

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17025020

研究課題名（和文） ポリグルタミン病の病態解明とそれに基づく治療法の開発

研究課題名（英文） Development of pathogenesis-based therapy for polyglutamine diseases

研究代表者

祖父江 元 (SOBUE GEN)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20148315

研究成果の概要（和文）：変異アンドロゲン受容体（AR）による TGF- β シグナルの阻害が球脊髄性筋萎縮症（SBMA）における運動ニューロン変性の病態に寄与していることが明らかとなった。また、Hsp90 阻害剤を SBMA マウスに投与すると変異 AR の UPS での分解が促進することが示された。以上から、UPS の機能調節や TGF- β などの細胞内シグナルの是正が、SBMA や他のポリグルタミン病の治療戦略として有望であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated that the disruption of TGF- β signaling by the pathogenic androgen receptor (AR) is associated with polyglutamine-induced motor neuron damage in SBMA. Our in vivo analyses also showed that Hsp90 inhibitors facilitate proteasomal degradation of the pathogenic AR. These results indicate that pharmacological modification of UPS activity and cellular signals such as TGF- β appear to be promising therapeutic approaches for SBMA and other polyglutamine diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	32,700,000	0	32,700,000
2006年度	34,000,000	0	34,000,000
2007年度	34,000,000	0	34,000,000
2008年度	33,000,000	0	33,000,000
2009年度	33,400,000	0	33,400,000
総計	167,100,000	0	167,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：ポリグルタミン

1. 研究開始当初の背景

ポリグルタミン病では、異常延長したポリグルタミン鎖を持つ病因子蛋白質が神経細胞内に集積し、何らかの毒性により神経細胞

変性を招くと考えられている。神経細胞内に集積した病因子蛋白質の一部は病理学的に封入体として観察されることから、当初はこうした封入体自体が毒性の根源と考えられて

いたが、その後の研究により、封入体は毒性が低く、むしろオリゴマーなどの中間産物が主として毒性を発揮すると考えられるようになった。ポリグルタミン蛋白質のもつ毒性については、核内に集積した病因蛋白質が転写因子などに異常な相互作用を及ぼすことにより様々な遺伝子の転写障害が生じることが提唱されており、その他にもミトコンドリア障害・軸索輸送障害・DNA 修復障害などの分子機序が想定されている。しかし、こうした分子イベントがどのように神経細胞を傷害するのかについては不明な点が多く、病態の本質が未解明である。

一方、根本治療法の開発については、病因蛋白質の集積を抑制することが最も重要と考えられており、分子シャペロンの遺伝学的修飾や低分子化合物の投与による凝集抑制効果がポリグルタミン病の動物モデルにおいて検討されてきた。しかし、現在のところ患者における有効性が明らかにされた根本治療法はない。

研究代表者らはこれまで、遺伝性神経変性疾患である SBMA の分子病態の解明と、それに基づいた治療法の開発に取り組んできた。SBMA は成人男性に発症し、下位運動ニューロンの変性による四肢筋力低下・筋萎縮および球麻痺を主症状とする疾患である。緩徐進行性の経過をたどり、球麻痺に起因する呼吸器感染が死因となることが多いが、根本的治療は存在せず、残念ながら現状では理学療法や合併症治療が診療の中心となっている。本疾患の原因はアンドロゲン受容体 (AR) 第 1 エクソン内の CAG 繰り返し配列の異常延長である。SBMA の病態に基づく治療法開発として、研究代表者らはまず異常延長した CAG リピートをもつヒトの全長 AR 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製し、SBMA の病態においてテストステロン依存性の変異 AR の核内集積が極めて重要な役割を果たしていること、および男性ホルモン抑制剤であるリュープロレリン酢酸塩が SBMA マウスに対し強力な治療効果を有することを見いだした (Katsuno et al., *Neuron* 2002; Katsuno et al., *Nat Med* 2003)。

本研究では、SBMA のみならず他のポリグルタミン病にも共通する病態機序の解明と根本治療法の開発に取り組んだ。とくに注目したのは、分子シャペロンやユビキチン-プロテアソーム系といった蛋白質品質管理機構を介した変異 AR の凝集抑制治療の検討と、変異 AR 蛋白質凝集の下流に位置する分子イベントの解明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SBMA をはじめとするポリグルタミン病における病態機構を分子レ

ベルで明らかにし、病態関連分子を標的とする治療法を開発することである。とくにポリグルタミン病における転写障害の下流に位置する分子イベントの解明と蛋白質分解機構であるユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) を介した治療法の開発に重点を置き研究を行った。

3. 研究の方法

(1) UPS 賦活化による SBMA の病態抑止
SBMA に対するユビキチン-プロテアソーム系を介した治療法を開発すべく、SBMA マウスモデルにおけるプロテアソームのキモトリプシン様活性および 35S 標識ユビキチン化 cIAP1 による蛋白質分解活性を測定し、選択的 Hsp90 阻害剤である 17-AAG および 17-DMAG を SBMA モデルマウスに経口投与し、運動機能や病理学的所見などにおける治療効果を解析した。また、Hsp70/Hsp90 結合蛋白質である CHIP (C terminus of Hsc70 (heat shock cognate protein 70)-interacting protein) の機能解析のため、SBMA トランスジェニックマウスとの交配を行い、運動機能解析や病理学的解析を行った。

(2) SBMA における逆行性軸索輸送

SBMA マウスモデルにおける逆行性軸索輸送について、Fluoro gold labelling および座骨神経結紮を用いて解析した。また、軸索輸送に関与するモーター蛋白質について Western blot や定量 RT-PCR などを用いて発現量を解析した。

(3) SBMA における TGF- β シグナル

SBMA マウスモデルおよび患者剖検組織の免疫組織化学により、TGF- β シグナルに関する分子の発現や局在を解析した。変異 AR の N 末断片を発現する SH-SY5Y 細胞を用い、Western blot・定量 RT-PCR・ルシフェラーゼアッセイなどを検討した。

4. 研究成果

(1) ユビキチン-プロテアソーム系の賦活化による SBMA の病態抑制効果

SBMA マウスの脊髄におけるプロテアソーム活性は進行期においても野生型と同程度に保持されており、骨格筋ではその活性が亢進していた。20S および 19S プロテアソームサブユニットの発現量も SBMA マウス脊髄では野生型と同程度であったが、骨格筋では発現の亢進が認められた。生体におけるユビキチン-プロテアソーム系のレポーターである変異ユビキチン (Ub^{G67V}) の高発現マウスと SBMA マウスを交配した解析においても、ユビキチン-プロテアソーム系の機能が維持されていることが示された。

特異的 Hsp90 阻害である

17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) は、AR などのクライアント蛋白質と呼ばれる分子に作用し、複合体の構成蛋白質の種類を変化させることによりクライアント蛋白質の構造を不安定化し、プロテアソームにおける分解を促進することが知られている。本研究では、17-AAG の有効性と安全性を培養細胞（ヒト neuroblastoma cell line）およびマウスモデル（ヒト全長 AR-97Q を発現するトランスジェニックマウス）を用いて解析した。培養細胞モデルでは、17-AAG 投与により濃度依存性に AR の蛋白量減少効果を認められたが、その減少効果は野生型である AR-24Q に比べ病因蛋白質である AR-97Q でより強く認められた。17-AAG による AR 減少効果は、プロテアソーム阻害剤である MG132 併用により相殺された。マウスに 17-AAG を腹腔内投与したところ、筋萎縮、歩行運動能などの有意な改善が認められ、AR 抗体を用いたウェスタンブロットおよび 1C2 抗体を用いた免疫染色では脊髄などにおける変異 AR の核内集積が有意に減少し、その効果は AR-24Q に比べ AR-97Q でより強く認められた。17-AAG は AR-Hsp90 複合体から p23 を離脱させるとによりユビキチン-プロテアソーム系による変異 AR の分解を促進し、神経変性を抑制することが示された (Waza et al. *Nat Med* 2005)。17-AAG の誘導体である 17-DMAG を SBMA マウスモデルに経口投与したところ、変異 AR 蛋白質の減少および Hsp70・Hsp40 などの熱ショック蛋白質の発現誘導が認められ、反応性グリオシスの改善が認められた。また、マウスの運動機能 (rotarod, cage activity)、体重、および寿命の有意な改善が認められた (Tokui et al. *Hum Mol Genet* 2009)。

一方、分子シャペロンとユビキチン-プロテアソーム系を連携する作用を有する C terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) トランスジェニックマウスとの交配により CHIP を高発現した AR-97Q マウス脊髄および骨格筋の immunoblot では、変異 AR の凝集体 (高分子量複合体) およびモノマーの現象が認められたが、こうした効果は AR-24Q マウスでは認められなかった。AR-97Q マウスの脊髄および骨格筋を用いたフィルタートラップアッセイでは、セルロースアセテート膜にブロットされる AR 凝集体およびニトロセルロース膜にブロットされる可溶性 AR モノマーの量はいずれも CHIP 高発現により減少した。CHIP を高発現した AR-97Q マウスではロータロッド、ケージアクティビティ、歩幅、体重、生存期間の有意な改善が認められ、とくにその効果は CHIP をホモで高発現するマウスにおいて強く認められた。病理学的には、脊髄前角および骨格筋のいずれにおいても抗ポリグルタミン抗体で核がびまん

性に染色される細胞数が減少し、骨格筋の HE 染色では神経原性筋萎縮の所見にも改善が認められた。脊髄前角の GFAP 染色では反応性グリオシスの減弱が示唆された (Adachi et al. *J Neurosci* 2007)。

(2) SBMA の初期病態における軸索輸送障害

ポリグルタミン病の動物モデルでは原因遺伝子の発現を抑制することにより神経変性の病態が改善することが知られており、病態の初期には可逆性があり、適切な治療により神経機能が回復する可能性が示唆されている。本研究では、SBMA の初期病態における神経細胞機能障害の分子メカニズムおよびその可逆性について検討した。まず、SBMA モデルマウスの骨格筋の免疫組織化学を解析したところ、ニューロフィラメントが終板近傍の運動ニューロン遠位軸索に蓄積していた。この蓄積はマウスの神経症状発症に先行して認められ、症状の進行とともに増強した。同様の集積は患者筋間筋でも観察された。また、シナプス小胞関連蛋白質のうちシナプトフィジンはニューロフィラメントと同様の蓄積を示したが、Rab-3A の蓄積は認められなかった。ニューロフィラメントやシナプトフィジンは軸索内を順行性および逆行性に輸送されるが、Rab-3A は順行性のみ輸送されることに着目し、坐骨神経結紮法によりシナプス小胞関連蛋白質の軸索輸送を調べたところ、野生型マウスに比べて SBMA マウスでは逆行性に輸送されるシナプトフィジンの量が有意に減少していることが明らかとなった。この減少はマウスの神経症状発症前から認められ、進行とともに顕著となった。さらに、フルオロゴールドの腓腹筋内ないし坐骨神経断端投与により脊髄前角の運動ニューロンをラベルしたところ、野生型マウスに比べて SBMA マウスでは発症前からラベルされるニューロン数が減少していることが明らかとなった。次に、軸索輸送を担うモーター蛋白質の発現量を定量したところ、SBMA マウスの脊髄運動ニューロンおよび前根では dynactin 1 蛋白質の発現量が発症前から有意に減少しており、その mRNA レベルも発症前から減少していた。Dynactin 1 は dynein などと複合体を形成し、順行性および逆行性軸索輸送を制御する蛋白質であり、その遺伝子変異により遺伝性運動ニューロン疾患が生じることが報告されている。以上から、ポリグルタミン鎖の延長した変異 AR の核内集積による dynactin 1 の転写障害が逆行性軸索輸送障害の原因であると考えられた。一方、神経症状発症後早期の SBMA マウスに去勢術を行ったところ、dynactin 1 の発現量およびフルオロゴールドによりラベルされるニューロンの数が増加し、症状は可逆的に改善した。以上から、変異 AR の集積による dynactin

1の転写障害がSBMAの初期病態に関与していると考えられた (Katsuno et al. *J Neurosci* 2006)。

(3) SBMAの病態関連遺伝子の探索

神経変性疾患をはじめ多くの疾患に対して、未解明の病態を解明する一つの手段としてcDNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析が用いられている。そこで本研究では、SBMAのモデルマウスの各病期(発症前、発症初期、発症後期)の脊髄から抽出した mRNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、病態関連遺伝子を探索した。その結果、対照と比較して発症前より発現に有意な差を認める遺伝子を抽出し、そのうち発症前から対照と比較し有意に発現の亢進のみられる遺伝子として calcitonin/calcitonin-related polypeptide (CGRP1) を同定した。CGRP1 は体内に広く分布し、血管拡張作用、胃酸分泌の制御、インスリン作用の拮抗、骨リモデリングなどの多彩な機能を有する神経ペプチドである。まず、RT-PCRによりDNA マイクロアレイ結果の裏付けを行い、SBMA マウス脊髄において mRNA レベルで CGRP1 の発現が亢進していることを確認した。次に、SBMA の培養細胞モデル (SHSY5Y-mutant AR stable cell line) においてもアンドロゲン添加による変異 AR 誘発により CGRP1 の発現が亢進することが示された。そこで、上記モデル細胞における CGRP1 の発現を RNAi を用いて抑制し viability assay を行ったところ、CGRP1 の発現抑制により SBMA モデル細胞の viability が改善した。次に、マウス個体における CGRP1 の病態への関与について検討した。SBMA モデルマウスと CGRP1 ノックアウトマウスを交配し、AR97Q^{+/+}、CGRP1^{+/+}および AR97Q^{+/+}、CGRP1^{-/-}マウスを作製し、phenotype の解析を行ったところ、AR97Q^{+/+}、CGRP1^{-/-}マウスでは AR97Q^{+/+}、CGRP1^{+/+}マウスに比べ rotarod task, 体重、握力、cage activity, 生存率において有意な改善が認められた。以上より、CGRP1 は SBMA マウスの神経症状発症前から病態に強く関与している遺伝子と考えられ、治療の新しいターゲットとなりうると考えられた。

(4) SBMAにおける TGF-βシグナルの異常

ポリグルタミン病では病因蛋白質の集積によりヒストンのアセチル化を阻害し転写障害が生じると考えられているが、どのような遺伝子の転写障害が神経変性に繋がるかについては明らかにされていない。そこで、ヒストンのアセチル化によって発現が制御されている遺伝子群のうち、成熟ニューロンに対し強い生存維持作用を示す TGF-βシグナル伝達の SBMA における役割について検討した。TGF-βは受容体に結合して転写因子 Smad のリ

ン酸化および核内移行を促進し、成体神経細胞の生存や機能維持に寄与することが知られている。まず、SBMA モデルマウス脊髄の免疫組織化学およびウエスタンブロットを解析したところ、核内へのリン酸化 Smad2 の移行は、正常マウスに比べ発症前から有意に低下していた。脊髄内の TGF-β濃度は低下していないため、TGF-βシグナル伝達障害の原因として、II型 TGF-β受容体 (Tβ RII) に注目し、その発現を免疫組織化学およびウエスタンブロットにより解析したところ、SBMA モデルマウスの脊髄運動ニューロンでは発症前から発現が低下しており、その傾向はとくに変異 AR の核内集積を認める細胞において顕著にみられた。定量 RT-PCR では SBMA マウスにおける Tβ RII の mRNA レベルの低下が認められた。Tβ RII の発現はヒストンのアセチル化により調節されていることが知られているため、SBMA マウスにヒストン脱アセチル化阻害剤である酪酸ナトリウムを投与したところ、脊髄運動ニューロンにおける Tβ RII の発現増加およびリン酸化 Smad の核内移行の増加が認められた。次に、AR の N 末断片を培養細胞に強制発現させたところ、ポリグルタミンが延長した AR により Tβ RII の mRNA レベルが低下し、核内へのリン酸化 Smad2 の移行が阻害された。ルシフェラーゼによるレポーターアッセイを行ったところ、変異 AR による Tβ RII のプロモーター活性の低下が示された。培養細胞への変異 AR の強制発現による細胞死は、抗 TGF-β抗体 (中和抗体) によって増加し、Tβ RII の強制発現により抑制された。さらに、患者組織でも同様の変化が見られるか否かを検討したところ、SBMA 患者脊髄の運動ニューロンでは対照に比べ Tβ RII の発現が低下し、核内へのリン酸化 Smad2 の移行が低下していることが明らかとなった。以上より、変異 AR の核内集積により Tβ RII の転写が障害され TGF-βシグナル伝達が阻害されることが、SBMA における神経変性の病態に深く関与していると考えられた (Katsuno et al. *J Neurosci* 2010)。

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 10 件)

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 TGF-beta signaling in spinal and bulbar muscular atrophy. *J. Neurosci.* **30**, 5702-5712 (2010). 査読あり
2. Palazzolo, I., Stack, C., Kong, L.,

- Musaro, A., Adachi, H., Katsuno, M., Sobue, G., Taylor, J.P., Sumner, C.J., Fischbeck, K.H. & Pennuto, M. Overexpression of IGF-1 in muscle attenuates disease in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* **63**, 316-328 (2009). 査読あり
3. Katsuno, M., Adachi, H. & Sobue, G. Getting a handle on Huntington's disease, the case for cholesterol. *Nat. Med.* **15**, 253-254 (2009). 査読あり
 4. Iguchi, Y., Katsuno, M., Niwa, J., Yamada, S., Sone, J., Waza, M., Adachi, H., Tanaka, F., Nagata, K., Arimura, N., Watanabe, T., Kaibuchi, K. & Sobue, G. TDP-43 Depletion Induces Neuronal Cell Damage through Dysregulation of Rho Family GTPases. *J Biol Chem.* **284**, 22059-22066 (2009). 査読あり
 5. Banno, H., Katsuno, M., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Kawashima, M., Suga, N., Takamori, M., Ito, M., Nakamura, T., Matsuo, K., Yamada, S., Oki, Y., Adachi, H., Minamiyama, M., Waza, M., Atsuta, N., Watanabe, H., Fujimoto, Y., Nakashima, T., Tanaka, F., Doyu, M. & Sobue, G. Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann Neurol.* **65**, 140-150 (2009). 査読あり
 6. Tokui, K., Adachi, H., Waza, M., Katsuno, M., Minamiyama, M., Doi, H., Tanaka, K., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, F. & Sobue, G. 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in a SBMA model mouse. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 898-910 (2009). 査読あり
 7. Suzuki, K., Katsuno, M., Banno, H., Takeuchi, Y., Atsuta, N., Ito, M., Watanabe, H., Yamashita, F., Hori, N., Nakamura, T., Hirayama, M., Tanaka, F. & Sobue, G. CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA. *Brain* **131**, 229-239 (2008). 査読あり
 8. Adachi, H., Waza, M., Tokui, K., Katsuno, M., Minamiyama, M., Tanaka, F., Doyu, M. & Sobue, G. CHIP overexpression reduces mutant androgen receptor protein and ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model. *J. Neurosci.* **27**, 5115-5126 (2007). 査読あり
 9. Katsuno, M., Sang, C., Adachi, H., Minamiyama, M., Waza, M., Tanaka, F., Doyu, M. & Sobue, G. Pharmacological induction of heat-shock proteins alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 16801-16806 (2005). 査読あり
 10. Waza, M., Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Sang, C., Tanaka, F., Inukai, A., Doyu, M. & Sobue, G. 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration. *Nat. Med.* **11**, 1088-1095 (2005). 査読あり
- [学会発表] (計 5 件)
1. Iguchi, Y., Katsuno, M., Niwa, J., Yamada, S., Sone, J., Waza, M., Adachi, H., Tanaka, F., Nagata, K., Arimura, N., Watanabe, T., Kaibuchi, K. & Sobue, G. TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases. **Neuroscience 2009**, Chicago, USA, Oct 17-21, 2009.
 2. Banno, H., Katsuno, M., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Kawashima, M., Suga, N., Takamori, M., Ito, M., Nakamura, T., Matsuo, K., Yamada, S., Oki, Y., Adachi, H., Minamiyama, M., Waza, M., Atsuta, N., Watanabe, H., Fujimoto, Y., Nakashima, T., Tanaka, F., Doyu, M. & Sobue, G. Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy. **61th American Academy of Neurology Annual Meeting**, Seattle, USA, Apr25-May2, 2009.
 3. Adachi, H., Tokui, K., Waza, M., Katsuno, M., Minamiyama, M., Doi, H., Tanaka, F. & Sobue, G. An oral Hsp90 inhibitor ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model. **Neuroscience 2008**, Washington DC, USA, Nov 15-19, 2008.
 4. Katsuno, M., Adachi, H., Minamiyama, M., Waza, M., Tokui, K., Jiang, Y.M., Banno, H., Suzuki, K., Tanaka, F. & Sobue, G. Reversible disruption of retrograde axonal transport in spinal and bulbar muscular atrophy. **17th International Symposium on ALS/MND**. Yokohama, Japan, Nov

30-Dec 2, 2006.

5. Tanaka, F., Jiang, Y.M., Yamamoto, M., Huang, Z., Katsuno, M., Adachi, H., Niwa, J.I., Doyu, M. & Sobue, G. Gen expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **17th International Symposium on ALS/MND**. Yokohama, Japan, Nov 30-Dec 2, 2006.

[図書] (計 1 件)

1. Katsuno, M., Banno, H., Suzuki, K., Adachi, H., Tanaka, F. & Sobue, G. Clinical features and Molecular Mechanisms of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). In Diseases of DNA Repair. Shamim I. Ahmad ed. Landes Bioscience, Austin, USA, pp1-9, 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：球脊髄性筋萎縮症治療薬
発明者：祖父江 元、勝野 雅央、南山 誠
権利者：未定
種類：特許
番号：特願 2009-277101
出願年月日：2009 年 12 月 5 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

祖父江 元 (SOBUE GEN)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：2 0 1 4 8 3 1 5

(2) 研究分担者

田中 章景 (TANAKA FUMIAKI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：3 0 3 7 8 1 0 2

勝野 雅央 (KATSUNO MASAHISA)
名古屋大学・高等研究院・特任講師
研究者番号：5 0 4 0 2 5 6 6