実際に結合を阻害するかを MF20 などにより検証していく。

### 3) その他の成果

PQBP1 は私たちのグループがポリグルタミン配列結合タンパクとして初めて報告した分子であり、変異ハンチンチン及び変異アタキシン1との結合が示されている。変異タンパクが結合すると PQBP1 の機能低下がおこる。私たちはショウジョウバエ PQBP1 発現欠損モデルを作成したところ、学習障害が認められ、これに対応して投射ニューロンの NR1 受容体発現が低下していた。この結果はハンチントン病などに見られる認知症状との関連が示唆される<sup>6)</sup>(JST よりプレス発表)。また、変異アタキシン1発現により小脳で発現低下する新規分子 Maxer を発見し、主にバーグマングリアに発現する小胞体タンパクであり、バーグマングリアの増殖を担う分子であることを明らかにした。変異アタキシン1が Maxer に結合することでバーグマングリアの増殖は抑制され、結果としてプルキンエ細胞への保護効果が低下する。したがって、Non-cell autonomous な神経変性を担う分子を脊髄小脳変性症において初めて発見したことになる<sup>3)</sup>(JST よりプレス発表)。

#### (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

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) の運動ニューロン-骨格筋クロストークによる神経変性機序を分子レベルで明らかにするため、2 種類の異なるモデルマウス(ヒト変異アンドロゲン受容体ト

ランスジェニックマウス[AR97Q]およびノックインマウス[AR113Q])とアンドロゲン受容体ノックアウトマウス[HAS-AR]の各々から骨格筋サンプルを採取し、抽出した mRNA を用いてマイクロアレイ解析を実施した。その結果、全体としては各マウス間で 20%程度の遺伝子発現変化の共通性が認められた。とくにアンドロゲン受容体の loss of function によると考えられる細胞接着、エネルギー代謝、筋萎縮および再生に関する遺伝子発現の変化がみられ、また AR97Q と AR113Q のみに共通した発現変化の中には、P/CAF などハンチントン病のモデルマウスにおける変化と同様な傾向を示すものが認められた<sup>5)</sup>。

一方、SBMA モデルマウス[AR97Q]の脊髄における遺伝子発現解析により、マウスの運動障害発症前から発現が亢進している遺伝子として CGRP1 を同定した。培養細胞のルシフェラーゼアッセイにて変異 AR が CGRP1 プロモーターの活性を増加させることが示された。SBMA マウスと CGRP1 ノックアウトマウスを交配したところ、CGRP1 の発現抑制によりマウスの運動機能や病理変化が改善したことから、CGRP1 の発現亢進が神経変性の原因に寄与していることが明らかとなった。さらに、CGRP1 の発現亢進による神経変性の分子機序として、JNK 経路が CGRP1 により活性化されることが示されており、セロトニン受容体アゴニストなどの低分子化合物による CGRP1/JNK 経路の抑制が神経変性に及ぼす効果について、培養細胞・マウスモデルを用いて解析中である。

## 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

SBMA のマウスモデルにおいて神経変性に対する抑止効果が示されているリュープロレリン酢酸塩について、204 例の患者を対象としたプラセボ対照二重盲検比較試験を実施した<sup>4)</sup>。TAP-144-SR(3M)を SBMA 患者に 1 年間投与した結果、副次評価項目のうち、陰囊皮膚抗ポリグルタミン抗体陽性細胞数の割合及び入院時血清 CK には、TAP 群で大きな改善が認められ、変異アンドロゲン受容体の核内集積が抑制され、筋障害が改善されたことが示唆された。主要評価項目である咽頭部バリウム残留率には差は認められなかった(p=0.06)が、発症 10 年未満の群での層別解析の結果、投与開始時から終了時までの変化量の平均値(95%信頼区間)が TAP 群で-6.41%(-11.77%~-1.04%)、プラセボ群で 3.40%(-1.49%~8.29%)であった。群間差(TAP 群-プラセボ群)(95%信頼区間)は-9.81%(-17.10%~-2.51%)であり、TAP 群で咽頭部バリウム残留率が減少する傾向が認められた(p=0.009)ことから、疾患の罹病期間が TAP-144-SR(3M)の効果に影響を及ぼすことが示唆された。

また、SBMA の病態を反映するバイオマーカーとして、酸化ストレスマーカーである尿中 8-OHdG が SBMA 患者の運動機能や経過年数と相関し、本指標が SBMA の病態の重症度を反映することが示された。現在、前向き研究により縦断的解析を進めており、本指標の自然歴における経時的変化を解析中である。

## §4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

- 1) 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 transforming growth factor-beta signaling in spinal and bulbar muscular atrophy. *J. Neurosci.* **30**, 5702-5712 (2010). (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0388-10.2010)
- 2) 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., Wanker, E.E. & Okazawa, H. Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. *J. Cell Biol.* **189**, 425-443 (2010). (DOI: 10.1083/jcb.200905138)
- 3) Shiwaku, H., Yoshimura, N., Tamura, T., Sone, M., Ogishima, S., Watase, K., Tagawa, K. & Okazawa, H. Suppression of the novel ER protein Maxer by mutant ataxin-1 in Bergman glia contributes to non-cell-autonomous toxicity. *EMBO J.* **29**, 2446-2460 (2010). (DOI: 10.1038/emboj.2010.116)
- 4) Katsuno, M., Banno, H., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Kawashima, M., Yabe, I., Sasaki, H., Aoki, M., Morita, M., Nakano, I., Kanai, K., Ito, S., Ishikawa, K., Mizusawa, H., Yamamoto, T., Tsuji, S., Hasegawa, K., Shimohata, T., Nishizawa, M., Miyajima, H., Kanda, F., Watanabe, Y., Nakashima, K., Tsujino, A., Yamashita, T., Uchino, M., Fujimoto, Y., Tanaka, F. & Sobue, G. Efficacy and safety of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy (JASMITT study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* **9**, 875-884 (2010). (DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70182-4)
- 5) Mo, K., Razak, Z., Rao, P., Yu, Z., Adachi, H., Katsuno, M., Sobue, G., Lieberman, A.P., Westwood, J.T. & Monks, D.A. Microarray analysis of gene expression by skeletal muscle of three mouse models of Kennedy disease/spinal bulbar muscular atrophy. *PLoS One* **5**, e12922 (2010). (DOI: 10.1371/journal.pone.0012922)
- 6) Tamura, T., Horiuchi, D., Chen, Y.C., Sone, M., Miyashita, T., Saitoe, M., Yoshimura, N., Chiang, A.S. & Okazawa, H. Drosophila PQBP1 regulates learning acquisition at projection neurons in aversive olfactory conditioning. *J. Neurosci.* **30**, 14091-14101 (2010). (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1319-10.2010)
- 7) Kino, Y., Washizu, C., Aquilanti, E., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Doi, H. & Nukina, N. Intracellular localization and splicing regulation of FUS/TLS are variably affected by amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations. *Nucleic Acids Res* (2010). (DOI: 10.1093/nar/gkq1162)

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1件)