

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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：24402
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2010年度～2012年度
 課題番号：22390056
 研究課題名（和文）滑脳症治療薬開発に向けた新戦略

研究課題名（英文）New strategy for lissencephaly therapeutic medicine development.

研究代表者

山田 雅巳 (YAMADA MASAMI)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：10322851

研究成果の概要（和文）：本研究課題は、「滑脳症発症機構の分子レベルでの解明」と「滑脳症治療薬の開発」からその治療戦略の確立に挑んだ。新規カルパイン阻害薬探索の結果、SNJ1945を滑脳症治療薬の有力候補とした。SNJ1945による滑脳症モデル動物に対する個体レベルでの症状改善は、滑脳症の治療薬開発が大いに期待できる。

さらに、蛍光分子イメージングにより、神経細胞内の微小管上での分子動態を可視化し、Rab6aによるダイニンの活性化機構とLIS1機能不全の関係を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Toward a therapeutic intervention of lissencephaly, we applied a novel calpain inhibitor, SNJ1945. Peri-natal or post-natal treatment with SNJ1945 rescued defective neuronal migration in *Lis1*^{-/-} mice, impaired behavioral performance. Thus, SNJ1945 is a potential drug for the treatment of human lissencephaly patients.

On the other hand, cytoplasmic dynein drives the movement of a wide range of cargoes towards the minus ends of microtubules. We previously demonstrated that LIS1 forms an idling complex with dynein, which is transported to the plus ends of microtubules by kinesin motors. Here, we revealed a surprising function for GTP-bound Rab6a as an activator of stalled dynein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2012年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：LIS1、カルパイン阻害剤、滑脳症、神経遊走、細胞内物質輸送、細胞質ダイニン

1. 研究開始当初の背景

ヒト滑脳症は、脳回の欠如、神経細胞の層構造の異常を伴う中枢神経系の代表的な

疾患の一つである。その発生頻度は、新生児1万5千人に1人の割合で、臨床的には重度の精神遅滞、てんかん発作等を主な症

状とする。滑脳症は先天的な疾患であり、対症療法を除外すれば、根本的な治療方法は未だ確立されていない。ヒト脳において神経細胞は、発生初期に分化し、本来機能すべき場所にダイナミックに移動(神経細胞の遊走)されることで正常な六つの層構造が形成される。滑脳症は、この神経細胞の遊走が阻害されることで正常な脳の層構造が構築できず(四層)、さまざまな異常をきたすことに起因すると考えられている。その原因遺伝子としては、いくつかの遺伝子が同定されているが、全体の60%は染色体17番目にあるLIS1遺伝子のヘテロ変異によることが知られている。これまでに私たちは、LIS1およびその結合蛋白質としてNDEL1を同定し、これらが共に細胞内に於いて中心体周辺に高頻度に局在すること、微小管モーター蛋白質の一つである細胞質ダイニンの輸送を制御していることを報告した。これらの結果より、滑脳症は、LIS1の機能不全が細胞質ダイニンを介した核移動、オルガネラ分布、微小管ネットワーク形成の異常をもたらし、神経細胞の遊走の異常を引き起こすことで発症すると考えることができる。さらに私たちは、細胞質ダイニンがキネシン依存的にLIS1/細胞質ダイニン/transportable microtubule (tMT)複合体を形成して微小管上を順行性(核周辺から細胞辺縁の方向へ)に輸送されることを報告した。このことから、LIS1は、細胞質ダイニンを微小管上に乗せてリサイクル輸送させる過程において重要な役割を果たしているという新しいモデルを提唱するに至った。また、LIS1は、細胞質ダイニンを微小管のプラス端までリサイクルし送り届けた後、タンパク質分解酵素の一種であるカルパインによって分解されていることが、カルパイン阻害剤とRNA干渉による実

験結果から明らかになった。カルパインは、細胞内モジュレータープロテアーゼの代表の一つであり、細胞内情報伝達系を制御する為、その活性異常と筋ジストロフィー、糖尿病、ガン、アルツハイマー病などの様々な病態の関連が注目を集め、近年、カルパインの特異的阻害剤や活性化剤が薬剤の開発に繋がる可能性は大いに期待できると考えられている。私たちは、カルパインの阻害剤が滑脳症の疾患モデルマウスであるLIS1ヘテロ欠損マウスにおいても、タンパク質、細胞、組織および行動実験のそれぞれのレベルにおいて、滑脳症(様)症状を改善させ、正常マウスにはほとんど副作用を及ぼさなかったことから、滑脳症の治療に適用できるのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

ヒト滑脳症は、中枢神経系の形成異常を伴う代表的な遺伝疾患の一つであり、臨床的には重度の精神遅滞、てんかん発作等を主な症状とする。現状では、この滑脳症に対する有効な治療方法は未だ確立されておらず、対症療法に依存するのみである。私たちは、滑脳症の発症が原因遺伝子LIS1のヘテロ変異に起因することから、LIS1の機能に着目して研究を進めてきた。これまでに、滑脳症の原因遺伝子LIS1が、微小管モータータンパク質である細胞質ダイニンのリサイクルの過程を制御していること、タンパク質分解酵素の1つであるカルパインによって細胞質ダイニンのリサイクル後に分解されることを報告している。本研究課題は、滑脳症のモデルマウス(LIS1ヘテロ欠損マウス)を用いて、カルパイン阻害薬による滑脳症治療薬を開発と滑脳症の発症分子機構の解明の2つの立場から、これまでの研究をさらに発展させ、新たな滑脳症の治療法

を開発することを目指す。さらには、滑脳症と同様のハプロ不全による遺伝子疾患についての新しい治療戦略の概念を確立する。

3. 研究の方法

(1) 新規カルパイン阻害薬の探索

新規カルパイン阻害薬の薬剤スクリーニングとしては、滑脳症モデル(*LIS1* ヘテロ欠損)マウス由来の小脳顆粒細胞を用いたインビトロ神経細胞遊走活性を指標にして創薬探索を行った。この薬剤スクリーニングにより選抜された SNJ1945 については、組織レベルでの症状(神経細胞死、神経細胞の遊走、海馬での層構造の形成)の改善を確認した。また、個体レベルの滑脳症の改善の評価については、滑脳症モデルマウスを用いて、カルパイン阻害薬の効果を行動解析実験により調べた。具体的には、一般的な身体検査項目に加えて握力測定テスト、握力と運動能力を測定するワイヤ・ハングテスト、協調運動と運動学習能力を評価するローターロードテスト、運動能力の異常や小脳失調を調べることができる歩行解析の Gait Analysis を行い、治療薬としての有効性と安全性を総合的に評価した。

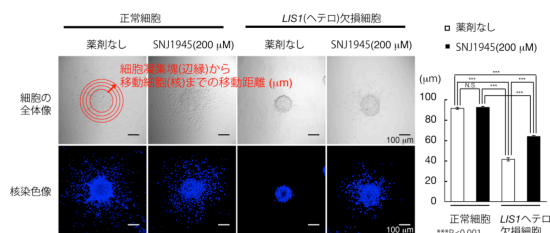
(2) Rab6a による細胞質ダイニン活性化機構の解明

私たちがこれまでに同定した *LIS1*/細胞質ダイニンを含む順行性複合体の形成を制御する新規因子を蛍光微小管インビトログライディングアッセイにより探索した。具体的には、細胞質ダイニンの輸送活性に対する *LIS1* の阻害活性を解除する活性によって新規(活性)因子を探索した。また、神経細胞内での微小管モーター分子あるいは輸送基質(Cargo)を直接観察できる *in situ* 蛍光イメージングシステム(蛍光1分子イメージングと蛍光相互相関分光法(FCCS))により、平均速度、拡散係数、微小管上での

方向性、輸送の特性、分子間相互作用等を解析・評価できる実験系)を確立した。これにより、上記の蛍光微小管インビトログライディングアッセイを用いて新規に同定した Rab6a と *LIS1* およびダイニンの神経終末における相関関係を調べた。

4. 研究成果

私たちは、先天性神経疾患である滑脳症の新治療薬のターゲットとして、その原因遺伝子 *LIS1* に着目して研究を推進しており、*LIS1* がタンパク質分解酵素の1つであるカルパインによって分解されること、カルパイン阻害薬が滑脳症疾患モデル(*LIS1* ヘテロ欠損)マウスでみられる滑脳症(様)症状を個体レベルで改善させることを独自に発見した。現状に於いて、ヒト滑脳症に対する根本的な治療法は未だ確立していないことから、カルパイン阻害薬の滑脳症治療薬として治験・実用化に向けての開発は重要性が高く且つ喫緊の課題である。本研究課題に於いて、私たちがカルパイン阻害薬の薬剤一次スクリーニングとして確立した滑脳症疾患モデル(*LIS1* ヘテロ欠損)マウス由来の小脳の顆粒細胞を用いた簡便且つ再現性の高いインビトロ神経細胞遊走活性を指標に新規カルパイン阻害薬として SNJ1945 を同定した(図1参照)。



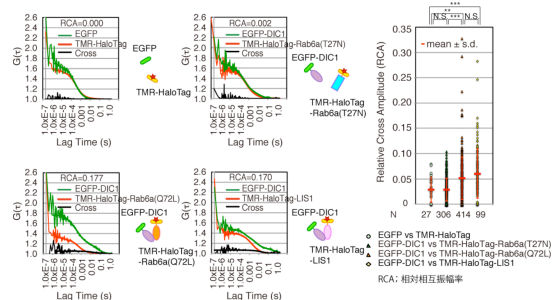
【図1】小脳顆粒細胞による神経細胞遊走アッセイとカルパイン阻害薬の効果

さらに、の薬効(毒性)について細胞、組織、個体の各レベルで詳細に検討した。その結果、SNJ1945 は、*LIS1* ヘテロ欠損マウス由来の神経細胞に於いて、著しく低下していた *LIS1* タンパク質の発現量と遊走活性をほぼ正常レベルまで改善させることがわかった。

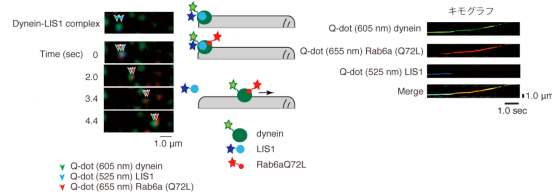
さらに、SNLJ1945 は、マウスの行動解析実験 (RotaRod テスト、Gait analysis テスト等) の結果、滑脳症疾患モデルマウスに観られる運動失調、学習障害、鬱様行動等の行動異常を顕著に改善させることがわかった。さらに、SNJ1945 は生体に於いて、脳-血液関門を通過することから妊娠中の母体への経口投与でその薬効が認められたのみならず、生後新生児への強制経口投与によっても滑脳症様症状の改善が確認できたこと、カルパインに対する特異性の高さによる低毒性からも、ヒト滑脳症治療薬の治験・実用化に向けての期待が高まった (Toba et al., *Scientific Reports*, 2013)。

次に本研究課題は、滑脳症原因遺伝子 *LIS1* の機能不全による「細胞内物流の攪乱・破綻」に起因する「神経細胞遊走の欠如」の観点から滑脳症発症メカニズムを解明することに挑んだ。これまでに私たちは、*LIS1* が微小管モータータンパク質の一つである細胞質ダイニンをアイドリング状態で微小管プラス端 (神経終末) までリサイクルしていることを明らかにしてきた。本研究課題に於いては、神経細胞終末での細胞質ダイニンの活性化メカニズムを蛍光分子イメージングにより解明することを目的とした。これらの神経細胞内における分子ダイナミクスが、神経細胞遊走という力学的現象を如何にして制御しているかを解明することは、神経細胞遊走障害を伴う先天性疾患の発症メカニズムの解明のためには意義があり、重要性も高い。具体的には、インビトロ蛍光標識微小管グライディングアッセイによるスクリーニングの結果、低分子量 GTPase Rab6a を *LIS1*・細胞質ダイニン複合体の再編成過程を制御している候補因子として同定することができた。低分子量 GTPase Rab6 の神経細胞内での機能的役割を蛍光相互相関分光法 (FCCS) (図 2 参照)、

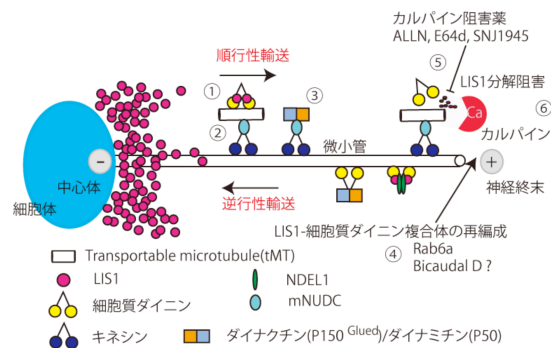
蛍光 1 分子イメージングによる *in situ* 蛍光分子イメージング、量子ドット蛍光標識による *in vitro* 微小管トランスポートアッセイ (図 3 参照)、微小管共沈法、免疫沈降法等により詳細に検討した。これらより、活性型低分子量 GTPase Rab6a は、神経細胞終末領域で、*LIS1* によってリサイクルされてきた細胞質ダイニンに直接結合することによって活性化し、細胞質ダイニン自身が微小管モーター分子として働く逆行性輸送複合体を形成するという新しい微小管モータータンパク質の分子制御メカニズムを示すことができた (図 4 参照) (Yamada et al., *Nature Communications*, in press)。



[図2] 蛍光相互相関分光法(FCCS)によるマウス後根神経節細胞終末に於ける分子間相互作用解析



[図3] 量子ドット(Q-dot)標識によるin vitro微小管トランスポートアッセイ



[図4] LIS1による細胞質ダイニンの輸送制御モデル

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9件)

- ① **Masami Yamada**, Kanako Kumamoto, Shintaro Mikuni, Yoshiyuki Arai, Masataka Kinjo, Takeharu Nagai, Yoshikazu Tsukasaki, Tomonobu M. Watanabe, Mitsuru Fukui, Mingyue Jin, Shiori Toba and Shinji Hirotsune;
Rab6a releases LIS1 from a dynein idling complex and activates dynein for retrograde movement.
Nature Communications, 査読有 (in press).
- ② Shiori Toba, Yasuhisa Tamura, Kanako Kumamoto, **Masami Yamada**, Keizo Takao, Satoko Hattori, Tsuyoshi Miyakawa, **Yosky Kataoka**, Mitsuyoshi Azuma, Kiyoshi Hayasaka, Masano Amamoto, Keiko Tominaga, Anthony Wynshaw-Boris, Mitsuhiro Kato and Shinji Hirotsune;
Post-natal therapeutic intervention for lissencephaly using a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945
Scientific Reports, 査読有 3, doi:10.1038/srep 01224 (2013).
- ③ **山田雅巳**
LIS1による細胞内ロジスティクスと滑脳症発症メカニズム
新学術領域研究・細胞内ロジスティクス班・ニュースレター pp3-7 (2013).
- ④ **山田雅巳**
蛍光一分子イメージングを用いた LIS1 の細胞内ロジスティクスと滑脳症発症機構の解明
物質・デバイス領域共同研究拠点研究成果報告集 pp77-78(2011).
- ⑤ **山田雅巳**
カルパイン阻害剤による滑脳症の治療
上原記念生命科学財団・研究報告集 vol. 25, p71(2011).
- ⑥ **山田雅巳**
LIS1による細胞内ロジスティクスと滑脳症の関係
「生物物理」 査読有 vol. 51(6), pp268-269 (2011).

- ⑦ **Masami Yamada**, Shinji Hirotsune and Anthony Wynshaw-Boris;
A novel strategy for therapeutic intervention for the genetic disease; Preventing proteolytic cleavage using small chemical compound.
The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 査読有 vol. 42(9), pp1401-1407(2010).
- ⑧ **Masami Yamada**, Shinji Hirotsune and Anthony Wynshaw-Boris;
A therapeutic intervention of gene disease by augmented recycling of target genes.
Future Neurology, 査読有 vol. 5(1), pp5-8 (2010).
- ⑨ **Masami Yamada**, Shinji Hirotsune and Anthony Wynshaw-Boris;
The essential role of LIS1, NDEL1 and Aurora-Ain polarity formation and microtubules organization during neurogenesis.
Focal Adhesion and migration, 査読有 vol. 4(2), pp180-184 (2010).

[学会発表] (計9件)

- ① **山田雅巳**
カルパイン阻害薬の *in vitro* 神経細胞遊走活性による探索
科学技術振興機構 (JST) ・新技術説明会 優良シーズ発表会, 東京(2013年2月25日).
- ② **Masami Yamada**
Rab6a releases LIS1 from a dynein idling complex and activates dynein for retrograde movement.
第85回日本生化学会年会, 福岡(2012年12月16日).
- ③ **Masami Yamada**
Rab6a releases LIS1 from a dynein idling complex and activates dynein for retrograde movement.
第35回日本分子生物学会年会, 福岡(2012年12月13日).
- ④ **山田雅巳**
LIS1による細胞内ロジスティクスと滑脳症発症の関係
文部科学省 科学研究費「新学術領域研究」第4回「細胞内ロジスティクス」班会議, 仙台 (2012年6月15日).

⑤ **Masami Yamada**, Takako Takitoh,
Shinji Hirotsune
Inhibition of calpain increases
LIS1(PAFAH1B1) and partially rescues
in vivo phenotypes in a mouse model of
lissencephaly.
第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜
(2011 年 12 月 17 日).

⑥ **Masami Yamada**, Takako Takitoh,
Shinji Hirotsune
Inhibition of calpain increases
LIS1(PAFAH1B1) and partially rescues
in vivo phenotypes in a mouse model of
lissencephaly.
第 84 回日本生化学会年会, 京都
(2011 年 9 月 23 日).

⑦ **Masami Yamada**
Inhibition of calpain increases
LIS1(PAFAH1B1) and partially rescues
in vivo phenotypes in a mouse model of
lissencephaly.
第 63 回日本細胞生物学会大会,
札幌 (2011 年 6 月 29 日).

⑧ **山田雅巳**
LIS1 による細胞内ロジスティックス
滑脳症発症の関係
文部科学省 科学研究費
「新学術領域研究」
第 3 回「細胞内ロジスティックス」
班会議, 三重 (2011 年 6 月 1 日).

⑨ **Masami Yamada**
A novel mechanism of plus-end-
directed transport of cytoplasmic
dynein and dynactins by kinesin-1.
The role(s) of LIS1 and mNUDC in
this process.
International Symposium on
Single-molecule nano detection
and its application to life
science,
(Hyogo, Awaji) (2010 年 4 月 17 日).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 神経細胞の遊走障害を伴う疾患の判定
方法

発明者: 山田 雅巳

権利者: 大阪市立大学

種類: 特許

番号: P I U - 1 5 0 5 2

出願年月日: 2 0 1 3 年 2 月 5 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

(1) 大阪市立大学・大学院医学研究科・
細胞機能制御学

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/biochem2/>
理化学研究所

ライフサイエンス技術基盤研究センター・
細胞機能評価研究チーム

[http://www.riken.jp/research/labs/clst/
biofunct_dyn_img/img_funct/cell_funct_i
mg/](http://www.riken.jp/research/labs/clst/biofunct_dyn_img/img_funct/cell_funct_img/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 雅巳 (YAMADA MASAMI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 1 0 3 2 2 8 5 1

(2) 研究分担者

片岡 洋祐 (KATAOKA YOSUKE)

独立行政法人理化学研究所・

ライフサイエンス技術基盤研究センター・
細胞機能評価研究チーム・チームリーダー

研究者番号: 4 0 2 9 1 0 3 3