

「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」

H23 年度
実績報告

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. 研究実施体制

(1) 「貫名」グループ

① 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)

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
- ・オートファジーを用いた異常蛋白質分解促進治療法開発
- ・分解系以外の分子標的の解析と治療法開発

(2) 「永井」グループ

① 主たる共同研究者: 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

ポリグルタミン凝集を標的とした治療法開発

- ・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 主たる共同研究者: 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

転写障害・DNA 損傷修復障害を標的とした治療開発

- ・レンチウイルスベクターによる DNA 損傷修復障害治療開発
- ・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
- ・DNA 修復蛋白質とポリグルタミン蛋白質との結合を利用した治療薬のスクリーニング

(3)「勝野」グループ

① 主たる共同研究者:勝野 雅央 (名古屋大学 大学院医学系研究科、特任准教授)

② 研究項目

ポリグルタミン病の病態因子を標的とした治療開発とその臨床応用

- ・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

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

本研究ではポリグルタミン病の包括的治療法の開発のために、異常タンパク質の凝集の抑制(永井グループ)、異常タンパク質の分解制御(貫名グループ)、さらに異常タンパク質凝集後の病態カスケードの制御(岡澤、勝野グループ)をめざしている。さらに治療効果の判定のためのバイオマーカーの同定(勝野グループ)を目指している。以下本年度の進展を報告する。

<貫名信行グループ：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

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、*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た。さらに分子標的の同定もほぼ完了した。

2) オートファジーを用いた異常蛋白質分解促進治療法開発

選択的オートファジーの制御タンパク質と考えられている p62 に関してその機能解析を行い、プロテアソーム阻害時に増加する p62 リン酸化部位を同定した。S403 のリン酸化がオートファジーを促進することを確認し、これがポリユビキチンタンパク質と p62 の結合を増強し、セクエストソーム形成を促進することによることを示した。さらにこのリン酸化酵素としてカゼインキナーゼ 2 を同定した。またオートファジー阻害によってこのリン酸化型 p62 の分解が阻害されること、ポリグルタミン凝集体の分解が p62S403 のリン酸化によって促進されることなど p62S403 のリン酸化が異常タンパク質分解制御の標的になり得ることを示した⁹⁾。

3) 分解系以外の分子標的の解析と治療法開発

ポリグルタミン病細胞モデルを用いて凝集体形成阻害活性のある化合物をスクリーニングし、IP3R1 阻害剤に凝集体形成抑制効果があること確認した。IP3R1 を直接ノックダウンすることによっても同様の効果を認めることからこの効果は IP3R1 を直接介していることが示唆された。また IP3R1 阻害剤において細胞毒性が少なく凝集体形成抑制効果のあるものが存在することを見出した⁷⁾。ポリグルタミン凝集体結合タンパク質としてわれわれが

同定し、凝集阻害効果のある FUS/TLS についてその機能解析を行った¹²⁾。

<永井義隆グループ：ポリグルタミン凝集を標的とした治療法開発>

4) 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

ポリグルタミン鎖との結合に関わる QBP1 配列中のアミノ酸残基とその立体配位、QBP1 の立体構造を明らかにするために、ポリグルタミン蛋白質 Thio-PolyQ と QBP1 との複合体の NMR 解析を行った。15N 標識した Thio-Q62 (20 μ M) に高濃度 (100 μ M) の QBP1 を添加したところ、1 週間程度は凝集せずに安定で良好な NMR スペクトルが得られた。その結果、PolyQ 鎖部分は主鎖由来のシグナルがほとんど得られず、均一な構造をとらないか微細な凝集体を形成していると考えられた。Thioredoxin 部分は本来の立体構造を保ったままであった。続いて 15N 標識 QBP1 を得るために、大腸菌での QBP1 の大量発現・精製系を構築した。

また、ポリグルタミン鎖と QBP1 の結合様式を明らかにするために、カロリメトリーを用いた Thio-PolyQ と QBP1 との結合解析を開始した。

5) 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、活性が強くかつ入手可能な化合物約 20 種類について、他の神経変性疾患の原因となる amyloid- β 、tau、 α -synuclein に対する凝集阻害活性を評価した。その結果、様々な神経変性蛋白質に幅広い活性を発揮する凝集阻害化合物をいくつか同定した。そのうち 3 化合物は PolyQ 病モデル ショウジョウバエに対する *in vivo* での治療効果も確認されたことから、有力な治療薬候補となると考えられた。

一方、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ヒト患者での遺伝子異常を忠実に再現した脊髄小脳失調症 3 型 (SCA3) のノックインマウスモデルを作製している。これまでマウス ataxin-3 遺伝子内に Q144 が導入された ES 細胞が得られており、現在キメラマウスを作成中である。

<岡澤均グループ：転写障害・DNA 損傷修復障害を標的とした治療開発>

6) レンチウイルスベクターによる DNA 損傷修復障害治療開発

レンチウイルスベクターが完成してマウス脳への投与実験を行った。マーカーとした EGFP の蛍光は認められるものの、必ずしも発現量は高くないことが分かっている。このため、レンチウイルスベクターでのエンハンサー/プロモーターの変更を行った。

7) 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

疾患蛋白質ターゲット分子として HMGB および Ku70 を発見し、これらの分子を介した DNA 損傷修復不全がポリグルタミン病態の主要な要素であることを示してきた。さらに変異ハンチンチンと DNA 修復タンパク Ku70 の結合とこれに基づく病態をマウスモデルおよびショウジョウバエモデルを用いて解析し、既に論文発表を行った⁶⁾。これらの成果は PNAS の総

説にも大きく取り上げられており、新規バイオマーカーとの関連が想定されている。したがって、HMGB あるいは Ku70 の補充によって病態を改善できる可能性が出てきている。

一方、関連するポリグルタミン病の病態について、新知見を得た。脊髄小脳変性症 7 型の原因遺伝子 ATAXIN-7 は SAGA/STAGA 複合体の一要素として、DNA のアセチル化を通じて転写調節に関わり、その機能破綻が疾患の主要な原因と考えられて来た。しかし、私たちは ATAXIN-7 がダイナミックに核-細胞質間を移行しており、細胞質においては微小管安定化に寄与することを明らかにした⁵⁾。これは脊髄小脳変性症 7 型の新たな病態解明と治療開発につながりうるものである。また、ポリグルタミン病態を仲介する分子として私たちが同定した PQBP1 が天然変性タンパク質であることを構造解析から証明した¹⁾。

8) DNA 修復蛋白質とポリグルタミン蛋白質との結合を利用した治療薬のスクリーニング

DNA 修復蛋白質とポリグルタミン蛋白質との結合を利用した治療薬のスクリーニングを行っている。これまでに行った MF20 を用いた Ku70 と変異ハンチンチンの結合阻害作用を持つ低分子化合物のスクリーニング、同じく結合阻害低分子化合物の構造解析ソフトを用いた *in silico* スクリーニングがこれまで順調に進行しており、候補低分子がこれまでに全体で 50 種類程度得られている。平成 23 年度には、これらの候補分子を必要量購入して、ショウジョウバエ疾患モデルおよびマウス疾患モデルに投与して、*in vivo* スクリーニングを開始した。ショウジョウバエモデルにおいて、一部の化合物では治療効果が有意差を持って示されている。

<勝野雅央グループ: ポリグルタミン病の病態因子を標的とした治療開発とその臨床応用>

9) ポリグルタミン病に共通する病態因子の探索・同定

これまでに、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) の原因蛋白質である変異アンドロゲン受容体 (AR) が TGF- β 受容体である T β RII の転写を抑制し、TGF- β シグナルを阻害することを明らかにしてきた。TGF- β シグナルは細胞周期を抑制する作用を有していることから、SBMA のモデルマウス [AR-97Q] における細胞周期について解析した。その結果、AR-97Q マウスの脊髄運動ニューロンでは p21 や p15 などの発現が低下し、細胞周期の G1/S 期マーカーであるリン酸化 Rb やサイクリン D1 および M 期マーカーである PCNA の発現が増加し、E2F1 の核内集積が亢進していた。SBMA マウスの運動ニューロンでは BrdU の取り込みが認められたが、非病変部である小脳のプルキンエ細胞では異常な取り込みは認められなかったことなどから、SBMA における運動ニューロン変性過程には、TGF- β シグナルの破綻による細胞周期の異常が寄与していると考えられた。また、一塩基多型 (SNP) 解析により SBMA と同様に運動ニューロン変性をきたす ALS (筋萎縮性側索硬化症) の疾患感受性遺伝子として ZNF512B を同定し、その遺伝子産物が TGF- β シグナルに関与することを明らかにした¹⁰⁾。さらに、運動ニューロン変性において酸化ストレスが病因蛋白質の翻訳後修飾を変化させることによっ

てその不溶性を亢進させることを報告した⁴⁾。

一方、これまでの研究により、AR-97Q マウスの脊髄では運動障害発症前から calcitonin gene-related peptide alpha (CGRP1) の発現が亢進していること、CGRP1 は JNK 経路の活性化を介して細胞障害を誘導すること、および AR-97Q マウスと CGRP1 ノックアウトマウスを交配すると 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することが明らかとなっている。本年度は、CGRP1 の産生を抑制する作用が知られている各種のセロトニン受容体 (5-HT1B/1D) アゴニストのうち、培養細胞モデルを用いたスクリーニングの結果最も強い病態抑止効果が認められた naratriptan について、AR-97Q マウスに経口で投与し効果を解析した。その結果、naratriptan の経口摂取により MKP1 (mitogen-activated protein kinase phosphatase 1) の発現誘導を介して CGRP1 の発現が抑制され、マウスの筋萎縮・運動機能・寿命が有意に改善し、病理学的にも運動ニューロンの萎縮や反応性グリオシスが軽減した。さらに、naratriptan は培養細胞モデルにおいても、AR-97Q マウスにおいても、JNK 経路を抑制することが示された。

近年、小胞体による蛋白質品質管理機構である unfolded protein response (UPR) とポリグルタミン病をはじめとする神経変性疾患の病態との関連が示唆されている。本年度我々は、SBMA マウスモデルの骨格筋において UPR が誘導されていること、および小胞体ストレスにより誘導される転写因子である CHOP (C/EBP homologous protein) の発現を抑制すると、変異 AR による骨格筋障害が増悪することを明らかにした⁸⁾。この結果は小胞体による蛋白質の品質管理がポリグルタミンの細胞毒性を軽減していることを示唆している。

10) 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 の前方視的縦断解析を行った。その結果、SBMA 患者における尿中 8-OHdG の値が経時的に増加すること、およびベースラインにおける値がその後の運動機能（とくに 6 分間歩行検査における歩行機能）と変化と逆相関することが明らかとなり、本指標が SBMA の重症度を反映するのみならず、予後を推定する因子の一つとなりうることを示唆された。一方、電気生理学的検査については、感覚神経の活動電位が ALS と SBMA の鑑別診断に重要なマーカーであることを明らかにした³⁾。また、SBMA の自然歴と臨床試験におけるプラセボ効果の関連を解析したところ、6 分間歩行などの客観的指標ではプラセボの影響が少ないのに対し、運動機能スコアなどの主観的指標ではプラセボ効果が生じやすいことを明らかにした²⁾。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Ress, M., Gorba, C., de Chiara, C., Bui, T.T.T., Garcia-Maya, M., Drake, A.F., Okazawa, H., Pastre, A., Svergun, D. & Chen, Y.W. The solution model of the intrinsically disordered polyglutamine tract binding protein-1 (PQBP-1). *Biophys J* (2012). in press.
2. Hashizume, A., Katsuno, M., Banno, H., Suzuki, K., Suga, N., Tanaka, F. & Sobue G. Differential change of clinical outcome measures in spinal and bulbar muscular atrophy: comparison of natural history with placebo-treated group. *J Neurol* (2011) in press. (DOI: 10.1007/s00415-011-6251-2)
3. Hama, T., Hirayama, M., Hara, T., Nakamura, T., Atsuta, N., Banno, H., Suzuki, K., Katsuno, M., Tanaka, F. & Sobue, G. Discrimination of spinal and bulbar muscular atrophy from amyotrophic lateral sclerosis using sensory nerve action potentials. *Muscle Nerve* **45**, 169-174 (2012). (DOI: 10.1002/mus.22291)
4. Iguchi, Y., Katsuno, M., Takagi, S., Ishigaki, S., Niwa, J.I., Hasegawa, M., Tanaka, F. & Sobue, G. Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol Dis* **45**, 862-870 (2012). (DOI: 10.1016/j.nbd.2011.12.002)
5. Nakamura, Y., Tagawa, K., Oka, T., Sasabe, T., Ito, H., Shiwaku, H., La Spada, A.R. & Okazawa, H. Ataxin-7 associates with microtubules and stabilizes the cytoskeletal network. *Hum Mol Genet* **21**, 1099-110 (2012). (DOI: 10.1093/hmg/ddr539)
6. Tamura, T., Sone, M., Iwatsubo, T., Tagawa, K., Wanker, E.E. & Okazawa, H. Ku70 alleviates neurodegeneration in Drosophila models of Huntington's disease. *PLoS One* **6**, e27408 (2011). (DOI: 10.1371/journal.pone.0027408)
7. Bauer, P.O., Hudec, R., Ozaki, S., Okuno, M., Ebisui, E., Mikoshiba, K. & Nukina, N. Genetic ablation and chemical inhibition of IP3R1 reduce mutant huntingtin aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* **416**, 13-17 (2011). (DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.10.096)
8. Yu, Z., Wang, A.M., Adachi, H., Katsuno, M., Sobue, G., Yue, Z., Robins, D.M. & Lieberman, A.P. Macroautophagy is regulated by the UPR-mediator CHOP and accentuates the phenotype of SBMA mice. *PLoS Genet* **7**, e1002321 (2011). (DOI: 10.1371/journal.pgen.1002321)
9. Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M., Kurosawa, M. & Nukina, N. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol Cell* **44**, 279-289 (2011). (DOI: 10.1016/j.molcel.2011.07.011)

10.1016/j.molcel.2011.07.039)

10. Iida, A., Takahashi, A., Kubo, M., Saito, S., Hosono, N., Ohnishi, Y., Kiyotani, K., Mushiroda, T., Nakajima, M., Ozaki, K., Tanaka, T., Tsunoda, T., Oshima, S., Sano, M., Kamei, T., Tokuda, T., Aoki, M., Hasegawa, K., Mizoguchi, K., Morita, M., Takahashi, Y., Katsuno, M., Atsuta, N., Watanabe, H., Tanaka, F., Kaji, R., Nakano, I., Kamatani, N., Tsuji, S., Sobue, G., Nakamura, Y. & Ikegawa, S. A functional variant in ZNF512B is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. *Hum Mol Genet* **20**, 3684-3692 (2011). (DOI: 10.1093/hmg/ddr268)
11. Sun, H., Satake, W., Zhang, C., Nagai, Y., Tian, Y., Fu, S., Yu, J., Qian, Y., Chu, J. & Toda, T. Genetic and clinical analysis in a Chinese parkinsonism-predominant spinocerebellar ataxia type 2 family. *J Hum Genet* **56**, 330-334 (2011). (DOI: 10.1038/jhg.2011.14)
12. 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* **39**, 2781-2798 (2011). (DOI: 10.1093/nar/gkq1162)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 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)