

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461549

研究課題名(和文)細胞内シグナル伝達経路を標的とする脊髄性筋萎縮症治療法の開発

研究課題名(英文)Drug treatment for spinal muscular atrophy activating signal transduction pathways

研究代表者

西尾 久英(Nishio, Hisahide)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80189258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄性筋萎縮症(SMA)は、SMN1遺伝子欠失で生じる遺伝性神経筋疾患である。最近、交感神経作動薬のサルブタモールがSMA患者の症状を改善すると報告された。我々は、その機序を解明するためにSMN1遺伝子欠失線維芽細胞にサルブタモールを投与したところ、SMN2遺伝子由来のSMN蛋白が増加した。PKA阻害剤、脱ユビキチン化酵素阻害剤)を投与したときには、その効果は抑制された。また、HeLa細胞の実験で、サルブタモールがSMNのユビキチン化を阻害することが示された。以上より、同剤の「PKAシグナル伝達系を介してSMN蛋白のユビキチン化を阻害し、SMN蛋白を増加させる」という機序が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Spinal muscular atrophy (SMA) is a genetic neuromuscular disorder. SMA is caused by the loss of the SMN1 gene. Although the SMN2 gene also produces SMN protein, it is not enough to compensate for the loss of the SMN1 gene. Salbutamol (adrenergic drug) was reported to improve SMA symptoms. To clarify the mechanism, we treated SMA fibroblasts lacking the SMN1 gene with salbutamol, and analyzed SMN2 mRNA and SMN protein levels. Salbutamol increased SMN protein levels in a dose-dependent manner, although SMN2 mRNA levels were not changed. The salbutamol-induced increase in SMN protein level was blocked by PKA inhibitor and deubiquitinase inhibitor. Immunoprecipitation assay using HeLa cells showed that salbutamol decreased ubiquitinated SMN protein levels, suggesting that salbutamol inhibited ubiquitination. These findings suggest that salbutamol increases SMN protein levels in SMA cells by inhibiting ubiquitin-mediated SMN degradation via activating 2-adrenergic receptor-PKA pathways.

研究分野：小児神経学

キーワード：脊髄性筋萎縮症 SMN1遺伝子 SMN2遺伝子 SMN蛋白 サルブタモール 交感神経作動薬  
ユビキチン化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) SMA の臨床像について 脊髄性筋萎縮症 (以下 SMA) は、頻度の高い小児運動ニューロン病である。SMA は 3 つの臨床型に分類される。1 型は生後 6 ヶ月までに発症する急性・重症型である。2 型 (中間型) は生後 18 ヶ月までに発症する中等症型である。3 型は 18 ヶ月以降に発症する軽症型である。

(2) SMA の責任遺伝子について SMA は常染色体劣性遺伝疾患であり、5 番染色体上の SMN1 遺伝子が責任遺伝子である。95% 以上の患者において SMN1 遺伝子の欠失、残りの患者に SMN1 遺伝子内変異が認められる。現在、SMA は、SMN 蛋白の発現低下あるいは機能低下によって引き起こされる疾患であると理解されている。

(3) 治療戦略について SMN2 遺伝子は SMN1 遺伝子と相同で同じ蛋白をコードしているが、SMN1 遺伝子とはスプライシングが異なり、エクソン 7 をスキップした転写産物や、機能をもたない蛋白を産生することが多い。そのため、SMN2 遺伝子が存在しているにもかかわらず、SMN1 遺伝子異常による SMA 発症を阻止できない。近年、SMA の治療戦略として SMN2 遺伝子の利用が考えられている。SMN2 遺伝子転写産物の発現増加、スプライシング修正によって SMA が治療できると考えられるようになったのである。

## 2. 研究の目的

サルブタモールは気管支拡張剤としてよく用いられる 2 - アドレナリン作動薬である。最近、サルブタモールが SMA 患者の臨床症状を改善したという報告が出た。その後、患者細胞において SMN 蛋白を増加したという報告も出た。それらの報告では、その機序として、SMN2 遺伝子転写産物の発現を増加させ、かつスプライシングを修正するためと考えられている。しかし、この機序を確かめる研究は少なく、我々は、これまでの実験からそのような報告の根拠は弱いように思われた。そこで、我々は、サルブタモールが SMN 蛋白を増加させることを確認し、かつその機序を解明するために、SMA 患者線維芽細胞、HeLa 細胞を用いて実験を行った。

## 3. 研究の方法と結果

### (1) 実験「サルブタモールは SMN 蛋白量を増加させるか」

SMA 患者線維芽細胞 (SMN1 遺伝子は完全に欠失し、SMN2 遺伝子が 3 コピー残存している) に、各種濃度のサルブタモール (0.005, 0.05, 0.5  $\mu\text{M}$ ) を添加し、36 時間経過を観察したが、明らかな SMN2 遺伝子転写

産物の発現変動は認められなかった。Fig.1 に完全長型 SMN2 遺伝子転写産物の発現レベルを示す。

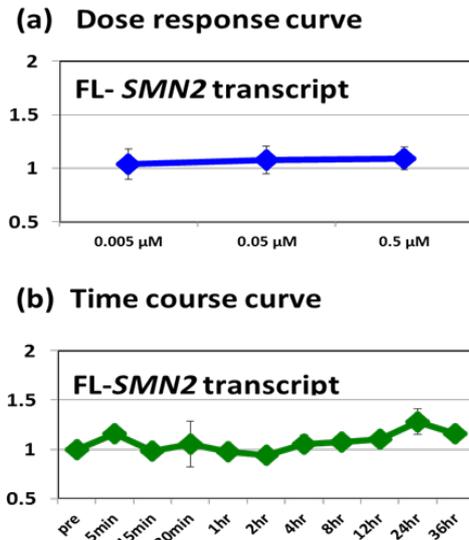


Fig. 1 FL-SMN2 transcript levels in salbutamol-treated SMA fibroblasts.

しかし、サルブタモール用量依存的に、SMN 蛋白量の増加が認められた (Fig.2)。このことより、サルブタモールには、SMN2 遺伝子転写産物の調節を介さないで、SMN 蛋白量を増加させる機序が存在するものと思われた。

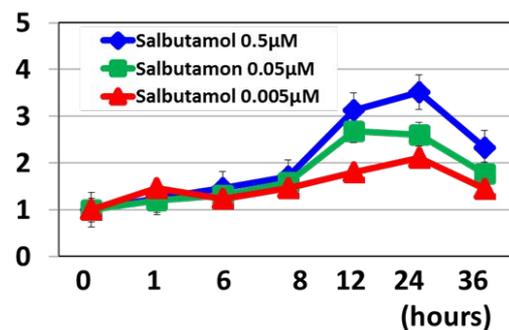


Fig. 2 SMN protein levels in salbutamol-treated SMA fibroblasts.

### (2) 実験「PKA 阻害剤は、サルブタモールによる SMN 蛋白量増加を抑制するか」

2 - アドレナリン受容体の下流蛋白である PKA が SMN2 蛋白量に及ぼす影響を知るために実験を行った。SMA 患者線維芽細胞に、サルブタモール (0.5  $\mu\text{M}$ ) と PKA 阻害剤 (14 - 22 amide cell-permeable, myristoylated : 1 mM) を添加したところ、サルブタモールの効果は完全に抑制され、SMN2 蛋白量の増加は認められなくなった (Fig.2)。このことより、サルブタモールによる

る SMN 蛋白量の増加には、PKA の働きが必須であることが明らかになった。

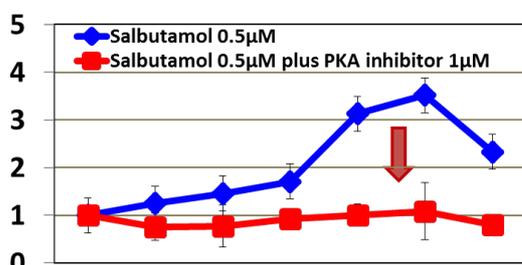


Fig. 3 Effect of PKA inhibitor on salbutamol-treated SMA fibroblasts

### (3) 実験「サルブタモールは、SMN 蛋白ユビキチン化を抑制するか」

HeLa 細胞にサルブタモール (20 µM) を添加し、免疫沈降法を用いて、ユビキチン化 SMN 蛋白を検出した。この際、ユビキチン化 SMN 蛋白の検出を容易にするために、プロテオソーム阻害剤である MG-132 も用いた。サルブタモールは HeLa 細胞のユビキチン化 SMN 蛋白の割合を減少させていたことから、サルブタモールが SMN 蛋白ユビキチン化を抑制する機序が考えられた。

### (4) 実験「脱ユビキチン化阻害剤は、サルブタモールによる SMN 蛋白量増加を抑制するか」

SMA 患者線維芽細胞に、サルブタモール (0.5 µM) と脱ユビキチン化阻害剤 (PR-619 : 10 µM) を添加したところ、サルブタモールの効果は有意に抑制され、SMN2 蛋白量の増加が有意に抑制された (Fig.4)。このことより、SMA 患者線維芽細胞におけるサルブタモールによる SMN 蛋白量の増加は、ユビキチン化の抑制であることが明らかになった。

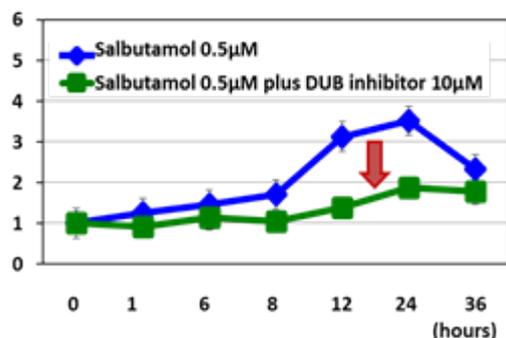


Fig. 4 Effect of deubiquitinase (DUB) inhibitor on salbutamol-treated SMA fibroblasts.

## 4. 研究成果

(1) 我々は、一連に実験で、サルブタモールによる SMN 蛋白量増加の機序には、PKA 経路を介して SMN 蛋白ユビキチン化を抑制する経路があることを見出した。

(2) 以上の成果より、SMA の治療戦略として、SMN 蛋白の分解を調節するという方向性があることが示された。

## 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 12 件)

1. Harahap NI, Nurputra DK, Ar Rochmah M, Shima A, Morisada N, Takarada T, Takeuchi A, Tohyama Y, Yanagisawa Y, Nishio H. Salbutamol inhibits ubiquitin-mediated survival motor neuron protein degradation in spinal muscular atrophy cells. *Biochem Biophys Rep*. 査読有 4:351-356. 2015  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.10.012>
2. Harahap NI, Takeuchi A, Yusoff S, Tominaga K, Okinaga T, Kitai Y, Takarada T, Kubo Y, Saito K, Sa'adah N, Nurputra DK, Nishimura N, Saito T, Nishio H. Trinucleotide insertion in the SMN2 promoter may not be related to the clinical phenotype of SMA. *Brain Dev*. 査読有 37:669-676. 2015  
[doi:10.1016/j.braindev.2014.10.006](https://doi.org/10.1016/j.braindev.2014.10.006)
3. Sa'adah N, Harahap NI, Nurputra DK, Rochmah MA, Morikawa S, Nishimura N, Sadewa AH, Astuti I, Haryana SM, Saito T, Saito K, Nishio H. A rapid, accurate and simple screening method for spinal muscular atrophy: High-resolution melting analysis using dried blood spots on filter paper. *Clin Lab*. 査読有 61:575-580. 2015  
[doi:10.7754/Clin.Lab.2014.141008](https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2014.141008)
4. Yamada H, Nishida Y, Maihara T, Sa'adah N, Harahap NI, Nurputra DK, Ar Rochmah M, Nishimura N, Saito T, Kubo Y, Saito K, Nishio H. Two Japanese patients with SMA type 1 suggest that axonal-SMN may not modify the disease severity. *Pediatr Neurol*. 査読有 52:638-641. 2015  
[doi:10.1016/j.pediatrneurol.2015.02.023](https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2015.02.023)
5. Kubo Y, Nishio H, Saito K. A new method for SMN1 and hybrid SMN gene analysis in spinal muscular atrophy using long-range PCR followed by sequencing.

- J Hum Genet. 査読有 60:233-239. 2015  
doi:10.1038/jhg.2015.16.
6. Saito T, Nurputra DK, Harahap NI, Harahap IS, Yamamoto H, Muneshige E, Nisizono H, Matsumura T, Fujimura H, Sakoda S, Saito K, Nishio H.  
A Study of valproic acid for patients with spinal muscular atrophy.  
Neurol Clin Neurosci, 査読有 3:49-57. 2015 doi:10.1111/ncn3.140
7. Kato N, Sa'Adah N, Ar Rochmah M, Harahap NI, Nurputra DK, Sato H, Sadewa AH, Astuti I, Haryana SM, Saito T, Saito K, Nishimura N, Nishio H, Takeuchi A.  
SMA screening system using dried blood spots on filter paper: Application of COP-PCR to the SMN1 deletion test.  
Kobe J Med Sci. 査読有 60:E78-85. 2015  
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/journal/contents/60/E78.pdf>
8. Yamamoto T, Sato H, Lai PS, Nurputra DK, Harahap NI, Morikawa S, Nishimura N, Kurashige T, Ohshita T, Nakajima H, Yamada H, Nishida Y, Toda S, Takanashi JI, Takeuchi A, Tohyama Y, Kubo Y, Saito K, Takeshima Y, Matsuo M, Nishio H.  
Intragenic mutations in SMN1 may contribute more significantly to clinical severity than SMN2 copy numbers in some spinal muscular atrophy (SMA) patients. Brain Dev. 査読有 36:914-920. 2014  
doi:10.1016/j.braindev.2013.11.009.
9. 西尾久英. 脊髄性筋萎縮症 遺伝子診断から治療戦略まで. 日本小児科学会誌, 査読有 118 : 1315-1323. 2014
10. Nishio H. PLS3 expression and SMA phenotype: a commentary on correlation of PLS3 expression with disease severity in children with spinal muscular atrophy. J Hum Genet. 査読有 59:64-65. 2014
11. Nurputra DK, Lai PS, Harahap NI, Morikawa S, Yamamoto T, Nishimura N, Kubo Y, Takeuchi A, Saito T, Takeshima Y, Tohyama Y, Tay SK, Low PS, Saito K, Nishio H. Spinal Muscular Atrophy: From Gene Discovery to Clinical Trials. Ann Hum Genet. 査読有 77:435-63. 2013  
doi:10.1111/ahg.12031.
12. 羽深理恵, 鈴木俊明, 長谷川博也, 唐澤環, 金子詩子, 池住洋平, 大橋伯, 赤坂紀幸, 遠山潤, 西尾久英, 齋藤昭彦.  
劇症肝不全を発症した脊髄性筋萎縮症の 1 例. 日本小児科学会雑誌, 査読有 116 : 1031-1036. 2013
- [学会発表](計 14 件)
1. Harahap NI, Nurputra DK, Ar Rochmah M, Shima A, Morisada N, Takarada T, Takeuchi A, Tohyama Y, Yanagisawa Y, Nishio H. Sulbutamol inhibits ubiquitin-mediated survival motor neuron protein degradation in spinal muscular atrophy cells. The 13th International Congress of Human Genetics 2016.4.7, 国立京都国際会館 (Kyoto)
2. Shima A, Ar Rochmah M, Morisada N, Yanagisawa Y, Harahap NI, Saito T, Umeno A, Kaneko K, Saito K, Iijima K, Nishio H. Gender effects on the severity of spinal muscular atrophy (SMA) in 286 Japanese patients diagnosed in 1996-2015. The 13th International Congress of Human Genetics 2016.4.6, 国立京都国際会館 (Kyoto)
3. 森貞直哉, 島亜衣, Harahap NI, Ar Rochmah M, 叶明娟, 飯島一誠, 西尾久英. 脊髄性筋萎縮症の重症度を規定する因子についての検討. 日本人類遺伝学会第 60 回大会, 2015.10.15, 京王プラザホテル (東京)
4. 齋藤加代子, 荒川玲子, 齋藤利雄, 西尾久英. 小児期発症脊髄性筋萎縮症に対するバルプロ酸ナトリウム多施設共同医師主導治験. 第 57 回日本小児神経学会学術集会, 2015.5.29, 帝国ホテル (大阪)
5. Dian K Nurputra, Morita H, Harahap NI, Rochmah MA, Tohyama Y, Nishio H. HDAC6, a new candidate for therapeutic target of Spinal Muscular Atrophy (SMA) The 11th Asian Society for Pediatric Research, 2015.4.17, グランキューブ大阪 (大阪)
6. 野口依子, 中町祐司, 林伸英, 河野誠司, 中川卓, 西尾久英. 脊髄性筋萎縮症における SMN1、SMN2、NAIP、GTF2H2、SERF1 遺伝子解析. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会 2014.11.23, 福岡国際会議場 (福岡)
7. Dian KN, Morita H, Tohyama Y, Nishio H. HDAC6, a new therapeutic target of SMA, work in the downstream pathway of cytoskeleton dynamics. 日本人類遺伝学会第 59 回大会, 2014.11.20, タワーホール船堀 (東京)
8. 山田博之, 西田吉伸, 松本貴子, 毎原敏郎, 山本友人, 西尾久英. SMN1 遺伝子

exon6にframeshift変異を認めた脊髄性筋萎縮症1型の一例. 第56回小児神経学会総会 2014.5.30, アクトシティ浜松(静岡)

9. Nurputra DK, Morita H, Nishio H, Tohyama Y. SMN is essential for the HDAC6 mediated tubulin-deacetylation in fibroblasts. 第61回日本生化学会近畿支部例会 2014.5.17, 京都産業大学(京都)

10. 西島数人, 加藤俊明, 馬艶, 西尾久英 分裂酵母モデル系を用いた脊髄性筋萎縮症の原因タンパク質 Smn1 の機能解明. 第124回日本薬理学会近畿部会 2013.11.1, 京都ガーデンパレス(京都)

11. 久保祐二, 山本友人, 森川悟, 西尾久英, 中嶋秀樹, 大下智彦, 倉重毅志, 齋藤加代子. 脊髄性筋萎縮症患者における新たな SMN1 遺伝子単離法による新規遺伝子変異の同定. 第20回日本遺伝子診療学会大会, 2013.7.20, アクトシティ浜松(静岡)

12. 西尾久英. 神経筋疾患と IGF-1: 脊髄性筋萎縮症治療法の確立に向けて. 第47回兵庫内分泌研究会 2013.7.6, 神戸ポートピアホテル(兵庫)

13. 中森正博, 大下智彦, 倉重毅志, 上野弘貴, 越智一秀, 丸山博文, 西尾久英, 松本昌泰. 軽症で経過している SMN1 遺伝子新規点変異(c.5C>T)を認めた spinal muscular atrophy type III の16歳男性例. 第94回日本神経学会中国・四国地方会 2013.6.29, 松山市総合コミュニティセンター(愛媛)

14. Nurputra DK, Morita H, Nishio H, Tohyama Y. Abnormal acetylation status of  $\alpha$ -tubulin in fibroblasts derived from SMA patients. 第60回日本生化学会近畿支部例会 2013.5.18, 大阪大学吹田キャンパス(大阪)

[図書](計1件)

1. 西尾久英 (分担執筆)【神経症候群(第2版)-その他の神経疾患を含めて-】変性疾患 運動ニューロン疾患 脊髄性筋萎縮症 5 番染色体性劣性遺伝性脊髄性筋萎縮症 脊髄性筋萎縮症[SMA I型(infantile acute SMA、Werdnig-Hoffmann病)、SMA II型(infantile chronic SMA、Dubowitz病)] 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.27 別冊神経症候群 II 日本臨床社, 533-537, 2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 久英 (NISHIO Hisahide)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 80189258

(2) 研究分担者

西村 範行 (NISHIMURA Noriyuki)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 00322719

森川 悟 (MORIKAWA Satoru)  
神戸大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 50457074