

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390243

研究課題名(和文)

ポリグルタミン病の分子シャペロン-U P S系を介する病態の解明と治療法の開発

研究課題名(英文)

Therapeutic strategy for polyglutamine-mediated motor neuron disease via molecular chaperone-ubiquitin proteasome system

研究代表者

足立 弘明 (ADACHI HIROAKI)

名古屋大学・医学系研究科・COE 特任講師

研究者番号：40432257

研究成果の概要(和文)：

異常延長した CAG リピートをもつヒトの全長のアンドロゲンレセプター (AR) 遺伝子を発現する球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) トランスジェニックマウス (SBMA マウス) を用いてペオニ抽出物 (PE) 投与の効果を検討したところ、PE はストレス応答蛋白の発現レベルを上昇させ、変異 AR の凝集体形成を有意に抑制し、ポリグルタミンによる筋力低下、自発的行動減少などの表現型を改善し生存率を大きく向上させた。

研究成果の概要(英文)：

We administrated the peony extract to male spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) transgenic mouse model (androgen receptor (AR)-97Q or AR-24Q) and examined various neurological and behavioral parameters. Administration of the peony extract markedly ameliorated motor impairments in AR-97Q mice without detectable toxicity, and reduced amounts of monomeric and nuclear accumulated mutant AR. Mutant AR was preferentially degraded in the presence of the compound in both SBMA cell and mouse models when compared with wild-type AR. It also significantly induced Hsp70 and Hsp40. These observations suggest that the compound is a promising therapeutic candidate for polyglutamine (polyQ)-mediated neurodegenerative diseases including SBMA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：球脊髄性筋萎縮症、ポリグルタミン病、分子シャペロン、ペオニ抽出物

1. 研究開始当初の背景

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は、成人期に

発症する緩徐進行性の下位運動ニューロン疾患であり、ポリグルタミン病に含まれる。SBMAの原因はアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子の CAG リピートの異常延長である。特異的な神経組織が変性するが、原因遺伝子の CAG リピートが蛋白質に翻訳され、異常伸長したポリグルタミン鎖になることで、変異蛋白質が新たな毒性を獲得することに因っている。ポリグルタミン病では変異蛋白質からなる核内封入体 (NI) とびまん性核内集積が特徴的な病理所見であり、異常伸長したポリグルタミン鎖を含有する異常蛋白質が生体の防御機構を凌駕して神経細胞内で不溶性の凝集体を形成したり、あるいは蓄積する過程で細胞毒性をもたらし、神経細胞が変性し細胞死に至ると考えられている。また、ポリグルタミン鎖の延長した病因蛋白質は折りたたみ異常を持ち (misfold 蛋白質)、3次元構造が変化して病原性を発揮していることも想定されている。この病因蛋白質の蓄積による選択的な神経細胞変性死のメカニズムには、核内の転写因子が枯渇することやユビキチン・プロテアソームシステム (UPS) やライソソームなどの蛋白質分解系の破綻など多くの機序が関与していることが明らかになってきている。

生体 (細胞) を熱ショックに曝すと、熱ショック蛋白質 (heat shock protein, Hsp と略) あるいは分子シャペロンと呼ばれている蛋白質が合成されてくる。この熱ショックによって分子レベルでは蛋白質の構造変化が引き起こされる。変性した蛋白質はその機能を失うとともに、疎水性領域が外に露出して互いに凝集しやすくなり、細胞にとって毒性を発揮する。個々の Hsp は、変性した蛋白質を元どおりに折りたたむ、あるいは修復不能の場合には分解する機能を持っている。近年、Hsp 発現量が多い神経細胞ではポリグルタミン鎖の延長した変異蛋白質への耐性が強く変性を起こさないことが報告されており、個体レベルである SBMA マウスモデルと剖検患者組織で Hsp の発現の程度と病変組織の選択性の関わりの有無を検討することは、Hsp 発現のポリグルタミン病の病態形成への関与を明らかにする意味で重要であると考えられる。さらに、毒性のない低分子 Hsp 誘導剤および誘導補助剤を探索することは、神経変性疾患の治療や予防にとって有用であると考えられる。

2. 研究の目的

神経変性疾患の一つである SBMA のトランスジェニックモデルマウスに対して、新たな Hsp 誘導剤を探索していたところ、シャクヤクの主成分であるペオニ抽出物には、毒性の

ない用量で強い Hsp 誘導効果があることを見い出した。そこで、シャペロン—UPS を分子標的とし、Hsp 誘導による治療法の開発を視野に入れて、SBMA の神経培養細胞とマウスモデルに対してペオニ抽出物を用いた治療的介入実験を行った。我々は、すでにペオニ抽出物を用いて、神経培養細胞では分子シャペロンと UPS が活性化されている現象を見いだしており、神経変性疾患のモデル動物で治療効果が見られるかどうかを表現型の解析で検討した。さらに、ペオニ抽出物の分子シャペロン発現増加効果を神経組織部位別に、各臓器別に検討し、作用機序を解析した。

3. 研究の方法

(1) 神経培養細胞モデルにおける Hsp 高発現による治療効果の検討

ヒト神経培養細胞モデルでは、Hsp 誘導剤であるペオニ抽出物を様々な濃度で投与して、Hsp 高発現による変異したヒトアンドロゲン受容体 (AR) 蛋白質の発現量、ユビキチン化やその分解課程における分子シャペロン及びユビキチンリガーゼなどとの相互作用について調べた。SBMA 培養細胞モデルは、正常および異常伸長したポリグルタミン鎖を含有する AR 遺伝子発現ベクターを恒常的に発現する SBMA ヒト神経培養細胞 (SH-SY5Y) モデルを使用した。これらの培養細胞モデルを用い、様々な濃度のペオニ抽出物で、AR 蛋白質 (正常 CAG リピート及び異常伸長 CAG リピート) の発現量に及ぼす影響をウエスタンブロット法や免疫沈降法などの分子生物学的手法を用いて検討した。

(2) マウスモデルにおける Hsp 高発現

SBMA マウスモデルは、chicken β -actin プロモーターの調節下で異常伸長した CAG リピートをもつヒトの全長の AR 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (SBMA マウス) を用いる。SBMA マウスは、表現形に性差があり、進行性の運動障害を来す。ペオニ抽出物の治療効果を検討するために、モデルマウスに対して、これまでの報告において短期投与では毒性が問題にならないことが確認されている量を薬剤吸収が確実な腹腔内に連日投与する。Hsp 高発現の効果を、体重変化、生存率、Rotarod 法 (一定の速度で回転する棒の上に、落下せずにつかまっていられる時間を測定)、Cage activity 測定法 (24 時間のマウスの動作の回数の測定)、の 4 つのパラメーターを用いて解析した。さらに、抗ポリグルタミン抗体などを用いた免疫組織化学などの病理学的検索、ウエスタンブロットなどを用いたタンパク発現解析および電子顕微鏡による凝集体の形態観察などにより分子生物学的に検討した。特に、ウエスタンブロットや病理学的解析により核内変異

蛋白の蓄積の程度を定量的に解析し、in vitro での効果との比較検討を行った。

4. 研究成果

培養細胞モデルにおいて、ペオニ抽出物の投与により薬剤濃度依存性に 97 リピート数の AR (AR97Q) の減少効果がみられた。人体では正常リピート数とされる 24 リピートの AR (AR24Q) でも同様の効果を認めたが、AR 減少効果は AR97Q でのほうに強くみられた。また、薬剤投与により変異タンパクの分解に関わる分子シャペロンの発現増加がみられた。このとき HSP の転写因子である NF-YA の発現量に増加が見られた。またペオニ抽出物の投与によりシャペロン依存性ユビキチンリガーゼ (CHIP) の発現量も増加した。こうした培養細胞モデルの結果より、ポリグルタミンが伸長した病的な AR は、ペオニ抽出物により生体内でもその発現量を減少させることが可能と考えられ、次にマウスモデルにペオニ抽出物の投与を行った。コントロール群は生理食塩水、治療群は PE×1 (ペオニ抽出物:6.7g/kg), PE×2 (ペオニ抽出物:13.4g/kg) で施行した。マウスの表現型の変化は、体重、生存率、運動機能解析 (Rotarod, cage activity) にて評価したところ、ペオニ抽出物はポリグルタミンによる筋力低下、自発的行動減少などの表現型を改善し生存率を大きく向上させ、治療群でも生殖能力が保たれ、その他に明らかな副作用は見られなかった。このように、ペオニ抽出物投与群は非治療群に比べて、すべての解析において投与量依存性に有意な治療効果を認めた

タンパクの発現量の評価をウエスタンブロット法により SBMA マウスモデルの脊髄と骨格筋にて行くと、ペオニ抽出物の投与によりポリグルタミン鎖が異常伸長した AR が減少し、異常伸長したポリグルタミンを特異的に認識する 1C2 抗体を用いた免疫染色においては、有意に治療群で 1C2 陽性細胞の減少が認められた。Hsp70 などの分子シャペロンの発現は脊髄、筋ともに強く上昇し、NF-YA もモデル細胞と同様に治療群で発現量が増加した。CHIP の発現量も増加した。

このようにペオニ抽出物のポリグルタミン病培養細胞モデルとモデルマウスへの投与は、有意な治療効果を示し、モデルマウスへの長期連続投与に明らかな副作用が確認されなかったことより、その他の異常タンパク質によって引き起こされる神経変性疾患においてもこれらの病因タンパク質の発現量低下が認められれば、ペオニ抽出物の投与は安全で有望な治療として応用が可能となると考えられる。

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] (すべて査読あり) (計 17 件)

1. Hoshino T, Murao N, Namba T, Takehara M, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Matsushima T, Suzuki T, Mizushima T. Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *J Neurosci* 31: 5225-5234, 2011.
2. Katsuno M, Adachi H, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G. Transforming Growth Factor- β Signaling in Motor Neuron Diseases. *Curr Mol Med* 11:48-56, 2011
3. Mo K, Razak Z, Rao P, Yu Z, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Lieberman AP, Westwood JT, Monks DA. Microarray Analysis of Gene Expression by Skeletal Muscle of Three Mouse Models of Kennedy Disease/Spinal Bulbar Muscular Atrophy. *PLoS ONE* 5: e12922, 2010.
4. Koike H, Atsuta N, Adachi H, Iijima M, Katsuno M, Yasuda T, Fukada Y, Yasui K, Nakashima K, Horiuchi M, Shiomi K, Fukui K, Takashima S, Morita Y, Kuniyoshi K, Hasegawa Y, Toribe Y, Kajiura M, Takeshita S, Mukai E, Sobue G. Clinicopathological features of acute autonomic and sensory neuropathy. *Brain* 133(10): 2881-2896, 2010.
5. Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Adachi H, Tanaka F, Sobue G. Clinical features and molecular mechanisms of spinal and bulbar muscular atrophy

- (SBMA). *Adv Exp Med Biol* 685:64-74, 2010.
6. Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Doi H, Kondo N, Mizoguchi H, Nitta A, Yamada K, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G. Disrupted transforming growth factor-beta signaling in spinal and bulbar muscular atrophy. *J Neurosci* 30:5702-5712, 2010.
 7. Hoshino T, Matsuda M, Yamashita Y, Takehara M, Fukuya M, Mineda K, Maji D, Ihn H, Adachi H, Sobue G, Funasaka Y, Mizushima T. Suppression of melanin production by expression of HSP70. *J Biol Chem* 285:13254-13263, 2010.
 8. Matsuda M, Hoshino T, Yamashita Y, Tanaka KI, Maji D, Sato K, Adachi H, Sobue G, Ihn H, Funasaka Y, Mizushima T. Prevention of ultraviolet B radiation-induced epidermal damage by expression of heat shock protein 70. *J Biol Chem* 285: 5848-5858, 2010.
 9. Sone J, Niwa J, Kawai K, Ishigaki S, Yamada S, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Dorfin ameliorates phenotypes in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* 88:123-135, 2010.
 10. Adachi H, Katsuno M, Waza M, Minamiyama M, Tanaka F, Sobue G. Heat shock proteins in neurodegenerative diseases: pathogenic roles and therapeutic implications. *Int J Hyperthermia* 25:647-654, 2009.
 11. Tokui K*, Adachi H*, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka K, 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. (* Evenly contributed to the study)
 12. 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.
 13. Katsuno M, Adachi H, Sobue G. Getting a handle on Huntington's disease: the case for cholesterol. *Nat Med* 15:253-254, 2009.
 14. Suemasu S, Tanaka KI, Namba T, Ishihara T, Katsu T, Fujimoto M, Adachi H, Sobue G, Takeuchi K, Nakai A, Mizushima T. A role for HSP70 in protecting against indomethacin-induced gastric lesions. *J Biol Chem* 284:19705-19715, 2009.
 15. Teita A, Tanaka KI, Yamakawa N, Adachi H, Sobue G, Goto H, Takeuchi K, Mizushima T. HSP70 Confers Protection against Indomethacin-Induced Lesions of the Small Intestine. *J Pharmacol Exp*

Ther 330: 458-467, 2009.

16. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa JI, Yamada SI, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata KI, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, Sobue G. TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases. J Biol Chem 284:22059-22066, 2009.
17. Palazzolo I, Stack C, Kong L, Musaro A, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Taylor JP, Sumner CJ, Fischbeck KH, Pennuto M. Overexpression of IGF-1 in muscle attenuates disease in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. Neuron 63:316-328, 2009.

[学会発表] (計 4 件)

1. Adachi H, Tohnai G, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Tanaka F, Ohtsuka K, Sobue G.
A peony extract alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease
40th Annual Meeting for the Society for Neuroscience, San Diego 17 November 2010
2. Tohnai G, Adachi H, Tokui K, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka F, Ohtsuka K, Sobue G.
Medical induction of stress response alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease
The 4th International Congress Responses in Biology and Medicine(CSSI)
The 4th Annual Meeting of The Biomedical Society for Stress Response(BSSR) 6-9 October 2009, Sapporo

一般演題

3. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa JI, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata KI, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, Sobue G.
TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases
39th Annual Meeting for the Society for Neuroscience, Chicago, IL 18 October 2009

一般演題

4. Adachi H, Tokui K, 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
第 38 回 The Society for Neuroscience Annual meeting, 2008. 11 Washington DC

一般演題

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

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

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 なし

()

研究者番号 :