

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19482

研究課題名(和文) タクロリムス誘導体のドラッグリポジショニングによる新規神経変性治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy for neurodegenerative disease using tacrolimus derivative

研究代表者

藤内 玄規 (TOHNAI, Genki)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：00748353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：球脊髄性筋萎縮症(SBMA)はアンドロゲン受容体(AR)内のCAGリピートの異常伸長に起因する神経変性疾患である。本研究ではSBMAにおけるタクロリムスとその誘導体のタンパク質分解機構の誘導効果を検討した。タクロリムス誘導体はSBMA培養細胞モデルにおいてタンパク質分解機構に関わる分子の発現量を増加させ、変異ARを減少させた。またタクロリムス誘導体の投与によりSBMAマウスの表現型は改善した。これらの結果はタクロリムス誘導体投与がSBMAの治療法の候補となる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：To clarify the effect of medical-induction of proteolytic machinery in the spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), a neuromuscular disease caused by the CAG repeat expansion in the androgen receptor (AR) gene, we investigated effect of tacrolimus derivative in the SBMA model. Tacrolimus derivative increased the expression of proteolytic machinery-related molecule in cell models of SBMA. Mutant AR was reduced in the presence of tacrolimus derivative. Administration of the tacrolimus derivative ameliorated behavioral parameters in SBMA Tg mice. These observations suggest that tacrolimus derivative is a promising therapeutic candidate for motor neuron diseases including SBMA.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経変性疾患 球脊髄性筋萎縮症 タクロリムス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 球脊髄性筋萎縮症はアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子内の CAG リピートの異常伸長に起因する成人発症の神経変性疾患であり、下位運動ニューロン変性による進行性の筋萎縮と筋力低下を示す。多くの神経変性疾患に共通する特徴として、異常なタンパク質の蓄積とそれに伴う神経細胞の機能低下と脱落が見られる。SBMA では変異 AR がテストステロン依存性に核内に蓄積し、それに伴う転写障害や軸索輸送障害により神経変性、機能低下が起こると考えられる。そのため SBMA を含む神経変性疾患の治療は異常タンパク質を蓄積させない、あるいは分解することによる病態進行抑制と、神経細胞の機能改善が重要と考えられる。

(2) 我々はこれまでに SBMA におけるタンパク質分解機構の働きを中心に、病態解明と治療法開発に取り組んできた。SBMA モデルマウスを用いて分子シャペロンやオートファジーなどタンパク質分解機構とそこに関わる分子を解析し、その重要性を見出した (Kondo et al, Nat Commun 2013, Doi et al, J Neurosci 2013, Tohnai et al, Hum Mol Genet 2014)。これらのことから SBMA においてタンパク質分解機構の賦活化が病態の抑止に繋がると考えられる。一方、神経細胞機能を改善するためには機能低下した神経細胞に神経栄養因子を供給することが必要である。したがって神経栄養因子の誘導やタンパク質分解機構の賦活化の作用を持つ低分子化合物の探索が SBMA をはじめとする神経変性疾患の治療にとって重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

タクロリムスは FK506 結合タンパク質 (FKBP) と複合体を形成しカルシニューリンの活性を阻害することで免疫抑制作用を示す。FKBP は神経系において豊富に存在し、タクロリムスと複合体を形成することで神経栄養因子を誘導または効果を増強すると考えられている。また、タクロリムスには分子シャペロンである Hsp70 やオートファジーの誘導作用があることから、タクロリムスを用いた治療法開発は異常タンパク質の分解を介した病態抑止と栄養因子補充双方の効果が期待できる。一方、タクロリムス誘

導体はタクロリムスの一部の構造が修飾された化合物で、分子シャペロンの誘導や神経栄養作用、神経保護作用を有していると考えられる。したがってタクロリムスとその誘導体の投与はタンパク質分解機構の賦活化と神経栄養因子の誘導を同時に行え、神経変性疾患の病態抑止と機能改善の2つの効果を併せ持つ治療法になる可能性が考えられることから本研究を立案し、SBMA の細胞モデルとマウスモデルでその効果を検討した。

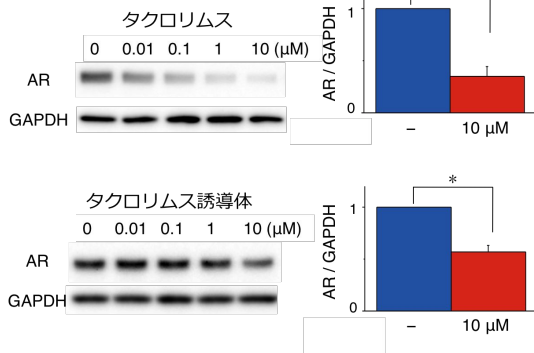
## 3. 研究の方法

異常伸長したポリグルタミン鎖 (AR-97Q) を持つヒト AR 遺伝子を恒常的に発現する NSC34 細胞を SBMA 培養細胞モデルとしてタクロリムス及びタクロリムス誘導体を様々な濃度で添加しその効果をウェスタンブロットやリアルタイム PCR などを用いて解析した。また核移行シグナルと GFP を付加することで毒性を強めた AR-97Q を作成し NSC34 細胞に一過性強制発現させ、培養細胞の突起伸長作用や細胞生存に薬剤が与える影響を明らかにするとともに蛍光タイムラプス顕微鏡により変異 AR の分解の可視化を試みた。また異常伸長したポリグルタミン鎖 (AR-97Q) を持つヒト AR 遺伝子と chicken  $\beta$ -actin プロモーターを導入したトランスジェニックマウスを SBMA マウスモデルとして使用した。この SBMA マウスに薬剤を連日投与しその効果を体重、生存率、Rotarod 法、Grip の項目で評価した。さらにマウス組織の免疫組織化学、ウェスタンブロット解析、リアルタイム PCR 解析を行い、変異 AR の変化、タンパク質分解機構関連分子の発現及び相互作用を検討した。

## 4. 研究成果

(1) SBMA 培養細胞モデルにおけるタクロリムス及びタクロリムス誘導体の効果

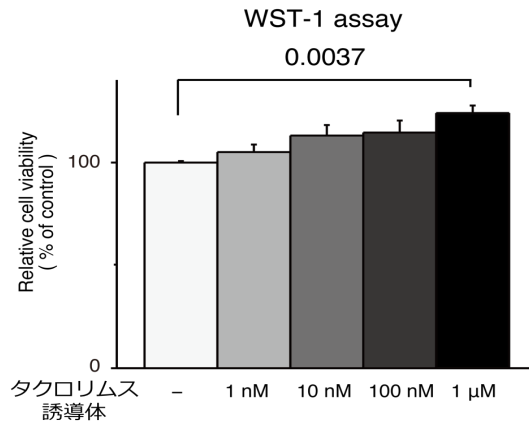
SBMA 培養細胞モデルにおける薬剤の効果を検討したところ、タクロリムス投与により変異 AR タンパク質の発現量が濃度依存的に減少した。タンパク質分解機構に関わる分子では、オートファジーに関わる Beclin-1、Atg5、Atg13 の発現が濃度依存的に増加していた。また SBMA 培養細胞モデルにタクロリムス誘導体を投与したところタクロリムスと同じく変異 AR タンパク質の発現量の減少が見られた (図 1)。



**図 1. SBMA 培養細胞モデルにおけるタクロリムス及びタクロリムス誘導体の効果**

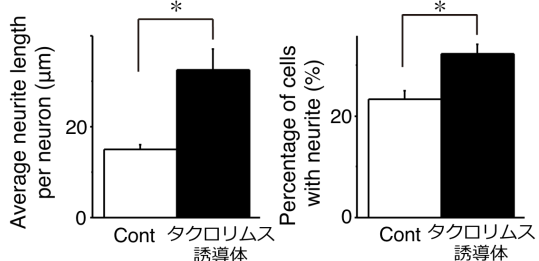
薬剤投与により変異 AR タンパク質の発現量が有意に減少した。( \* p < 0.05, n=4 )

毒性を高めた SBMA 培養細胞モデルを用いてタクロリムス及びタクロリムス誘導体の細胞保護作用、突起伸長増強作用を解析したところ WST-1 アッセイによる解析で細胞増殖能の改善が見られた ( 図 2 )。また薬剤添加による神経突起長の伸長と細胞あたりの神経突起数の増加が確認された ( 図 3 )。



**図 2. SBMA 培養細胞モデルにおけるタクロリムス誘導体の細胞保護効果**

核移行シグナルと GFP を付加し毒性を高めた SBMA 培養細胞モデルを用いて WST-1 アッセイにより薬剤の細胞生存率への影響を解析した。薬剤の濃度依存的に SBMA 細胞の生存率は改善した。

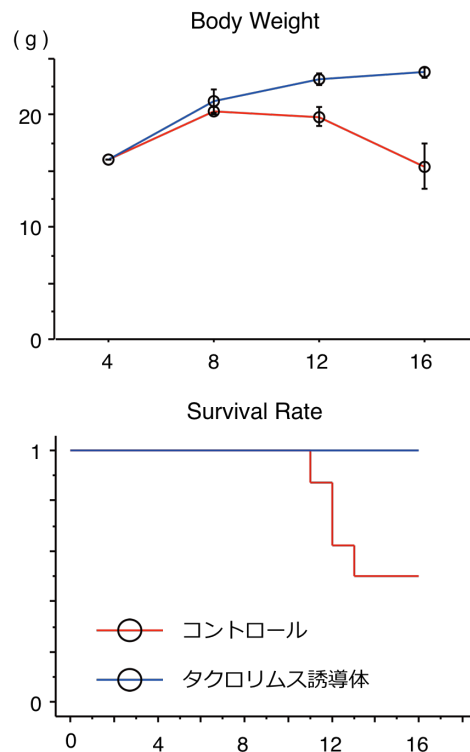


**図 3. 神経突起に対するタクロリムス誘導体の効果**

毒性を高めた SBMA 培養細胞モデルを用いて薬剤の神経突起への影響を解析した。薬剤添加により神経突起長が伸長し、神経突起を有する細胞数が増加した。( \* p < 0.05, n=10 )

**(2) SBMA マウスモデルにおけるタクロリムス及びタクロリムス誘導体の効果**

SBMA 培養細胞モデルでの結果から薬剤による AR タンパク質の減少効果が期待できるため、SBMA マウスモデルに薬剤の投与を行った。薬剤はポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60 と無水エタノールを含む生理食塩水に希釈し、0.5 mg/kg、5 mg/kg の濃度で連日経口投与を行った。コントロール群にはポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60 と無水エタノールを含む生理食塩水のみを投与した。マウス表現型への薬剤の効果は体重変化、生存率、運動機能解析により評価した。変異 AR による SBMA マウスモデルの体重減少、筋力低下などの表現型は薬剤の投与により改善した ( 図 4 )。マウス組織におけるタンパク質の発現量をウェスタンブロット法により評価した結果、マウス脊髄、骨格筋で変異 AR タンパク質の低下が見られ ( 図 5 )、タンパク質分解機構に関わる分子が増加していた。マウスの脊髄及び骨格筋で抗ポリグルタミン抗体である 1C2 を用いて免疫染色を行うと 1C2 陽性細胞数は薬剤投与により減少した。



**図 4. SBMA マウスモデルにおけるタクロリムス誘導体の効果**

薬剤投与により SBMA マウスの体重変化(上)と生存率(下)が改善した。(タクロリムス誘導体 5 mg/kg、n=10)

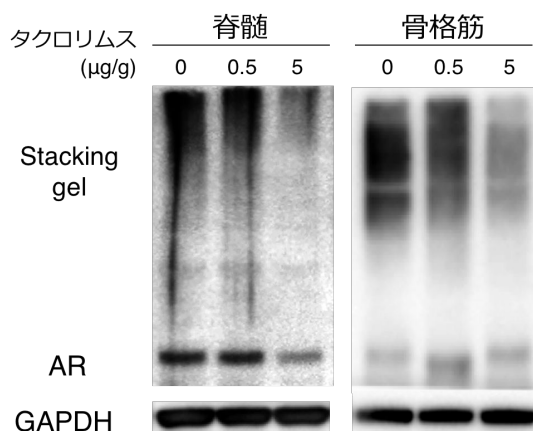


図 5. SBMA マウスモデルにおけるタクロリムスの治療効果

SBMA マウスの脊髄と骨格筋における AR タンパク質の発現量をウェスタンブロットにより解析した。スタッキングゲル上の異常伸長した AR タンパク質の発現量が薬剤投与により低下した。

以上のようにタクロリムス及びタクロリムス誘導体は SBMA 培養細胞モデルとマウスモデルにおいて病因である変異 AR を減少させる有意な治療効果を示した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)(すべて査読あり)

Ding Y, Adachi H, Katsuno M, Sahashi K, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Sobue G. BIIB021, a synthetic Hsp90 inhibitor, induces mutant ataxin-1 degradation through the activation of heat shock factor 1. *Neuroscience*. 2016 327:20-31. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.03.064.

Nakamura R, Sone J, Atsuta N, Tohnai G, Watanabe H, Yokoi D, Nakatochi M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS). Next-generation sequencing of 28

ALS-related genes in a Japanese ALS cohort. *Neurobiol Aging*. 2016 39:219.e1-8. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.030.

Ding Y, Adachi H, Katsuno M, Huang Z, Jiang YM, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Funakoshi H, Nakamura T, Sobue G. Overexpression of hepatocyte growth factor in SBMA model mice has an additive effect on combination therapy with castration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015. 468(4):677-83. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.015.

Sahashi K, Katsuno M, Hung G, Adachi H, Kondo N, Nakatsuji H, Tohnai G, Iida M, Bennett CF, Sobue G. Silencing neuronal mutant androgen receptor in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2015 24(21):5985-94. doi: 10.1093/hmg/ddv300.

〔学会発表〕(計 4 件)

Tohnai G. Therapeutic effect of tacrolimus and its derivative on a model of motor neuron disease. 第 9 回 NAGOYA グローバルリトリート 2017.2.10, あいち健康プラザ (愛知県大府市)

藤内玄規, 勝野雅央, 足立弘明, 佐橋健太郎, 近藤直英, 中辻秀朗, 飯田円, 祖父江元. 神経変性疾患モデルにおけるタクロリムスとその誘導剤の治療効果. 第 39 回日本分子生物学会年会 2016.11.30, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

藤内玄規 運動ニューロン疾患モデルにおけるタクロリムスとその誘導剤の治療効果. 第 6 回名古屋大学・生理学研究所合同シンポジウム 2016. 9.24, 名古屋大学附属病院 (愛知県名古屋市)

藤内玄規, 足立弘明, 勝野雅央, 佐橋健太郎, 近藤直英, 中辻秀朗, 飯田円, 祖父江元. 球脊髄性筋萎縮症モデルにおけるタクロリムス誘導剤の治療効果. 第 33 回日本神経治療学会総会 2015.11.28, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

藤内 玄規 (TOHNAI, Genki)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教  
研究者番号: 00748353