

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19147

研究課題名(和文) ドパミンニューロン分化誘導核内受容体Nurr1の制御によるパーキンソン病薬の創製

研究課題名(英文) Transcriptional regulation of nuclear receptor Nurr1 in dopaminergic neurons for neuronal disease treatments

研究代表者

松島 綾美 (Matsushima, Ayami)

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：60404050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病は、脳内のドパミン不足により生じる疾患の1つである。しかし、対症療法としてドパミンを補うための薬しか存在せず、現在でも根治につながる治療薬は見つかっていない。このドパミンを放出するニューロンの分化を促すのが、ヒト核内受容体Nuclear receptor related 1 (Nurr1)である。この核内受容体Nurr1の転写活性を変化させる化合物を用いたパーキンソン病を根治するための治療薬開発を目指し、化合物の神経細胞伸長評価や試験系構築を行った。試験系構築に有用なペプチドの設計合成に成就した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病は高齢者に発症することが多い。すべての人が健康に生きるために、この根治できる薬が社会的に強く望まれている。本課題の遂行により、核内受容体Nurr1の転写活性を変化させ、神経伸長に影響する化合物を見出した。さらにNurr1に結合するペプチドの設計合成に成就した。これらは、パーキンソン病の根治薬開発のために重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease is characterized by loss of dopaminergic neurons. L-dopa is used for treatment cure; however, no drugs for permanent cure of this disease have been developed yet. A nuclear receptor, nuclear receptor related 1 (Nurr1), is able to generate directly functional dopaminergic neurons from fibroblasts. Small molecules to control the Nurr1 function will be potent candidate for permanent cure of Parkinson's disease. We found small molecules affecting Nurr1 transcriptional activity and these molecules will be useful for the future drug development.

研究分野：生物化学

キーワード：蛋白質 発現制御 生体分子 生理活性 受容体化学 分子認識 タンパク質

1. 研究開始当初の背景

近年の長寿高齢化に伴い、パーキンソン病患者は増えている。パーキンソン病では、手の震え、こわばり、転びやすくなる、動作緩慢になるといった運動に関する症状が生じ、歩行や姿勢に異常があらわれる。難病センターの病気の解説によると、現在、日本人の約 1,000 人に 1 人~1.5 人がこの病気にかかる。したがって、パーキンソン病の治療薬開発は必須・緊要の課題である。パーキンソン病の発病要因としては、脳の黒質にあるドーパミン神経細胞が障害を受け、ドーパミンが欠乏することに由来することがわかっている。また、家族性のパーキンソン病も知られており、ユビキチンリガーゼである parkin、perkin をリン酸化する PINK1、 α -シヌクレイン、キナーゼである LRRK2 といった遺伝子がパーキンソン病の発病に関わっていると報告されている。さらに、レビー小体とよばれる α -シヌクレイン異常な沈着が、脳機能の妨げになると報告されている。このレビー小体を伴う認知症であるレビー小体型認知症が、認知症患者の 20%程度をしめており、これらには手足の震え、小刻みな歩き方などのパーキンソン症状を伴うことが多いことも報告されている。しかし、このように症状の理解が進んでいるが、パーキンソン病の発病の原因については、複数の説が提唱されているものの不明である。パーキンソン病の治療薬としては、脳内で欠乏するドーパミンを補う L-Dopa (レボドパ)、ドーパミンと同様にドーパミン受容体に結合するドーパミンアゴニスト、ドーパミンの脳内での代謝を抑えドーパミン量を増やすのに役立つ B 型モノアミン酸化酵素 (MAO-B) 阻害薬、震えなどの症状を軽減させる作用のある抗てんかん薬などが利用されている。これらには、パーキンソン病の症状を改善する効果がある。しかし、パーキンソン病を根本から治す根治薬は、未だに見つかっていない。

ところで、ヒトには、細胞核内で標的遺伝子の転写を調節する核内受容体が、全部で 48 種類存在する。これらは、機能および構造から NR1~NR6、そしていずれにも当てはまらない NR0 の合計 7 つにグループ分けされている。なかでも脳・神経系には、NR4 グループに分類される NGFIB、NOR1、そして Nurr1 の 3 種類が高発現することが報告されている。なお、パーキンソン病で欠如するドーパミンを放出するのは、ドーパミン神経細胞である。近年、このドーパミン神経細胞の分化に核内受容体のひとつである Nuclear receptor related 1 (Nurr1) が重要な役割を果たしていることが報告された。そのために、Nurr1 はパーキンソン病治療の標的として近年、注目を集めている^[1,2]。

- [1]Caiazzo, M., et al. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*, 476(7359), 224-227 (2011).
- [2]Decressac, M., et al. NURR1 in Parkinson disease - From pathogenesis to therapeutic potential. *Nature Reviews Neurology*, 9(11), 629-636 (2013).

2. 研究の目的

本研究では、将来的に Nurr1 リガンドを用いた、Nurr1 の活性制御によりドーパミン神経細胞を新生するという新規分子メカニズムに基づく、パーキンソン病を根治するための治療薬を開発することを目的とする。現在でも根治につながる治療薬のないパーキンソン病の、新たな治療薬ができれば、ヒトの長寿・健康に大きく貢献できる。パーキンソン病の発病要因はドーパミン神経細胞が障害を受け、ドーパミンが欠乏することであることから、このドーパミン神経細胞自体を再生できれば、これまでになかった根治薬の開発につながると強く期待される。核内受容体 Nurr1 は、同じく核内受容体である女性ホルモン・エストロゲンの受容体と異なり、内在性のホルモンが見つかっていないオーファン (孤児を意味する) 核内受容体である。しかも Nurr1 は、内在性ホルモンの結合なしではじめから高い転写活性を示す、いわば自発活性化型の核内受容体である (図 1)。申請者らは、これまでに、Nurr1 と同じ自発活性化型の核内受容体であるエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) の新たな結合化合物を、ライブラリスクリーニングから見出した。本研究では、ERR γ の結合物質発見の際に用いた転写活性変動を指標に用いて、新たな Nurr1 結合物質を見出し、それらを用いたパーキンソン病治療薬開発の端緒を拓く。

3. 研究の方法

核内受容体 Nurr1 は、ホルモンの結合なしで転写活性を示すことから、レポーター遺伝子発現システム構築において、常にレポーターとなる酵素ルシフェラーゼを高活性化してしまう。そのため、Nurr1 およびレポーター遺伝子の両方を安定発現する細胞株を用いるスクリーニングは不適切である。そこで、はじめに Nurr1 が結合する応答配列を組み込んだレポーターベクターのみを安定発現する細胞株を HeLa 細胞をもちいて作製した (NurRE)。これに化合物を暴露することによる活性変化を指標として、化合物探索を実施した。

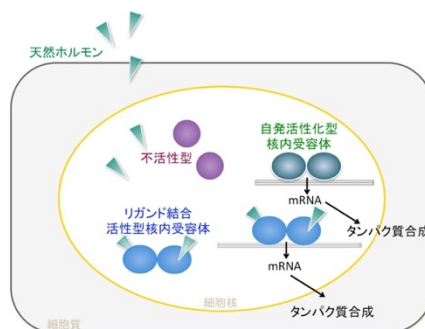


図 1 ホルモン結合なしで活性化する自発活性化型核内受容体

得られた化合物について、神経細胞に与える効果を調べるために、神経成長因子 (NGF) に誘導される神経突起の伸長が見られることから神経細胞分化のモデルとして古くから使われる PC12 細胞を用いて、化合物の暴露により、NGF 誘導性の神経突起伸長へ与える影響を解析した。さらに、パーキンソン病研究に用いられるヒト神経芽細胞腫に由来する SH-SY5Y 細胞についても同様に、NGF 誘導性の神経突起伸長へ与える影響を解析した。実験について、播種翌日に培地交換して化合物を暴露し、その後 5 日間培養を継続したのちに、神経突起の長さを計測した (図 2)。

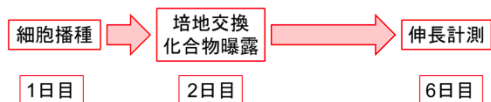


図 2 細胞播種を 1 日目とした時の試験スケジュール

さらに、化合物が直接 Nurr1 受容体に結合するのか、間接的に Nurr1 の活性に影響を与えるのかを明らかにするために、BiacoreT100 を用いて Nurr1 のリガンド結合ドメインと化合物の結合を評価しようと試みた。Nurr1 のリガンド結合ドメインは、発現ベクター-pGEX6P-1 に Nurr1 のリガンド結合ドメインを組み込み、大腸菌 BL21 を用いてグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質として発現・精製した。これを一般的に用いられるカルボキシメチルデキスロランをつけたセンサーチップ (CM5 チップ) に固定し、マイクロ流路系に化合物を流すことで表面プラズモン共鳴による角度を表すセンサグラムの変化を測定した。また、抗 GST 抗体を固定し、マイクロ流路系に GST 融合 Nurr1 を、そして化合物を流すことでセンサグラムの変化を測定した。

4. 研究成果

Nurr1 が結合する応答配列を組み込んだレポーターベクターのみを安定発現する細胞株 NurRE に Nurr1 を一過性に強制発現して転写活性を測定することで、Nurr1 の転写活性を変動する化合物をスクリーニングした (図 3)。スクリーニングの際には、Nurr1 の siRNA を用いて内在の Nurr1 による影響ではなく、確かに強制発現した Nurr1 により転写活性が変動することも確認した。これらの化合物は、Nurr1 に結合すると報告されている化合物に構造類似性があるものが多かった。さらに、これらの化合物を用いて、PC21 の NGF 誘導性の神経突起伸長へ与える影響を解析した (図 4)。その結果、最終的に 4 種の化合物が神経突起伸長を促進し、4 種の化合物が神経突起伸長を抑制した。SH-SY5Y 細胞についても同様の傾向であった。

これらの化合物が Nurr1 に直接結合するのか、間接的に Nurr1 の活性に影響を与えるのかを明らかにするために、表面プラズモン共鳴を利用した相互作用解析装置 Biacore を用いて相互作用解析を実施した。はじめに、発現 Nurr1 を直接センサーチップに固定し、化合物をマイクロ流路系に流して相互作用解析を行った。しかし、Nurr1 を活性化させると報告されている C-DIM12 や CQ という化合物の応答が不明瞭であった。これは、センサーチップの再生を繰り返すことで、おそらく Nurr1 がダメージをうけることと、化合物の分子量が小さいこと、などが原因と考えられた。そこで、抗 GST 抗体をセンサーチップに固定し、GST 融合 Nurr1 をマイクロ流路系に流して GST の抗原抗体反応を利用して Nurr1 をセンサーチップに固定し、再生のたびに新しい Nurr1 をセンサーチップ上に結合させた上で、化合物の結合を評価する系を構築した。測定結果は改善されたものの、分子量が装置の検出限界に近いこともあり、安定して結合が測定できなかった。そこで、転写活性化因子と転写抑制因子のそれぞれの配列を比較し、転写活性化因子 SRC1 の部分断片ペプチドを母体とする新しいペプチド配列を設計した。得られたペプチドは確かに Nurr1 に結合し、これが Nurr1 結合解析のツールとして利用できる。

このように、本研究では、Nurr1 を活性化、あるいは抑制する化合物を見出し、現時点ではこれらが直接 Nurr1 に結合するのか不明であるが、神経細胞モデルで神経突起を伸長させるものがあると判明した。これらの結果は、将来のパーキンソン病治療薬の開発に役立つ有用な成果である。

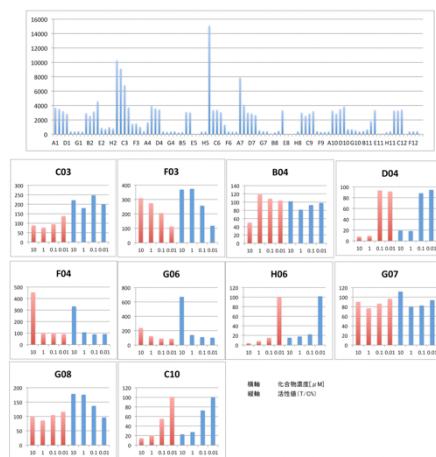


図 3 転写活性測定結果の一例。赤はコントロール、青は Nurr1 を発現した細胞。

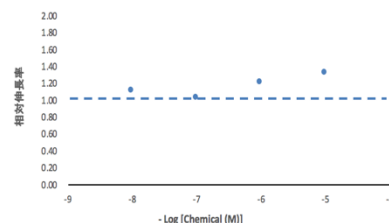


図 4 神経突起伸長の解析例

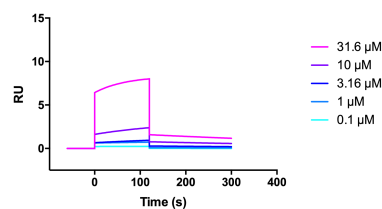


図 5 ペプチドと Nurr1 の結合解析

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tagawa, K., Suyama, K., Kesamaru, H., Masuya, T., Nose, T., Matsushima, A.	4. 巻 2020
2. 論文標題 Design and synthesis of a universal coactivator peptide binding to the estrogen receptor and Nurr1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 123-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Matsushima Ayami, Sese Jun, Koyanagi Kanako O.	4. 巻 20
2. 論文標題 Biosynthetic Short Neuropeptides: A Rational Theory Based on Experimental Results for the Missing Pain Relief Opioid Endomorphin Precursor Gene	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 2054 ~ 2058
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.201900317	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 Matsushima Ayami	4. 巻 19
2. 論文標題 A Novel Action of Endocrine-Disrupting Chemicals on Wildlife; DDT and Its Derivatives Have Remained in the Environment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1377 ~ 1377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19051377	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 Masuya, T., Tada, Y., Lui, A., and Matsushima, A.	4. 巻 2018
2. 論文標題 Evaluation of the binding ability of an orphan nuclear receptor nurr1 to synthetic peptides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田川 幸樹、嵯山 慶太郎、袈裟丸 仁志、枅屋 宇洋、野瀬 健、松島 綾美
2. 発表標題 エストロゲン受容体 とオーファン核内受容体 Nurr1に結合する合成コアクチベータペプチドの合理的設計
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田川 幸樹、嵯山 慶太郎、袈裟丸 仁志、枅屋 宇洋、野瀬 健、松島 綾美
2. 発表標題 女性ホルモン受容体と核内受容体Nurr1に結合するコアクチベータペプチドの設計と合成
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩本 雅輝、枅屋 宇洋、松島 綾美
2. 発表標題 神経細胞における核内受容体Nurr1とエストロゲン関連受容体 型の発現変動解析
3. 学会等名 2019年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本 雅輝、枅屋 宇洋、松島 綾美
2. 発表標題 有害環境化学物質の暴露による脳神経ペプチド遺伝子発現量の変化
3. 学会等名 第 56 回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Masuya, Yusuke Tada, Xiaohui Liu, Ayami Matsushima
2. 発表標題 Evaluation of the binding ability of an orphan nuclear receptor Nurr1 and synthetic peptides
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多田 悠亮、枅屋 宇洋、田川 幸樹、劉 曉輝、松島 綾美
2. 発表標題 ビスフェノール誘導体が培養細胞の神経突起伸長に及ぼす影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多田 悠亮、枅屋 宇洋、劉 曉輝、松島 綾美
2. 発表標題 培養細胞PC12を用いた神経系に対する新世代ビスフェノールの影響評価
3. 学会等名 第55回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 枅屋 宇洋、劉 曉輝、松島 綾美
2. 発表標題 アンタゴニスト活性の発現要因解明を目指した新世代ビスフェノールとエストロゲン受容体 型の結合能評価
3. 学会等名 平成30年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学理学研究院化学部門構造機能生化学研究室ホームページ
<http://lsfb.scc.kyushu-u.ac.jp>

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
---------	---------