

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390265

研究課題名（和文）複合的動物フェノタイプ解析システムによるポリグルタミン病治療薬開発  
 研究課題名（英文）Drug development for polyglutamine diseases by a combined phenotype analysis system

研究代表者

岡澤 均（OKAZAWA HITOSHI）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：50261996

研究成果の概要（和文）：私たちはフェノタイプおよび病態解析に有用で薬剤開発にも利用出来る複合的モデルシステムを戦略的に開発した。細胞モデル、ショウジョウバエモデル、マウスモデルで構成される複合的システムは、オミックス解析と組み合わせることで多くの結果を生み出すことが出来た。私たちは、新規病態として DNA 損傷修復障害を明らかにし、さらに HMGB, Ku70, Hsp70, Omi, Maxer などの主要分子を発見した。さらに、この解析システムを用いた薬剤スクリーニングで候補薬剤を同定した。

研究成果の概要（英文）：We developed strategically a combined model system for analyzing phenotypes and pathomechanisms and available for developing novel therapeutics of polyglutamine diseases. The system consisted of cell, fly and mouse models was very powerful when combined with omics analyses. We could elucidate a new pathomechanism of polyglutamine diseases, DNA repair impairment and could identify key molecules such as HMGB, Ku70, Hsp70, Omi and Maxer. Furthermore, we identified candidate drugs for polyglutamine diseases by using the combined analysis system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

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：神経分子病態学、ポリグルタミン病、ハイスループット

#### 1. 研究開始当初の背景

ポリグルタミン病はアルツハイマー病、パーキンソン病に次ぐ頻度を持つ神経変性疾患であり、根本的な治療法は存在していない。

#### 2. 研究の目的

したがって、治療薬の開発の為に、効率的かつ確実な動物・細胞レベルの病態モデルを開発することが、分子病態の理解とともに重要である。

#### 3. 研究の方法

マウス、ショウジョウバエ、培養神経細胞を複合的に組み合わせた複合的病態モデルを開発し、これらを基盤としたトランスクリプトーム、プロテオーム、インタラクトームなどのオミックス解析を行った。

#### 4. 研究成果

トランスクリプトーム、プロテオーム、インタラクトームの解析から、DNA 損傷修復という新規病態がポリグルタミン病の発症進行に大きな役割を果たしていることを明らかにし、Ku70, HMGB, Hsp70, Omi, Maxer がなかでも重要な分子であることを発見した。これらの分子によりショウジョウバエおよびマウスモデルで従来の報告を上回る顕著な治療成績を得ることができた。

#### 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 22 件)

1. Tagawa, K., Marubuchi, S., Qi, M. L., Enokido, Y., Tamura, T., Inagaki, R., Murata, M., Kanazawa, I., Wanker, E. E., and Okazawa, H. (2007). The induction levels of heat shock protein 70 differentiate the vulnerabilities to mutant huntingtin among neuronal subtypes. *J Neurosci.* 27, 868-880. doi:10.1523/JNEUROSCI.4522-06.200 査読有り
2. Qi, M. L., Tagawa, K., Enokido, Y., Yoshimura, N., Wada, Y., Watase, K., Ishiura, S., Kanazawa, I., Botas, J., Saitoe, M., Wanker, E. E., and Okazawa, H. (2007). Proteome analysis of soluble nuclear proteins reveals that HMGB1/2 suppress genotoxic stress in polyglutamine diseases. *Nature Cell Biol.* 9, 402-414. doi:10.1523/JNEUROSCI.4522-06.200 査読有り
3. Inagaki, R., Tagawa, K., Qi, M. L., Enokido, Y., Ito, H., Tamura, T., Shimizu, S., Oyanagi, K., Arai, N., Kanazawa, I., Wanker E.E, and Okazawa, H. (2008). Omi / HtrA2 is relevant to the selective vulnerability of striatal neurons in Huntington's disease. *Eur J Neurosci.* 28, 30-40. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06323.x, 査読有り
4. Enokido, Y., Yoshitake, A., Ito, H., and Okazawa, H. (2008). Age-dependent change of HMGB1 and DNA double-strand break accumulation in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 376, 128-133. doi:10.1016/j.bbrc.2008.08.108 査読有り
5. Takahashi, K., Yoshina, S., Masashi, M., Ito, W., Inoue, T., Shiwaku, H., Arai, H., Mitani, S., and Okazawa, H. (2009). Nematode homologue of PQBP1, a mental retardation causative gene, is involved in lipid metabolism. *PLoS One.* 4, e4104. doi:10.1371/journal.pone.0004104. 査読有り
6. Tamura, T., Sone, M., Yamashita, M., Wanker, E. E., and Okazawa, H. (2009). Glial cell lineage expression of mutant ataxin-1 and huntingtin induces developmental and late-onset neuronal pathologies in Drosophila models. *PLoS One.* 4, e4262. doi:10.1371/journal.pone.0004262 査読有り
7. Sone, M., Uchida, A., Komatsu, A.,

- Suzuki, E., Ibuki, I., Asada, M., Shiwaku, H., Tamura, T., Hoshino, M., Okazawa, H., and Nabeshima, Y. (2009). Loss of yata, a novel gene regulating the subcellular localization of APPL, induces deterioration of neural tissues and lifespan shortening. *PLoS One*. 4, e4466.  
doi:[10.1371/journal.pone.0004466](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004466)  
査読有り
8. Morimoto, N., Nagai, M., Miyazaki, K., Kurata, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Kamiya, T., Okazawa, H., and Abe, K. (2009). Progressive decrease in the level of YAPdeltaCs, prosurvival isoforms of YAP, in the spinal cord of transgenic mouse carrying a mutant SOD1 gene. *J Neurosci Res*. 87, 928-936.  
doi: 10.1002/jnr.21902、 査読有り
9. Takahashi, M., Mizuguchi, M., Shinoda, H., Aizawa, T., Demura, M., Okazawa, H., and Kawano, K. (2009). Polyglutamine tract binding protein-1 is an intrinsically unstructured protein. *Biochim Biophys Acta*. 1794, 936-943.  
[doi:10.1016/j.bbapap.2009.03.001](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.03.001)  
査読有り
10. Chin, J. H., Shiwaku, H., Goda, O., Komuro, A., and Okazawa, H. (2009). Neural stem cells express Oct-3/4. *Biochem Biophys Res Commun*. 388, 247-251.  
[doi: 10.1016/j.bbrc.2009.07.165](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.07.165)  
査読有り
11. Ito, H., Yoshimura, N., Kurosawa, M., Ishii, S., Nukina, N., and Okazawa, H. (2009). Knock-down of PQBP1 impairs anxiety-related cognition in mouse. *Hum Mol Genet*. 18, 4239-4254.  
doi: 10.1093/hmg/ddp378、 査読有り
12. Enokido, Y., Tamura, T., Ito, H., Arumughan, A., Komuro, A., Shiwaku, H., Sone, M., Foulle, R., Sawada, H., Ishiguro, H., Ono, T., Murata, M., Kanazawa, I., Tomilin, N., Tagawa, K., Wanker, E.E., and Okazawa, H. (2010). Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. *J Cell Biol*. 189, 425-443.  
doi: 10.1083/jcb.200905138  
査読有り
13. Takahashi, M., Mizuguchi, M., Shinoda, H., Aizawa, T., Demura, M., Okazawa, H., and Kawano, K. (2010). Polyglutamine tract-binding protein-1 binds to U5-15kD via a continuous 23-residue segment of the C-terminal domain. *Biochim Biophys Acta*. 1804, 1500-1507.  
doi:10.1016/j.bbapap.2010.03.007  
査読有り
14. Shiwaku, H., Yoshimura, N., Tamura, T., Sone, M., Ogishima, S., Watase, K., Tagawa, K., and Okazawa, H. (2010). Suppression of the novel ER protein Maxer by mutant ataxin-1 in Bergman glia contributes to non-cell-autonomous toxicity. *EMBO J*. 29, 2446-2460.  
doi:10.1038/emboj.2010.116  
査読有り
15. Honda, S., Hayashi, S., Imoto, I., Toyama, J., Okazawa, H., Nakagawa, E., Goto, Y., and Inazawa, J. (2010). Copy-number variations on the X chromosome in Japanese patients with mental retardation detected by array-based comparative genomic hybridization analysis. *J Hum Genet*. 55, 590-599.  
doi: 10.1038/jhg.2010.74  
査読有り
16. Konno, M., Hamazaki, T. S., Fukuda, S., Tokuhara, M., Uchiyama, H., Okazawa, H., Okochi, H., and Asashima, M. (2010). Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived

- mesenchymal stem cells in serum-free culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 400, 461-465.  
doi:10.1016/j.bbrc.2010.08.029  
査読有り
17. Tamura, T., Horiuchi, D., Chen, Y. C., Sone, M., Miyashita, T., Saitoe, M., Yoshimura, N., Chiang, A. S., and Okazawa, H. (2010). Drosophila PQBP1 regulates learning acquisition at projection neurons in aversive olfactory conditioning. *J Neurosci.* 30, 14091-14101.  
doi:10.1523/JNEUROSCI.1319-10.2010
18. Aoki, Y., Nakamura, A., Yokota, T., Saito, T., Okazawa, H., Nagata, T., and Takeda, S. (2010). In-frame Dystrophin Following Exon 51-Skipping Improves Muscle Pathology and Function in the Exon 52-Deficient mdx Mouse. *Mol Ther.* 18, 1995-2000、査読有り
19. Oka, T., Tagawa, K., Ito, H. and Okazawa, H. (2011). Dynamic Changes of the Phosphoproteome in Postmortem Mouse Brains. *PLoS One.* 6, e21405.  
doi:10.1371/journal.pone.0021405  
査読有り
20. Tamura, T., Sone, M., Iwatsubo, T., Tagawa, K., Wanker, E.E. and Okazawa, H. (2011). Ku70 alleviates neurodegeneration in Drosophila models of Huntington's disease. *PLoS One.* 6, e27408.  
doi: 10.1371/journal.pone.0027408  
査読有り
21. Nakamura, Y., Tagawa, K., Oka, T., Sasabe, T., Ito, H., Shiwaku, H., La Spada, A.R. and Okazawa, H. (2012). Ataxin-7 associates with microtubules and stabilizes the cytoskeletal network. *Hum Mol Genet.* 21 (5): 1099-1110.  
doi: 10.1093/hmg/ddr539、査読有り
22. Ress, M., Gorba, C., Gorba, C., de Chiara, C., Bui, T.T.T., Garcia-Maya, M., Drake, A.F., Okazawa, H., Pastre, A., Svergun, D. and Chen, Y.W. (2012). The solution model of the intrinsically disordered polyglutamine tract binding protein-1 (PQBP-1). *Biophys J.* in press
- [学会発表](計 130 件)
1. Okazawa, H., Qi, M. L. Proteome analysis of soluble nuclear proteins unravels a novel cell-protective role of HMGB1/2 to suppress genotoxic stress in the polyglutamine disease pathology. Gordon Research Conferences 2007 Meeting, CAG Triplet Repeat Disorders, Centre Paul Langevin, Aussois, France, 2007.5.13-18
  2. Okazawa, H., Qi, M. L. Proteome analysis of soluble nuclear proteins unravels a novel cell-protective role of HMGB1/2 to suppress genotoxic stress in the polyglutamine disease pathology Meeting on the Molecular Mechanisms of Neurodegeneration, Milano, Italy, 2007.5.19-21
  3. Luo, H., Okazawa, H. PQBP1 controls brain size through cell cycle regulation of neural stem cells. Days of Molecular Medicine 2008, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, 2008.4.17-19 (ポスター)
  4. Okazawa, H. Molecular Mechanisms of PQBP1-Linked MR and Microcephaly. 15<sup>th</sup> International Workshop on Fragile X and Other Early-Onset Cognitive Disorders, Harnack-House, Berlin, Germany, 2011.9.4-7

5. Okazawa, H. PQBP1, a new major causative gene for mental retardation and microcephaly, regulates gene expression through mRNA splicing. Elsevier Conference, RNA Binding Proteins in Neurological Disease, Sheraton National, Arlington, U.S.A., 2011.11.10-11

〔図書〕(計 20 件)

1. Okazawa, H. (2007). "POLYGLUTAMINE DISEASES" in Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neural Protein Metabolism and Function, Edited by A Lajtha, Springer (ISBN 9780387303468)

〔産業財産権〕

取得状況 (計 11 件)

1. 特許許可 (US Patent and Trade Office)  
Prophylactic/Therapeutic Agent for Neurodegenerative Disease.  
Inventor : Hitoshi Okazawa  
Application: National Corporation  
Tokyo Medical and Dental University  
Date : September 17, 2010  
Application Number : 12/313,837  
Issue Date: November 16, 2010  
Patent Number: 7833975
2. 特許登録 (European Patent Office)  
Prophylactic/Therapeutic Agent for Neurodegenerative Disease.  
Inventor : Hitoshi Okazawa  
Application : National Corporation  
Tokyo Medical and Dental University  
International Application Date : April 24, 2007  
Application Number : 07742308.5  
Issue Date : April 27, 2011  
Patent Number : 2039367
3. 特許登録 (US Patent and Trade Office)  
Gene Encoding a Protein and Preventive/Remedy for

Neurodegenerative Diseases such as Polyglutamine Diseases by Utilizing the Same

Inventor : Hitoshi Okazawa

Application : National Corporation  
Tokyo Medical and Dental University

International Application Date :  
November 16, 2005

Application Number : 11/791,053

Issue Date : May 31, 2011

Patent Number : 7951928

4. 特許登録 (European Patent Office)  
Novel Protein and Preventive/Remedy for Neurodegenerative Disease such as Polyglutamine Disease Using the Same  
Inventor : Hitoshi Okazawa  
Application : National Corporation  
Tokyo Medical and Dental University  
International Application Date :  
November 16, 2005  
Application Number : 05807046.7  
Issue Date : August 24, 2011  
Patent Number : 1878793

〔その他〕

- ・2007.3.26「東京医科歯科大、神経変性疾患、関連タンパク特定 - 治療法開発も」日本経済産業新聞
- ・2007.3.26「東京医科歯科大、JST、HMGB たんぱく質が神経細胞を正常な状態に保つ作用を発見」日経 Biotechnology Japan
- ・2007.4.2 「DNA 修復タンパクが減少 難病の治療につながる可能性」共同通信
- ・2007.4.2 「DNA 修復タンパクが減少 難病の神経変性疾患で」東京新聞
- ・2007.4.2 「DNA 修復タンパクが減少 難病の神経変性疾患で」京都新聞
- ・2010.4.28 プレスリリース「ハンチントン病の主要病態が DNA 損傷修復障害による神経変性であることを解明」—DNA 修復機能回復によるハンチントン病の新たな治療法の開発—
- ・2010.5.4「DNA 修復障害が原因 ハンチントン病 マウス実験で確認」産経新聞 朝刊

20 面

- ・2010.5.4 「神経の難病『ハンチントン病』原因の一端解明 医科歯科大など」日本経済新聞 朝刊 26 面
- ・2010.5.4 「ハンチントン病 損傷 DNA 修復を阻害 東京医科歯科大教授ら 原因たんぱく質解明」毎日新聞 朝刊 2 面
- ・2010.5.4 「ハンチントン病は DNA 修復障害 東京医科歯科大教授ら発表」共同通信
- ・2010.5.4 「神経難病の原因解明」東京新聞 3 面
- ・2010.5.4 「原因は DNA 修復障害 ハンチントン病 新たな治療法へ道 岡澤教授(東京医科歯科大)ら米誌発表」東奥日報 朝刊 15 面
- ・2010.5.4 「ハンチントン病 DNA 修復障害が原因」山形新聞 朝刊 19 面
- ・2010.5.4 「神経難病『ハンチントン病』DNA 修復障害が原因」茨城新聞 朝刊 17 面
- ・2010.5.4 「DNA の修復阻害 ハンチントン病 病態を解明 東京医歯大教授ら」静岡新聞 朝刊 21 面
- ・2010.5.4 「ハンチントン病の原因 DNA 修復機能せず 東京医科歯科大教授ら発表」信濃毎日新聞 朝刊 22 面
- ・2010.5.4 「神経難病『ハンチントン病』原因タンパク質 DNA 修復障害 東京医歯大教授ら確認」愛媛新聞 朝刊 3 面
- ・2010.5.4 「神経難病ハンチントン病 DNA 修復障害原因 東京医歯大教授ら発表」宮崎日日新聞 朝刊 5 面
- ・2010.5.4 「神経難病ハンチントン病 DNA 修復障害が原因」大分合同新聞 朝刊 3 面
- ・2010.5.7 「ハンチントン病の発症に DNA 修復蛋白 Ku70 が関与 東京医科歯科大グループが発表、治療法の開発に光明か」メディカルトリビューン
- ・2010.5.7 「ハンチントン病 原因解明 東京医科歯科大 DNA 修復の酵素不足」読売新聞 夕刊 16 面
- ・2010.5.21 「ハンチントン病の発症解明」朝日新聞 25 面
- ・2010.6.8 プレスリリース(JST と共同)「小

脳変性に関与する分子メカニズムを解明(神経変性疾患の治療開発につながる事が期待)」

- ・2010.6.9 「小脳の神経細胞変性 分子メカニズム解明 東京医科歯科大」日刊工業 21 面
- ・2010.6.25 「『1 リットルの涙』難病の原因に迫る」朝日新聞 朝刊 33 面
- ・2010.10.20 「東京医科歯科大学、NMDA 受容体の NR1 サブユニットの減少がポリグルタミン病による認知障害に関連」BTJ アカデミック

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者 岡澤 均(OKAZAWA HITOSHI)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授  
研究者番号：5 0 2 6 1 9 9 6

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

田川一彦、田村拓也、戚美玲、伊藤日加瑠、塩飽裕紀、榎戸靖、曾根雅紀