

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591287

研究課題名(和文) 毒性オリゴマーを標的としたポリグルタミン病に対する分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文) Establishment of a molecular therapy for the polyglutamine diseases targeting toxic oligomers

研究代表者

ポピエル ヘレナ・明子 (Popiel, Helena Akiko)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：40467593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、アルツハイマー病やポリグルタミン(PolyQ)病など多くの神経変性疾患において、異常蛋白質の毒性オリゴマーが神経変性疾患を引き起こすと考えられるようになった。本研究では、申請者が同定したPolyQ蛋白質の毒性オリゴマー阻害化合物(QA11)について、マウスにおける薬物動態を解析し、PolyQ病モデルマウスの神経症状と組織学的変化に対する治療効果を解析した。

QA11は経口投与によりマウスの脳内に到達することが確認された。さらに2種類のPolyQ病モデルマウスにQA11を経口投与した結果、神経症状の改善、脳の組織学的変化に対する治療効果が確認され、QA11の治療薬としての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have demonstrated that in many neurodegenerative diseases, including Alzheimer disease and the polyglutamine (polyQ) diseases, neurodegeneration results from the actions of a toxic oligomeric species of the mutant protein. In this study, we analyzed the effects of QA11, a small chemical compound inhibitor of polyQ protein oligomers that we previously identified. We analyzed the pharmacokinetics of QA11 in mice, as well as the therapeutic effects of QA11 on the neurological phenotypes and histological phenotypes of two mouse models of the polyQ diseases. We found that QA11 effectively enters the brain upon its oral administration in mice. Furthermore, oral administration of QA11 was shown to alleviate the neurological phenotypes and histological phenotypes of 2 mouse models of the polyQ diseases. Our results demonstrated the potential of QA11 as a therapeutic molecule for the polyQ diseases.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：神経変性疾患 ポリグルタミン病 治療薬開発 オリゴマー

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病、パーキンソン病、プリオン病、ポリグルトアミン (PolyQ) 病など多くの神経変性疾患では、脳の神経細胞内外にミスフォールディングを起こした異常蛋白質が蓄積することにより神経変性が起こり、様々な神経症状が引き起こされると考えられている。近年、実際に神経変性を起こすのは、異常蛋白質からなる大きな封入体ではなく、封入体が形成される前にできる毒性オリゴマーであると考えられるようになった。我々は神経変性の治療法開発を目指し、ほぼ100%遺伝的に発症するためモデルが作製しやすく実験もしやすい PolyQ 病を用いて、毒性蛋白質オリゴマーをターゲットとした治療法開発を目指した。まず、申請者の研究室で開発した PolyQ 蛋白質の試験管内オリゴマーアッセイを用いて、大規模な化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングを1次スクリーニングとして行った。そこで同定された数十のヒット化合物について、2次スクリーニングとして PolyQ 病のモデルショウジョウバエに投与し、神経変性に対する治療効果を発揮する化合物を9つ同定した。

### 2. 研究の目的

本研究では、PolyQ 病のモデルショウジョウバエに治療効果を示した9化合物のうち、血液脳関門透過性が高く、ヒトへの安全性も確認されている化合物である QAI1 に焦点をあてた。PolyQ 病の治療薬開発を目指し、QAI1 の投与による PolyQ 病モデルマウスに対する治療効果の検討、さらに他の神経変性疾患に対する治療効果の検討を行った。

### 3. 研究の方法

まず、マウスにおいて QAI1 の薬物動態を検討するため、野生型マウスに QAI1 をゾンデで経口投与し、5時間後に脳および血液サンプルを回収し、高速液体クロマトグラフィーを用いて、QAI1 の組織内の濃度を計測した。次に PolyQ 病の一種である脊髄小脳変性症1型 (SCA1) のモデルマウス (Watase, Neuron 2002) に対する QAI1 の治療効果を検討した。SCA1 マウスに3週齢あるいは5週齢から6%の QAI1 を水に混ぜて飲ませ、経時的にロータロッドテストおよびバランスビームテストにより神経症状に対する効果を検討した。さらにマウスの脳を経時的にサンプリングし、抗ユビキチン抗体による脳切片の免疫染色を行い、QAI1 の異常蛋白質の脳内蓄積に対する効果を検討した。次に、別の PolyQ 病に対する QAI1 の効果を検討するため、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) のモデルマウス (Katsuno, Neuron 2002) に経口投与し、ロータロッドテストや自発運動量に対する効果を検討した。さらに PolyQ 病以外の神経変性疾患に対する QAI1 の効果を検討するため、アルツハイマー病およびパーキンソン

病に対する効果検討するため、試験管内の蛋白質凝集アッセイを行い、さらにショウジョウバエモデルに対して、QAI1 を餌に混ぜて飼育することにより投与し、複眼変性に対する効果を検討した。さらにアルツハイマー病のモデルマウスに対する QAI1 の効果も検討した。QAI1 を水に入れて投与し、経時的に脳を採取、脳切片を Thio-S 染色し、脳ライセートの ELISA により、A-beta 蛋白質の蓄積の検討を行った。そして臨床試験に向けて、PolyQ 病の中で世界的に最も患者数の多い SCA3 のモデルマウスに対する QAI1 の治療効果を検討するため、ロックインマウスを作成し、このマウスの行動学的、組織学的変化の基礎データを収集した。

### 4. 研究成果

まず QAI1 の薬物動態を解析した。QAI1 を野生型マウスにゾンデを用いて投与した後に脳や血液を採取し、高速液体クロマトグラフィーを用いて脳内および血液内の濃度を解析したところ、QAI1 は濃度依存的に脳内で検出され、QAI1 は経口投与により効率良く血液脳関門を通過し、脳内に到達することが確認された。

次に QAI1 を症状が出る前の3週齢から経口投与し、SCA1 マウスの神経症状に対する効果を検討した。ロータロッドテストにおいてこのマウスは4週齢で既に症状が見られ、解析の最終ポイントであった36週齢まで徐々に症状は進行した。ロータロッドテストにおいて QAI1 を摂取していた SCA1 マウスは摂取していない SCA1 マウスに比べ、28週齢までロータロッドに乗っている時間が長く、また12週齢までは野生型マウスと差がなかった。野生型マウスに対して QAI1 の投与による影響は特に見られなかった。また、より後期になって現れる症状を検出するバランスビームテストでは、QAI1 を摂取していた SCA1 マウスは摂取していない SCA1 マウスに比べ28週齢の時にビームを渡るのにかかった時間が短く、QAI1 は後期に現れる症状に対しても治療効果を発揮することが示された。さらに QAI1 の脳内の PolyQ 蛋白質の蓄積に対する効果を検討したところ、12週齢のマウスの大脳皮質と海馬において、PolyQ 蛋白質の封入体形成が明らかに抑制されており、QAI1 が SCA1 マウスの脳内においても異常 PolyQ 蛋白質の構造異常を標的とし、蓄積を抑制することにより治療効果を発揮していることが確認された。

また、QAI1 が発症後の投与でも効果を示しうるかを検討するため、SCA1 マウスが発症した後の5週齢より投与し、ロータロッドテストで治療効果を検討した。QAI1 を摂取していた SCA1 マウスは15週齢から19週齢まで、摂取していない SCA1 マウスと比べロータロッドに乗っている時間が長く、治療効果が確認された。これらの結果は QAI1 が実際発症してから治療を受け始める患者さん

でも治療効果を発揮しうることを示唆している。

次に、QAI1 の SCA1 以外の PolyQ 病モデルに対する治療効果を確認するため、QAI1 を SBMA のモデルマウスに投与し、治療効果を検討した。SBMA のモデルマウスの自発運動量と立ち上がり回数を検討したところ、12 週齢で QAI1 を摂取していない SBMA マウスは野生型マウスと比べ有意に自発運動量や立ち上がりが少ないのに対し、QAI1 を摂取した SBMA マウスでは有意に野生型マウスと同程度まで改善されており、QAI が PolyQ 病全般的に治療効果を発揮する可能性を示した。

さらに QAI1 のアルツハイマー病やパーキンソン病

治療法  
開発に向けて、世界的に患者数の最も多い SCA3 のモデルマウスに対する QAI1 の治療効果を示すのが重要と考えた。しかしながら SCA3 の症状を反映し、治療実験に適した進行性の神経変性症状を示す、治療実験に適したモデルマウスが存在しないため、我々は異常伸長 PolyQ を含む SCA3 蛋白質を発現する SCA3 ノックインマウスを作製し、ライン化を行った。さらにまずこのマウスの症状を把握するために行動学的な基礎データをロータロッドテストや自発運動量解析で計測し、脳切片の免疫染色により組織学的変化を解析し、体重や寿命を測定したが、このマウスの寿命までには明らかな症状は確認できず、SCA3 蛋白質の発現量が高くなるほど寿命が短くなることを用いる必要があることが示唆された。

#### <引用文献>

Watase K et al., A long CAG repeat in the mouse Sca1 locus replicates SCA1 features and reveals the impact of protein solubility on selective neurodegeneration. *Neuron* 2002; 34(6):905-19

Kastuno et al., Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 2002; 35(5):843-54

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1) Takeuchi T, Suzuki M, Fujikake N, Popiel HA, Kikuchi H, Futaki S, Wada K, Nagai Y, Intercellular chaperone transmission via exosomes contributes to maintenance of protein homeostasis at the organismal level, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 査読有, 2015; 112(19):E2497-506  
doi: 10.1073/pnas.1412651112

ンソン病に対する効果の検討を行った。試験管内の A-beta 凝集アッセイでは、A-beta の凝集は QAI1 によりやや遅延されたが、シヌクレインの凝集に対する QAI1 の遅延効果は確認されなかった。そしてこれらの疾患モデルショウジョウバエに QAI1 を投与し神経変性に対する効果を、複眼変性を評価することで調べたところ、明確な治療効果は確認されなかった。またアルツハイマー病のモデルマウスに QAI1 を経口投与し、脳内の A-beta 蓄積に対する効果を脳切片の Thio-S 染色および脳ライセート内の A-beta 量を ELISA で計って検討したが、抑制効果は確認されなかった。

最後に、QAI1 を用いた臨床試験及び

2) Saitoh Y, Fujikake N, Okamoto Y, Popiel HA, Hatanaka Y, Ueyama M, Suzuki M, Gaumer S, Murata M, Wada K, Nagai Y, p62 plays a protective role in the autophagic degradation of polyglutamine protein oligomers in polyglutamine disease model flies, *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 2015; 290(3):1442-53  
doi: 10.1074/jbc.M114.590281

3) Takeuchi T, Popiel HA, Futaki S, Wada K, Nagai Y, Peptide-based therapeutic approaches for treatment of the polyglutamine diseases, *Current Medicinal Chemistry*, 査読有, 2014; 21(23):2575-82

4) Popiel HA, Takeuchi T, Burke JR, Strittmatter WJ, Toda T, Wada K, Nagai Y, Inhibition of protein misfolding/aggregation using polyglutamine binding peptide QBP1 as a therapy for the polyglutamine diseases, *Neurotherapeutics*, 査読有, 2013; 10(3):440-6.  
doi: 10.1007/s13311-013-0184-7

5) Popiel HA, Takeuchi T, Fujita H, Yamamoto K, Ito C, Yamane H, Muramatsu S, Toda T, Wada K, Nagai Y, Hsp40 gene therapy exerts therapeutic effects on polyglutamine disease mice via a non-cell autonomous mechanism, *PLoS One*, 査読有, 2012; 7(11):e51069  
doi: 10.1371/journal.pone.0051069

〔学会発表〕(計 2 件)

1) Popiel HA, Yamane H, Takahashi T, Tada M, Saitoh Y, Fujita H, Okamoto Y, Toda T, Wada K, Onodera O, Nagai Y, Identification of a polyglutamine oligomerization inhibitor with high brain permeability and safety, which exerts therapeutic effects on multiple mouse models of the polyglutamine diseases, *Gordon Research Conference on CAG*

Triplet Repeat Disorders, Waterville Valley  
Resort, 米国, 6月23日–6月28日, 2012

2) Nagai Y, Takeuchi T, Popiel HA, Wada K,  
Non-cell autonomous therapeutic effects of  
Hsp40 on polyglutamine disease models  
via its exome-mediated secretion, 2<sup>nd</sup>  
International Conference of Neural Cell  
Culture, 東京医科歯科大学・鈴木章夫記念講  
堂 (東京都), 6月16日, 2012

6 . 研究組織

(1)研究代表者

ポピエル ヘレナ・明子 (POPIEL, Helena  
Akiko)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：40467593