

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591235

研究課題名(和文)ポリグルタミン病ヒト疾患脳における重合体毒性の証明と治療薬開発

研究課題名(英文) Polyglutamine oligomers in human brain play a crucial role in the pathogenesis of polyglutamine diseases.

研究代表者

高橋 俊昭 (Takahashi, Toshiaki)

新潟大学・脳研究所・非常勤講師

研究者番号：70377191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症のヒト剖検脳組織において、特異的な高分子のスミア状のポリグルタミン重合体を検出し得た。重合体蓄積が顕著であった組織部位では、神経変性所見がより高度であった。ヒト疾患脳においても重合体は神経変性に関連した蓄積を示した。この成果をもとに、native PAGE法でポリグルタミン重合体形成を阻害する薬剤の選定を行った。候補薬剤の1つは、ポリグルタミンを過剰発現する線虫モデルへの投与することによって、寿命の延長を確認し得た。重合体形成阻害をターゲットとする治療は分子病態治療に有効であり、今回選定した薬剤をふくめて、臨床治療応用に発展させたい。

研究成果の概要(英文)：Expanded polyglutamine proteins cause neurodegenerative disorders. Although polyglutamine oligomers have been proposed as a cytotoxic structure, the cytotoxicity of polyglutamine oligomers, not inclusion bodies, has not been proven in human brain tissue. To clarify the cytotoxicity of polyglutamine oligomers, we carried out Semi-Denaturing Detergent-Agarose Gel Electrophoresis (SDD-AGE) and detected oligomers in autopsy brain tissue in DRPLA patients. Quantitative analysis indicates that accumulation of polyglutamine oligomers correlate with the severity of neuronal loss in human brain tissue. These results show that oligomers in human brain play a crucial role in the pathogenesis of polyglutamine diseases.

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：polyglutamine oligomer DRPLA C.elegans SDD-AGE

### 1. 研究開始当初の背景

小脳失調を中核とする遺伝性神経変性疾患群において原因蛋白中のグルタミン連続配列領域(ポリグルタミン)の伸長増大が疾病を引き起こすことが示されている。この共通した特性により、これらの疾患群はポリグルタミン病と包括される。

これまでの知見では、増大したポリグルタミン鎖が、自己重合する過程に細胞障害性が推察されている。しかしながら、重合体の毒性は主に培養細胞系を用いた検証であり、*in vivo*での検出の困難さから、組織レベルでの検証報告はきわめて乏しい。

### 2. 研究の目的

ポリグルタミン病疾患脳組織における研究では、神経傷害性とポリグルタミン鎖の発現量とは、必ずしも相関しない。このことは、ポリグルタミン鎖の発現自体が、神経障害性に必要十分なものではなく、構造変化や重合化、蛋白修飾などの翻訳後の変化の必要性を示唆するものである。創薬研究においては、毒性の高い構造体に対する分子病態治療の開発が期待されているが、治療開発に先立って、ポリグルタミン鎖重合体がヒト疾患脳においても神経障害性の主要因であることを証明することが前提となる。

本研究では、ヒト疾患脳組織における重合体の検出を目指し、病態への関与を検討する。研究中後半では、ポリグルタミン鎖重合体の形成を阻害する薬剤選定に着手し、ポリグルタミン鎖を恒常発現する線虫モデルに候補薬剤を投与し、重合体形成抑制が分子治療のターゲットとなり得ることを示したい。

### 3. 研究の方法

(1)ヒト疾患脳におけるポリグルタミン鎖重合体の証明

新潟大学脳研究所病理学分野の病理献体から提供を受けた DRPLA 症例 6 例および対照 9 例(アルツハイマー病 2 例、パーキンソン病 2 例、他に非変性疾患 4 名)の脳組織凍結標本の脳皮質、被殻、淡蒼球、小脳歯状核を検討した。各組織標本に RIPA buffer を加え、超音波破砕法(native sample)にて弱変性状態で蛋白抽出した。1% アガロースゲル(0.01% SDS 加)で電気泳動(Semi-Denaturing Detergent-Agarose Gel Electrophoresis)し、Western blot 法にて重合体をスメアバンドとして検出した。重合体蓄積は神経特異マーカーの Neurofilament-L により補正を行ない定量化し、症例間および組織部位ごとの重合体蓄積の程度を比較検討した。定量解析により、解剖部位毎のポリグルタミン鎖重合体の蓄積の差異を検証し、神経変性の局在性と重合体蓄積との関連を病理学的評価もあわせて検討した。

(2)ポリグルタミン鎖重合形成を阻害する薬剤選定と線虫モデル(Q40-EGFP)への投与による治療効果検討

蛍光 native-PAGE 法によるポリグルタミン鎖二量体の検出: HEK293T 細胞株に部分 DRPLA Q80-mYFP を発現する plasmid を transfection 48 時間後に lysis buffer [25mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM NaCl, 2mM EDTA] を加え cell lysate を回収した。非変性状態で 10% ポリアクリルアミドゲル(Wako)にて native-PAGE を行った。検出は、蛍光イメージスキャナー(Typhoon9400, GEヘルスケア)にて蛍光検出を行い(excitation 488nm/emission 520nm)、Image Quant TL(GEヘルスケア)にて定量値を計測した。

上記の手法を利用して、ポリグルタミン鎖単量体を含む細胞抽出蛋白に選定候補薬剤を添加し、37 で incubation した。薬剤添加により、ポリグルタミン鎖の単量体と二量体のバンドシグナルを蛍光値として定量し(「二量体蛍光値/単量体蛍光値」をもとめる)、二量体の低下を有し、かつ添加終濃度の定量値が、対照である DMSO の 50%以下となっている薬剤を効果有りとして判定した。

ポリグルタミン鎖(40glutamine repeat-GFP)を恒常発現する線虫モデルを用い、効果薬剤を飼育培地中に添加し、摂取させた。蛍光顕微鏡観察、Western blot 解析、Semi-Denaturing Detergent-Agarose Gel Electrophoresis、寿命測定等による解析を行った。

線虫モデルは、熊本大学発生医学研究所 小椋光教授、山中邦俊准教授より供与を受けた。

### 4. 研究成果

(1)ヒト疾患脳におけるポリグルタミン鎖重合体の証明

DRPLA 患者由来サンプルにおいて重合体を表す高分子のスメアバンドを検出した(図 1)。大脳皮質では 5 例中 2 例、被殻では 4 例中 2 例、淡蒼球では 3 例中 1 例、小脳歯状核では 5 例中 1 例で重合体の蓄積を認めた。一方で、神経変性疾患以外の対照患者(Alzheimer 病、Parkinson 病)由来サンプルでは、いずれの解剖部位においても重合体の蓄積を認めなかった。

DRPLA 症例間における神経細胞障害の程度について病理組織 HE 標本をもとに比較した。

重合体の蓄積が顕著であった DRPLA 症例 #3 の淡蒼球では、蓄積を認めなかった DRPLA 症例 #1 に比較して、神経細胞脱落と細胞体萎縮等の変性所見がより高度であった(図 2)。

伸長ポリグルタミン鎖重合体の蓄積量と臨床パラメータ(グルタミン伸長数、死亡時年齢、罹病期間、脳重量)との相関を解剖部位別に検討した。大脳皮質における重合体の蓄積量とグルタミン伸長数( $R^2 = 0.957$ ,  $p < 0.01$ )、小脳歯状核における重合体の蓄積量と罹病期間( $R^2 = 0.979$ ,  $p < 0.01$ )との間に有意な正の相関を認めた(図 3)。

(2) ポリグルタミン鎖重合形成を阻害する薬剤選定と線虫モデル(Q40-EGFP)への投与による治療効果検討

蛍光 native-PAGE 法によるポリグルタミン鎖二量体の検出系を確立した(図4)。この検出系を用いて、ポリグルタミン鎖重合形成の阻害効果をもつ6種類の生薬成分(hesperidin, astilbin, cosmosiin, sorbarin, iridin, apiin)と1種類の低分子化合物(候補薬剤A:論文にて報告予定)を選定した。

線虫モデル(Q40-EGFP)への薬剤投与:SDD-AGEにより、線虫モデルのポリグルタミン鎖重合体をスメア状に検出した。孵化後day3以降に経時的に重合体が蓄積していくが、候補薬剤Aを培地へ投与することで、day8時点での重合体の蓄積を軽減する効果が確認された( $p < 0.005$ )。

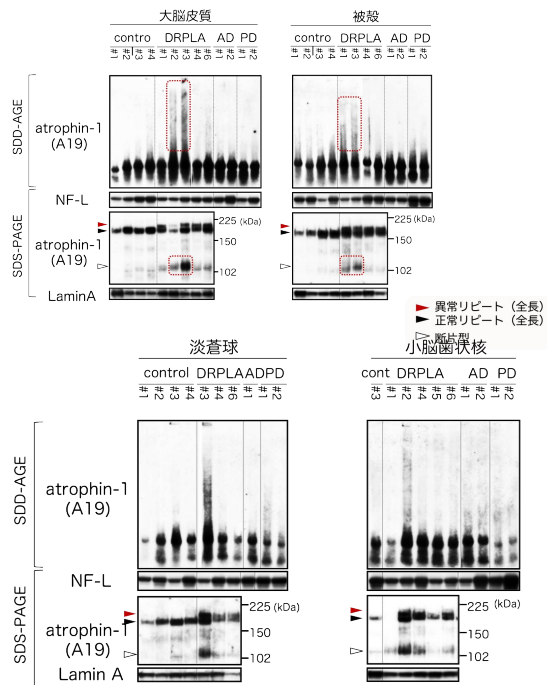
運動測定:孵化後 day10, day15, day16 の線虫において、1分間の運動回数(frequency of tail movements/min)を実体顕微鏡下で測定した。薬剤A添加群では、対照(DMSO)に比し、運動頻度低下の改善傾向があったが、統計学的には有意差は得られなかった。

寿命測定:薬剤A投与群では対照群(DMSO)に比し有意な寿命延長効果を認めた(図5, logrank 検定  $p < 0.001$ )。

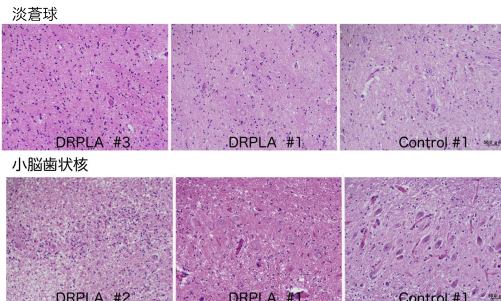
【考察】DRPLA ヒト剖検脳組織における重合体の存在を証明した。ポリグルタミン鎖重合体がヒト疾患脳においても神経障害性の要因であることの証明は、病態・治療研究においてきわめて重要な知見と考えられた。症例間によるポリグルタミン重合体蓄積には差があり、罹病期間、ポリグルタミン伸長、封入体形成の程度などの因子と重合体蓄積との関連の検討が今後の課題となる。

治療研究については、*in vitro* assayで重合体形成を阻害した選定薬剤のうち候補薬剤Aは線虫モデルへの投与において、重合体形成を抑制し、かつ寿命延長効果が確認された。このことは、重合体形成阻害をターゲットとする分子病態治療が有効である可能性を強く示したものと考えた。今回選定した薬剤をふくめて、臨床治療応用に発展させたい。

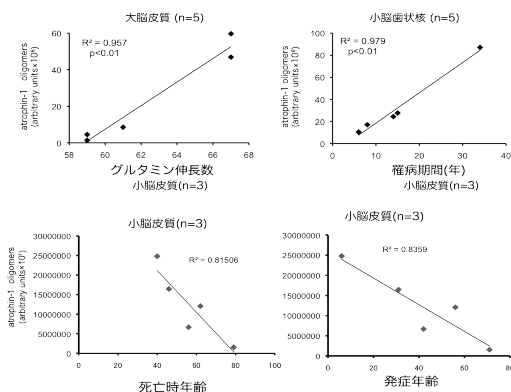
(図1)



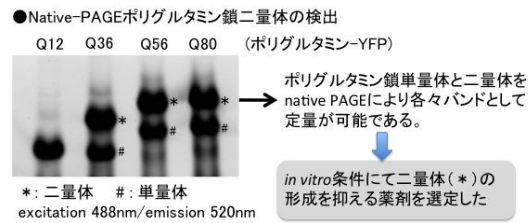
(図2)



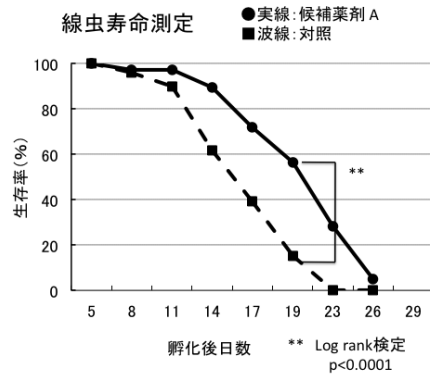
(図3)



( 図 4 )



( 図 5 )



## 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 ( 計 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[ その他 ]

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 俊昭 ( TAKHASHI, Toshiaki )

新潟大学・脳研究所・非常勤講師

研究者番号 : 70377191

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

他田 正義 ( TADA, Masayoshi )

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号 : 10467079

堅田 慎一 ( KATADA, Shinnichi )

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号 : 70599167