

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15360

研究課題名(和文)ケミカルバイオロジーを応用したポリグルタミン病の病態解析

研究課題名(英文)A chemical biology strategy to analyze polyglutamine diseases

研究代表者

申 民京 (Shin, Minkyong)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロジェクト助教

研究者番号：60738566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ポリグルタミン病は、遺伝性の難治疾患であり、異常ポリグルタミンの凝集が病態形成の主因である。私達は、ポリグルタミン蛋白質の発現量を抑制できる低分子化合物TMD-255を同定するとともに結合するタンパク質の同定にも成功した。また結合分子が、化合物の標的分子であることを確認し、さらに、当該分子の下流でポリグルタミンの発現量が減少する分子メカニズムを明らかにすることに成功した。本研究では、ポリグルタミン病モデルマウスの脳内にTMD-255を注入する実験も行っており、その結果、モデルマウスにおいて神経変性疾患の改善が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低分子化合物TMD-255を用いて、ポリグルタミン病モデルマウスの改善が認められたことより、当該化合物を基盤としたポリグルタミン病治療薬の開発が期待でき、社会的意義は大きい。また、TMD-255の標的分子が同定できたことから、ポリグルタミンタンパク質蓄積の分子メカニズムを明らかにできる端緒を得た。これらの知見は、神経疾患の病態を解析する上で重要な学術的意義である。さらに、本研究では、ケミカルバイオロジーを用いた新たな方法で、化合物の標的分子の同定に成功しており、この方法を他の疾患や病態に応用することで、本研究の成果を医学研究全体に波及させることができる。

研究成果の概要(英文)：Polyglutamine (polyQ) diseases are hereditary neurodegenerative disease caused by abnormally elongated glutamine-encoding CAG nucleotide expansions. In this study, we found low molecular compound TMD-255 to be effective at reducing accumulation of polyQ protein. We also identified an interacting protein with compound TMD-255 using chemical biology technique. Furthermore, we demonstrated the possible involvement of autophagy in the pharmacological effect of TMD-255. Importantly, TMD-255 improved the neurodegenerative disorder in polyQ-disease model mice.

研究分野：病態細胞生物

キーワード：ポリグルタミン病 低分子化合物 ケミカルバイオロジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ポリグルタミン病は代表的な神経変性疾患の1つで、原因遺伝子内のグルタミンをコードするCAG塩基配列の異常伸長を原因とする。グルタミン鎖の伸長は原因蛋白質のミスフォールディングを引き起こし、ミスフォールドされたタンパク質の蓄積から、難溶性の凝集体が形成される。形成された凝集体は神経細胞に蓄積することで神経変性の原因となる。しかしながら、ポリグルタミン蛋白質の発現や凝集体形成は、その他の様々な要因によっても制御されており、その詳細なメカニズムは明らかではない。

ポリグルタミン病の解析において、多くの研究は、細胞生物学的、あるいは分子生物学的な方法を用いているが、その解析は十分進んでおらず、申請者はケミカルバイオロジーを応用して、凝集体形成メカニズムの解明、および治療法開発への応用を目指した。具体的には、ポリグルタミンタンパク質の蓄積を抑制できる化合物を基盤として、ポリグルタミン病の病態に関わる細胞現象を明らかにすることを目指した。

研究開始時には、(1)YFP融合ポリグルタミンタンパク質(YFP-polyQ)を発現したPC12細胞、(2)ポリグルタミン病のモデルマウスである脊髄小脳変性症1型(SCA1)マウスなどを準備しており、また、(3)ハイスループットスクリーニングにより、神経細胞内でのポリグルタミンタンパク質の蓄積を抑制する機能を有した低分子化合物TMD-255を同定していた。本研究では、当該化合物などを用いて、(1)ポリグルタミン蛋白質の発現制御メカニズムの解明、(2)ポリグルタミン病治療法の開発研究を行なった。

## 2. 研究の目的

神経細胞内でのポリグルタミンタンパク質の蓄積を抑制する機能を有した化合物TMD-255を用いて、ポリグルタミンタンパク質の蓄積がどのようなメカニズムで抑制されているのかを明らかにする。また、TMD-255以外の同様な機能を有する化合物に関して、その有効性を、ポリグルタミン病モデルマウスを用いて検討し、詳細な解析を行う。これらの解析により、ポリグルタミンタンパク質による凝集体形成、および病態に関わる細胞機能を明らかにする。

本研究はケミカルバイオロジーを用いて、これまでの手法では見出すことのできなかつた疾患関連分子の探索を行うものであり、ポリグルタミンタンパク質蓄積の新たなメカニズムの解明が期待される。

## 3. 研究の方法

1) TMD-255によるポリグルタミンタンパク質の蓄積を抑制するメカニズムの解明

(1)TMD-255に結合する分子を複数同定しており、これらの分子のsiRNAサイレンシングを行い、YFP-PolyQの蓄積量を測定することにより、いずれの分子が真の標的分子であるかを明らかにする。また、TMD-255化合物が、標的分子をどのように変化させているのか明らかにする。さらに当該分子の過剰発現細胞や発現抑制細胞にTMD-255を添加した際の有効性の変化などの解析を行い、TMD-255の作用機構を明らかにする。

(2) TMD-255 の投与は脊髄小脳失調症のモデルマウスである SCA1 マウスにおいて、運動障害を有意に改善する。TMD-255 による、神経細胞の変化を、神経病理学的、細胞生物学的に解析する。

## 2) ポリグルタミンタンパク質の蓄積を抑制できる TMD-255 以外の化合物の同定

TMD-255 以外の化合物についても、細胞レベルの実験から、モデルマウスを用いた実験を行い、有効に機能する化合物を同定する。

## 3) 創薬に向けた TMD-255 化合物の改良

TMD-255 化合物の類縁体を多数作成し、ポリグルタミンタンパク質の分解活性を指標により活性の高い化合物を開発し、その有効性を SCA1 マウスにおいて確認する。

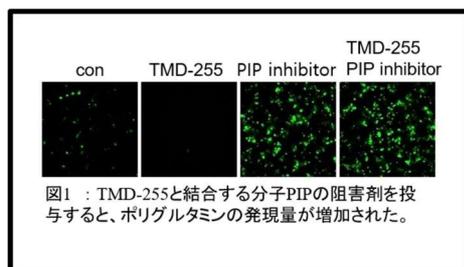
## 4. 研究成果

### 1) TMD-255 によるポリグルタミンタンパク質の蓄積を抑制するメカニズムの解明

#### (1) TMD-255 の作用機構：

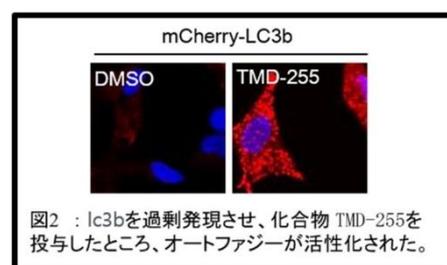
①ドキシサイクリン依存的に YFP-polyQ を発現する PC12 細胞に、ドキシサイクリンと同時に TMD-255 を投与しておく、YFP-polyQ の発現量は抑制される。この細胞に、複数の TMD-255 結合分子候補の siRNA サイレンシングを行い、ドキシサイクリンならびに TMD-255 を投与し、48 時間後の YFP-PolyQ の蓄積量を測定した。その結果、新規タンパク質(以下 PolyQ inhibiting protein [PIP] )の siRNA によって、TMD-255 による YFP-PolyQ の蓄積量抑制がキャンセルされた。即ち、TMD-255 化合物の分子標的は PIP であると結論づけられた。

②PIP の阻害剤を開発し、YFP-polyQ を発現する PC12 細胞に投与したところ、siRNA と同様に TMD-255 による YFP-PolyQ の蓄積量抑制がキャンセルされた(図1)。また、PIP 阻害剤単独でも、YFP-PolyQ の蓄積量が顕著に増加した(図1)。即ち、TMD-255 化合物の分子標的は PIP であり、PIP の発現量の多寡は YFP-polyQ の発現量調節に直結していることが結論づけられた。



③YFP-polyQ を発現する PC12 細胞に、PIP を過剰発現させた細胞を作成したところ、YFP-PolyQ の蓄積量が顕著に減少した。この結果も、PIP の発現量の多寡が YFP-polyQ の発現量調節に直結することを示している。

④TMD-522 の下流のシグナルを検討したところ、オートファジーの活性化が認められた。即ち、PC12 細胞に mCherry-LC3 を発現し、TMD-522 を投与したところ、細胞質に多数の LC3 puncta が形成され、オートファジーの活性化が顕著であった(図2)。オートファジーの活



性化は、ポリグルタミン病に対する抑制効果があることが知られている。

(2) アタキシンモデルマウスに対する効果：

化合物 TMD-255 をアタキシンモデルマウスに 投与したところ、ポリグルタミン蛋白質の蓄積減少、神経細胞脱落の減少、神経変性症状の改善などが認められた。即ち、この化合物はポリグルタミン病の治療薬開発のリード化合物となりうることが判明した。

化合物 TMD-255 をアタキシンモデルマウスに 投与 により TMD-255 結合分子 PIP の発現量も増加したことで、神経症状がどのように変化するのかについて、生化学的・神経病理学的 関連性が確認された。

2 ) ポリグルタミンタンパク質の蓄積を抑制できる TMD-255 以外の化合物の同定

TMD-255 以外の化合物についても、細胞レベルの実験から、YFP-polyQ の発現抑制が認められる化合物を 20 化合物同定することに成功した。

3 ) 創薬に向けた TMD-255 化合物の改良

TMD-255 化合物の類縁体を 10 化合物作成し、ポリグルタミンタンパク質の分解活性を指標により化合物の構造活性相関情報を得た。また、これを参考に、強活性の化合物 1 種類の開発に成功した。

これらの研究成果は、論文にまとめて、現在雑誌投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nobuhiro Fujikake, Minkyong Shin, Shigeomi Shimizu*	4. 巻 12
2. 論文標題 Association Between Autophagy and Neurodegenerative Diseases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 1:11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2018.00255. eCollection 2018	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

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