

令和 5 年 6 月 24 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15704

研究課題名（和文）進行性ミオクローヌステんかんの進行を止める病態抑止治療の開発

研究課題名（英文）The development of disease-modifying therapies for progressive myoclonus epilepsy

研究代表者

豊田 知子 (Toyota, Tomoko)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：30596432

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ポリグルタミン病である歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)は、atrophin-1遺伝子内のCAGリピートの異常延長により病因蛋白質の神経組織内への異常な蓄積が生じて神経変性が惹起され、臨床的に進行性ミオクローヌステんかんを呈する。フラボノールの一つであるケンペロールの投与によって、細胞モデルではオートファジーの活性化による病因蛋白質である変異したatrophin-1蛋白質の減少効果がみられ、リン酸化beclin-1の発現が上昇し、オートファジーが活性化した。ポリグルタミン病であるDRPLAマウスモデルにケンペロールを6週齢より連日投与したが表現型に変化はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリグルタミン病などの神経変性疾患では変異蛋白質が凝集して蓄積し、この過程に神経毒性が存在し神経変性が惹起される。有効な治療法は、病因蛋白質の異常な凝集を抑制したり、蓄積する量を減らすことで達成される。ケンペロール(kaempferol:KF)は、茶、フルーツ、野菜、及び豆類等をはじめとする多くの植物に含まれる天然フラボノールである。本研究では、KFにオートファジーを活性化作用を見だし、異常蛋白質の蓄積に起因する疾患の新規治療法の可能性を探索し、KFが病因蛋白質の分解を促進することにより、ポリグルタミン病などで神経機能障害を改善させる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：The juvenile-onset dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) presents progressive myoclonic epilepsy (PME). Kaempferol, a kind of flavonol, have a wide range of pharmacological activities. In this study, we investigated the effectiveness of kaempferol in the cell and mouse models of DRPLA. Kaempferol decreased the expression of the mutant atrophin-1. The expression of the autophagic marker LC-3 II and phosphorylated beclin-1 was significantly elevated in the cells after treatment with kaempferol. Kaempferol also decreased the expression of p62. Kaempferol was administrated every day at the doses of 10 or 30 mg/kg to the DRPLA transgenic mice carrying the full-length human atrophin-1 with Q113 via oral gavage from the early stage. Unfortunately, kaempferol did not demonstrate any behavioral changes in the mouse model. These findings demonstrated that kaempferol induced autophagosome formation and enhanced the preferential degradation of the disease-causative proteins.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経変性疾患 ポリグルタミン病 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 進行性ミオクローヌステんかん  
オートファジー フラボノール ケンペロール 蛋白質分解

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) 進行性ミオクローヌスてんかんとオートファジー

「ミオクローヌス」と「てんかん」の関連性は 1822 年には認識されていたが、近年の「進行性ミオクローヌスてんかん(PME)」の歴史は 1989 年の「マルセイユ進行性ミオクローヌスてんかんワークショップ」に端を発する。PMEs はミオクローヌス、てんかん及び認知症等の進行性神経症状を呈する疾患の総称であり、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)の若年型・早期成人型、myoclonic epilepsy with ragged red fibers (MERRF)、神経セロイドリポフスチン症の後期乳児型、若年型、成人型、Unverricht-Lundborg 病、Lafora 病、Gaucher 型、シアリドーシス 型、ガラクトシアリドーシス、ガラクトシアリドーシス 型などが含まれる。DRPLA は 1982 年に日本人によって報告され、日本人に多い疾患である。また、DRPLA は他の PME と異なり、choreoathetosis 等の不随意運動を示し、atrophin-1 遺伝子変異によるポリグルタミン病の一つである。PME は一般的に若年で発症する進行性疾患で予後不良の転帰を辿るが、根本的治療法がない。Lafora 病では serum/glucocorticoid-induced kinase1(SGK1)を抑制することで、グリコーゲンの凝集を抑制し、mTOR 活性化を阻害し、オートファジーの欠損を改善することが報告されている。DRPLA も Lafora 病と同じように神経細胞内封入体がみられる、常染色体優性遺伝性の神経変性疾患であり、Lafora 病と多くの共通点をもつ PME である。DRPLA においても mTOR カスケードが病態に関与している可能性がある。

我々はこれまでに、神経変性疾患の一つである球脊髄性筋萎縮症(SBMA)のトランスジェニックモデルマウスを作成し、このマウスでオートファジーのアプター分子である p62 の発現量を変化させたり、分子シャペロン Hsp70, Hsp90, Hsp105 などの発現を増加させたり、その機能を調節したりすることによって、神経変性疾患モデルマウスの神経機能障害の改善や神経細胞内への変異蛋白質の蓄積が押さえられることを明らかにしてきた。

### (2) 変異蛋白質分解系の調節促進因子と治療への展開

本研究では、これまでの研究をさらに発展させて、フラボノールによる強力な治療法の開発を目指した。今回用いたケンペロールは、茶、フルーツ、野菜、及び豆類等をはじめとする多くの植物に含まれる天然フラボノールである。ケンペロールは、抗酸化、抗炎症、抗がん、抗糖尿病、抗骨粗鬆症、及び抗アレルギー活性等の様々な薬理作用を有しており、とりわけ、強い抗酸化作用が注目されている。また、ケンペロールは、NADPH oxidase (NOX)への結合により、神経変性を予防し得る可能性が示唆されている。

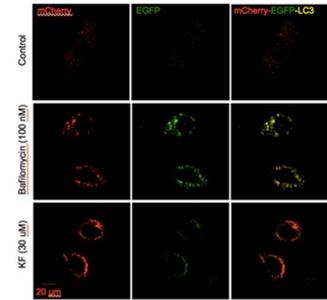
## 2. 研究の目的

### (1) 変異蛋白質分解系活性化による治療効果の検討

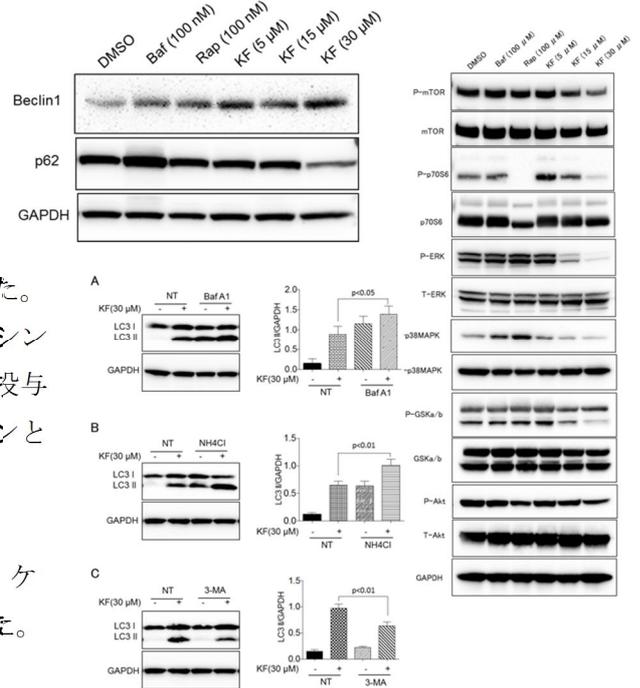
オートファジーと分子シャペロン-ユビキチン・プロテアソーム系(UPS)は、細胞内の変異蛋白質を分解するシステムとして重要であるが、多くの神経変性疾患では、神経変性の原因となる変異蛋白質が、このオートファジーと UPS の機能を凌駕して神経組織内で不溶性の凝集体を形成したり、あるいは蓄積する過程で細胞毒性をもたらす、神経細胞が変性し細胞死に至る。オートファジーは、細胞内でこれらの異常な蛋白を分解するシステムとして重要な役割を果たしており、この機能を効率よく利用することで副作用の少ない有効な神経変性疾患の治療を開発することができると考えられる。多くの神経変性疾患は、中年期以降に発症し、加齢と共にこれらの蛋白質分解系の機能が衰えてくるのが成人発症の一つの



(2) mCherry-EGFP-LC3 レポーターベクターを導入した HeLa 細胞をチャンバースライド上で培養し、100nM のバフィロマイシン、又は 30  $\mu$ M のケンペロールを投与した。ケンペロールの投与により、EGFP のシグナルが減少し、オートライソソームの形成が促進された。

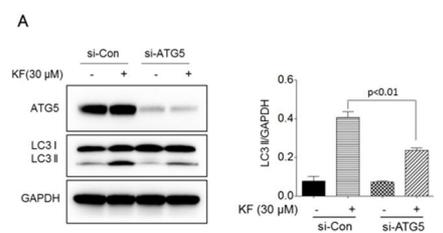


(3) Neuro2a 細胞にケンペロール(0、5、15、30  $\mu$ M)、100nM のバフィロマイシン、100nM のラパマイシンを投与した。ケンペロールは用量依存的に各タンパク質のリン酸化を抑制した。ケンペロールは用量依存的に Beclin1 の発現量を増加させた一方で、p62 の発現量を減少させた。

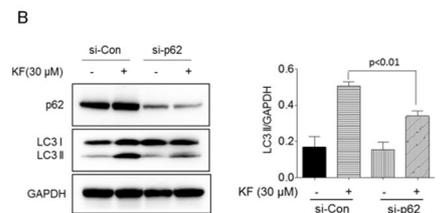


(4) Neuro2a 細胞に、30  $\mu$ M のケンペロール、及び (A)100nM のバフィロマイシン、(B)20mM の  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、又は(C)50mM の 3-メチルアデニン(3-MA)を投与した。LC3-II の発現量は、ケンペロールとバフィロマイシンとの同時投与、又はケンペロールと  $\text{NH}_4\text{Cl}$  との同時投与では増加したが、ケンペロールと 3-メチルアデニンとの同時投与では減少した。

(5) Atg5 又は p62 の siRNA によるノックダウンは、ケンペロールによる LC3-II の発現量の増加を抑制した。



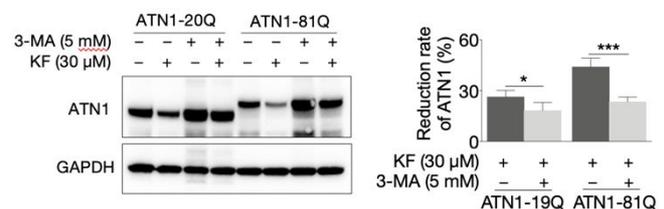
(6) Neuro2a 細胞に ATN1-20Q と ATN1-81Q ベクターをトランスフェクションした。12 時間後に当該細胞に 30  $\mu$ M のケンペロールと 50 mM の 3-メチルアデニン(3-MA)を同時に投与した。投与後 12 時間の時点で該細胞を回収した。ケンペロールによる atrophin-1 タンパク質の分解促進作用は、3-メチルアデニンによって抑制された。



(7) DRPLA マウスモデルにケンペロールを 6 週齢より 30mg/kg の投与量で連日投与したが表現型に変化はみられなかった。

### (8)まとめ

ポリグルタミン病などの神経変性疾患では変異蛋白質が凝集して蓄積し、この過程に神経毒性が存在し神経変性が惹起される。有効な治療法は、病因蛋白質の異常な凝集を抑制したり、蓄積する量を減らすことで達成される。ケンペロールは、茶、フルーツ、野菜、及び豆類等をはじめとする多くの植物に含まれる天然フラボノールである。本研究では、ケンペロールにオートファジーを活性化作用を見だし、異常蛋白質の蓄積に起因する疾患の新規治療法の可能性を探索し、ケンペロールが病因蛋白質の分解を促進することにより、ポリグルタミン病などで神経機能障害を改善させる可能性を示した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Mizuguchi T, Toyota T, Miyatake S, Mitsuhashi S, Doi H, Kudo Y, Kishida H, Hayashi N, Tsuburaya RS, Kinoshita M, Fukuyama T, Fukuda H, Koshimizu E, Tsuchida N, Uchiyama Y, Fujita A, Takata A, Miyake N, Kato M, Tanaka F, Adachi H, Matsumoto N. | 4. 巻<br>144               |
| 2. 論文標題<br>Complete sequencing of expanded <i>SAMD12</i> repeats by long-read sequencing and Cas9-mediated enrichment  | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Brain  | 6. 最初と最後の頁<br>1103 ~ 1117 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/brain/awab021  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)  | 国際共著<br>-                 |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Qiang Q, Skudder-Hill L, Toyota T, Wei W, Adachi H.   | 4. 巻<br>12          |
| 2. 論文標題<br>CSF GAP-43 as a biomarker of synaptic dysfunction is associated with tau pathology in Alzheimer ' s disease. | 5. 発行年<br>2022年     |
| 3. 雑誌名<br>Sci Rep   | 6. 最初と最後の頁<br>17392 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-022-20324-2  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)   | 国際共著<br>-           |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>豊田 知子、足立弘明                           | 4. 巻<br>51          |
| 2. 論文標題<br>良性成人型家族性ミオクローヌスてんかんの臨床所見及び脳波所見の特徴   | 5. 発行年<br>2023年     |
| 3. 雑誌名<br>臨床神経生理学                              | 6. 最初と最後の頁<br>42-50 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1142/jscn.51.42 | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)          | 国際共著<br>-           |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>豊田知子、黄 哲、岡田和将、佐藤俊哉、辻 省二、足立弘明  |
| 2. 発表標題<br>Perampanel improves the epilepsy phenotype by the phosphorylation of GluA1 in the DRPLA transgenic mice |
| 3. 学会等名<br>第62回日本神経学会学術大会  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>足立 弘明、強 強、豊田 知子、勝野 雅央、祖父江 元   |
| 2. 発表標題<br>Emodin alleviates SBMA phenotype via down regulation of androgen receptor |
| 3. 学会等名<br>第45回日本神経科学大会  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>足立弘明、黄 哲、豊田知子          |
| 2. 発表標題<br>神経変性疾患の病因蛋白質の分解亢進による治療 |
| 3. 学会等名<br>第16回 日本臨床ストレス応答学会      |
| 4. 発表年<br>2022年                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Qiang Q, Toyota T, Katsuno M, Sobue G, Adachi H.  |
| 2. 発表標題<br>Emodin alleviates the spinal and bulbar muscular atrophy phenotype via down regulation androgen receptor. |
| 3. 学会等名<br>PACTALS 2021 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Adachi H, Qiang Q, Huang Z, Toyota T, Katsuno M, Sobue G                  |
| 2. 発表標題<br>Emodin alleviates SBMA phenotype via down regulation of androgen receptor |
| 3. 学会等名<br>Neuroscience 2022 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|