

「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

H24 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 (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
- ・分子シャペロンを応用したポリグルタミン病モデルの治療

(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

- ・ウィ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

(4) 勝野グループ

① 主たる共同研究者: 岡澤 均 (名古屋大学大学院医学系研究科神経内科、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、貫名グループ)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 sigma1 受容体の可能性を同定した。この作用点は IP3R からの Ca リリースである可能性がある。この点ですでに抗凝集効果があると我々が報告した Rho kinase inhibitor, Y-27632, が IP3R の negative regulator である IRBIT の vimentin への sequestration を阻害することを見出した⁸⁾。sigma1 受容体も含めて、IP3R を介する分解系制御がポリグルタミン病の治療標的となる可能性が考えられる。

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、S403 のリン酸化がオートファジーを促進することを報告したが、この際に作製した S403 リン酸化特異モノクローナル抗体を用いて様々なヒト神経疾患の剖検脳を検討した。その結果を解析中である。また p62, Atg5 等のオートファジー関連分子のノックアウトのポリグルタミン凝集に対する影響を解析している。

3) 分解系以外の分子標的の解析と治療法開発

ハンチンチン凝集体の翻訳後修飾としてメチオニン酸化を見出し、凝集過程に関与し、その制御が治療標的になる可能性があることを指摘した⁹⁾。治療分子標的の探索の過程で当研究グループが当初ポリグルタミン結合タンパク質として見出した FUS/TLS に関してはノックアウトマウスと

R6/2との掛け合わせを行ってその影響を解析中である。MBNL1に関してはRNAレベルでの異常遺伝子発現への関与を検討している。またハンチントン病線条体において著明に発現減少していることを当グループが報告した SCN4b 遺伝子についてノックアウトマウスを作製し、その解析を行っている。SCN4b の分布を解析するのに必要なモノクローン抗体を作製した。

<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 (SNWKWPGIFD) 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。大腸菌から 15N 標識 QBP1 (100 μ M) を精製し、Thio-Q62 (20 μ M) に添加し NMR 解析を行ったところ、フリーの 15N 標識 QBP1 に比べて、シグナルの有意な減弱が認められた。このことから、Thio-Q62 の凝集体に 15N 標識 QBP1 が取り込まれ、NMR シグナルが減弱したと考えられた。NMR シグナルが十分に得られなかったため、Thio-Q62 との結合による QBP1 シグナルのシフトは明らかではなかった。

また、カロリメトリーを用いた Thio-Q62 と QBP1 との結合解析についても、Thio-Q62 の凝集体形成に伴う熱量変化が大きいと、ポリグルタミン鎖と QBP1 の結合様式は明らかにはできなかった。

一方、QBP1 由来化合物アナログの分子デザインは当初の予想より困難を極め、さらに時間を要することが考えられるため、QBP1 を応用した分子治療法開発へ向けて BBB 透過性の高い Protein Transduction Domain (PTD) の分子デザインを目指した。最近開発された BBB キット (Nakagawa et al. Cell Mol Neurobiol, 2007) を用いて 13 種類の様々な PTD の BBB 透過性を評価したところ、高い BBB 透過性を示す PTD をいくつか同定した。

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、ポリグルタミン病モデルシヨウジョウバエに対する有効性が確認され、かつ高い BBB 透過性、ヒトへの安全性が示されている化合物 QAI1 について、ポリグルタミン病モデルマウスに対する治療効果の検証を行った。化合物 QAI1 を脊髄小脳失調症 1 型 (SCA1) モデルノックインマウス SCA1-Q154-KI および共同研究者の勝野らが開発した球脊髄性筋萎縮症モデルマウス SBMA-Q97-Tg マウスに対して経口投与したところ、運動障害に対する有意な改善効果が明らかになった。

一方、本研究から見出される治療薬候補の臨床応用へ向けて、世界的に患者数が多い脊髄小脳失調症 3 型 (SCA3) に着目し、ノックインマウスモデルの作製を進めている。今年度はマウス ataxin-3 遺伝子内に Q144 が導入されたマウスの樹立の成功し、現在 Cre 発現マウスとの交配により Neo 遺伝子の除去を行っている。

6) 分子シャペロンを応用したポリグルタミン病モデルの治療

蛋白質ミスフォールディング・凝集に対する生体内防御機構である分子シャペロンに着目して、ポリグルタミン病モデルマウスに対するウイルスベクターを用いた遺伝子治療の有効性を検討した。

その結果、Hsp40を発現するAAVウイルスベクターAAV5-Hsp40の注射によりハンチントン病モデルマウス R6/2 の凝集体形成が抑制され、運動障害、寿命短縮などが改善することを明らかにした。驚くべきことに、AAV5-Hsp40 非感染細胞においても凝集体抑制効果を認め、non-cell autonomous な治療効果を発揮する可能性が考えられた⁴⁾。また、ポリグルタミン病培養細胞モデルにおいて、リアノジン受容体を介する Ca²⁺のリークにより細胞死が引き起こされることを明らかにした⁵⁾。

<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>

7) ウィルスベクターによる DNA 損傷修復障害治療開発

岡澤らは、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。したがって HMGB あるいは Ku70 の機能補充によって病態を改善できる可能性がある。本研究ではこれらの蛋白質補充のための遺伝子治療を効率よく行うために①小脳プルキンエ細胞、線条体神経細胞に特異的な発現を示す遺伝子のエンハンサー/プロモーターをクローニングして、その下流に Ku70, HMGB などの DNA 修復因子を組み込んだレンチウイルスベクターを作製する。同時に EGFP をマーカーとして発現するコントロールベクターも作製し、発現にどの程度の特異性があるかを in vivo で確認する、②HMGB および Ku70 の全長を発現するレンチウイルスベクター作成を行う、ことを目指して来た。

しかし、平成23年度までに、レンチウイルスベクターは必ずしも発現量は高くないことが分かり、さらに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が、やはり十分な発現をプルキンエ細胞等に示すことはできなかった。そこでアデノ随伴ウイルス(AAV1)への切り替えを行い、HMGB および Ku70 の AAV ベクターも併せて作成しマウス脳内投与による治療実験を開始した。この結果、プルキンエ細胞に強い発現をしめす HMGB1-AAV1 を作成することに成功し、さらに、プルキンエ細胞の DNA 損傷軽減およびロタロッド試験での運動機能改善を示すことが出来た。これらの治療効果は、併せて行って来た HMBG1-Tg マウスと Ataxin-1-KI マウスの成果とも良く対応しており、極めて信頼性の高い結果と考えられる。

8) 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

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 (JCB 2010; PLoS ONE 2011)。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。さらに Ku70 とハンチンチンタンパク質の結合面については、点変異体を用いて解析を行っているが、並行して行っている in silico の構造予測から、およそその結合部位(Ku70 の N 末端ドメインの小さなくぼみ)が想定されている。これを結合鑄型として役立てて in silico スクリーニングを行って、結合が想定される化合物20種類を選定した。

また、岡澤グループはポリグルタミン配列に結合する新規分子として PQBP1 を発見したが(Hum Mol Genet 1999; Neuron 2002)、PQBP1 は核の nuclear body のみならず細胞質ストレス顆粒にも

存在して、間接的あるいは直接的に DNA 損傷とも関係することが明らかになりつつある。そこで、PQBP1 についても各種タンパクとの結合ドメインである C 末ドメインの構造解析を行った¹²⁾。また、PQBP1 がポリグルタミン蛋白と結合して核内分布を変えて、転写および DNA 損傷修復への影響を来すことが想定されている(Neuron 2002)。転写プロファイル変動による一つの標的分子が NR1(NMDA 受容体サブユニット)であること、NR1 減少を介して学習障害が起きることを示してきた(J Neurosci 2010)。今回、学習障害と寿命短縮に対する PQBP1 発現量の影響についてショウジョウバエ遺伝学を用いて解析した結果、脳の PQBP1 発現低下のみ学習障害を生じるが、全身組織では PQBP1 減少も増加も寿命を短縮することが分かった³⁾。

また、関連するポリグルタミン病 SCA7 の原因遺伝子 Ataxin-7 の機能について、従来知られていた核におけるクロマチンモデリング(DNA 修復にも関連する)に加えて、微小管安定化に關与する結果を得た¹³⁾。

9) 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

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165種類程度得られている。さらに上述の in silico スクリーニングから得た候補化合物20種類を加え、ショウジョウバエ疾患モデルに投与して in vivo スクリーニングを開始した。その結果、ショウジョウバエモデルにおいても治療効果が有意差を持って示す12種類の化合物を同定した(寿命延長効果、 $p < 0.05$)。次年度に、マウスモデルでの治療実験を開始するために、これらの薬剤を大量購入し R6/2 マウスコロニーの拡張を急いでいる。

<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>

10) 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)モデルマウスの脊髄で発症前から発現の亢進のみられる遺伝子として calcitonin/calcitonin-related polypeptide(CGRP1)を同定し、CGRP1 が JNK シグナルを活性化し細胞障害を誘導すること、および変異アンドロゲン受容体(AR)の細胞毒性が JNK 阻害剤によって抑制されることを明らかにした。変異 AR を安定発現する培養細胞株を用いて CGRP1 の発現を抑制する低分子化合物として naratriptan を同定し、これを SBMA モデルマウス(AR-97Q)に経口投与したところ、運動ニューロンにおける JNK シグナルが抑制され、神経原性筋萎縮および脊髄における反応性グリオシスが抑止されるとともに、運動機能や寿命の有意な改善が認められた⁶⁾。また、SBMA モデルマウス脊髄で発現が亢進しているマイクロ RNA として miR-196a を同定し、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて miR-196a をマウスに投与することにより AR の mRNA を安定化させる CUGBP2, Elav-like family member 2(CELF2)の発現抑制を介して AR の mRNA の分解を促進し、運動ニューロン変性を抑止することを明らかにした¹¹⁾。さらに、熱ショック蛋白質の制御因子である heat shock factor-1(HSF-1)が SBMA マウスモデルにおける病変部の選択性に寄与し、HSF-1 のノックアウトにより運動ニューロン変性が悪化するとともに病変部位が拡大すること、およ

びAAV ベクターによるHSF-1の局所過剰発現により変異ARの凝集が抑制され、ニューロン変性が軽減することを明らかにした¹⁾。

1 1) 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を同定するため、SBMA患者の重症度の経時的推移を、機能スコア・定量的筋力測定・血清学的マーカーなどを評価指標とした前方視的縦断解析を実施した。その結果、筋量を反映すると考えられる血清クレアチニン値や酸化ストレスマーカーである尿中8-OHdGが、運動機能の重症度や罹病期間と強く相関し、経時的に悪化することが示された。また、発症早期の患者では多くの機能指標が正常値を呈していたが、血清クレアチニン値や6分間歩行検査などの客観的指標は発症早期でも正常値を下回っており、発症前や発症早期の患者を対象とした臨床試験におけるエンドポイントとなり得ることが示された⁷⁾¹⁰⁾。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Fujita, K., Nakamura, Y., Oka, T., Ito, H., Tamura, T., Tagawa, K., Sasabe, T., Katsuta, A., Motoki, K., Shiwaku, H., Sone, M., Yoshida, C., Katsuno, M., Eishi, Y., Murata, M., Taylor, J.P., Wanker, E.E., Kono, K., Tashiro, S., Sobue, G., La Spada, A.R. & Okazawa, H. A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA damage repair in multiple polyglutamine diseases. *Nature Commun* (in press).
2. Kondo, N., Katsuno, M., Adachi, H., Minamiyama, M., Doi, H., Matsumoto, S., Miyazaki, Y., Iida, M., Tohnai, G., Nakatsuji, H., Ishigaki, S., Fujioka, Y., Watanabe, H., Tanaka, F., Nakai, A. & Sobue, G. Heat shock factor-1 influences pathological lesion distribution of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Nat Commun* **4**, 1405 (2013).
3. Tamura, T., Sone, M., Nakamura, Y., Shimamura, T., Imoto, S., Miyano, S. & Okazawa, H. A restricted level of PQBP1 is needed for the best longevity of *Drosophila*. *Neurobiol Aging* **34**, 356 e11-20 (2013). DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.07.015
4. Popiel, H.A., Takeuchi, T., Fujita, H., Yamamoto, K., Ito, C., Yamane, H., Muramatsu, S., Toda, T., Wada, K. & Nagai, Y. Hsp40 Gene Therapy Exerts Therapeutic Effects on Polyglutamine Disease Mice via a Non-Cell Autonomous Mechanism. *PLoS One* **7**, e51069 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0051069
5. Suzuki, M., Nagai, Y., Wada, K. & Koike, T. Calcium leak through ryanodine receptor is involved in neuronal death induced by mutant huntingtin. *Biochem Biophys Res Commun* **429**, 18-23 (2012). DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.107
6. Minamiyama, M., Katsuno, M., Adachi, H., Doi, H., Kondo, N., Iida, M., Ishigaki, S., Fujioka, Y., Matsumoto, S., Miyazaki, Y., Tanaka, F., Kurihara, H. & Sobue, G. Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by an expanded polyglutamine repeat tract. *Nat Med* **18**, 1531-8 (2012). DOI: 10.1038/nm.2932
7. Mano, T., Katsuno, M., Banno, H., Suzuki, K., Suga, N., Hashizume, A., Tanaka, F. & Sobue, G. Cross-sectional and longitudinal analysis of an oxidative stress

- biomarker for spinal and bulbar muscular atrophy. *Muscle Nerve* **46**, 692-7 (2012). DOI: 10.1002/mus.23413
8. Bauer, P.O., Hudec, R., Goswami, A., Kurosawa, M., Matsumoto, G., Mikoshiba, K. & Nukina, N. ROCK-phosphorylated vimentin modifies mutant huntingtin aggregation via sequestration of IRBIT. *Mol Neurodegener* **7**, 43 (2012). DOI: 10.1186/1750-1326-7-43
 9. Mitomi, Y., Nomura, T., Kurosawa, M., Nukina, N. & Furukawa, Y. Post-aggregation oxidation of mutant huntingtin controls the interactions between aggregates. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 34764-75 (2012). DOI: 10.1074/jbc.M112.387035
 10. Hashizume, A., Katsuno, M., Banno, H., Suzuki, K., Suga, N., Mano, T., Atsuta, N., Oe, H., Watanabe, H., Tanaka, F. & Sobue, G. Longitudinal changes of outcome measures in spinal and bulbar muscular atrophy. *Brain* **135**, 2838-48 (2012). DOI: 10.1093/brain/aws170
 11. Miyazaki, Y., Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Jiang, Y.M., Huang, Z., Doi, H., Matsumoto, S., Kondo, N., Iida, M., Tohnai, G., Tanaka, F., Muramatsu, S. & Sobue, G. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat Med* **18**, 1136-41 (2012). DOI: 10.1038/nm.2791
 12. Rees, M., Gorba, C., de Chiara, C., Bui, T.T., Garcia-Maya, M., Drake, A.F., Okazawa, H., Pastore, A., Svergun, D. & Chen, Y.W. Solution model of the intrinsically disordered polyglutamine tract-binding protein-1. *Biophys J* **102**, 1608-16 (2012). DOI: 10.1016/j.bpj.2012.02.047
 13. 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

(3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 1件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2件)