

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19509

研究課題名(和文) α -シヌクレインの発現を抑制する薬剤スクリーニング研究

研究課題名(英文) Drug screening for suppression of alpha-synuclein expression

研究代表者

上村 麻衣子 (Uemura, Maiko)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：00767395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤スクリーニングで選出された、 α -シヌクレイン(α -Syn)の発現を抑制する2種類の化合物(A・B)を基に、15種類の類似構造化合物、60種類の類似作用化合物を選出し、スクリーニングを行った。その結果、特に、一定の芳香環を持つ化合物が、 α -Synの発現に影響を及ぼすと考えられ、より効果と安全性の高い薬剤選出への方向性が示された。

一方で、 α -Syn脳内接種モデルマウスに化合物A・Bを投与し、異常 α -Synの伝播抑制効果の検証も行った。 α -Syn脳内接種モデルマウスに関しては、既存のマウスよりも数倍 α -Syn伝播速度の速いモデルマウスの作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：We performed drug screening using 15 compounds of similar structure and 60 compounds of similar action to compound A and B. We found that the compounds with a certain aromatic ring have potential to suppress alpha-synuclein expression.

At the same time, we developed mouse model which showed alpha-synuclein propagation more rapidly and dramatically. Next, we will infuse the compounds to the brain of alpha-synuclein-propagation mouse model to see the effect of the compounds in vivo.

研究分野：パーキンソン病

キーワード：パーキンソン病 α -シヌクレイン 薬剤スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)は黒質線条体系ドパミン神経細胞の選択的変性と α -シヌクレイン(α -Syn)を主要構成成分とするレヴィ小体の存在を特徴とする神経変性疾患である。 α -Synをコードする遺伝子 SNCA には、遺伝性 PD の原因となる点変異 (A53T、A30P、E46K 等) および遺伝子コピー数の異常 (copy number variation : CNV) が知られている。CNV は今までに二重重複と三重重複が知られているが、コピー数が多いほど平均発症年齢が若く、その後の病状進行も急速で重症化する傾向が強い。また、genome-wide association study (GWAS) の解析から、SNCA が PD のリスクファクターとなることが同定され (Satake et.al., *Nat. Genet.*, 2009) 一塩基多型による転写・発現量の軽微な増加を介して孤発性 PD の発症にも重要な役割を果たしていると考えられる。さらに近年、動物モデルで脳内に接種した α -Syn が脳内を伝播し、PD の病態進行を反映する可能性が示されたが、 α -Syn ヘテロ KO マウスにおいてはこの伝播が抑制され、 α -Syn ホモ KO マウスでは伝播が起こらないことが報告された(Luk KC et al., *Science*. 2012)。これらの事実は、 α -Syn の発現を抑制することで PD の発症もしくは α -Syn の伝播による病態進行が抑制できる可能性を示唆し、PD の疾患修飾治療とも言うべき新たな創薬開発の可能性を秘めている。

我々は、 α -Syn の遺伝子とその発現調節領域を含む細菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome : BAC) に分泌性ルシフェラーゼカセットを挿入し、 α -Syn の発現をルシフェラーゼ活性でモニターできるコンストラクトを作製した。また、このコンストラクトを安定発現する SH-SY5Y 細胞を樹立した (α -Syn-Luc 細胞) (図 1)。

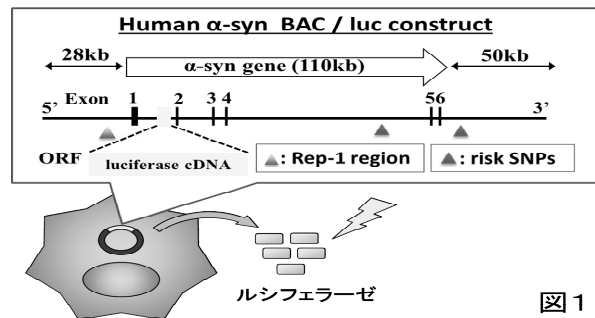
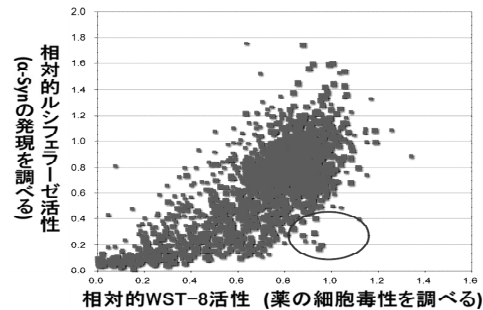


図 1

この細胞に、京都大学に保有している既存薬および機能既知化合物を含む、2600 種類の低分子化合物ライブラリーを添加し、合計 3 回のスクリーニングで α -Syn の発現を低下させる化合物を選出した (図 2)。



図 2



スクリーニングした化合物のうち、化合物 A および B は転写レベルおよび蛋白レベルで α -Syn の発現を低下させる事を確認し (図 3) また、転写レベルよりも蛋白レベルでより α -Syn 量を抑制することから、蛋白の翻訳や分解機構などにも関与している可能性が考えられた。

この二種類の化合物はすでに他疾患で臨床応用されており、PD 治療薬の実現可能性が高い事が期待される。

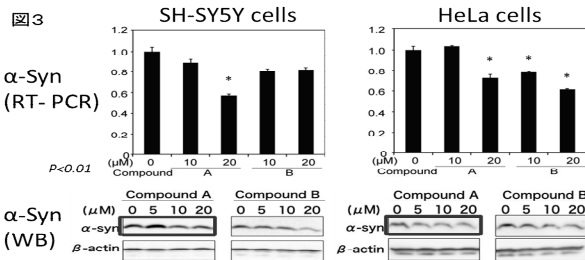


図 3

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究経過をもとに、本研究では化合物 A・B を、標的分子 α -Syn を抑制する「シード化合物」とした。これらの化合物を元に、今回の研究期間内では以下の事を明らかにする。

1) α -Syn 抑制機序の解明

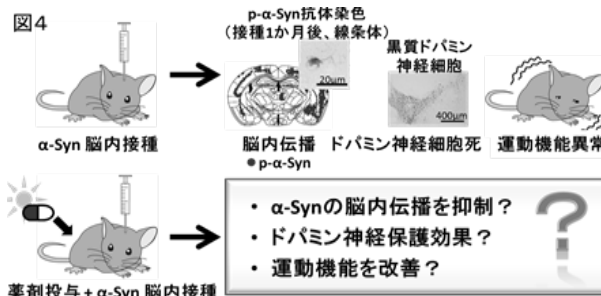
化合物 A・B が α -Syn の転写、翻訳抑制および分解促進にかかわる可能性を考えてその機序を解明する。

2) 化合物 A・B の類似構造化合物 / 類似作用化合物のスクリーニング

化合物 A・B は、ともに共通した構造を持っており、この構造が α -Syn 抑制に関与している可能性が考えられる。このため、化合物 A・B の類似構造化合物のスクリーニングを行う。また、化合物 A・B と共通の受容体結合能をもつ化合物についても同様にスクリーニングを行う。

3) モデル動物への投与による薬効検証

マウスの脳内に α -Syn 凝集体を接種すると、ホストの α -Syn が凝集体を形成し、脳内を伝播すると共に神経細胞死が見られる。このモデルに化合物 A・B を投与し、 α -Syn の脳内伝播抑制効果、黒質緻密部ドパミン神経細胞の保護効果、運動機能の改善効果について検証する(図4)。



3. 研究の方法

1) α -Syn 抑制機序の解明

化合物 A・B は、いくつかの核内受容体に作用することが知られており、転写制御に関わる可能性が示唆される。このため、これらの転写因子をノックダウンし、 α -Syn の発現制御に関与しているかどうかを調べる。

また、化合物 A・B は蛋白レベルでより α -Syn 抑制効果が高く、翻訳調節や分解促進にも関与している可能性がある。そこでまず、蛍光標識し、荷電された修飾型リジントランスファー RNA(リジン tRNA)を使用し、化合物 A・B が翻訳調節に関わる可能性を調べる。また、3'UTR レポータークローンを用いて miRNA 等による α -Syn の翻訳抑制作用を検証する。

α -Syn 分解に関しては、化合物 A がオートファジーを促進する薬剤としても報告があることから、まずは LC3-I/II や p62 蛋白の増減を調べる。

2) 類似構造化合物 / 類似作用化合物のスクリーニング

化合物 A・B との共通構造をもつ類似構造化合物、および共通の受容体結合能をもつ類似作用化合物のスクリーニングを行う。スクリーニング方法は、前回と同じくルシフェラーゼ活性による α -Syn の発現量、および WST-8 による細胞毒性の濃度依存性効果を確認する事により進める。これにより、 α -Syn 抑制効果がより高く、細胞毒性がより低い薬剤を選出する。化合物 A に関しては、すでに 15 種類の類似構造化合物、65 種類の類似作用化合物のスクリーニングを開始している。

3) モデル動物による薬効検証

まず、化合物 A・B がマウスの α -Syn も抑制するかどうかを *in vitro* で検証する。これまでに、マウス初代培養神経細胞とマウス胚性線維芽細胞において内因性 α -Syn の発現を確認している。この二種類の細胞に化合物 A・B を添加し、マウスの α -Syn を抑制するかどうかを検証する。抑制効果を認めれば、次に α -Syn 凝集体脳内接種マウスへの化合物 A・B 投与を検討する(図4)。

4. 研究成果

薬剤スクリーニングで選出された、 α -シクレイン(α -Syn)の発現を抑制する2種類の化合物(A・B)を基に、15種類の類似構造化合物、60種類の類似作用化合物を選出し、スクリーニングを行った。その結果、特に、一定の芳香環を持つ化合物が、 α -Syn の発現に影響を及ぼすと考えられ、より効果と安全性の高い薬剤選出への方向性が示された。類似作用化合物に関しては、化合物 A・B と同様の傾向を示すものもあったが、低用量では α -Syn の発現量を増加させるものもあり、至適濃度が重要と考えられた。また、スクリーニングに使用した細胞は神経線維芽細胞株であったが、これは化合物投与によりわずかに分化し、 α -Syn 量に変化して実験の再現性に影響を及ぼす可能性が考えられた。このため、神経線維芽細胞株を神経細胞に分化させて α -Syn 量を一定にし、化合物の薬効を再検証した。

一方で、 α -Syn 脳内接種モデルマウスに化合物 A・B を投与し、異常 α -Syn の伝播が抑制されるかどうかの検証も行った。 α -Syn 脳内接種モデルマウスに関しては、複数の遺伝子改変マウスに α -Syn 脳内接種を行い、野生型マウスよりも数倍 α -Syn 伝播速度の速いモデルマウスの作製に成功した。化合物 A・B は脂溶性薬剤のためジメチルスルホキシドを溶媒に使用する必要があったが、 α -Syn の発現抑制効果のある濃度まで化合物 A・B を投与するためにジメチルスルホキシド濃度を上げると、マウス生体への毒性が強くなり、目標量の投与は難しかった。今後は、より低用量での投与が可能な薬剤をスクリーニングし、モデルマウスでの検証を試みる。

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 2 件)

1. Uemura MT, Ihara M, Maki T, Nakagomi T, Kaji S, Uemura K, Matsuyama T, Kalaria RN, Kinoshita A, Takahashi R. "Pericyte-derived Bone Morphogenetic Protein 4 Underlies White Matter Damage after Chronic Hypoperfusion." *Brain Pathology*, 2017, doi: 10.1111/bpa.12523 [Epub ahead of print] (査読あり)
2. Uemura MT, Asano T, Hikawa R, Yamakado H, Takahashi R. "Zonisamide inhibits monoamine oxidase and enhances motor performance and social activity." *Neuroscience Research*, 124:25-32, 2017 pii: S0168-0102(17)30178-5. doi: 10.1016/j.neures.2017.05.008. (査読あり)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Maiko Uemura, Masafumi Ihara, Takayuki Nakagomi, Takakuni Maki, Seiji Kaji, Kengo Uemura, Kazuyuki Nagatsuka, Tomohiro Matsuyama, Ayae Kinoshita, Ryosuke Takahashi. Pericyte-derived bone morphogenetic protein 4 underlies white matter damage after chronic hypoperfusion, WCN, 2017, Kyoto, Japan
2. Maiko Uemura, Masafumi Ihara, Takayuki Nakagomi, Takakuni Maki, Seiji Kaji, Kengo Uemura, Kazuyuki Nagatsuka, Tomohiro Matsuyama, Raj Kalaria, Ayae Kinoshita, Ryosuke Takahashi. BMP4 expressed in pericytes after hypoperfusion aggravate white matter damage, VasCog Congress 2016, Amsterdam, Netherlands
3. Maiko Uemura, Masafumi Ihara, Takayuki Nakagomi, Takakuni Maki, Seiji Kaji, Kengo Uemura, Kazuyuki Nagatsuka, Tomohiro Matsuyama, Raj Kalaria, Ayae Kinoshita, Ryosuke Takahashi. BMP4 expressed in pericytes after ischemia aggravate white matter damage, Society for Neuroscience (SfN), 2016, San Diego, USA,
4. Sinya Okuda, Maiko Uemura, Norihito Uemura, Hodaka Yamakado, Takahashi Ryosuke. A novel mice model for Parkinson's disease: fibril-inoculated mutant α -synuclein BAC transgenic mice. World Congress of Neurology, 2017, Kyoto, Japan.
5. 奥田真也、上村紀仁、上村麻衣子、山門穂高、高橋良輔. α シヌクレイントランスジェニックマウスへのフィブリル脳内接種によるパーキンソン病モデル作製. 第11回パーキンソン病・運動障害疾患カンファレンス, 2017年, 東京.
6. Maiko Uemura, Masashi Ikuno, Tomoyuki Taguchi, Kouji Uemda, Yusuke Hatanaka, Norihito Uemura, Hodaka Yamakado, Ryosuke Takahashi. A dopaminergic phenotype with alpha-synuclein accumulation in the A53T-SNCA-BAC transgenic rat. 第59回日本神経学会学術大会, 2018, 北海道.
7. Tomoyuki Taguchi, Masashi Ikuno, Maiko Uemura, Yusuke Hatanaka, Norihito Uemura, Hodaka Yamakado, Ryosuke Takahashi, A53T mutant alpha-synuclein BAC transgenic mice as a novel model for Parkinson disease. 第59回日本神経学会学術大会, 2018, 北海道.
8. Tomoyuki Taguchi, Masashi Ikuno, Maiko Uemura, Yusuke Hatanaka, Norihito Uemura, Hodaka Yamakado, Ryosuke Takahashi, A53T mutant human synuclein BAC transgenic mice as a model for Parkinson's disease. 第41回日本神経科学大会, 2018年, 神戸.
9. Tomoyuki Taguchi, Masashi Ikuno, Maiko Uemura, Yusuke Hatanaka, Norihito Uemura, Hodaka Yamakado, Ryosuke Takahashi. A53T mutant human α -synuclein BAC transgenic mice as a model for Parkinson's disease. International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, 2018, Hong Kong.
10. 奥田真也、上村紀仁、生野真嗣、山門穂高、高橋良輔. Does inoculation of α -synuclein fibrils promote Lewy pathology of α -synuclein BAC transgenic mice? 第10回パーキンソン病・運動障害疾患カンファレンス, 2016年, 京都
11. 奥田真也、上村紀仁、高橋良輔. Inoculation of α -synuclein fibrils to α -synuclein BAC transgenic mice did not accelerate Lewy-like pathology. 第39回神経科学大会, 2016年, 横浜
12. 上村紀仁、長谷川成人、高橋良輔. Glucocerebrosidase deficiency accelerates the propagation of alpha-synuclein pathology. 第57回日本神経学会学術大会, 2016年, 神戸

〔図書〕(計 1 件)

1. 上村紀仁, モデル動物から治療へ, アクチュアル脳・神経疾患の臨床 神経疾患治療のストラテジー, 343-347

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村麻衣子 (UEMURA, Maiko)
京都大学大学院医学研究科臨床神経学特定研究員
研究者番号：00767395

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高橋良輔 (TAKAHASHI Ryosuke)
京都大学大学院医学研究科臨床神経学教授
研究者番号：90216771

上村紀仁 (UEMURA Norihito)
京都大学大学院医学研究科臨床神経学特定助教
研究者番号：90749045

(4) 研究協力者

奥田真也 (OKUDA Shinya)
京都大学大学院医学研究科臨床神経学大学院生

田口智之 (TAGUCHI Tomoyuki)
京都大学大学院医学研究科臨床神経学大学院生

玉野竜太郎 (TAMANO Ryotaro)
京都大学大学院医学研究科臨床神経学技術補佐員