

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17942

研究課題名(和文)ポリグルタミン病におけるタンパク質リン酸化酵素NLKの機能解析と新規治療法の検討

研究課題名(英文)Functional analysis of protein kinase NLK in polyglutamine diseases and exploration of novel therapeutic strategies.

研究代表者

石谷 閑(Ishitani, Shizuka)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教

研究者番号：90608861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：NLKは、神経組織に豊富に発現するタンパク質リン酸化酵素である。最近、疾患モデルマウスを用いた解析によりNLKがポリグルタミン病の発症を正に制御することが示されたが、その分子機構は不明であった。本研究では、NLKがポリグルタミン病の原因タンパク質を直接リン酸化することで原因タンパク質の蓄積を促進することなど、メカニズムの一端を明らかにした。また、ポリグルタミン病の治療を目指して、脳内で安定的にNLK活性を阻害する化合物の開発を進めた。加えて、*in vivo*におけるNLK阻害剤の効果を予測するためにNLK酵素活性欠損マウスを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、NLKによるポリグルタミン病発症の制御メカニズムの一端を解明することができた。これにより、神経変性の新たなメカニズムが明らかになり、神経科学や細胞生物学の発展に寄与することができた。また、NLK特異的阻害剤の開発が進んだことにより、新たなポリグルタミン病治療戦略へつながる可能性がより高まった。

研究成果の概要(英文)：NLK is a protein kinase which is highly expressed in nervous system. Although recent studies using disease model mice showed that NLK positively regulates onset of polyglutamine diseases, the detailed mechanism remains unclear. In this study, we revealed new mechanisms by which NLK promotes polyglutamine diseases. We also tried to generate a chemical inhibitor which can stably inhibits NLK activity in brain to aim for treatment of polyglutamine diseases. In addition, we generated the genetically modified mice lacking NLK kinase activity to estimate the effects of NLK inhibitor *in vivo*.

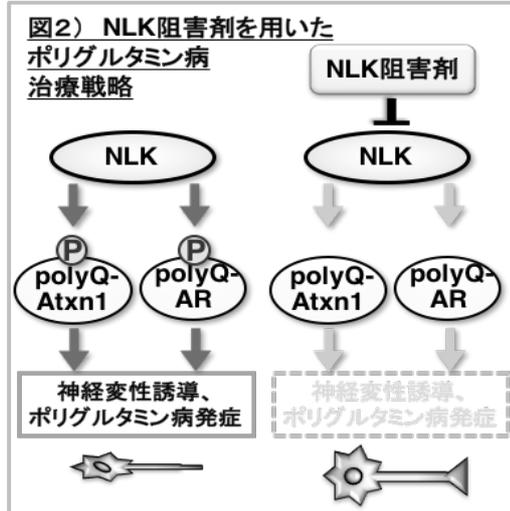
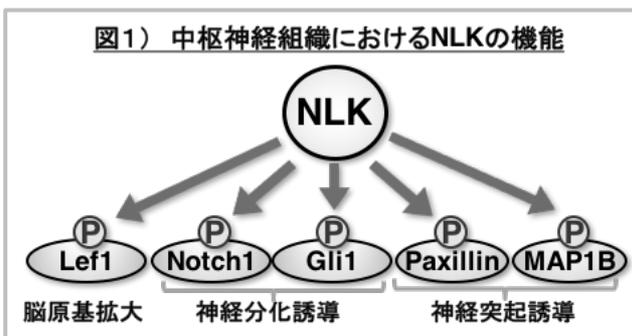
研究分野：医化学、細胞生物学

キーワード：ポリグルタミン病 Nemo-like kinase (NLK)

1. 研究開始当初の背景

ポリグルタミン病は、球脊髄性筋萎縮症や遺伝性脊髄小脳変性症、ハンチントン病を代表とする、遺伝性の神経変性疾患である。この疾患では、原因遺伝子中でグルタミンをコードする CAG 配列の反復回数が異常に増加し、その結果として産生された異常ポリグルタミンタンパク質が神経細胞の変性を誘導し、神経系に重篤な障害を及ぼす。具体的には、球脊髄性筋萎縮症ではアンドロジェン受容体 (AR)、遺伝性脊髄小脳変性症一型では Ataxin1 タンパク質 (Atxn1)、ハンチントン病ではハンチンチンタンパク質 (Htt) が異常ポリグルタミン伸長したもの (それぞれ polyQ-Atxn1・polyQ-AR、polyQ-Htt) が神経変性を引き起こす。ポリグルタミン病の症状の詳細は病型ごとに異なるが、多くの場合において手足に運動障害が生じ、10 年余りをかけて徐々に症状が進行し、最終的に自立生活が不可能になり、重篤なケースでは死に至る。したがって発症早期に症状の進行を止める治療を施すことが極めて重要である。また、ポリグルタミン病は遺伝性疾患であるため、発症が予測可能な保因者には積極的な予防的治療が必要である。しかしながら、現在のポリグルタミン病治療は、抗精神病薬による運動症状や神経症状の改善や、神経系の活性化薬による失調症状の改善、運動療法、生活指導、合併症治療といった対処療法が一般的であり、神経変性そのものを対象とした有効な原因療法は未だに確立されていない。一方、近年の研究により異常ポリグルタミンタンパク質が神経変性を導く機序の一端が明らかにされており、現在それらの知見を基盤とした治療法開発が進められている。例えば、オートファジーやプロテアソームによる異常ポリグルタミンタンパク質の分解を促す方法や、RNAi により異常ポリグルタミンタンパク質の発現を抑制する方法などの多様なアプローチが行われている (Weber JJ et al., Biomed Res Int 2014; Keiser MS et al., Hum Mol Genet 2015)。一部の方法については既に臨床試験が開始されているが、現時点では有効な治療効果は確認されていない。

私は、大学院修士課程より、神経組織に発現するタンパク質リン酸化酵素 nemo-like kinase (NLK) の機能と制御の解析を継続して行ってきた。まず、共同研究者と共に NLK の機能解析を行い、脳原基において NLK が転写因子 Lef1 のリン酸化を介して細胞増殖を促し、脳原基のサイズ拡大に寄与すること (図 1; Ota S, Ishitani S et al., EMBO J 2012) や、NLK が脊髄や延髄において転写制御因子 Notch1 や転写因子 Gli1 をリン酸化して神経前駆細胞の神経細胞分化を促すこと (図 1; Ishitani T, Ishitani S (5th author) et al., Nat Cell Biol 2010; Ishitani S et al., in preparation)、NLK が細胞骨格関連因子である Paxillin や MAP1B をリン酸化して神経突起伸長を促すことを見出した (図 1; Ishitani T, Ishitani S et al., JNC 2009)。また、NLK の活性制御機構の解析を行い、NLK が NGF や EGF、Wnt-3a の刺激によって活性化することや、NLK がホモダイマー形成とそれに伴う自己リン酸化を経て活性化することを明らかにした (Ishitani T, Ishitani S et al., JNC 2009; Ishitani S et al., MBoC 2011; Ota S, Ishitani S et al., EMBO J 2012)。続いて、NLK の機能をさらに詳細に明らかにするために、そのツールとして NLK 阻害剤の開発に着手した。東大創薬機構から入手した約 17000 種の低分子化合物を対象とした大規模スクリーニングを実行し、「*in vitro*、*in vivo* 双方において NLK の酵素活性を特異的に抑制し、かつ特異性が高く細胞毒性が低い化合物」を探索した。そしてさらにヒット化合物の構造改変も進



め、その結果、ヒト細胞内で NLK の活性を $IC_{50} = 0.1\mu M$ で抑制できる強力な NLK 阻害剤を得た。この NLK 阻害剤は非常に特異性が高く、ヒトの全キナーゼのうち NLK に最も強く作用するだけでなく、NLK と構造が類似したキナーゼ群 (MAPK ファミリーや CDK ファミリー等) の活性を殆ど抑制しない (Ishitani S et al., in preparation)。このような良いツールができたので、満を持してこれを用いて神経組織における NLK の新機能を探索し始めたところ、海外のグループにより **NLK がポリグルタミン病の発症に関わる**という非常に興味深い報告がなされた。具体的には、NLK が脊髄小脳変性症原因分子 polyQ-Atxn1 や球脊髄性筋萎縮症原因分子 polyQ-AR と直接的に結合すること、NLK を培養細胞に過剰発現すると polyQ-Atxn1 の Ser-239 がリン酸化されて polyQ-Atxn1 の遺伝子発現誘導活性が促進され、また、polyQ-AR の Ser-81 と Ser-301 がリン酸化されてその遺伝子発現誘導活性と凝集体形成能が促進されること、そして、脊髄小脳変性症 1 型や球脊髄性筋萎縮症のモデルマウスにおいて NLK をゲノム改変によりノックダウンすると症状が有意に改善することが示された (図 2 左; Ju H et al., J Neurosci 2013; Todd TW et al., eLIFE 2015)。これらの研究では全ての細胞実験は NLK の過剰発現によって行われており、NLK を機能阻害した実験は行われていないため**脊髄小脳変性症や球脊髄性筋萎縮症の発症における NLK の機能の詳細は不明**であるが、一方でこの報告は、私たちが保有する **NLK 阻害剤がポリグルタミン病の有効な治療薬となる可能性**を示している (図 2 右)。また、NLK は複数のポリグルタミン病の発症に関与することから、ハンチントン病などのその他のポリグルタミン病の発症にも関与する可能性がある。したがって、NLK 阻害剤が複数のポリグルタミン病の治療に使用可能な画期的な薬になる可能性も期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、ポリグルタミン病における NLK の分子機能解明を目指した。また、細胞モデルと動物モデルを用いて、私たちが保有する NLK 阻害剤がポリグルタミン病の有効な治療薬となり得るかを検討するとともに、動物個体内で効果的に働きうる NLK 阻害剤の改良を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、私がこれまでの研究で蓄積してきた NLK 研究のツールを総動員し、**ポリグルタミン病における NLK の分子機能を解明した**。特に、NLK がどのようなメカニズムを介して脊髄小脳変性症原因分子 polyQ-Atxn1 や球脊髄性筋萎縮症原因分子 polyQ-AR を制御するのか、生化学的・細胞生物学的手法を駆使して明らかにした。また、動物個体内における NLK 阻害剤の効果を評価する系を構築し、それを基盤に動物個体内で効果を発揮しうる NLK 阻害剤構造展開体の選別を行った。また、NLK 阻害剤の *in vivo* での効果を推測するために、NLK 機能阻害マウスの作製も進めた。

4. 研究成果

①NLK のポリグルタミン病における作用機序の解析

上述のように、*in vitro* において NLK が脊髄小脳変性症原因分子 polyQ-Atxn1 や球脊髄性筋萎縮症原因分子 polyQ-AR と直接的に結合してリン酸化し、これらの分子活性を高めることが報告されており、これらのことから NLK はポリグルタミン病の発症を正に制御する分子であると考えられているが、その分子機能の詳細は不明であった。そこでまず、哺乳類培養神経細胞において NLK を RNAi し、polyQ-Atxn1 および polyQ-AR への影響を調べた。その結果、NLK の RNAi により、polyQ-Atxn1 のタンパク質安定性が減少し、また、polyQ-AR の転写活性が低下した。加えて、NLK 阻害剤でも同様の結果が得られた。したがって、NLK は polyQ-Atxn1 のタンパク質安定性、polyQ-AR の転写活性を正に制御すると考えられる。

続いて、NLK が polyQ-Atxn1 のリン酸化を介して polyQ-Atxn1 を安定化するかを確かめるために、リン酸化部位の同定を行った。先行研究において NLK が polyQ-Atxn1 の Ser-239 をリン酸化することが報告されていたが、一方で、Ser-239 に変異を導入しても NLK による polyQ-Atxn1 のリン酸化はほとんど減少しなかった。このため、Ser-239 の他にも重要なリン酸化部位が存在することが想定された。そこで、NLK の新たなリン酸化部位の同定を進めた。まず、NLK が Ser-Pro あるいは Thr-Pro を認識して Ser/Thr をリン酸化することから、human Atxn1 に存在する Ser-Pro、Thr-Pro モチーフを探り、該当する Ser/Thr 残基を新たなリン酸化部位候補として注目した。我々

はこれらの残基を Val 残基に置換した polyQ-Atxn1 変異体 polyQ-Atxn1-SV を作製した。NLK を細胞に過剰発現すると野生型の polyQ-Atxn1 がリン酸化を受けてタンパク質量が増加した一方で、polyQ-Atxn1-SV は NLK によってリン酸化されず、タンパク質量も変化しなかった。したがって、NLK はこれらのアミノ酸残基のリン酸化を介して polyQ-Atxn1 を安定化すると考えられる。また現在、NLK が polyQ-Atxn1 を安定化するメカニズムを解析している。現在までに NLK 阻害剤による polyQ-Atxn1 の減少がプロテアソーム阻害剤やオートファジー阻害剤によってキャンセルされることから、NLK によるリン酸化を受けない polyQ-Atxn1 はこれらの分解経路を介して分解されていると考えている。

次に、polyQ-AR のリン酸化部位を探った。先行研究において NLK が polyQ-AR の Ser-81 と Ser-308 をリン酸化することが報告されていたが、残念ながらこの結果を再現できないことがわかった。現在、新たなリン酸化部位の探索を進めている。

②NLK 阻害剤の構造展開体の評価とマウス個体での効果の評価

NLK 阻害剤をポリグルタミン病治療に使用することを目標として、標的組織である脳内で NLK を阻害する化合物の作製を目指し、東大創薬機構構造展開ユニットと連携して、NLK 阻害剤リード化合物の薬物動態解析や構造展開を進めた。現在までに、リード化合物が脳内に到達し、かつ、NLK 阻害に必要な濃度が一定期間保たれることを確認した。また、マウス個体において NLK の活性を評価するための実験系を構築した。具体的には、マウスの小脳、大脳、精巣から NLK を免疫沈降で回収し、その活性化状態をリン酸化 NLK 抗体(NLK の自己リン酸化状態、活性化状態を検出できる抗体)を用いた western blotting により評価する系を確立した。現在の NLK 阻害剤リード化合物混合液を注入したマウスの小脳において NLK 活性(pNLK レベル)が大きく低下することも確認できた。

一方で、*in vivo* における NLK 阻害剤の効果を予測するために、NLK 酵素活性欠損マウスを作製した。NLK 酵素活性ヘテロ欠損マウスが外見上健康に発生、成長し、生殖能力にも問題がないことから、NLK 阻害剤で NLK の活性を半減させても個体の健康に大きな副作用が生じないと推測された。

このように、本研究により、NLK による脊髄小脳変性症の発症促進機構の一端を明らかにすることができた。また、マウス実験での検証に使用可能と思われる NLK 阻害剤の開発に成功した。今後は、本研究で得られた知見やツールを活用し、ポリグルタミン病の新規治療戦略開発を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishina Sachiko, Hosono Katsuhiko, Ishitani Shizuka, Kosaki Kenjiro, Yokoi Tadashi, Yoshida Tomoyo, Tomita Kaoru, Fukami Maki, Saitsu Hiroto, Ogata Tsutomu, Ishitani Tooru, Hotta Yoshihiro, Azuma Noriyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Biallelic CDK9 variants as a cause of a new multiple-malformation syndrome with retinal dystrophy mimicking the CHARGE syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-021-00909-x	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 Zarate YA, Uehara T, Abe K, Oginuma M, Harako S, Ishitani S, 他25名, Hirose Y, Ishitani T, Kosaki K.	4. 巻 -
2. 論文標題 CDK19-related disorder results from both loss-of-function and gain-of-function de novo missense variants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genetics in Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41436-020-01091-9	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 該当する
1. 著者名 Uehara Tomoko, Abe Kota, Oginuma Masayuki, Ishitani Shizuka, Yoshihashi Hiroshi, Okamoto Nobuhiko, Takenouchi Toshiki, Kosaki Kenjiro, Ishitani Tooru	4. 巻 10
2. 論文標題 Pathogenesis of CDK8-associated disorder: two patients with novel CDK8 variants and in vitro and in vivo functional analyses of the variants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74642-4	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 Akieda Y, Ogamino S, Furuie H, Ishitani S, Akiyoshi R, Nogami J, Masuda T, Shimizu N, Ohkawa Y, Ishitani T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Cell competition corrects noisy Wnt morphogen gradients to achieve robust patterning in the zebrafish embryo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12609-4	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1件

1. 著者名 Ishitani T , Ishitani S	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 6330
3. 書名 Encyclopedia of Signaling Molecules, 2nd Edition	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------