

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2008

課題番号：19209033

研究課題名（和文） ポリグルタミン病の病態抑止療法の開発

研究課題名（英文） Pathogenesis-based therapy development for polyglutamine diseases

研究代表者

祖父江 元 (SOBUE GEN)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20148315

研究成果の概要：遺伝性運動ニューロン疾患である球脊髄性筋萎縮症（SBMA）のマウスモデルにおいて、分子シャペロンやユビキチン-プロテアソーム系の機能を増強することにより神経変性の進行が抑えられることを明らかにした。また、すでにSBMAのマウスモデルにおいて病態抑止効果が明らかとなっているアンドロゲン低下療法について、患者を対象とした第Ⅱ相臨床試験を実施し、本治療法が患者においても病態を抑えることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	25,900,000	7,770,000	33,670,000
2008年度	13,300,000	3,990,000	17,290,000
総計	39,200,000	11,760,000	50,960,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学・ポリグルタミン・分子シャペロン・ユビキチン-プロテアソーム・球脊髄性筋萎縮症

1. 研究開始当初の背景

ポリグルタミン病はCAG繰り返し塩基配列の異常延長を原因とする遺伝性神経変性疾患であり、球脊髄性筋萎縮症（SBMA）、ハンチントン病（HD）、脊髄小脳失調症（SCA）などが知られている。原因遺伝子は疾患により異なるが、ポリグルタミン病には共通する病態の存在が明らかとなってきている。他の神経変性疾患同様、ポリグルタミン病に対する治療法は確立されておらず、治療法開発は今後の極めて重要な課題である。原因遺伝子を導入した動物モデルの開発により、病態解明や治療法開発についての試みが加速的に進

められているが、臨床試験において有効性が示された治療法はない。基礎研究の成果を臨床応用するためには、治療の標的となる分子病態の解明やバイオマーカーの同定が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

遺伝性神経変性疾患であるポリグルタミン病に共通する病態に基づく治療法（病態抑止療法）を開発し臨床応用する。とくに球脊髄性筋萎縮症の疾患モデルを用いて神経毒性を発揮する病因・病態分子を同定し、この分子の分解を促進することによって治療を

行う分子標的治療を開発する。さらにこの成果の臨床への効率的な移行を可能にするため、病態や臨床的重症度を反映し、臨床試験におけるエンドポイントになりうるバイオマーカーを開発し、臨床試験への展開を行う。

3. 研究の方法

(1) ユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) 賦活化による SBMA の病態抑止

SBMA に対する UPS を介した治療法を開発すべく、SBMA マウスモデルにおけるプロテアソームのキモトリプシン様活性および 35S 標識ユビキチン化 cIAP1 による蛋白質分解活性を測定し、選択的 Hsp90 阻害剤である 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin を SBMA モデルマウスに経口投与し、運動機能や病理学的所見などにおける治療効果を解析した。また、Hsp70/Hsp90 結合蛋白質である CHIP (C terminus of Hsc70 (heat shock cognate protein 70)-interacting protein) の機能解析のため、SBMA トランスジェニックマウスとの交配を行い、運動機能解析や病理学的解析を行った。

(2) SBMA に対するリュープロレリン酢酸塩の第 II 相臨床試験

50 例の被験者を対象に 1 年間のプラセボ対照二重盲検試験を行った。対象は遺伝子診断で診断が確定された SBMA 患者であり、独歩もしくは杖を用いて歩行が可能な 30 歳~70 歳の挙児希望のない患者とした。年齢と重症度とを層とする最小化法を用いて、50 例の患者をリュープロレリン群とプラセボ群に不作為割付した。また、1 年間の臨床試験を終えた 49 例の被験者を対象として、希望者に 2 年間の leuprorelin 継続投与を行い、投与を行わなかった群との比較を行った。プロトコールは名古屋大学附属病院 IRB の承認を得ており、文書による同意を得た被験者を対象とした。主要評価項目は日本版 ALSFRS-R とし、副次評価項目として陰嚢皮膚の抗ポリグルタミン抗体陽性細胞数の割合、血清 CK, AST, ALT、嚥下機能指標、呼吸機能検査等を測定した。

(3) SBMA のバイオマーカーの探索・同定

運動機能検査として呼吸器疾患や循環器疾患に対して広く用いられている、6 分間歩行検査 (6MWT) が SBMA のバイオマーカーとなりうるか検討した。遺伝子検査にて SBMA と確定診断されている患者 35 名及び及び健常コントロール 29 名を対象に検討を行った。6MWT は American Thoracic Society によるガイドラインに従い、30m の水平な廊下を往復して距離を測定した。同意が得られた患者 24 名では初回と約 1 年後 (54.3±6.8 週) に測定

を行った。また、再現性評価のため患者 15 名で約 1 月後 (29.4±10.9 日) に再測定を行った。

4. 研究成果

(1) ユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) 賦活化による SBMA の病態抑止

SBMA マウスの脊髄におけるプロテアソーム活性は進行期においても野生型と同程度に保持されており、骨格筋ではその活性が亢進していた。20S および 19S プロテアソームサブユニットの発現量も SBMA マウス脊髄では野生型と同程度であったが、骨格筋では発現の亢進が認められた。生体におけるユビキチン-プロテアソーム系のレポーターである変異ユビキチン (Ub^{667V}) の高発現マウスと SBMA マウスを交配した解析においても、ユビキチン-プロテアソーム系の機能が維持されていることが示された。17-DMAG を SBMA マウスモデルに経口投与したところ、変異 AR 蛋白質の減少および Hsp70・Hsp40 などの熱ショック蛋白質の発現誘導が認められ、反応性グリオシスの改善が認められた。また、マウスの運動機能 (rotarod, cage activity)、体重、および寿命の有意な改善が認められた。

CHIP トランスジェニックマウスとの交配により CHIP を高発現した AR-97Q マウス脊髄および骨格筋の immunoblot では、変異 AR の凝集体 (高分子量複合体) およびモノマーの現象が認められたが、こうした効果は AR-24Q マウスでは認められなかった。AR-97Q マウスの脊髄および骨格筋を用いたフィルターラップアッセイでは、セルロースアセテート膜にプロットされる AR 凝集体およびニトロセルロース膜にプロットされる可溶性 AR モノマーの量はいずれも CHIP 高発現により減少した。CHIP を高発現した AR-97Q マウスではロータロッド、ケージアクティビティー、歩幅、体重、生存期間の有意な改善が認められ、とくにその効果は CHIP をホモで高発現するマウスにおいて強く認められた。病理学的には、脊髄前角および骨格筋のいずれにおいても抗ポリグルタミン抗体で核がびまん性に染色される細胞数が減少し、骨格筋の HE 染色では神経原性筋萎縮の所見にも改善が認められた。脊髄前角の GFAP 染色では反応性グリオシスの減弱が示唆された。

以上より、SBMA のモデルマウスではユビキチン-プロテアソーム系の機能が維持されていること、およびその機能を活性化する薬物治療が、マウスの運動機能や病理所見を改善することが示された。ユビキチン-プロテアソーム系は SBMA をはじめとする神経変性疾患の治療標的として極めて重要と考えられる。

(2) SBMA に対するリュープロレリン酢酸塩

の第Ⅱ相臨床試験

SBMAは緩徐進行性の疾患で、病態を反映するバイオマーカーが確立されていないため、まずサロゲートエンドポイントとなりうる臨床評価指標を探索した。とくに予後に直結する球麻痺の解析方法として嚥下造影に注目し、空間的・時間的解析による嚥下機能の定量化を検討した。その結果、食道入口部開大時間が患者の重症度と最もよく相関し、再現率の高い優れたマーカーであることが明らかとなった。そこで、運動機能スコア(ALSFRS-R)を主要評価項目、食道入口部開大時間などを副次的評価項目とする第Ⅱ相臨床試験をデザインし、SBMA患者に対するリユープロレリン酢酸塩の治療効果を検討した。50例の被験者を対象に試験を行ったところ、48週間のプラセボ対照比較試験ではリユープロレリン酢酸塩による血清テストステロンの有意な低下、血清CKの有意な低下、陰囊皮膚における1C2(抗ポリグルタミン抗体)陽性細胞数の有意な減少、および嚥下造影における食道入口部開大時間の有意な改善が認められ、その後の継続試験ではリユープロレリン酢酸塩の長期投与(144週)により運動機能スコア(ALSFRS-R)の悪化が有意に抑制されることが明らかとなった。さらに、リユープロレリン酢酸塩の投与を2年間受けた後に不整脈で死亡した被験者の剖検組織を用いた病理学的解析では、リユープロレリン酢酸塩により脊髄運動ニューロンにおける変異ARの核内集積が抑制されることが示唆された(図)。有害事象は前立腺癌患者に対する臨床試験の成績と比べ明らかな差は乏しかった。以上より、本治療法は患者においても病態の中心である変異ARの凝集を阻害し、疾患の進行を抑える可能性が示された。

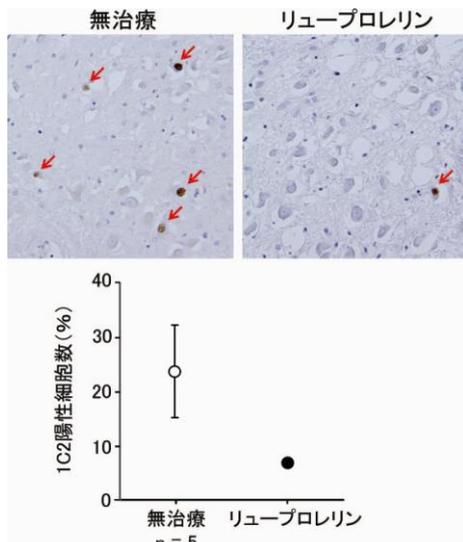


図. 橋底部の抗ポリグルタミン免疫染色
無治療の剖検例に比べ、リユープロレリン投与症例では陽性細胞数が少ない。

(3) SBMAのバイオマーカーの探索・同定

6分間歩行距離(6MWD)は健常コントロール(637.6±94.2m)と比較して患者群(323.3±143.8m)で明らかに少なかった($p < 0.001$)。Test-retestの分析においては高い級内相関を認めた($r = 0.982$, $p < 0.001$)。患者24名において、約1年(54.3±6.8週)の間に11.3±17.6%の歩行距離減少を認めた。他の運動機能指数との相関を調べたところALSFRS-R($p < 0.001$)やLimb Norris Score($p < 0.001$)などのスコアと高い相関が認められた。以上の結果により、SBMA患者において6MWTは再現性が高く、他の運動機能指数との相関が高いことから、バイオマーカーとして有用であることが示された。また、その他の運動ニューロン疾患に対する運動機能評価としても応用することができるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計15件)

- ① Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Sobue G. Pathogenesis-targeting Therapeutics for Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA). *Neuropathology* [in press]. 2009 査読あり
- ② Banno H, Katsuno M, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G. Neuropathology and therapeutic intervention in spinal and bulbar muscular atrophy. *Int. J. Mol. Sci.* [in press]. 2009 査読あり
- ③ Senda J, Ito M, Watanabe H, Atsuta N, Kawai Y, Katsuno M, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H, Sobue G. Correlation between pyramidal tract degeneration and widespread white matter involvement in amyotrophic lateral sclerosis: A study with tractography and diffusion-tensor imaging. *Amyotroph. Lateral Scler.* [in press]. 2009 査読あり
- ④ Katsuno M, Adachi H, Sobue G. Getting a handle on Huntington's disease: the case for cholesterol. *Nat. Med.* 15: 253-254, 2009. 査読あり
- ⑤ Young JE, Garden GA, Martinez RA, Tanaka F, Sandoval CM, Smith AC, Sopher BL, Lin A, Fischbeck KH, Ellerby LM, Morrison RS, Taylor JP, La Spada AR. Polyglutamine-expanded androgen receptor truncation fragments activate a Bax-dependent apoptotic cascade mediated by DP5/Hrk. *J. Neurosci.* 29: 1987-1997, 2009. 査

- 読あり
- ⑥ Banno H, Katsuno M, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Suga N, Takamori M, Ito M, Nakamura T, Matsuo K, Yamada S, Oki Y, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Atsuta N, Watanabe H, Fujimoto Y, Nakashima T, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann. Neurol.* 65: 140-150, 2009. 査読あり
- ⑦ Tokui K, Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka F, Hamazaki J, Murata S, Tanaka F, Sobue G. 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in a SBMA model mouse. *Hum. Mol. Genet.* 18: 898-910, 2009. 査読あり
- ⑧ Takeuchi Y, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Kawashima M, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G. Walking capacity evaluated by the 6-minute walk test in spinal and bulbar muscular atrophy. *Muscle Nerve* 38: 964-971, 2008. 査読あり
- ⑨ Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G. Molecular Genetics and Biomarkers of Polyglutamine Diseases. *Current Mol. Med.* 8: 221-234, 2008. 査読あり
- ⑩ Suenaga M, Kawai Y, Watanabe H, Atsuta N, Ito M, Tanaka F, Katsuno M, Fukatsu H, Naganawa S, Sobue G. Cognitive impairment in spinocerebellar ataxia type 6. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79: 496-499, 2008. 査読あり
- ⑪ Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Yamashita F, Horii N, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G. CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA. *Brain* 131: 229-239, 2008. 査読あり
- ⑫ Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Minamiyama M, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G. Therapeutic strategies for spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Drug Future* 32: 907-917, 2007. 査読あり
- ⑬ Adachi H, Waza M, Tokui K, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. CHIP Overexpression Reduces Mutant Androgen Receptor Protein and Ameliorates Phenotypes of the Spinal and Bulbar Muscular Atrophy Transgenic Mouse Model. *J. Neurosci.* 27: 5115-5126, 2007. 査読あり
- ⑭ Adachi H, Waza M, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Pathogenesis and molecular targeted therapy of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33: 135-151, 2007. 査読あり
- ⑮ Yang Z, Chang YJ, Yu IC, Yeh S, Wu CC, Miyamoto H, Merry DE, Sobue G, Chen LM, Chang SS, Chang C. ASC-J9 ameliorates spinal and bulbar muscular atrophy phenotype via degradation of androgen receptor. *Nat. Med.* 13: 348-353, 2007. 査読あり
- [学会発表] (計 15 件)
- ① 祖父江 元. 神経変性疾患の病態に基づく治療開発. 第四回神経内科の基礎と臨床. 京都. 2008年11月21日.
- ② Adachi H, Tokui K, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka F, Sobue G. An oral Hsp90 inhibitor ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model. Neuroscience 2009. Washington DC, USA, Nov 15-19, 2008.
- ③ Katsuno M, Kawashima M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Suga N, Adachi H, Tanaka F, Sobue G. Skeletal muscle involvement in spinal and bulbar muscular atrophy. The 19th International Symposium on ALS/MND. Birmingham, UK, Nov 3-5, 2008.
- ④ 祖父江 元. 分子シャペロンによる神経変性疾患の治療への展望. 日本ハイパーサーミア学会第 25 回大会. 名古屋. 2008年9月12日.
- ⑤ 祖父江 元. 神経変性疾患の病態抑止治療第 39 回日本内科学会北海道支部生涯教育講演会. 北海道. 2008年6月16日.
- ⑥ 祖父江 元. 神経変性疾患の分子標的治療: 球脊髄性筋萎縮症を中心に. 第 49 回日本神経病理学会総会学術集会シンポジウム I 「末梢神経・筋疾患の臨床病理-病因解明と治療開発にはたす新たな役割-」. 東京. 2008年5月20日.
- ⑦ 田中章景、和座雅浩、丹羽淳一、祖父江 元. 孤発性 ALS 病態関連分子の探索と疾患モデルの開発. 第 49 回日本神経学会総会. シンポジウム. 横浜. 2008年5月16日.
- ⑧ 祖父江 元. 神経変性疾患の分子標的治療への展望-SBMAを中心に-. Academic

- Conference in Tokyo. 東京. 2008年2月7日
- ⑨ Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Tanaka F, Sobue G. Myocardial involvement in spinal and bulbar muscular atrophy. 18th International symposium on ALS/MND. Toronto, Canada, Dec 1-3, 2007.
- ⑩ 祖父江 元. 分子シャペロンによる神経変性疾患の治療への展望. 第2回臨床ストレス応答学会大会ランチョンセミナー. 福岡. 2007年11月30日.
- ⑪ Adachi H, Waza M, Tokui K, Katsuno M, Tanaka F, Sobue G. CHIP overexpression reduces the mutant AR protein and ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model. Neuroscience 2007. San Diego, USA, Nov 3-7, 2007.
- ⑫ Sobue G. Translational approaches for polyglutamine disease. 第4回21世紀COE国際シンポジウム (The 21st century center for excellence (COE) program 4th international symposium on functional molecules linked to neurodegeneration and oncogenesis - toward molecular targeted therapy-). Nagoya, Japan, Oct 25-26, 2007.
- ⑬ Sobue G. Mutant SOD1 and protein aggregation/degradation in motoneuronal cells. Mutant SOD1 and familial ALS: from molecule to man. Milano, Italy, Sep 13-16, 2007.
- ⑭ Sobue G. Reversible dysfunction in polyglutamine disease. Neuro2007. Yokohama, Japan, Sep 10-12, 2007.
- ⑮ 祖父江 元. 神経変性疾患の病態抑止治療. 第48回日本神経学会総会 シンポジウム「神経変性疾患の動物モデル」. 名古屋. 2007年5月16日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

祖父江 元 (SOBUE GEN)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20148315

(2) 研究分担者

田中 章景 (TANAKA FUMIAKI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30378012

足立 弘明 (ADACHI HIROAKI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・COE
特任講師
研究者番号：40432257

勝野 雅央 (KATSUNO MASAHISA)
名古屋大学・高等研究院・特任講師
研究者番号：50402566

(3) 連携研究者

道勇 学 (DOYU MANABU)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：90293703