

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893065

研究課題名(和文)ケミカルバイオロジーを用いたポリグルタミン病に対する治療法開発研究

研究課題名(英文)Development of small compound against polyglutamine diseases based on the chemical biology

研究代表者

申 民京 (Shin, Minkyong)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：60738566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ポリグルタミン病は、遺伝性の難治疾患であり、異常ポリグルタミン蛋白質の凝集が病態形成の主因である。私達は、ケミカルバイオロジーの手法を応用して、ポリグルタミン病の病態解明研究と治療法開発研究を行った。「ポリグルタミン病の病態解明研究」に関しては、ポリグルタミン蛋白質の発現を抑制できる化合物F7の標的分子の同定に成功した。実際に、この分子を欠損させるとポリグルタミン蛋白質の発現が増加し、過剰発現すると発現が抑制された。さらに、この調節にはオートファジーが関わっている事を見出した。さらに、F7をポリグルタミン病モデルマウスに投与したところ、神経性疾患の改善が認められた。

研究成果の概要(英文)：Polyglutamine disease is a Hereditary neurodegenerative disease caused by a CAG repeat expansion in protein-coding portions of specific genes. Expanded CAG repeats are translated into a series of glutamine residues (polyQ) and are subject to increased aggregation. We previously identified a small compound (F7) that digests polyQ proteins.

In this study, we identified the target molecule for F7 chemical. The lack of this molecule increased polyQ accumulation, and its overexpression decreased it. We also identified the involvement of autophagy machinery in the pharmacological effect of F7 chemical. We confirmed that F7 chemical improved the neurodegeneration observed in polyQ model mice.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ポリグルタミン 神経変性疾患 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

グルタミン鎖の異常伸長を原因とするポリグルタミン病は、遺伝性の難治疾患であり、異常蛋白質の凝集が病態を形成する事が知られている。しかしながら、ポリグルタミン蛋白質の発現や凝集体形成は、その他の様々な要因によっても制御されており、その詳細なメカニズムは明らかではない。

研究開始時には、(1)GFP 融合ポリグルタミン(GFP-polyQ)を発現した PC12 細胞に、約 5 万種類の低分子化合物を投与し、ハイスループットアッセイにより、GFP-polyQ の発現を抑制できる化合物を 24 種類同定していた。(2)これらの化合物を PolyQ 病モデルショウジョウバエ (polyQ を複眼に発現させて複眼変性を誘導したショウジョウバエ) に摂食させ、複眼変性を改善できる化合物 F7 を選定していた。

本研究では、これらの化合物を用いて、(1)ポリグルタミン蛋白質の発現制御メカニズムの解明、(2)ポリグルタミン病治療法の開発研究を行なった。

2. 研究の目的

(1)ポリグルタミン蛋白質の発現制御メカニズムの解明：これを目的として、以下の研究を企図した。低分子化合物に結合する分子からの探索：低分子化合物 F7 は、ポリグルタミン蛋白質の発現量を抑制できる事から、これらの化合物の標的分子を同定する。その上で、これら化合物の標的分子が、ポリグルタミン蛋白質の発現量を調節しているメカニズムを明らかにする。また、標的分子に対する低分子化合物の薬理作用 (蛋白量の増減、機能変化) を明らかにする。オートファジーの関与：低分子化合物 F7 は、強いオートファジー誘導活性を有していることより、ポリグルタミン蛋白質の発現とオートファジーとの関連を解析する。

(2)ポリグルタミン病治療法の開発研究を行なう。具体的には、アタキシンモデルマウス(SCA1 トランスジェニック)に、化合物を投与したときの治療効果判定。この化合物の合成展開による化合物の改良。

3. 研究の方法

(1)低分子化合物の標的分子同定：

ポリグルタミン蛋白質の発現量を抑制できる低分子化合物 F7 にアジド基を付加した標的分子同定用の新規化合物を開発し、「光親和性標識法」を用いて、結合分子を探索した。標的分子によるポリグルタミン蛋白質の発現量調節機構を明らかにするため、当該分子を過剰発現、発現抑制し、その後のシグナル伝達機構を解析した。標的分子に対する低分子化合物 F7 の薬理作用を明らかにする為に、F7 投与後の標的分子の変動を解析した。

(2)オートファジーの関与：

オートファジーの関与を調べる為に、種々のオートファジー欠損細胞に低分子化合物 F7 を投与し、その後のポリグルタミン蛋白質の発現を測定した。

(3)アタキシンモデルマウスに対する効果：

アタキシンモデルマウスに対する治療効果を調べる為に、この疾患モデルマウスの髄腔内にチュービングし、浸透圧ポンプを用いて、低分子化合物 F7 を持続注入した。その後の神経症状 (roter rod test など) 神経病理を解析した。

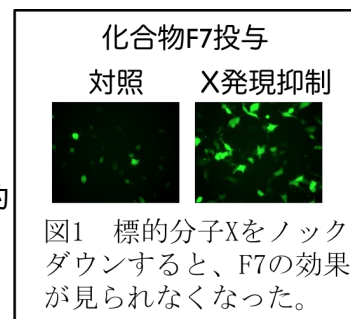
(4)化合物の合成展開による改良：

構造活性相関を基に、化合物の側鎖を変えて、より活性の高い化合物を開発した。

4. 研究成果

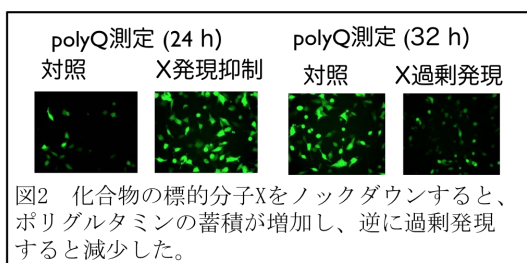
(1)低分子化合物の標的分子同定：

低分子化合物 F7 の標的分子 X の同定に成功した。また、分子 X をノックダウンすると、低分子化合物 F7 のポリグルタミン除去効果が見られなくなったことより、化合物 F7 の標的分子 X であることが確認され



た(図1)。

標的分子によるポリグルタミン蛋白質の発現量調節を検討したところ、この分子 X をノックダウンすると、ポリグルタミンの蓄積が増加し、逆に過剰発現すると減少した(図2)。



低分子化合物 F7 の薬理作用を解析したところ、F7 投与により分子 X の発現量が増加した。

(2)オートファジーの関与：

種々のオートファジー欠損細胞にポリグルタミンを発現させ、化合物 F7 を投与したところ、ポリグルタミンの発現量が減少しなかった。即ち、F7 の効果の一部はオートファジーを介しているものと考えられた。また、標的分子 X を過剰発現すると、オートファジーが活性化されることも明らかとなった。

(3)アタキシンモデルマウスに対する効果：

化合物 F7 をアタキシンモデルマウスに投与したところ、ポリグルタミン蛋白質の蓄積減少、神経細胞脱落の減少、神経変性症状の改善などが認められた。即ち、この化合物はポリグルタミン病の治療薬開発のリード化合物となりうることが判明した。

(4)化合物の合成展開による改良：

化合物 F7 の類似化合物を 30 種類作製し、ポリグルタミン発現細胞に添加して、ポリグルタミン蛋白質の発現量が低下する化合物を同定した。30 種類のうち、18 種類はポリグルタミン蛋白質の除去効果を認めた。一方で、残りの 12 種類には、ポリグルタミン蛋白質の除去効果を認めなかった。これら 30 種類の化合物の構造活性相関を解

析することにより、ポリグルタミン除去活性に重要な化合物の骨格ならびに側鎖の位置を明らかにした。さらに、この情報を基に、化合物 F7 に比して、約 10 倍の活性を有する新規化合物の開発に成功した。

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 2 件)

- 1, Shimizu S, Shin M. : "Development of Small Compound against Polyglutamine Diseases based on the Regulation of Alternative Autophagy" Brain Protein Aging and Dementia Control 1st International Symposium. Noyori Conference Hall (Aichi・Nagoya) Oct 9-10, 2015
- 2, 清水重臣、申珉京 : 「オートファジー破綻に起因する疾患治療薬の創製」第 6 回東京医科歯科大学 医学・歯学・工学連携セミナー「東京医科歯科大学講堂」(東京都・文京区) 2015/6/26
- 3, 清水重臣、申珉京 : 「新しく発見したオートファジー機構と神経変性疾患」新学術領域「脳内環境」班会議招待講演「ウインクあいち」(愛知県・名古屋市) 2014/7/25

[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
<http://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/index.html>
http://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/eng/index_e.html

報道関連

日経産業新聞2014年6月18日「ハンチントン病
症状改善に道」

6．研究組織

(1)研究代表者

申 珉京 (Minkyong Shin)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所
・特任助教 研究者番号：60738566