

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2008～2009
 課題番号： 20700336
 研究課題名（和文） ポリグルタミン病に対する凝集阻害ペプチドの新規脳内デリバリーによる分子治療
 研究課題名（英文） Molecular therapy for the polyglutamine diseases using a novel brain delivery method of aggregate inhibitor peptides
 研究代表者
 ポピエル ヘレナ・明子 （Popiel Helena Akiko）
 国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部・流動研究員
 研究者番号： 40467593

研究成果の概要（和文）：

ポリグルタミン（PolyQ）病は蛋白質が脳内で凝集することが原因の神経疾患である。研究代表者はPolyQ病の治療薬開発を目指し、PolyQ病の凝集を抑える分子QBP1を同定したが、治療への応用にはQBP1の脳への移行効率が問題であった。本研究では、QBP1の脳への移行効率の改善を目指し（1）様々な分子の細胞内移行を可能にするPTD分子の中からQBP1の脳内移行を可能にするPTDを検討し、（2）QBP1を小さくするため、治療効果に必要なQBP1の部分を検討した。その結果（1）数種類のPTDはQBP1に付加すると脳内への移行が改善する可能性を示し、（2）治療効果に必要なQBP1の部位の同定に成功した。

研究成果の概要（英文）：

The polyglutamine (PolyQ) diseases are neurological diseases caused by protein aggregation in the brain. We previously identified QBP1, a molecule that inhibits PolyQ disease aggregation. However, for actual use of QBP1 as a therapy, its inefficient delivery to the brain was a problem. In this study, to improve brain delivery of QBP1, we (1) screened for PTDs, which are sequences that allow the delivery of various molecules into cells, that enable brain delivery of QBP1, and (2) to decrease the size of QBP1, we analyzed which part of QBP1 is required for its activity. As a result, we (1) found that fusion of some PTDs to QBP1 appears to enhance its brain delivery, and (2) determined the part of QBP1 required for its therapeutic effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学 生化学 神経内科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経科学、脳神経疾患、ドラッグデリバリー、血液脳関門、創薬、神経変性疾患、

ポリグルタミン病、凝集阻害

1. 研究開始当初の背景

近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン (PolyQ) 病など多くの神経変性疾患において、蛋白質のミスフォールディング・凝集が神経変性を引き起こすという共通の発症分子メカニズムが考えられるようになった。PolyQ 病はハンチントン病、種々の脊髄小脳失調症などの9つの遺伝性神経変性疾患の総称で、これらの疾患では変異遺伝子から翻訳される異常伸長 PolyQ 鎖を持つ変異蛋白質が構造異常を起こし、その結果難溶性の凝集体形成を経て最終的に封入体として神経細胞内に蓄積し、神経変性を引き起こすと考えられている。研究代表者らは異常伸長 PolyQ 蛋白質の凝集を治療標的として、これまでに異常伸長 PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1 (SNWKWPGIFD) を同定し、PolyQ 病モデルショウジョウバエに対する QBP1 の遺伝子発現による治療効果を示した (*Hum Mol Genet*, 2003)。さらに遺伝子発現ではなく、QBP1 の体外からの投与による治療法開発を目指し、ペプチド・蛋白質などの細胞内導入を可能にする細胞膜透過性ペプチド (PTD) に着目した。そして PTD を付加した PTD-QBP1 の体外からの投与により PolyQ 病モデルショウジョウバエに対する治療効果を示した (*Mol Ther*, 2007)。しかしモデルマウスに対しては、PTD-QBP1 の血液脳関門 (BBB) 透過性が十分ではなく、わずかな治療効果が得られたのみであった (*Neurosci Lett*, 2009)。

2. 研究の目的

本研究では、QBP1 を体外からの投与により BBB を通過し、脳内広範囲に効率良く到達する治療分子として開発するため、(1) BBB 透過効率の高い PTD-QBP1 を、BBB *in vitro* 再構築系 (BBB キット™, Nakagawa *et al. Cell Mol Neurobiol*, 2007) を用いてスクリーニングすることと (2) QBP1 の非ペプチド化、低分子化により、脳内移行性・生体内安定性に優れた物性を持つ QBP1 化合物アナログを設計し、PolyQ 病に対する創薬を目指す。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、以下の検討を行った。

(1) BBB 透過効率の高い PTD-QBP1 のスクリーニング : QBP1 の BBB 透過効率・脳内浸透性を改善するために、まず、HIV-1 の TAT やショウジョウバエの Antennapedia など様々な PTD、さらに PTD と細胞外分泌に必要なシグ

ナルの両方を持つ SecPen (Dupont *et al. J Biol Chem*, 2007) を付加した QBP1 を作製した。そしてこれらのペプチドの BBB 透過効率と BBB に与える影響を BBB キット™ を用いて検討し、ラット脳毛細血管内皮細胞を用いてペプチドの毒性を検討した。

(2) QBP1 の非ペプチド化・低分子化 : まず QBP1 の凝集阻害活性に必要な基本骨格を明らかにするため、QBP1 の様々なアミノ酸置換変異体 (アラニン置換体、D 体置換体) や欠失変異体 (N 末欠失、C 末欠失、N&C 末欠失変異体) を作製し、それらの PolyQ 凝集阻害活性を、精製 PolyQ 蛋白質を用いた *in vitro* 濁度測定法により検討した。

4. 研究成果

(1) BBB 透過効率の高い PTD-QBP1 のスクリーニング : まず TAT、Antennapedia および SecPen を付加した QBP1 と QBP1 単独の BBB 透過効率を BBB キット™ を用いて検討したところ、いずれの PTD も QBP1 の BBB 透過効率を改善させる可能性が示された。またラット脳毛細血管内皮細胞を用いた細胞毒性試験では、PTD を付加した QBP1 は 5 μM 以上の濃度で顕著な細胞毒性が確認された。さらに PTD-QBP1 は BBB キット™ に添加直後は BBB のバリアー機能の指標である TEER を減少させ、タイトジャンクション構成蛋白質である claudin-5 の発現パターンを変化させたため、BBB に影響を与えることが明らかとなった。しかし培地から PTD-QBP1 を除いて 24 時間後には TEER が回復したことから、PTD-QBP1 が BBB に与える影響は一過性であると考えられた。今後は PTD のアミノ酸置換体などの検討により、BBB 透過効率の高い PTD-QBP1 のデザインと、それを用いた PolyQ 病モデルマウスに対する治療効果の証明が期待される。

(2) QBP1 の非ペプチド化・低分子化 : アラニン置換体の *in vitro* PolyQ 凝集阻害活性結果から、QBP1 配列 (SNWKWPGIFD) 中の W3、W5、W5、I9、F10 が活性に必須であることが明らかとなり、芳香族官能基の重要性が示された。そしてすべての親水性アミノ酸 (S1、N2、K4、D11) は QBP1 の活性に不要であることから、QBP1 の疎水性が PolyQ 凝集阻害活性に重要であることが示唆された。そして QBP1 配列中のアミノ酸の立体特異性を調べるために D 体置換体を解析したところ、活性に不要であった K4 と P7 の位置には L 体構造が必須であることが示された。さらに欠失変異体

の結果から、QBP1の最小活性配列は中心の8アミノ酸(WKWWPGIF)であることが明らかとなった。今後はQBP1の活性に必須なアミノ酸骨格を基本としたQBP1化合物アナログのデザインと、それを用いたPolyQ病モデルマウスに対する治療効果の証明が期待される。

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 7件)

① Nagai Y, Fujikake N, Popiel HA, Wada K, Induction of molecular chaperones as a therapeutic strategy for the polyglutamine diseases, *Curr. Pharm. Biotech.*, 11, 188-197, 2010, 査読有

② Tomita K, Popiel HA, Nagai Y, Ohno H, Oishi S, Fujii N, Structure-activity relationship study on polyglutamine binding peptide QBP1, *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 188-197, 2010, 査読有

③ Okamoto Y, Nagai Y, Fujikake N, Popiel HA, Yoshioka T, Toda T, Inui T, Surface plasmon resonance characterization of specific binding of polyglutamine aggregation inhibitors to the expanded polyglutamine stretch, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 378, 634-639, 2009, 査読有

④ Popiel HA, Nagai Y, Fujikake N, Toda T, Delivery of the aggregate inhibitor peptide QBP1 into the mouse brain using PTDs and its therapeutic effects on polyglutamine disease mice, *Neurosci. Lett.*, 449, 87-92, 2009, 査読有

⑤ 永井義隆, ポピエル明子, 脊髄小脳変性症の遺伝子治療, *Clin. Neurosci.*, 27, 95-98, 2009, 査読無

⑥ Nagai Y, Popiel HA, Conformational changes and aggregation of expanded polyglutamine proteins as therapeutic targets of the polyglutamine diseases: exposed β -sheet hypothesis, *Curr. Pharm. Des.*, 14, 3267-3279, 2008, 査読有

⑦ Fujikake N, Nagai Y, Popiel HA, Okamoto Y, Yamaguchi M, Toda T, Heat shock transcription factor-1 activating compounds suppress polyglutamine induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones, *J. Biol. Chem.*, 283, 26188-26197, 2008, 査読有

[学会発表] (計 12件)

① ポピエル明子, ポリグルタミン病モデルマウスに対する凝集阻害ペプチド QBP1 を用いた遺伝子治療, 第 82 回日本生化学会, 2009.10.21, ポートアイランド, 神戸

② 永井義隆, 凝集阻害ペプチド QBP1 を用いたポリグルタミン病に対する分子標的治療法の開発, 第 54 回日本人類遺伝学会, 2009.9.23, グランドプリンスホテル高輪, 東京

③ Nagai Y, 17-AAG, an HSF1-activator, suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration via induction of molecular chaperones, 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, 2009.10.6, Gateaux Kingdom Hotel & Spa Resort, Sapporo, Japan

④ Fujikake N, Opposing effects of HSF1 expression on tau- and polyglutamine-induced neurodegeneration *in vivo*, 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, 2009.10.6, Gateaux Kingdom Hotel & Spa Resort, Sapporo, Japan

⑤ 永井義隆, 熱ショック転写因子 (HSF1) 活性剤は分子シャペロン群の発現を誘導し、ポリグルタミン病の神経変性を抑制する, 第 52 回日本神経化学会, 2009.6.22, 伊香保温泉ホテル天坊, 群馬

⑥ Nagai Y, Surface plasmon resonance as a useful technique for screening for specific polyglutamine aggregation inhibitors, 5th Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders, 2009.5.31, Waterville Valley Resort, USA

⑦ Popiel HA, Towards designing chemical analogues of the polyglutamine aggregation inhibitor peptide QBP1: a structure-activity relationship study on QBP1, 5th Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders, 2009.5.31, Waterville Valley Resort, USA

⑧ Fujikake N, Pharmacological activation of heat shock transcription factor 1 suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones, 5th Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders, 2009.5.31, Waterville Valley

Resort, USA

⑨ 岡本佑馬, 表面プラズモン共鳴法を用いた異常伸長ポリグルタミンタンパク質に対する凝集阻害分子の結合特異性の解析, 第51回日本神経化学会, 2008.9.11, 富山国際会議場, 富山

⑩ 藤掛伸宏, 17-AAGによる熱ショック転写因子の活性化はポリグルタミンが引き起こす神経変性を抑制する, 第31回日本神経科学会, 2008.7.9, 東京国際フォーラム, 東京

⑪ 永井義隆, ポリグルタミン蛋白質の毒性構造変移の捕捉—露出 β シート仮説の提唱—, 第31回日本神経科学会, 2008.7.9, 東京国際フォーラム, 東京

⑫ 永井義隆, 蛍光相関分光法を用いた細胞内ポリグルタミン蛋白質オリゴマーの検出とその阻害, 第49回日本神経学会, パシフィコ横浜, 横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r4/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ポピエル ヘレナ・明子 (Popiel Helena Akiko)

国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部・流動研究員

研究者番号: 40467593