

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04032

研究課題名(和文) 脊髄小脳変性症におけるアミロイド様線維形成機構の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of amyloid formation mechanism in Spinocerebellar ataxia and its application to drug therapy

研究代表者

齋藤 尚亮 (SAITO, NAOAKI)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教授

研究者番号：60178499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄小脳変性症14型(SCA14)の原因となる変異型PKC γ をモデルとして、凝集体形成を原因とする神経変性症の治療薬の開発を、特に分子シャペロンの機能に着目して行った。Hsp70の発現誘導作用を有し、脳内移行性の高い薬剤Hsp990は初代培養小脳プルキンエ細胞において、Hsp70発現を誘導し、変異型PKC γ の凝集体形成を抑制した。さらに、SCA14モデルマウスにおいても、Hsp990は経口投与により変異型PKC γ 凝集体を減少させた。これらの薬物をリード化合物としたHsp発現誘導化合物がSCA14の治療薬、さらには多くの神経変性症の治療薬となりうることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性症の多くは神経内に凝集体を形成することを原因としていることが知られている。これらの凝集体の形成を抑制することができれば、多くの神経変性症治療薬の開発につながると考えられる。本研究での成果は、今後、長期的な投与による効果、副作用を検討する必要があるが、これらの薬物をリード化合物としたHsp発現誘導化合物がSCA14の治療薬、さらには多くの神経変性症の治療薬となりうることを示された。同定された薬物は、アミロイド形成により発症するすべての神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、小脳脊髄変性症などの本質的な治療薬としても応用可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neurodegenerative disease that affects cerebellar Purkinje cells, is characterized by the intracellular formation of neurotoxic amyloid-like aggregates of genetic variants of protein kinase C γ (PKC γ). We studied the effect of Hsp90 inhibitors, such as celastrol and Hsp990, for the PKC γ aggregation by up-regulation of Hsp70 to develop a new drug for various neurodegenerative diseases. Hsp990, a BBB permeable Hsp90 inhibitor, diminished net PKC γ aggregation by preventing aggregate formation, resulting in decreased levels of apoptotic cell death among primary cultured Purkinje cells expressing PKC γ variant. Furthermore, oral administration of Hsp990 decreased PKC γ aggregation in SCA14 model mice. These compounds may be of utility as therapeutic agents against SCA14.

研究分野：神経薬理

キーワード：リン酸化酵素 アミロイド 創薬 Hspファミリー モデル動物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患である脊髄小脳変性症 14 型 (SCA14) が PKC γ の変異により発症することが報告され、PKC 研究で世界をリードしてきた我々はその発症メカニズムについても重要な報告を行ってきた。まず、SCA14 の原因となる変異 PKC γ の酵素学的な解析により、変異 PKC γ は Ca²⁺ イオンチャネルである TRPC3 をリン酸化できないことにより、持続的な Ca²⁺ イオン流入をもたらすことを報告した。さらに、変異により、PKC γ の立体構造が崩れ、一部ドメイン (C1A, KD) が露出することにより、分子間の domain がお互いに結合、oligomer を形成し、その oligomer がゆっくりと増大し、アミロイド様構造体を形成するという報告を行った。この発見は、初めて multidomain 機能タンパク質がアミロイド様線維を形成することを示したものであった。

SCA14 などの神経変性疾患はアミロイド病とも呼ばれ、アミロイド様線維が脳内に蓄積し、数年～数十年の経過を経て、症状を呈する。これらの神経変性疾患を予防・治療するためには、まず、2つの方法、つまり、①凝集体の形成を抑制する、②凝集体を可溶化して無毒化する、が考えられる。近年、シャペロンタンパク質である Hsp ファミリー群が神経変性症における高次構造体の形成を抑制する事実が報告されている。また、Hsp 分子群が協同的に作用し ATP 依存的に α -synuclein アミロイドを分解し、凝集体を無毒化する可能性も示された。

本研究では、凝集体の形成機構を明らかにするとともに、薬物により内在性の Hsp ファミリー群を誘導し、アミロイドの形成抑制・無毒化を可能とする治療法の開発を目指すものである。

2. 研究の目的

本研究では、①Hsp ファミリーによる凝集体形成抑制・アミロイド分解の機序の解明、②Hsp ファミリー分子 Heat shock factor(HSF)による Hsp 発現誘導の機構解明と有効な Hsp の発現誘導が可能な薬物のスクリーニング、を行う。①の実験には、精製した変異 PKC γ タンパク質を用いた生化学的解析および変異 PKC γ を発現する初代培養神経細胞を用いた細胞生物学的な解析により、アミロイド線維形成に至る機序を明らかにする。②の実験に関して、Cerastrol 以外にも、既知の分子シャペロン誘導薬を in vivo, in vitro で用いて、どの薬物が、神経細胞特に小脳プルキンエ細胞において Hsp 分子群を効率よく発現し、アミロイド合成を阻害するかを明らかにする。またすでに作製した SCA14 モデルマウスを用いて個体レベルで検討し、その有効性を細胞内凝集体への影響、行動学的な改善を確認することにより明らかにする。さらには、これらの薬物が、神経細胞のみならず他の臓器においてどの Hsp 分子を誘導するかについても検討する。これにより細菌感染など他の原因による細胞障害から細胞保護作用を示す薬物を見出せると考えている。

3. 研究の方法

初代培養神経細胞および培養細胞を用いて、効率的に Hsp 分子群を発現誘導し変異型 PKC γ の凝集体を減少させる薬物のスクリーニングを行う。その候補薬物としては、セラストール、ハービマイシン等を予定している。また、薬物の脳内移行度も考慮して、他の薬物 (Hsp990, Debio0932) も候補薬物とする

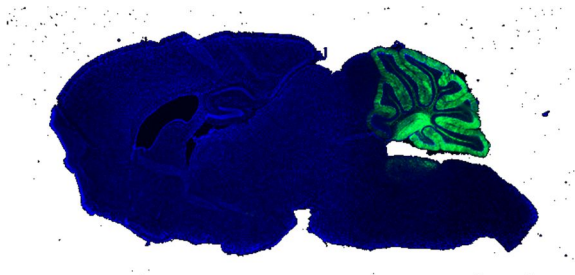
精製した変異型 PKC γ により形成させたアミロイド様線維を用いて、アミロイドを試験管内あるいは細胞内で無毒化する因子群と分解条件を解析する。

SCA14 モデルマウスを用いて、得られた候補薬物による顆粒状構造物・毒性凝集体の抑制や神経細胞死の抑制効果を個体レベルで検討する。

4. 研究成果

初年度には、Hspファミリーによる変異型PKC γ の凝集体形成抑制機序の検討を行い、有効なHspの発現誘導が可能な薬物のスクリーニングを行った。具体的には、培養細胞および初代培養プルキンエ細胞において、Hsp70およびHsp40の発現が変異型PKC γ の凝集体形成を抑制することが可能であり、セラストロールおよびハービマイシンに、Hsp70およびHsp40の発現誘導する作用をもつことが確認できた。セラストロールおよびハービマイシンは初代培養プルキンエ細胞においても、凝集体形成を有意に抑制した。セラストロールおよびハービマイシンをマウスに投与したところ、セラストロールは、小脳において、Hsp70の発現誘導作用は有したが、ハービマイシンにはその作用はみられず、脳内移行性に問題点があることが示唆された。そこで、2年目には動物投与を念頭に置き、脳内移行度の高いHsp誘導薬であるHsp990、Debio0932についても検討を行い、培養細胞および初代培養プルキンエ細胞、マウス個体において、Hsp70およびHsp40の発現誘導する作用をもつことを確認した。同時に、AAVウイルスを用いて、小脳プルキンエ細胞に変異型PKC γ を発現するSCA14モデル動物を作製することにも成功した。

下図: 変異型PKC γ (緑色蛍光) が小脳プルキンエ細胞特異的に発現するSCA14モデルマウス



最終年度には、昨年度作製に成功したSCA14モデルマウスに、経口投与による薬物の作用を検討した結果、セラストロールおよびハービマイシンより脳内移行性が高く、かつHsp誘導作用を持つ薬物の開発が必要であることが判明した。その候補薬剤として、Hsp990およびDebio0932を用いて検討を行った。両薬剤は脳内移行性が高いと考えられており、変異型PKC γ (G128D)を小脳プルキンエ細胞特異的に発現するSCA14モデルマウスに経口投与による効果を検討した。その結果、Hsp990は経口投与により高い脳内移行性を示し、変異型PKC γ 凝集体を有意に減少させた。

今後、長期的な投与による効果や運動機能の改善などを検討する必要があるが、これらの薬物をリード化合物としたHsp発現誘導化合物がSCA14の治療薬、さらには多くの神経変性症の治療薬となりうることが示された。同定された薬物は、アミロイド形成により発症するすべての神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、小脳脊髄変性症などの本質的な治療薬としても応用可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Adachi Naoko, Hess Douglas T., Kaku Mika, Ueda Chie, Numa Chisato, Saito Naoaki	4. 巻 294
2. 論文標題 Differential S-palmitoylation of the human and rodent 3-adrenergic receptors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 2569 ~ 2578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.004978	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakazono Aoi, Adachi Naoko, Takahashi Hideyuki, Seki Takahiro, Hamada Daizo, Ueyama Takehiko, Sakai Norio, Saito Naoaki	4. 巻 293
2. 論文標題 Pharmacological induction of heat shock proteins ameliorates toxicity of mutant PKC in spinocerebellar ataxia type 14	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14758 ~ 14774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.002913	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Morioka Shigefumi, Sakaguchi Hirofumi, Yamaguchi Taro, Ninoyu Yuzuru, Mohri Hiroaki, Nakamura Takashi, Hisa Yasuo, Ogita Kiyokazu, Saito Naoaki, Ueyama Takehiko	4. 巻 146
2. 論文標題 Hearing vulnerability after noise exposure in a mouse model of reactive oxygen species overproduction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 459 ~ 473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14451	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakamoto Isao, Ueyama Takehiko, Hayashibe Masakazu, Nakamura Takashi, Mohri Hiroaki, Kiyonari Hiroshi, Shigyo Michiko, Tohda Chihiro, Saito Naoaki	4. 巻 302
2. 論文標題 Roles of Cdc42 and Rac in Bergmann glia during cerebellar corticogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 57 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2017.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shirafuji Toshihiko, Ueyama Takehiko, Tanaka Shigeru, Hide Izumi, Saito Naoaki, Sakai Norio	4. 巻 50
2. 論文標題 Validation of Anti-CSP , SNAP25, Tyrosine Hydroxylase, Ubiquitin, Cleaved Caspase 3, and pSer PKC Motif Antibodies for Utilization in Western Blotting	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Acta Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 177 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.17028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hanaki Yusuke, Kikumori Masayuki, Tokuda Harukuni, Okamura Mutsumi, Dan Shingo, Adachi Naoko, Saito Naoaki, Yanagita Ryo C., Irie Kazuhiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Loss of the Phenolic Hydroxyl Group and Aromaticity from the Side Chain of Anti-Proliferative 10-Methyl-aplog-1, a Simplified Analog of Aplysiatoxin, Enhances Its Tumor-Promoting and Proinflammatory Activities	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 631 ~ 631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules22040631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Takashi, Ueyama Takehiko, Ninoyu Yuzuru, Sakaguchi Hirofumi, Chojookhuu Narantsog, Hishikawa Yoshitaka, Kiyonari Hiroshi, Kohta Masaaki, Sakahara Mizuho, de Curtis Ivan, Kohmura Eiji, Hisa Yasuo, Aiba Atsu, Saito Naoaki	4. 巻 144
2. 論文標題 Novel role of Rac-Mid1 signaling in medial cerebellar development	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1863 ~ 1875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.147900	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hanes Cheryl M., D' Amico Anna E., Ueyama Takehiko, Wong Alexander C., Zhang Xuexin, Hynes W. Frederick, Barroso Margarida M., Cady Nathaniel C., Trebak Mohamed, Saito Naoaki, Lennartz Michelle R.	4. 巻 199
2. 論文標題 Golgi-Associated Protein Kinase C- Is Delivered to Phagocytic Cups: Role of Phosphatidylinositol 4-Phosphate	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Immunol	6. 最初と最後の頁 271 ~ 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1700243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishii, T., Ueyama, T., Shigyo, M., Kohta, M., Kondoh, T., Kuboyama, T., Uebi, T., Hamada, T., Gutmann, D.H., Aiba, A., Kohmura, E., Tohda, C., Saito, N.	4. 巻 292
2. 論文標題 A Novel Rac1-GSPT1 Signaling Pathway Controls Astrogliosis Following Central Nervous System Injury.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.,	6. 最初と最後の頁 1240-1250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M116.748871	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shirafuji, T., Ueyama, T., Adachi, N., Yoshino, YK-I., Sotomaru, Y., Uwada, J., Kaneoka, A., Ueda, T., Tanaka, S., Hide, I., Saito, N., Sakai, N.	4. 巻 38
2. 論文標題 The role of cysteine string protein alpha (CSP) phosphorylation at Serine 10, and 34, by protein kinase C for presynaptic maintenance	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 278-290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1649-17.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	足立 直子 (Adachi Naoko) (70604510)	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・助教 (14501)	
研究分担者	上山 健彦 (Ueyama Takehiko) (80346254)	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授 (14501)	