

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02655

研究課題名(和文) Hippo pathwayを基盤とするシームレス変性過程の統合理解と治療応用

研究課題名(英文) Integrative understanding and therapeutic application of seamless degenerative processes based on Hippo pathway

研究代表者

岡澤 均 (Okazawa, Hitoshi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：50261996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者が2007年に発表して以後、現在に至るまで研究を続けて来た『Hippo pathway障害による能動的ネクローシス』を、機能障害から細胞死に至る連続的変性過程を統合的に説明する分子病態として再定義し、加えて、分子的介入によるマウスモデルの治療実験を行い、次の段階のトランスレーショナル研究につなげることを目的とした。これに対して、Hippo細胞死を制御する分子を同定し、Hippo細胞死がマウスとヒト脳に生じていること、YAP発現AAVあるいはS1Pが細胞死抑制によりハンチントン病態等の治療に有効であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患(ハンチントン病、アルツハイマー病など)には、現時点で根本治療薬(病態修飾薬)が存在しない。本研究成果は、新しいネクローシスサブタイプ(Hippo経路依存的細胞死もしくはTRIAD)の存在を示し、その分子経路を明らかにした点で、学術的に高い価値を有するのみならず、新規細胞死を標的とする新たな治療戦略が治療困難な神経変性疾患に対して有効であることを示した点で、社会的にも極めて有意義であったと考える。

研究成果の概要(英文)：In this project, we intended to define the new "Hippo pathway dependent necrosis", which the PI discovered as transcriptional repression-induced atypical neuronal death (TRIAD) in 2007 (Hoshino et al, JCB 2007), as a pathological concept that can conclusively explain the seamless progression of neurodegenerative pathologies. In parallel, we intended to develop a new therapeutics strategy targeting on this new necrosis. Consequently, we have identified new molecules regulating TRIAD/Hippo-dependent necrosis, have proven the existence of TRIAD/Hippo-dependent necrosis in human and mouse neurodegenerative states, and revealed that the suppression of TRIAD/Hippo-dependent necrosis by using AAV-vector or chemicals successfully inhibited the progression of symptoms and pathologies in mouse models of multiple neurodegenerative diseases.

研究分野：神経内科学、神経科学、神経病理学

キーワード：TRIAD Hippo pathway ネクローシス 神経変性 細胞死 YAP hnRNP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患における病理学的特徴は、変性タンパク質の蓄積・凝集とともに神経細胞死が挙げられる。近年、神経細胞あるいはグリア細胞の機能障害が、細胞死もしくは変性タンパク質凝集に先行して生じることが示唆されている。100年を超える歴史を持つ神経変性疾患において、未だなお、疾患理解と治療実現が達成されていない現実の背景には、変性タンパク質の産生、その凝集、細胞機能失調、細胞死、の時間的關係と分子的關係が十分に確定されていないことが大きな理由の一つとして考えられる。一方、変性疾患の分子的病態には多数の要素が関与しながらも、病態の本幹は切れ目のない連続的(シームレス)なものであり、機能失調から細胞死に至る過程を『統合的に説明しうる分子病態仮説』が求められている。また、変性細胞死の形として、アポトーシスよりも能動的ネクローシスを指示する研究成果が急速に増加している。

神経細胞およびグリア細胞の機能失調から細胞死に至る過程が神経変性病態であるという仮説は、今日広く受け入れられている。一方、変性タンパク質の凝集体が細胞死を誘導するという古典的な凝集仮説については、議論が分かれるところであり、凝集体形成以前に存在する凝集前タンパク質が高次構造的にミスフォールドした段階で細胞毒性を獲得するという考え方(凝集前タンパク質仮説)が、ポリグルタミン病において始まり、各種リピート配列の遺伝的伸長に伴う異常RNAの核内フォーカス形成も同様なメカニズム(新規のタンパク質結合關係の獲得による細胞毒性)を持って説明されつつある。アルツハイマー病においても、長らくアミロイド凝集毒性仮説による治療開発が進んで来たが、ビッグファーマの抗体療法は全て失敗し、アミロイド凝集と症状の間に乖離が存在することも明らかになった。しかし、現時点では依然として、従来と違った凝集前オリゴマーをターゲットとする抗体、あるいは既に失敗した抗ポリマー(抗凝集体)抗体(Biogenの抗体療法など)が混淆して治療研究が進んでいる。パーキンソン病においては、家族性パーキンソン病の原因遺伝子同定あるいはGWAS研究のリスクファクター遺伝子同定などからオートファジー・リソソーム系に問題があることが示唆されているが、そのターゲットが機能低下ミトコンドリア(マイトファジー)なのか、シヌクレイン凝集なのか、さらには、シヌクレインオリゴマーなのか議論があるところである。さらに、これと別次元の議論として、プリオノイド(プリオン)仮説があり、アミロイド、タウ、TDP43、シヌクレインなど全ての変性疾患タンパク質が基本的に(量は別として)細胞間でやり取りされることが明らかになり、大きな問題となっている。しかし、細胞の外から内に取り込まれるのが、どの程度の分子量のものかは分からないし、取り込まれた疾患タンパク質がどのような分子メカニズムで毒性を発揮するかは明らかでなく、この点は当初に述べた議論に立ち戻るところである。

つまり、構造上のミスフォールドにより毒性を獲得した疾患タンパク質が、細胞内で、もしくは細胞膜表面から、どのような病態パスウェイを引き起こすか、そして、その病態パスウェイが『細胞機能障害から細胞死につながる分子現象』をシームレスに説明できるか、という基本的かつ重要な問題は未解決であり、今日の神経変性疾患研究の最前線に位置する最重要課題の一つであると言える。数ある仮説の中で、『転写レベルあるいはポスト転写レベルでの遺伝子発現の変調』は、機能障害から細胞死に至る過程をシームレスに説明しうる最適の仮説である。しかし、どのような転写系あるいはRNA代謝系が重要であるかは明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、『細胞機能障害から細胞死につながる分子現象』をシームレスに説明しうる『統合分子病態仮説』の提唱にむけて、申請者が2007年に発表して以後、現在に至るまで研究を続けて来た『Hippo pathway 障害による能動的ネクローシス』を、機能障害から細胞死に至る連続的変性過程を統合的に説明する分子病態として概念を拡張し再定義することを目的とした。加えて、Hippo pathway への分子的介入によるマウスモデルの治療実験を行い、アプローチの実効性を証明して、本研究の次の段階においてトランスレーショナル研究につなげることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 研究項目

A) Hippo ネクローシス ; Htt 細胞死 ; トリアド の3者共通性の検討

B) YAP 転写調節異常がシームレス変性過程を誘導するメカニズムの解明

C) 疾患を超えたトリアドの共通性の検討

D) トリアドのシグナル経路を標的とした変性疾患治療

A) については、既に予備的検証を行っており、その結果に基づく研究計画提案である。B) では、YAP 転写障害が、神経細胞の機能障害を起こすメカニズムと最終的にトリアド細胞死に至る分子機構を明らかにする。C) では、A)B) で示した病態が、ハンチントン病だけでなくアルツハイマー病、FTLD にも共通するかを検討する。D) では、変性疾患モデルマウスに対して、YAP, LATS など Hippo pathway 主要分子をターゲットにした分子標的治療を試みる。

## 4. 研究成果

本研究では、申請者が2007年に発表して以後、現在に至るまで研究を続けて来た『Hippo pathway 障害による能動的ネクローシス』を、機能障害から細胞死に至る連続的変性過程を統合的に説明する分子病態として再定義し、加えて、分子的介入によるマウスモデルの治療実験を行い、次の段階のトランスレーショナル研究につなげることを目的とした。これに対応して、3年間の研究期間で、下記の5項目について成果を得た。

1) ショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーニングを行って、TRIADEに關与する分子として、YAP, LATS, PIK1に加えて、hnRNPA2B1, hnRNPAB, Httを得た。この結果、Hippo pathwayによる小胞体不安定性につながる直接経路に加えて、hnRNP遺伝子の発現抑制が RNAスプライシングの異常を介してTRIADEを増強する間接経路があることが示された(Mao et al, Cell Death Dis 2016)。

2) 小胞体のin vivoイメージング技術を開発し、TRIADEをin vivoで捉えることに成功した。さらにこの技術を用いて、S1P, LPAをハンチントン病モデルマウスに投与することにより、Hippo細胞死をin vivoで抑制できることを示した(Mao et al, Hum Mol Genet 2016)。

3) YAPの異なる部位のリン酸化(Thr77とSer127)が結合相手になる転写因子をTEADからp73へスイッチする機能に関わることを明らかにした。特に増殖細胞に豊富なPIK1はYAPのThr77をリン酸化することにより、YAPのターゲットとなる転写因子をTEAD(細胞増殖促進)からp73(細胞死の促進)にシフトすることが明らかになった(Mao et al, Hum Mol Genet 2016)。

4) Hippo細胞死がヒトハンチントン病患者で起きていることを、ヒトハンチントン病患者死後脳の超微形態観察によって示した(Yamanishi et al, Acta Neuropathol Commun 2016)。

5) YAPdel taC(機能的にはYAPと同等と考えられる)の発達期の発現が成熟後の神経変性過程に影響することをマウス遺伝学的に示した(Fujita et al, Nat Commun 2017)。

6) さらに、他の複数の変性疾患（公開不可）についても、Hippoネクロシスの関与の可能性について、モデルマウス、iPS細胞由来神経細胞等を対象に、分子生物学的手法、生化学的手法、細胞生物学的手法、in vivoイメージング等を組み合わせて検討を行った。

本研究によって、図1、2に示す仮説を概ね証明することができた。

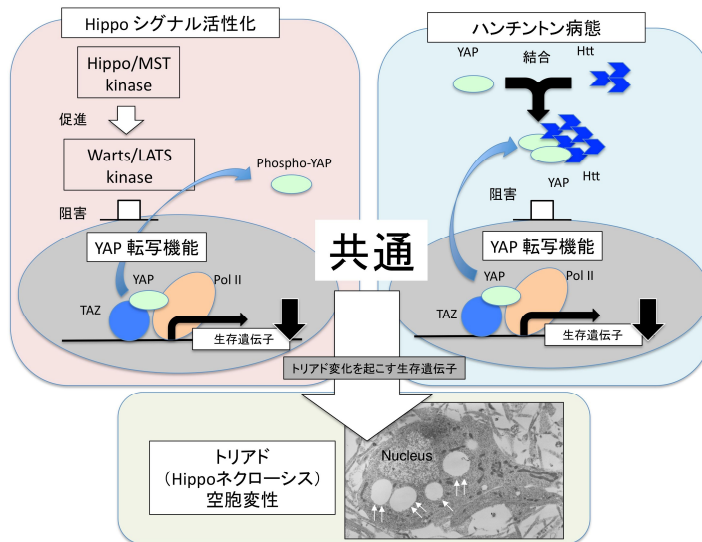


図1：転写抑制によって生じる細胞死・トリアド(Hoshino et al, 2007)では、YAPの機能低下が空胞を伴うネクロシスにつながる事が明らかになっている。一方、YAPを最下流エフェクタとするHippoシグナル経路では、細胞表面レセプタからのHippoシグナルが活性化すると、2つのキナーゼの活性上昇を介してYAPはリン酸化を受けp-YAPは核内に移行できなくなる。このため、YAPが発現調節する細胞生存・増殖遺伝子の転写量が減少し、トリアドになると想定される。一方、HttがYAPと直接結合することを私たちは発見している。このため、YAPはハンチンチン(Htt)との結合を介して直接的に、あるいは封入体に取り込まれて核に入れないことで、転写機能への阻害を受ける。この2つの状況は、YAP機能不全という点では共通した状態である。したがって、この共通状態（YAP機能低下状態）では、未同定のエフェクタ遺伝子（細胞空胞化につながる遺伝子など）を介して、トリアドの形態変化・機能変化が引き起こされるという仮説を立てることが可能である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 33 件)

1. Tanaka H, Kondo K, Chen X, Homma H, Tagawa K, Kerever A, Aoki S, Saito T, Saido T, Muramatsu SI, Fujita K, Okazawa H. (2018) The intellectual disability gene PQBP1 rescues Alzheimer's disease pathology. *Mol psychiatry*. 23(10):2090-2110 Published 2018 October. doi: 10.1038/s41380-018-0253-8. 査読有
2. Okazawa H. PQBP1, an intrinsically disordered/denatured protein at the crossroad of intellectual disability and neurodegenerative diseases. *Neurochem Int*. 119:17-25. doi: 10.1016/j.neuint.2017.06.005. Published 2018 October. 査読有
3. Fujita K, Chen X, Homma H, Tagawa K, Amano M, Saito A, Imoto S, Akatsu H, Hashizume Y, Kaibuchi K, Miyano S, Okazawa H. (2018) Targeting Tyro3 ameliorates a model of PGRN-mutant FTLD-TDP via tau-mediated synaptic pathology. *Nat Commun*. 9(1):433 Published 2018 Jan 30. doi: 10.1038/s41467-018-02821-z. 査読有
4. Fujita K, Mao Y, Uchida S, Chen X, Shiwaku H, Tamura T, Ito H, Watase K, Homma H, Tagawa K, Sudol M, Okazawa H. (2017) Developmental YAPdeltaC determines adult pathology in a model of spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Commun*. 8(1):1864. Published 2017 November 30; doi: 10.1038/s41467-017-01790-z. 査読有

5. Okazawa H. Ultra-Early Phase pathologies of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* Vol.93(6):361-377. doi: 10.2183/pjab.93.022. Published 2017 June 12. 査読有
6. Yamanishi E, Hasegawa K, Fujita K, Ichinose S, Yagishita S, Murata M, Tagawa K, Akashi T, Eishi Y, Okazawa H.(2017) A novel form of necrosis, TRIAD, occurs in human Huntington's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 5(1):19 Published 2017 March 8. doi: 10.1186/s40478-017-0420-1. 査読有
7. Mao Y, Chen X, Xu M, Fujita K, Sasabe K, Homma H, Murata M, Tagawa K, Tamura T, Kaye J, Finkbeiner S, Blandino G, Sudol M, Okazawa H.(2016) Targeting TEAD/YAP-transcription-dependent necrosis, TRIAD, ameliorates Huntington's disease pathology. *Hum Mol Genet.* 25(21):4749-4770. Published 2016 November 1. doi: 10.1093/hmg/ddw303. 査読有
8. Fujita K, Motoki K, Tagawa K, Chen X, Hama H, Nakajima K, Homma H, Tamura T, Watanabe H, Katsuno M, Matsumi C, Kajikawa M, Saito T, Saido T, Sobue G, Miyawaki A, Okazawa H. (2016) HMGB1, a pathogenic molecule that induces neurite degeneration via TLR4-MARCKS, is a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *Scientific Reports.* 6:31895. Published 2016 August 25. doi: 10.1038/srep31895. 査読有
9. Mao Y, Tamura T, Yuki Y, Abe D, Tamada Y, Imoto S, Tanaka H, Homma H, Tagawa K, Miyano S, Okazawa H. (2016) The hnRNP-Htt axis regulates necrotic cell death induced by transcriptional repression through impaired RNA splicing. *Cell Death and Disease* Vol.7: e2207. Published 2016 April 28. doi:10.1038/cddis.2016.101. 査読有

〔学会発表〕(計 53 件)

1. Hitoshi Okazawa. “ Developmental YAPdeltaC determines adult pathology of spinocerebellar ataxia type 1 ” the 75th FUJIHARA Seminar, Tokyo Medical and Dental University(東京)、発表日 2018/12/3 (招待講演)
2. 岡澤 均「認知症の超早期病態と新たな治療戦略」、生命科学連携推進協議会 市民公開講演会、東京大学医科学研究所(東京)、発表日 2018/10/9 (招待講演)
3. Hitoshi Okazawa. “ Symptomatic and Disease Modifying Treatments for Chorea and Huntington's Disease ”, MDS2018 International Congress, Hong Kong Convention and Exhibition Centre (中国 香港)、発表日 2018/10/7(招待講演)
4. Hitoshi Okazawa. “ Comprehensive proteome analysis reveals ultra-early phase pathologies of neurodegenerative diseases ”, ICN 2018 Tokyo, Keio Plaza Hotel (東京), 発表日 2018/9/27 (招待講演)
5. Hitoshi Okazawa. “ Novel Hippo pathway-dependent necrosis, TRIAD and Huntington's disease ” 「Hippo 経路依存的・新規ネクロシス TRIAD とハンチントン病」、国際神経病理学会 (ICN 2018 Tokyo) Keio Plaza Hotel (東京) 発表日 2018/9/24 (招待講演)
6. 岡澤 均 「HMGB1 を介した認知症の超早期病態と治療開発」、第 40 回日本生物学的精神医学会・第 61 回日本神経化学学会大会、神戸国際会議場(神戸)、発表日 2018/9/8 (招待講演)
7. 岡澤 均「網羅的分子ネットワーク解析が紐解く新たな神経変性病態と治療応用」、第 55 回日本臨床分子医学会学術集会、京都みやこメッセ(京都府京都市)、発表日 2018/4/13

(招待講演)

8. Hitoshi Okazawa. "Impaired DNA Damage Repair in SCA1 and Other CAG Repeat Diseases" Oral, Gordon Research Conference, Mount Snow Grand Summit Hotel (アメリカ、バーモント州) 発表日 2017/06/06 (招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 13 件)

1. 名称: 神経変性疾患タンパク質の異常凝集を伴って発症する神経疾患に対する予防又は治療剤、及び上記予防又は治療剤のスクリーニング方法  
発明者: 岡澤 均  
出願人: 東京医科歯科大学, 株式会社ペプチド研究所  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-177528  
出願年: 2016 年度  
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件) 該当なし

〔その他〕【プレスリリース】

1. 「アルツハイマー病の新規病態と遺伝子治療法の発見」 新規の超早期病態分子を標的にした治療法開発にむけて 2018 年 10 月 5 日  
[http://www.tmd.ac.jp/press-release/20181005\\_1/index.html](http://www.tmd.ac.jp/press-release/20181005_1/index.html)
2. アルツハイマー病と前頭側頭葉変性症の共通病態を発見」 新たなシグナルを標的とする早期治療法の開発にむけて  
2018 年 1 月 30 日 [http://www.tmd.ac.jp/press-release/20180130\\_1/index.html](http://www.tmd.ac.jp/press-release/20180130_1/index.html)
3. 「発達期病態が脊髄小脳失調症の発症後予後に関与する」 YAPdeltaC による治療法開発にむけて 2017 年 11 月 30 日  
[http://www.tmd.ac.jp/press-release/20171130\\_1/index.html](http://www.tmd.ac.jp/press-release/20171130_1/index.html)
4. 「ハンチントン病の新しい治療薬シーズを発見」 化合物ライブラリーの統合的スクリーニングから意外な結果 2016 年 9 月 22 日  
<http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20160922.pdf>
5. 「ハンチントン病の新しい治療戦略を開発」 第 3 の細胞死を標的とする神経変性疾患治療の可能性をひらく 2016 年 9 月 13 日  
<http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20160913.pdf>
6. 「アルツハイマー病の新たな抗体治療に道をひらく」 アミロイド凝集前の病態シグナルを治療の分子標的に 2016 年 8 月 25 日  
<http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20160825.pdf>
7. 「RpA1 を用いて小脳失調症モデルマウスの治療に成功」 新しい小脳失調症の遺伝子治療開発に期待 2016 年 8 月 12 日  
<http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20160812.pdf>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 該当なし