

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390230

研究課題名(和文)ポリグルタミン病における細胞周期およびJNKシグナル異常の病態解明と治療法開発

研究課題名(英文)Development of therapy targeting dysregulation of cell cycle and JNK pathway in polyglutamine diseases

研究代表者

勝野 雅央(KATSUNO, MASAHISA)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50402566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：ポリグルタミン病はCAG繰り返し塩基配列の異常延長を原因とする遺伝性神経変性疾患で、変異蛋白質が神経細胞内に集積することが中心的病態であり、治療法開発の重要なターゲットであると考えられている。本研究により、ポリグルタミン病である球脊髄性筋萎縮症(SBMA)において細胞周期調節異常およびJNK経路の異常活性化が神経変性に寄与していること、およびJNKの活性化を標的とする治療がポリグルタミンによる運動ニューロン変性を抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Polyglutamine diseases are a group of hereditary neurodegenerative disorders caused by an expansion of genomic CAG trinucleotide expansion. Intra-neuronal accumulation of causative protein is construed as a pivotal molecular event in the pathogenesis of polyglutamine diseases. Our study demonstrated that dysregulation of cell cycle and abnormal activation of JNK pathway underlie the motor neuron degeneration in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). We also showed that pharmacological suppression of JNK ameliorates polyglutamine-mediated neurodegeneration in SBMA.

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：ポリグルタミン病 球脊髄性筋萎縮症 神経変性 細胞周期 JNK

1. 研究開始当初の背景

ポリグルタミン病は CAG 繰り返し塩基配列の異常延長を原因とする遺伝性神経変性疾患であり、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) や脊髄小脳失調症、ハンチントン病などが含まれる。これらの疾患では、神経細胞内に蓄積した変異蛋白質が転写因子などの機能を阻害することによりヒストンのアセチル化を抑制することが知られており、申請者のこれまでの検討において、SBMA では運動ニューロンの核内に集積した変異 AR がヒストンのアセチル化阻害を介して TGF- β 受容体の遺伝子発現を抑制し、TGF- β シグナルを阻害することが明らかとなっている。同様の変化は SCA3 の患者剖検組織や細胞モデルにおいても認められており、TGF- β シグナルの阻害はポリグルタミン病に共通する病態のひとつと考えられる。TGF- β により発現誘導される p21 は強力な細胞周期抑制効果を有するとともに、JNK 経路の阻害活性も有していることが知られている。

2. 研究の目的

本研究では、SBMA の細胞・動物モデルおよび患者剖検組織などを用い、cell cycle re-entry に関する分子機構を明らかにし、細胞周期異常による細胞死のメカニズムを網羅的に解析し、鍵となる分子を同定する。さらに、そうした細胞周期制御分子を初代培養ニューロンに過剰発現することなどにより cell cycle re-entry によって神経変性が生じうることを直接的に証明する。一方、JNK の活性化および c-Jun の異常リン酸化が神経変性を惹起するメカニズムについては、SBMA の細胞・動物モデルおよび患者剖検組織などを用いて JNK 経路に関わる様々な分子の発現レベルを解析し、JNK を標的とした治療法の開発を進める。

3. 研究の方法

SBMA の細胞・マウスモデルにおいて、細胞周期調節に関与する分子の発現レベル・分布を解析し、発現レベルの変化を同定する。次に、初代培養ニューロンに強制的に cell cycle re-entry を誘導し、細胞活性の測定・細胞形態の観察および遺伝子発現解析を行い、ニューロン変性に関与する細胞周期の制御分子を同定する。また、SBMA モデルマウス脊髄を用い、発症前から発現が変化している遺伝子をマイクロアレイ解析 (Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array) により同定する。同定された分子の発現を患者剖検組織で確認するとともに、細胞レベルで過剰発現・ノックダウンした際の細胞毒性への影響について解析する。さらに、同定された分子に作用する低分子化合物を同定し、そ

れを SBMA モデルマウスに投与した際の運動機能・病理学的変化について解析する。

4. 研究成果

(1) SBMA における細胞周期異常

SBMA の原因タンパク質である変異アンドロゲン受容体 (AR) による TGF- β のシグナル異常により運動ニューロンで細胞周期の調節障害が生じているか否かを明らかにするため、SBMA マウス・患者組織をもちいた細胞周期の解析を行った。その結果、SBMA マウス脊髄運動ニューロンでは p21 や p15 などの細胞周期抑制分子の発現レベルが低下し、Rb のリン酸化や E2F1、cyclin D1、cyclin B1、PCNA などの細胞周期マーカーの発現が亢進していた。こうした細胞周期関連分子の発現異常は患者脊髄運動ニューロンにおいても認められたが、非病変部である小脳プルキンエ細胞などでは観察されなかった。また、ニューロンにおける DNA 合成の有無を BrdU の取り込みにより解析したところ、野生型マウスのニューロンでは BrdU の集積は認められなかったが、SBMA 運動ニューロンでは BrdU の異常集積が認められた (図 1)。

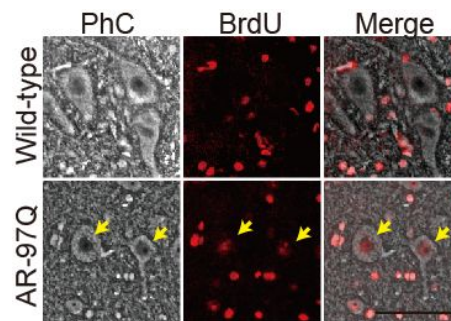


図 1. SBMA のマウスモデル中枢神経における BrdU の取り込み

SBMA マウス脊髄運動ニューロンでは、野生型では観察されない BrdU の異常取り込みが認められたが (矢印)。

野生型マウスの脳室に TGF- β 阻害剤を投与した際にも、脊髄・脳幹運動ニューロンでは p21 や p15 の発現低下に伴い Rb のリン酸化亢進や E2F1 発現増強が認められたが、小脳プルキンエ細胞などでは細胞周期マーカーの発現は誘導されなかった。一方、マウス初代培養皮質ニューロンに E2F1 を強制発現すると caspase-3 の活性化が誘導された。

以上より、SBMA では TGF- β シグナルの破綻とそれに伴う細胞周期の異常が神経変性の病態に関与していると考えられた。

(2) SBMA における JNK の異常活性化

SBMA モデルマウス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、発

症前から対照（野生型マウスおよび正常ヒト AR を過剰発現したトランスジェニックマウス）と比較し有意に発現の亢進のみられる 13 の遺伝子を同定し、そのうち多機能神経ペプチドである calcitonin/calcitonin-related polypeptide (CGRP1) が SH-SY5Y 細胞で過剰発現すると細胞死を誘導すること、および CGRP1 のノックダウンや薬物学的阻害により SBMA の原因蛋白質である変異アンドロゲン受容体の毒性を抑制することを明らかにした。その分子機序として、CGRP1 が c-Jun のリン酸化を介して JNK シグナルを活性化すること、および変異アンドロゲン受容体の細胞毒性が JNK 阻害剤によって抑制されることが示された。

さらに、SBMA モデルマウス (AR-97Q) と CGRP1 ノックアウトマウスを交配し表現型の解析を行ったところ、CGRP1 の発現抑制により SBMA マウスの運動ニューロンにおける c-Jun のリン酸化が抑制されるとともに、運動機能や生存率に有意な改善が認められた。

CGRP1-JNK 経路をターゲットとした治療法を開発するため、低分子化合物による CGRP1 の発現を抑制する低分子化合物をスクリーニングしたところ、naratriptan などのセロトニン受容体アゴニストが CGRP1 のプロモーター活性を抑制し、培養細胞およびマウス脊髄の双方において蛋白質レベルで CGRP1 の発現量を低下させた。Naratriptan を SBMA モデルマウスに経口投与したところ、運動ニューロンにおける JNK シグナルが抑制され、神経原生筋萎縮および脊髄における反応性グリオシスが抑止されるとともに、運動機能や寿命の有意な改善が認められ、JNK 活性も抑制された (図 2)。

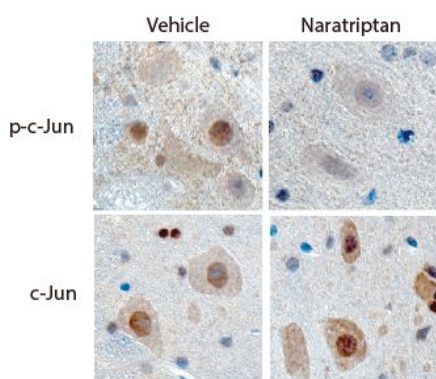


図 2. SBMA マウスモデルにおける JNK 異常活性化に対する naratriptan の効果
SBMA マウスに対する naratriptan の経口投与により c-jun のリン酸化および JNK の発現が抑制された。

以上より、CGRP1 による JNK 活性化が変異 AR による運動ニューロン変性を誘導する役

割を果たしていることが明らかとなった。CGRP1 および JNK はともに ALS においても異常が指摘されていることから、CGRP1-JNK シグナルは ALS・SBMA に共通する運動ニューロン変性の病態として重要であることが示唆された。また、naratriptan による CGRP1-JNK シグナルの抑制は運動ニューロン変性機序を抑制する治療法となりうることを示された (Minamiyama et al., *Nat Med.* 2012)。

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 18 件)

1. Renier KJ, Troxell-Smith SM, Johansen JA, Katsuno M, Adachi H, Sobue G, Chua JP, Sun Kim H, Lieberman AP, Breedlove SM, Jordan CL. Anti-androgen flutamide protects male mice from androgen-dependent toxicity in three models of spinal bulbar muscular atrophy. *Endocrinology*. 2014 [in press] 査読有
2. Tohnai G, Adachi H, Katsuno M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Nakatsuji H, Qiang Q, Ding Y, Watanabe H, Yamamoto M, Ohtsuka K, Sobue G. Paeoniflorin eliminates a mutant AR via NF- κ B-dependent proteolysis in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2014 [in press] 査読有
3. Chua JP, Reddy SL, Merry DE, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Robins DM, Lieberman AP. Transcriptional activation of TFEB/ZKSCAN3 target genes underlies enhanced autophagy in spinobulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2014 [Epub ahead of print] doi: 10.1093/hmg/ddt527 査読有
4. Doi H, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Qiang Q, Tanaka F, Yanagawa T, Warabi E, Ishii T, Sobue G. p62/SQSTM1 differentially removes the toxic mutant androgen receptor via autophagy and inclusion formation in a spinal and bulbar muscular atrophy mouse model. *J Neurosci*. 33: 7710-7727, 2013. 査読有
doi: 10.1523/JNEUROSCI.3021-12.2013.
5. Qiang Q, Adachi H, Huang Z, Jiang YM, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, *Sobue G. Genistein, a natural product derived from soybeans, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *J Neurochem*. 126: 122-130, 2013. doi: 10.1111/jnc.12172. 査読有
6. Kondo N, Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S,

- Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Ishigaki S, Fujioka Y, Watanabe H, Tanaka F, Nakai A, Sobue G. Heat shock factor-1 influences pathological lesion distribution of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Nat Commun*. 4:1405, 2013. doi: 10.1038/ncomms2417 査読有
7. Minamiyama M, *Katsuno M, Adachi H, Doi H, Kondo N, Iida M, Ishigaki S, Fujioka Y, Matsumoto S, Miyazaki Y, Tanaka F, Kurihara H, Sobue G. Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by expanded polyglutamine. *Nat Med*. 18: 1531-1538, 2012. doi: 10.1038/nm.2932 査読有
 8. Katsuno M, Tanaka F, Adachi H, Banno H, Suzuki K, Watanabe H, *Sobue G. Pathogenesis and therapy of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Prog Neurobiol*. 99: 246-256, 2012. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.05.007 査読有
 9. Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Adachi H, Tanaka F, Sobue G. Molecular pathophysiology and disease-Modifying therapies for spinal and bulbar muscular atrophy. *Arch Neurol*. 69: 436-440, 2012. doi: 10.1001/archneurol.2011.2308 査読有
 10. Yu Z, Wang AM, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Yue Z, Robins DM, Lieberman AP. Macroautophagy is regulated by the UPR-mediator CHOP and accentuates the phenotype of SBMA mice. *PLoS Genet*. 7: e1002321, 2011. doi: 10.1371/journal.pgen.1002321 査読有

[学会発表](計 20 件)

1. Katsuno M, Sobue G. Pathogenesis of selective neurodegeneration in polyglutamine-mediated motor neuron disease. International symposium. New Frontier of Molecular Neuropathology 2014, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, Mar 16-17, 2014.
2. Adachi H, Qiang Q, Hunag Z, Jinag YM, Katsuno M, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Sobue G. Genistein, a natural product derived from soybeans, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron disease. Neuroscience 2013, San Diego, USA, Nov 9-13, 2013.
3. Katsuno M. Neurobiological Study of Postmortem Brain from Brain Bank: for the study of spinal disorders. Neuro2013, Kyoto International Conference Center, Kyoto City, Japan, Jun 22, 2013.
4. Katsuno M, Adachi H, Kondo N, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Miyazaki Y, Iida M, Nakatsuji H, Tanaka F, Sobue G. Cell cycle dysregulation in motor neurons of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). 23rd International Symposium on ALS/MND. Chicago, USA, Dec 5-7, 2012.
5. Adachi H, Doi H, Katsuno M, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Tohnai G, Iida M, Tanaka F, Sobue G. p62/SQSTM1 removes toxic mutant androgen receptor in spinal bulbar muscular atrophy model mouse. Neuroscience 2012, New Orleans, USA, Oct 13-17, 2012.
6. Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Muramatsu SI, Sobue G. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. Neuroscience 2012, New Orleans, USA, Oct 13-17, 2012.
7. Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Doi H, Kondo N, Iida M, Ishigaki S, Fujioka Y, Matsumoto S, Miyazaki Y, Tanaka F, Kurihara H, Sobue G. Naratriptan ameliorates SBMA pathology by the repression of CGRP1-activated JNK pathway. Neuroscience 2012, New Orleans, USA, Oct 13-17, 2012.
8. Adachi H, Tohnai G, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Tanaka F, Ohtsuka K, Sobue G. A peony extract enhances protein degradation systems and exerts therapeutic effects in the polyglutamine-mediated motor neuron disease. Neuroscience 2011, Washington DC, USA, Nov 11-16, 2011.
9. Katsuno M. Elucidation of neuronal death signaling pathways and development of disease-modifying therapies for Kennedy's disease. Kennedy's Disease Association 2011 Annual Conference and Education Symposium. Coarsegold, USA, Nov 11, 2011.
10. Kondo N, Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S-J, Miyazaki Y, Tanaka F, Sobue G. Heat shock factor-1(Hsf-1) influences distribution of pathogenic androgen receptor aggregations in model mouse of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) . Gordon conference on CAG triplet repeat disorders, Il Ciocco, Italy, Jun 5-10, 2011.
11. Katsuno M, Adachi H, Kondo N, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S-J, Miyazaki Y, Tanaka F, Sobue G. Cell cycle dysregulation in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). Gordon conference on CAG triplet repeat disorders, Il Ciocco, Italy, Jun 5-10, 2011.

(1)研究代表者

勝野 雅央 (Katsuno Masahisa)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：50402566

(2)研究分担者

祖父江 元 (Sobue Gen)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20148315

田中 章景 (Tanaka Fumiaki)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：30378012

(平成 22 年度～平成 24 年度)

足立 弘明 (Adachi Hiroaki)
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座准教授
研究者番号：40432257