

平成21年 5月18日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19700343  
 研究課題名(和文) 変異 $\gamma$ PKC発現細胞及びモデル動物を用いた脊髄小脳変性症に対する新規治療薬の探索  
 研究課題名(英文) Exploration of novel therapeutic agents against spinocerebellar degeneration using cultured cells and model mice expressing mutant  $\gamma$ PKC  
 研究代表者  
 関 貴弘 (SEKI TAKAHIRO)  
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：50335650

研究成果の概要：脊髄小脳失調症（SCA）の新規治療薬の探索を目的として、変異 $\gamma$ PKCの凝集体形成・細胞毒性に対する薬物スクリーニングを行う系を構築した。二糖類トレハロースとアミロイド抑制化合物コンゴローレッドが、この系において変異 $\gamma$ PKCの凝集体形成・細胞毒性を抑制した。これらの薬物はSCAの病変部位である小脳プルキンエ細胞の初代培養でも変異 $\gamma$ PKCの凝集体形成・細胞毒性を抑制し、新規SCA治療薬として期待できる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード：精神・神経疾患の病態と治療、脊髄小脳失調症、ミスセンス変異、 $\gamma$ PKC、薬物スクリーニング、トレハロース、コンゴローレッド

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症は小脳または脊髄性の運動失調を主症状とし、小脳や脊髄の神経核や伝導路に病変を持つ神経変性疾患の総称である。全体の約40%は遺伝性であり、同定された原因遺伝子座の順に脊髄小脳失調症(SCA)1型、2型と分類されている。近年、SCAの14型(SCA14)の原因遺伝子がプロテインキナーゼC(PKC)の神経特異的分子種の $\gamma$ PKCであると同定された。しかしながら、

$\gamma$ PKC遺伝子変異がSCAを発症させる詳細な分子機序は明らかになっていない。

申請者らは $\gamma$ PKCとgreen fluorescent protein(GFP)との融合タンパク質( $\gamma$ PKC-GFP)にSCA14の原因として特定された遺伝子変異を導入し、培養細胞に発現させたところ、変異 $\gamma$ PKC-GFPは細胞質で凝集し、細胞死を誘発しやすいことが明らかとなった。さらに、変異 $\gamma$ PKCの凝集体が見られる細胞では、ユビキチン・プロテアソーム系(UPS)の機能低下

や小胞体ストレスが誘発されていることが明らかとなり、それが神経細胞死の原因であると推測している。このような変異タンパク質の凝集体形成やそれによるUPS異常や小胞体ストレスは、パーキンソン病やアルツハイマー病などの他の神経変性疾患の多くでも報告されている現象であり、神経変性疾患における神経細胞死には共通の分子メカニズムが存在することが示唆された。

## 2. 研究の目的

変異  $\gamma$ PKC の凝集体形成により細胞死が誘発されたため、このような凝集体形成を抑制する薬物及び凝集体による細胞死を抑制する薬物は SCA の治療薬として有用であると考えられる。このような薬物を *in vitro* でスクリーニングする系を確立し、新たな SCA の治療薬となりうる候補化合物を探索すること、及び疾患モデルとなりうるトランスジェニックマウスを作製し、候補化合物が *in vivo* でも有効かどうかを検討すること、以上2点を研究目的とした。

## 3. 研究の方法

以上の研究目的を達成するために、以下の4点について、検討した。

(1) *In vitro*薬物スクリーニングを行うために、変異 $\gamma$ PKC-GFPの凝集体形成や細胞死が誘発される培養細胞系を確立する。

(2) 変異 $\gamma$ PKC-GFP発現細胞を用いて、凝集体形成や細胞死を抑制する薬物を *in vitro* でスクリーニングする。

(3) SCA14のモデル動物として、変異 $\gamma$ PKC-GFP発現トランスジェニックマウスを作製する。

(4) *In vitro*スクリーニングにより効果の見た薬物が *in vivo*でも効果を示すかを、変異 $\gamma$ PKC-GFP発現トランスジェニックマウスを用いて検討する。

## 4. 研究成果

(1) 変異  $\gamma$ PKC-GFP の凝集体形成や細胞死が誘発される細胞系を確立するため、アデノウイルスベクターを用いて、神経モデル細胞株である SH-SY5Y 細胞へ変異  $\gamma$ PKC-GFP の遺伝子導入を行った。その結果、発現1~2日という短い期間で変異  $\gamma$ PKC-GFP の凝集体形成が多くの細胞で観察され (図1)、発現3日後には核のクロマチン凝縮やカスパーゼ3の活性化などを伴うアポトーシスが観察された。アデノウイルスベクターにより SH-SY5Y 細胞に変異  $\gamma$ PKC-GFP を発現させる系は *in vitro* 薬物スクリーニング系として利用可能であると考えられる。

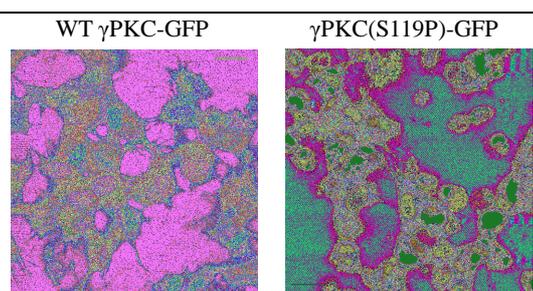


図1 野生型 (WT) 及び変異 (S119P)  $\gamma$ PKC-GFP を発現する SH-SY5Y 細胞。アデノウイルスベクター感染2日後の細胞の GFP 蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察 (bar = 20  $\mu$ m)。

(2) この培養細胞系を用いて、凝集体形成抑制作用や細胞死抑制作用を持つ薬物の *in vitro* スクリーニングを行った。その結果、ポリグルタミンなどの凝集体形成抑制作用を持つトレハロースが変異  $\gamma$ PKC-GFP の凝集体形成及びアポトーシスを抑制することが明らかとなった (図2)。トレハロースは変異  $\gamma$ PKC-GFP 発現細胞ライセートにおいても凝集体形成抑制作用を示し、また、トレハロースが SH-SY5Y 細胞内へと取り込まれたため、トレハロースは変異  $\gamma$ PKC-GFP に直接的に作用して安定化させることにより、凝集体形成や細胞死誘発を抑制するのではないかと考えられる。

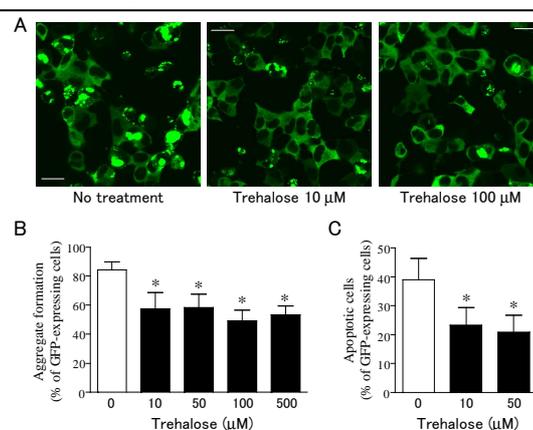


図2 変異  $\gamma$ PKC-GFP による凝集体形成・アポトーシス誘発に対するトレハロースの効果

(A)  $\gamma$ PKC (S119P)-GFP を SH-SY5Y 細胞に発現させて2日後の GFP 蛍光画像 (bar = 20  $\mu$ m)。 (B) ウイルス感染2日後の SH-SY5Y 細胞における  $\gamma$ PKC(S119P)-GFP の凝集体形成とそれに対するトレハロースの効果 (\*  $p < 0.05$  vs no treatment (paired t-test))。 (C) ウイルス感染3日後の  $\gamma$ PKC(S119P)-GFP 発現 SH-SY5Y 細胞におけるアポトーシス誘発とそれに対するトレハロースの効果の定量的解析。アポトーシスは核のクロマチン凝縮を指標に判定した (\*  $p < 0.05$  vs no treatment (paired t-test))。

また、アミロイド抑制化合物の一つであるコンゴーレッドも変異  $\gamma$ PKC-GFP 凝集体形成抑制作用を有していた。この結果により、変異  $\gamma$ PKC の凝集体がアミロイド構造を取る可

能性があること、変異  $\gamma$ PKC により発症する SCA14 は他の神経変性疾患と共通発症メカニズムを持つことが示唆される。

(3) 変異  $\gamma$ PKC-GFP を小脳プルキンエ細胞に発現するトランスジェニックマウスの作製を試みたが、完成には至らなかった。そこで、より疾患に近いモデルとして、マウス胎仔小脳由来初代培養を作製し、変異  $\gamma$ PKC が SCA14 の病変部位である小脳プルキンエ細胞に及ぼす影響を検討した。変異  $\gamma$ PKC-GFP は小脳プルキンエ細胞においても凝集体を形成し、アポトーシスを誘発することが明らかとなった。また、小脳プルキンエ細胞は非常に発達した樹状突起を持つが、変異  $\gamma$ PKC-GFP 発現により樹状突起の縮小や樹状突起上のスパインの減少が観察された。樹状突起の縮小は変異  $\gamma$ PKC-GFP の凝集体が見られる細胞、見られない細胞の両方で観察されており、凝集体形成に依存せず、変異  $\gamma$ PKC により引き起こされていた (図 3)。凝集体の見られない細胞でも変異  $\gamma$ PKC-GFP はオリゴマーを形成しており、細胞内流動性が低下し、刺激依存性の細胞膜への translocation をあまり示さなくなっていた。オリゴマー形成による変異  $\gamma$ PKC の translocation 能低下により、細胞内シグナル伝達に異常が生じ、プルキンエ細胞の樹状突起縮小に繋がる可能性も考えられる。

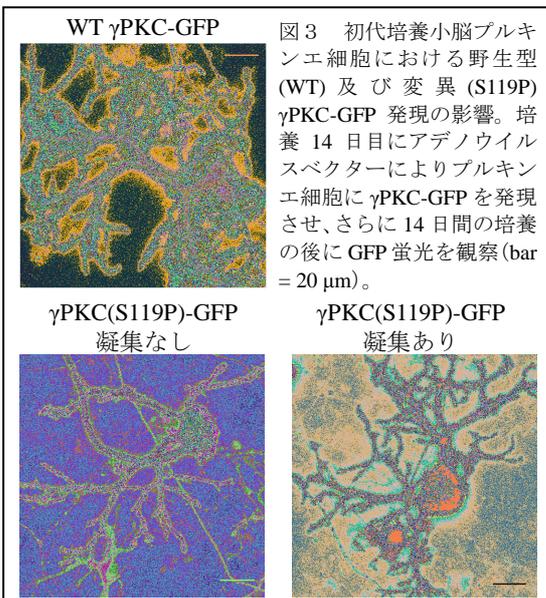


図 3 初代培養小脳プルキンエ細胞における野生型 (WT) 及び変異 (S119P)  $\gamma$ PKC-GFP 発現の影響。培養 14 日目にアデノウイルスベクターによりプルキンエ細胞に  $\gamma$ PKC-GFP を発現させ、さらに 14 日間の培養の後に GFP 蛍光を観察 (bar = 20  $\mu$ m)。

(4) SH-SY5Y 細胞において、変異  $\gamma$ PKC の凝集体形成・細胞毒性を抑制効果を示したトレハロースやコンゴレッドが初代培養小脳プルキンエ細胞においても同様の効果を示すかを検討した。トレハロース、コンゴレッドの両者ともに初代培養小脳プルキンエ細胞における変異  $\gamma$ PKC-GFP の凝集体・オリゴマー形成を抑制し、細胞死も抑制することが明らかとなった。

また、トレハロースは変異  $\gamma$ PKC-GFP によ

る樹状突起の縮小などの形態的な異常も改善した (図 4)。しかし、この効果は変異  $\gamma$ PKC-GFP の凝集体の見られないプルキンエ細胞のみで観察され、凝集体を有するプルキンエ細胞では樹状突起を改善する効果は見られなかった。この結果より、トレハロースは SCA14 の治療、特に疾患初期の治療に有効ではないかということが示唆された。

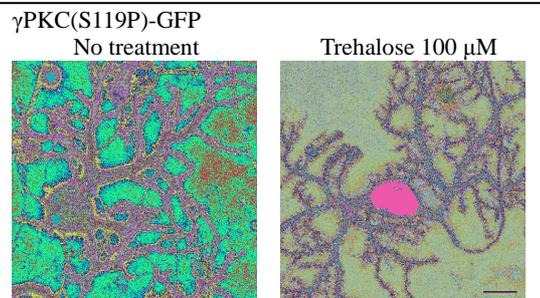


図 4 初代培養小脳プルキンエ細胞での変異 (S119P)  $\gamma$ PKC-GFP 発現に対するトレハロースの効果。培養 14 日目にプルキンエ細胞に  $\gamma$ PKC-GFP を発現させると同時にトレハロース (100  $\mu$ M) 処置を行い、さらに 14 日間の培養の後に GFP 蛍光を観察 (bar = 20  $\mu$ m)。

## 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 4 件)

1. Seki, T., Shimahara, T., Yamamoto, K., Abe, N., Amano, T., Adachi, N., Takahashi, H., Kashiwagi, K., Saito, N. and Sakai, N. Mutant  $\gamma$ PKC found in spinocerebellar ataxia type 14 induces aggregate-independent maldevelopment of dendrites in primary cultured Purkinje cells. *Neurobiol. Dis.*, (査読有) 33, 260-273 (2009)
2. Adachi, N., Kobayashi, T., Takahashi, H., Kawasaki, T., Shirai, Y., Ueyama, T., Matsuda, T., Seki, T., Sakai, N. and Saito, N. Enzymological analysis of mutant protein kinase C $\gamma$  causing spinocerebellar ataxia type 14 and dysfunction in Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *J. Biol. Chem.*, (査読有) 283, 19854-19863 (2008)
3. Seki, T., Takahashi, H., Adachi, N., Abe, N., Shimahara, T., Saito, N. and Sakai, N. Aggregate formation of mutant protein kinase C gamma found in spinocerebellar ataxia type 14 impairs ubiquitin-proteasome system and induces endoplasmic reticulum stress. *Eur. J. Neurosci.*, (査読有) 26, 3126-3140 (2007)
4. Okii, N., Amano, T., Seki, T., Matsubayashi, H., Mukai, H., Ono, Y., Kurisu, K. and Sakai, N. Fragmentation of protein kinase N (PKN) in

the hydrocephalic rat brain.  
*Acta Histochem. Cytochem.*, (査読有) 40,  
112-121 (2007)

[学会発表] (計 17 件)

1. 山本和央、他 遺伝性脊髄小脳失調症 14 型 (SCA14) で見出された変異  $\gamma$ PKC の分解にオートファジーが関与する 第 82 回日本薬理学会年会 2009 年 3 月 17 日 横浜市
2. 関 貴弘、他 遺伝性脊髄小脳失調症 14 型で見出された変異  $\gamma$ PKC のリソソーム系タンパク質分解に及ぼす影響 第 82 回日本薬理学会年会 2009 年 3 月 16 日 横浜市
3. 関 貴弘、他 トレハロースは脊髄小脳失調症 14 型の原因である変異  $\gamma$ PKC による細胞機能異常を減弱する BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会) 2008 年 12 月 11 日 神戸市
4. Seki, T., et al., Disaccharide trehalose alleviated various dysfunctions of Purkinje cells triggered by the mutant  $\gamma$ PKC found in spinocerebellar ataxia type 14. *Neuroscience 2008* (the 38th annual meeting of the Society for Neuroscience), 2008 年 11 月 18 日, Washington D. C., USA
5. Yamamoto, K., et al., Autophagic degradation of mutant protein kinase C gamma found in spinocerebellar ataxia type 14, *Neuroscience 2008* (the 38th annual meeting of the Society for Neuroscience), 2008 年 11 月 18 日, Washington D. C., USA
6. 関 貴弘、他 アミロイド染色色素 Congo red は脊髄小脳失調症 14 型 (SCA14) の原因である変異  $\gamma$ PKC のオリゴマー及び凝集体形成を抑制する 第 114 回日本薬理学会近畿部会 2008 年 11 月 14 日 神戸市
7. 関 貴弘、他 Trehalose alleviates various cellular dysfunctions caused by the mutant  $\gamma$ PKC found in SCA14 in neuronal cell lines and primary cultured cerebellar Purkinje cells. 第 31 回日本神経科学大会 2008 年 7 月 9 日 東京都
8. 酒井規雄、他 脊髄小脳失調症 (SCA14) で見いだされた変異  $\gamma$ PKC の小脳プルキンエ細胞における特性 第 49 回日本神経学会総会 2008 年 5 月 15 日 横浜市
9. 関 貴弘、他 初代培養小脳プルキンエ細胞において、二糖類トレハロースは脊髄小脳失調症 14 型で発見された変異  $\gamma$ PKC により引き起こされる様々な機能異常を改善した 第 81 回日本薬理学会年会 2008 年 3 月 17 日 横浜市
10. 関 貴弘、他 脊髄小脳失調症 14 型 (SCA14) で見出された変異  $\gamma$ PKC が初代培養プルキンエ細胞に及ぼす影響 BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会) 2007 年 12 月 14 日 横浜市
11. 高橋英之、他 脊髄小脳失調症 14 型における変異 PKC $\gamma$  の C1A とキナーゼドメインを介した分子間相互作用・凝集体形成傾向の重要性 第 112 回日本薬理学会近畿部会 2007 年 11 月 16 日 大阪市
12. 田中杏奈、他 セロトニン神経由来細胞株 RN46A におけるセロトニントランスポーターの機能解析 — 疾患感受性変異体を用いた検討 — 第 112 回日本薬理学会近畿部会 2007 年 11 月 16 日 大阪市
13. Seki, T., et al., Aggregate formation and cytotoxic effect of mutant protein kinase  $\gamma$  found in spinocerebellar ataxia 14 was prevented by disaccharide trehalose. *Neuroscience 2007* (the 37th annual meeting of the Society for Neuroscience) 2007 年 11 月 5 日, San Diego, USA
14. Sakai, N., et al., Effects of mutant  $\gamma$ PKC found in SCA14 on the nature of primary-cultured Purkinje cells. *Neuroscience 2007* (the 37th annual meeting of the Society for Neuroscience) 2007 年 11 月 5 日, San Diego, USA
15. 関 貴弘、他 Effects of mutant  $\gamma$ PKC found in SCA14 on Purkinje cells in mouse cerebellar primary culture. *Neuro2007* (第 30 回日本神経科学大会、第 50 回日本神経化学学会大会、第 17 回日本神経回路学会大会、合同大会) 2007 年 9 月 10 日 横浜市
16. 玉浦 萌、他 セロトニントランスポーター機能の細胞特異性の検討 第 113 回日本薬理学会禁忌部会 2007 年 6 月 20 日 岡山市
17. 酒井規雄、他 カオリン誘発水頭症ラットにおけるプロテインキナーゼ N(PKN)の断片化 第 111 回日本薬理学会近畿部会 2007 年 6 月 15 日 名古屋市

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

関 貴弘 (SEKI TAKAHIRO)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教  
研究者番号：50335650

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者