

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15071

研究課題名(和文) 神経細胞遊走障害を伴う遺伝性疾患に対する創薬探索

研究課題名(英文) Drug screening for genetic diseases that occur in conjunction with neuronal migration disorders.

研究代表者

山田 雅巳 (Yamada, Masami)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：10322851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回私たちは、神経細胞遊走障害を伴う遺伝性疾患に共通する創薬標的を微小管分子モーターに関連した細胞内物質輸送および分子ダイナミクスを指標に探索した。本研究は、これまでに私たちが同定した細胞質ダイニンを含む輸送複合体の荷台となる微小管フラグメント(tMT)とパーキンソン病等の神経変性疾患に於いて特徴的な構造体であるレビー小体を形成する α -シヌクレインが微小管上で挙動を共にしていることを明らかにした。今後は、 α -シヌクレインの変異あるいは欠損によって顕著なる神経細胞遊走障害が見られるかどうか、さらには、その遊走活性の低下を回復あるいは改善させる低分子化合物の網羅的なスクリーニングを行う。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we searched for a common drug target for genetic diseases that occur in conjunction with neuronal migration disorders, using intracellular transport and molecular dynamics related to microtubule molecule motors as indicators. The current study revealed that microtubule fragments (transportable microtubules: tMT), which are structures that serve as carriers for transport complexes, move along microtubules. These include cytoplasmic dynein, previously identified by our research group, and α -synuclein, which forms Lewy bodies that are characteristic of neurodegenerative disorders, including Parkinson's disease. In the future, we plan to investigate whether a mutation/deletion of α -synuclein would result in a marked change in the severity of neuronal migration disorders. Furthermore, we plan to conduct comprehensive screening of low molecular weight compounds that would restore or ameliorate decreased neuronal migration activity.

研究分野：細胞生物学

キーワード：神経細胞遊走障害 細胞内物質輸送 細胞質ダイニン 微小管分子モーター 発達障害 α -シヌクレイン

1. 研究開始当初の背景

私たちは、神経細胞遊走（移動）障害に起因する脳層構造の形成異常を特徴とした先天性神経疾患のひとつである滑脳症に着目し、「滑脳症の責任遺伝子 *Lis1* の機能不全と疾患発症に至る分子メカニズムの解明」と「カルパイン阻害薬による滑脳症治療薬の開発」の両側面から新規治療戦略に関する研究に取り組んできた。本研究開始当初までに、LIS1 の機能不全による「細胞内物流（移動細胞内在的なマシナリー）の攪乱・破綻」に起因する「神経細胞遊走の欠如」の観点から、滑脳症発症に至る分子メカニズムを明らかにする為に、LIS1 による微小管上での細胞内物質輸送制御メカニズムの解析を行ない、以下のような研究成果を挙げていた（図1参照）。

(1) LIS1 は、細胞質ダイニン（荷台となる）微小管フラグメント上に可逆的に固定して3者で輸送複合体を形成し（図1、赤枠内）、キネシンの Cargo（積み荷）として微小管プラス端へと順行性に輸送されることを明らかにした。これより、LIS1 の機能は、本来ならば逆行性の物質輸送を制御する細胞質ダイニンを微小管プラス端へとリサイクルする役割を果たしていると考えた（Yamada et al., *EMBO J*, 2008）。

(2) この LIS1-細胞質ダイニン複合体とキネシンのアダプタータンパク質として mNUDC を新規に同定した。この mNUDC は、様々なタンパク質、オルガネラの順行性輸送に於いても、キネシンとのアダプターとして機能する重要な因子であった。また、細胞質ダイニンとそのアクセサリタンパク質のダイナクチン(P150^{Glued})/ダイナミチン(P50)は、微小管プラス端への順行性輸送に於いては、挙動を共にしないことも合わせて報告した（Yamada et al., *EMBO J*, 2010）。

(3) LIS1 は、カルパインにより分解されることを独自に発見し、カルパインに対して阻害活性を有する低分子化合物が滑脳症疾患モ

デル(*Lis1* 遺伝子ヘテロ欠損マウス)でみられる滑脳症(様)症状を分子、細胞、組織、個体の各々のレベルで改善することを明らかにした（Yamada et al., *Nat Med*, 2009）。

さらに、自身が技術開発した「神経細胞遊走を伴う遺伝性疾患の判別と治療法の開発(特願)」による創薬探索の結果、新規カルパイン阻害薬を滑脳症治療薬の有力候補とすることができた(Toba et al., *Sci Rep*, 2013)。

(4) 神経終末および中心体側での微小管モーターからの Cargo の積み下ろしの分子制御メカニズムに於いて、LIS1 と共にアイドリング状態でキネシンの Cargo として微小管プラス端まで輸送された細胞質ダイニンは、低分子量 GTPase Rab6a が直接結合して LIS1 を解離させることによって、本来の逆行性分子モーターとして(再)活性化することを明らかにした(Yamada et al., *Nat Commun*, 2013)。

この際、輸送複合体から解離した LIS1 は、神経終末に於いて、カルパインによって分解されることが示唆される。

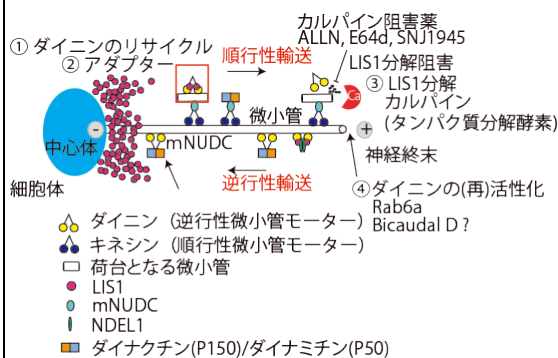


図1 LIS1による微小管モーターの細胞内物質輸送制御モデル

これらの私たちの研究成果は、LIS1 による微小管モーター輸送制御メカニズムを明らかにすると共に、神経細胞内に於ける LIS1 機能を解析する中で、カルパイン阻害活性をもつ低分子化合物が滑脳症治療薬となる可能性を示唆された(Yamada et al., *Int J Biochem & Cell Biol*, 2010)。

2. 研究の目的

本研究課題は、(胎児期の) 神経細胞遊走

障害に起因する遺伝性神経疾患に対する汎用な治療薬の開発を目的とする。これまでに、当該疾患に対する責任遺伝子は数多く同定されているが、対症療法を除外すれば、根本的な治療法は未だ確立されていない。この臨床症状である発達障害は、疾患自体が永続的で社会的に適応できない患児と家族の苦悩や負担は大きく、現代医学が解決すべき喫緊の課題の1つである。これらの疾患を惹起する責任遺伝子は、多種多様であるが、発達遅滞あるいは痙攣といった症状に類似性あるいは関連性が見られることから、疾患発症に至る共通の分子制御メカニズムが示唆される。本研究課題は、微小管関連因子の細胞内物質輸送および分子ダイナミクスの攪乱・破綻を指標に共通の創薬標的を同定し、低分子化合物による網羅的探索を行う。

3. 研究の方法

(1) まず、本研究に於いては、私たちが技術開発した「インビトロ神経細胞遊走障害を伴う疾患の判別方法と有効な治療薬スクリーニングへの応用 (特願, 発明者: 山田雅巳)」を用いて、種々の責任遺伝子に対する siRNA (small interference RNA) を電気穿孔法 (Neon® Transfection System, Thermo Fisher Scientific) にて幼若マウス (生後 2-3 日目) 由来の小脳の顆粒細胞内に遺伝子導入することによって、各々のタンパク発現を抑制することで神経細胞遊走障害が見られるものを網羅的にスクリーニングした。

(2) 研究開始当初の研究計画から派生して、その機能不全によって神経細胞遊走障害を惹起する LIS1 を含む微小管分子モーター複合体のさらなる輸送活性制御メカニズムを明らかにする為に、tMT を特異的に認識する TuJ1 抗体 (抗クラス III β -チューブリン抗体) を用いて免疫沈降を行ない、共沈した因子を MS/MS 質量分析を用いて同定した。

(3) (2) で同定した因子と LIS1/細胞質ダイ

ニン/(荷台となる)微小管フラグメントを含む順行性の輸送複合体の神経細胞内に於ける分子動態を下記の方法で直接観察・解析した。幼若マウス由来の後根神経節細胞内に上記の遺伝子を mTurquoise(mTQ)、mNeonGreen(mNG)、mCherry の異なる 3 波長領域の蛍光タンパク質で標識した融合タンパクとして発現させた。この際、高速(切り替え)フィルターホイール (SPECTRA X light engine, lumencor) を要する蛍光顕微鏡システム (Ti-E, Nikon Instech Co.) を用いてライブセルイメージングを行った。さらに、同細胞を 4%PFA 固定後、超解像蛍光顕微鏡 (N-SIM, Nikon Instech Co.) を用いて、これらの輸送複合体構成因子の詳細なる解析を行った。

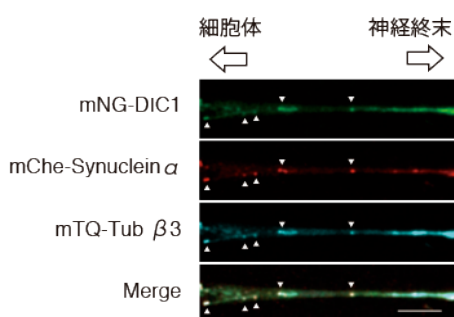
4. 研究成果

まず、本アッセイにより、神経細胞遊走障害症の一つである滑脳症の疾患モデル (*Lis1* 遺伝子ヘテロ欠損マウス) 由来の神経細胞で見られる遊走活性の低下が見られた。さらに、カルパイン阻害活性をもつ低分子化合物である SNJ-1945 にこの神経細胞遊走活性の低下を回復・改善させる効果を見ることができた。但し、その他の神経細胞遊走障害の責任遺伝子をノックダウンさせた細胞に於いては、顕著なる神経細胞遊走の低下を確認することができなかった。実際に神経細胞遊走の低下が見られないのか、電気穿孔法を用いた RNA 干渉法による責任遺伝子のノックダウンに問題があるのかさらなる検討が必要である。

そこで、本研究計画立案当初の作業仮説から派生して、その機能不全によって神経細胞遊走障害を惹起する LIS1 を含む微小管分子モーター複合体のさらなる輸送活性制御メカニズムを明らかにする為に、tMT を特異的に認識する TuJ1 抗体 (抗クラス III β -チューブリン抗体) を用いて免疫沈降を行ない、

パーキンソン病などの神経変性疾患に特徴的な構造体であるレビー小体を形成することが知られている α -シヌクレインを MS/MS 質量分析を用いて同定した。

この α -シヌクレインは、私たちが LIS1 を含む微小管上での輸送複合体として同定した構成因子、つまり、細胞質ダイニン、tMT および mNUC と微小管上での挙動が一致していることが生細胞を用いたライブ観察によって明らかになった。さらに、これらは固定化した神経細胞に対する超解像顕微鏡による解析結果においても、それらの分子挙動の一致が示唆された (図 2)。



[図 2] 超解像蛍光顕微鏡による後根神経細胞の観察像

α -シヌクレインの蓄積は、パーキンソン病などの神経変性疾患の原因とされている。また、微小管結合タンパク質としての性質も知られていた。本研究に於いて、これまでに私たちが発見した微小管輸送複合体と α -シヌクレインとの関連が明らかになったことにより、神経細胞遊走障害関連疾患の発症に至る共通の分子制御が示唆されたことは大きな意義がある。今後は、tMT あるいは細胞質ダイニン・tMT 等を含む順行性輸送複合体形成に於ける α -シヌクレインの役割を明らかにすることで神経細胞遊走障害に共通する神経疾患発症メカニズムのさらなる解明に迫りたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

① 山田雅巳

先天性神経疾患に対する新しい治療戦略、ブレインサイエンス・レビュー-2017、査読無、2017、pp283-304.

② 山田雅巳

神経細胞遊走障害を伴う遺伝性疾患に対する創薬探索、上原記念生命科学財団・研究報告集、査読無、Vol. 30 (063)、2016、pp1-7.

③ 山田雅巳

神経細胞遊走障害を伴う先天性神経疾患に共通する細胞内物質輸送機構の解明、第一三共生命科学研究振興財団研究報告集・研究助成成果論文、査読無、Vol. 32、2016、pp232-246.

④ 山田雅巳、新井由之、永井健治

神経細胞内ロジスティクスと神経疾患発症メカニズムの関係、物質・デバイス領域共同研究拠点・平成 28 年度研究成果報告書、査読無、2016、p31 (20161191).

⑤ 山田雅巳

LIS1 の微小管モーター制御と滑脳症発症機構の解明、月刊「化学工業」、査読無、2015、Vol. 66、pp44-50.

⑥ 山田雅巳

LIS1 の微小管モーター制御と滑脳症発症機構の解明、物質・デバイス領域共同研究拠点・平成 27 年度研究成果報告書、査読無、2015、p26 (2014334).

[学会発表] (計 9 件)

① Masami Yamada

Intracellular logistics of LIS1 and cytoplasmic dynein in lissencephaly. 2016 ASCB (American Society of Cell Biology) Annual Meeting

San Francisco, CA, USA (Moscone Center)、2016年12月06日。

② 山田雅巳

インビトロ神経細胞遊走活性を指標とした新規創薬探索、ライフサイエンスワールド2016第13回アカデミックフォーラム、東京ビッグサイト(東京江東区)、2016年05月12日。

③ 山田雅巳

LIS1の微小管モーター制御と滑脳症発症機構の解明、第89回日本薬理学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2016年03月11日。

④ 山田雅巳

インビトロ神経細胞遊走活性を指標とした新規創薬探索、「メディカルジャパン2016」セミナー関西広域連合・研究成果発表会(招待講演)、インステックス大阪センタービル(大阪府大阪市)、2016年02月24日。

⑤ 山田雅巳

インビトロ神経細胞遊走活性を指標とした新規創薬探索、DSAN疾患別商談会大阪産業創造館(大阪府大阪市)、2016年01月29日。

⑥ 山田雅巳

インビトロ神経細胞遊走活性を指標とした新規創薬探索、第35回バイオ技術シーズ公開会(招待講演)、大阪科学技術センター(大阪府大阪市)、2015年12月02日。

⑦ 山田雅巳

ARL3およびLC8による細胞質ダイニン・ダイナクチン輸送複合体からのCargo荷

下しの分子制御機構、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会年会合同大会、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)、2015年12月01日。

⑧ 山田雅巳

インビトロ神経細胞遊走活性を指標とした新規創薬探索、イノベーション・ジャパン2015-大学見本市、東京ビッグサイト(東京都江東区)、2015年08月27日～2015年08月28日。

⑨ 山田雅巳

A regulatory mechanism of cargo unloading: ARL3 and LC8 coordinately induce dissociation of the dynein-dynactin. 第67回日本細胞生物学会大会、タワーホール船堀(東京都江戸川区)、2015年07月02日。

[図書](計0件)

該当するもの無し。

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 神経細胞遊走を伴う遺伝疾患治療薬のスクリーニング法

発明者: 山田雅巳

権利者: 大阪市立大学

種類: 特許

番号: 特許願2013-020620

出願年月日: 2016年01月19日

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

該当するものなし。

[その他]

福井大学学術研究院医学系部門・医学科領域・生命情報医科学講座・分子生体情報学分野ホームページ

<https://www.seika2.med.lab.u-fukui.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 雅巳 (YAMADA, Masami)

福井大学・学術研究院医学系部門・医学領域・生命情報医科学講座・分子生体情報学分野・教授

研究者番号: 1 0 3 2 2 8 5 1

(2) 研究協力者

盛山 哲嗣 (MORIYAMA, Tetsuji)

福井大学・学術研究院医学系部門・医学領域・生命情報医科学講座・分子生体情報学分野・助教

研究者番号: 5 0 6 2 7 9 9 0