

機関番号：82611

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390245

研究課題名（和文） 毒性βシート構造体・オリゴマーを標的としたポリグルタミン病の分子標的治療薬の開発

研究課題名（英文） Molecular therapy for the polyglutamine diseases targeting the toxic β-sheet conformers and oligomers

研究代表者

永井 義隆 (NAGAI YOSHITAKA)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第四部・室長

研究者番号：60335354

研究成果の概要（和文）：

神経変性疾患ポリグルタミン（PolyQ）病に対する異常伸長 PolyQ 蛋白質の毒性βシート構造体・オリゴマーを標的とした治療法確立を目指して、1）細胞膜透過性 PTD-QBP1 の PolyQ 病モデルマウスに対する治療効果を示し、QBP1 配列中の最小活性部位を同定した。2）PolyQ 病モデルショウジョウバエに有効な PolyQ 凝集阻害化合物 9 種を同定した。3）分子シャペロン誘導剤 17-AAG の PolyQ 病モデルショウジョウバエへの治療効果を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Toward developing a therapy for the polyglutamine (polyQ) neurodegenerative diseases targeting β-sheet conformers and oligomers of the expanded polyQ protein, 1) we showed the modest therapeutic effects of PTD-QBP1 on a mouse model of the polyQ diseases, and determined essential residues within QBP1 for its activity. 2) We identified 9 polyQ aggregation inhibitors which exhibit therapeutic effects on a *Drosophila* model of the polyQ diseases. 3) We demonstrated the therapeutic effects of 17-AAG, a chaperone-inducing compound, on polyQ disease *Drosophila* models.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2009 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：神経内科学、神経科学、分子生物学

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：神経変性疾患、ポリグルタミン病、βシート、オリゴマー、QBP1、分子シャペロン、治療薬、スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン（PolyQ）病など多くの神経変性疾患において、異常蛋白質のミスフォールディング・凝集が神経変性を引き起こすという共通の発症分子メカニズムが考えられるようになった。PolyQ 病は原因蛋白質内の PolyQ 鎖の異常伸長 (>40) により発症する

ハンチントン病（HD）、種々の脊髄小脳失調症（SCA）などの 9 疾患の総称で、異常伸長 PolyQ 鎖を持つ変異蛋白質がミスフォールディング・凝集を生じ、その結果難溶性の封入体を形成して神経細胞内に蓄積し、最終的に神経変性を引き起こすと考えられている。最近、研究代表者らは生化学的・構造生物学的解析を行い、異常伸長 PolyQ 蛋白質はアミロ

イド様凝集体を形成する前に、 β シート構造へ異常コンフォメーション変移したモノマー・オリゴマーの段階で細胞毒性を獲得することを初めて明らかにした (Nagai et al. *Nat Struct Mol Biol* 2007、Takahashi et al. *J Biol Chem* 2007)。

このような異常伸長 PolyQ 蛋白質のミスフォールディング・凝集を標的とした治療法確立を目指して、研究代表者らが以前に同定した異常伸長 PolyQ 鎖特異的結合ペプチド QBP1 (SNWKWPGIFD、US 特許取得、Nagai et al. *J Biol Chem* 2000) が異常伸長 PolyQ 蛋白質の毒性 β シート変移・オリゴマー形成を阻害し (Nagai et al. *Nat Struct Mol Biol* 2007、Takahashi et al. *J Biol Chem* 2007)、QBP1 の遺伝子発現により PolyQ 病モデルショウジョウバエの神経変性が抑制されることを明らかにした (Nagai et al. *Hum Mol Genet*, 2003)。さらに最近、細胞膜透過性シグナルを付加した PTD-QBP1 の体外からの投与により PolyQ 病モデルショウジョウバエの神経変性が抑制されることを見出し、QBP1 の治療分子としての可能性を示した (Popiel et al. *Mol Ther* 2007)。

また研究代表者らは、より高い生体内・脳内移行性が期待される低分子化合物で QBP1 と同様に異常伸長 PolyQ 蛋白質の毒性 β シート変移・凝集の阻害活性を持つものが有力な治療薬候補となると考えた。そして、自らが樹立した PolyQ 蛋白質凝集体形成アッセイ (Nagai et al. *J Biol Chem* 2000、US 特許取得) を用いて、PolyQ 凝集阻害活性を持つ化合物のハイスループットスクリーニングを行い、現在までに約 46,000 化合物の 1 次スクリーニングから約 100 種類の新規 PolyQ 凝集阻害化合物を同定している。

一方、生体内には蛋白質ミスフォールディングに対する防御機構として分子シャペロンが備わっており、実際に分子シャペロン遺伝子の発現による PolyQ 病モデル動物に対する治療効果が示されている。研究代表者らは実際の治療への応用を目指して、体外からの投与により内在性分子シャペロンの発現を誘導する分子シャペロン誘導剤に着目している。

2. 研究の目的

本研究では、異常伸長 PolyQ 蛋白質の毒性 β シート構造体・オリゴマーを標的とした PolyQ 病に対する分子標的治療法確立へ向けた基礎を築くことを目的として、(1) 異常伸長 PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1 を応用する方法、(2) PolyQ 凝集阻害化合物をハイスループットスクリーニングにより同定する方法、(3) 内在性分子シャペロンの発現誘導剤を用いる方法により、PolyQ 病モデル動物に対する治療効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 異常伸長 PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1 を応用した PolyQ 病の治療法開発

① 細胞膜透過性 PTD-QBP1 による PolyQ 病モデルマウスの分子治療

PTD-QBP1 の PolyQ 病哺乳類モデルに対する治療効果を明らかにするために、PTD-QBP1 を HttEx1-Q150 を発現するハンチントン病 (HD) モデルマウス R6/2 の腹腔内に隔日投与、もしくは浸透圧ポンプを用いて脳室内・脳実質内に持続投与した。HD マウスの運動障害、体重減少や寿命を経時的に評価した。また、脳切片を作製し、免疫染色にて HttEx1-Q150 蛋白質の封入体形成を評価した。

② QBP1 の低分子化・非ペプチド化による QBP1 由来化合物アナログの分子デザイン

QBP1 配列 (SNWKWPGIFD) 中の PolyQ 凝集阻害活性に寄与するアミノ酸配列を明らかにするために、QBP1 配列のアラニン・スキャン体、D アミノ酸・スキャン体、欠変異体など様々な変異体を網羅的に作製し、Thio-Q62 蛋白質凝集体形成アッセイを用いて、PolyQ 凝集阻害活性を評価した。

また、これらの様々な QBP1 変異体の異常伸長 PolyQ 鎖に対する結合特異性・親和性を評価するために、Biacore[®]を用いて表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析を行った。

(2) PolyQ 凝集阻害化合物のハイスループットスクリーニングによる PolyQ 病の治療薬開発

1 次ヒット PolyQ 凝集阻害化合物約 100 種類のうち、*in vitro* での PolyQ 凝集阻害活性が強い上位 20 化合物について、2 次スクリーニングとして、PolyQ 病モデルショウジョウバエ MJDtr-Q78 に経口投与し、複眼変性に対する抑制効果を評価した。ショウジョウバエモデルでの有効性を認める治療薬候補化合物については、HD マウス R6/2 や脊髄小脳失調症 (SCA1) モデルノックインマウスに対する治療効果を検討した。

一方、PolyQ 病のみならずアルツハイマー病、パーキンソン病など様々な神経変性疾患に広く共通の凝集阻害薬開発を目指し、1 次ヒット化合物のアミロイド β 、 α シヌクレイン、タウに対する凝集阻害活性も評価した。

(3) 分子シャペロン誘導剤を応用した PolyQ 病の治療法開発

分子シャペロン遺伝子群の転写・発現誘導活性が知られている熱ショック転写因子 (HSF) 活性化剤など様々な薬剤について、PolyQ 病モデルショウジョウバエ MJDtr-Q78、Htt-Q128 に経口投与し、複眼変性に対する抑制効果を評価した。また、免疫染色により封入体形成を評価した。

4. 研究成果

(1) 異常伸長PolyQ鎖結合ペプチドQBP1を 応用したPolyQ病の治療法開発

①細胞膜透過性PTD-QBP1によるPolyQ病 モデルマウスの分子治療

HD マウス脳室内・脳実質内への PTD-QBP1 の持続投与では、その到達範囲は脳室上衣細胞や脳内カテーテル刺入部など局所に止まっていた。次に PTD-QBP1 を HD マウス腹腔内へ隔日投与したところ、コントロールと比べて体重減少が有意に改善した。しかし、運動障害や寿命短縮には有意な治療効果が認められなかった。脳切片の免疫染色でも封入体形成には有意な抑制効果は認めなかった (Popiel et al. *Neurosci Lett* 2009)。

マウス頸動脈への投与実験から、PTD-QBP1 の血液脳関門 (BBB) 透過効率が低いことが示唆され、その結果十分な治療効果が得られなかったと考えられた。今後、BBB 透過効率の高い PTD の開発が望まれる。

②QBP1 の低分子化・非ペプチド化による

QBP1 由来化合物アナログの分子デザイン
様々な QBP1 変異体の PolyQ 凝集阻害活性を評価した結果、N 末端の SN、および C 末端の D の欠失もしくは置換では PolyQ 凝集阻害活性に明らかな影響を与えず、W3、W5、W6、I9、F10 の 5 アミノ酸が QBP1 の活性に必須であることを明らかにした。以上のことから、WKWWPGIF の 8 アミノ酸が最小活性配列であると結論した (Tomita et al. *Bioorg Med Chem* 2009)。

一方、SPR 解析の結果、QBP1 は Thio-Q62 に特異的な結合活性 ($K_d = 5.7 \mu\text{M}$) を示したが、Thio-Q0/Q19 には有意な結合を認めなかった。一方、コンゴレードは Thio-Q0、-Q19、-Q62 いずれにも非特異的に結合することが明らかになった。さらに、様々な QBP1 変異体を用いた解析から、Thio-Q62 への結合親和性と凝集阻害活性が有意に相関することが明らかとなった。以上の結果から、SPR は PolyQ 凝集阻害分子の結合特異性・親和性の評価に有用であると考えられた (Okamoto et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2009)。

(2) PolyQ凝集阻害化合物のハイスループット スクリーニングによるPolyQ病の治療 薬開発

1 次ヒット PolyQ 凝集阻害化合物の PolyQ 病モデルショウジョウバエ MJDtr-Q78 に対する 2 次スクリーニングの結果、複眼変性抑制効果を認める 9 化合物を同定した。そのうち 3 化合物は、アミロイド β 、 α シヌクレイン、タウに対する凝集阻害活性も認めた。このうちヒトへの安全性、脳内移行性が示されている化合物 QAI1 を PolyQ 病モデルマウスに経口投与したところ、症状が重度である HD マウス R6/2 に対して

は明らかな治療効果を認めなかったが、より症状が軽度でヒトの病態を良く反映する SCA1 モデルノックインマウスに対しては、運動障害に対する治療効果を一部認めた。

今後、QAI1 の SCA1 モデルノックインマウスに対する治療効果を詳細に検討すると共に、他の PolyQ 凝集阻害化合物についても PolyQ 病モデルマウスに対する治療効果を順次検討する予定である。

(3) 分子シャペロン誘導剤を応用した PolyQ病の治療法開発

様々な分子シャペロン誘導剤を PolyQ 病モデルショウジョウバエ MJDtr-Q78 に経口投与したところ、ゲルダナマイシン誘導体の 17-AAG が、濃度依存的に複眼変性、封入体形成を抑制することを明らかにした。17-AAG は別の PolyQ 病モデルショウジョウバエ Htt-Q128 の複眼変性にも有効であった。この時に内在性分子シャペロン Hsp70、Hsp40 の発現誘導が確認され、さらに HSF のノックダウンによりその治療効果が消失したことから、17-AAG の治療効果は HSF 活性化を介した内在性分子シャペロンの発現誘導によると結論した (Fujikake et al. *J Biol Chem* 2008)。

一方、HSF の遺伝子発現によっては、予想に反して 17-AAG とは異なり PolyQ 病モデルショウジョウバエ MJDtr-Q78 の複眼変性が増悪したことから、薬剤による HSF 活性化と遺伝子発現では、発現誘導される標的遺伝子群が異なる可能性が考えられた。

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 19 件)

(以下、1-15 は査読有、16-19 は査読無)

1. Sun H, Satake W, Zhang C, Nagai Y, Tian Y, Fu S, Yu J, Qian Y, Qian Y, Chu J, Toda T. Genetic and clinical analysis in a Chinese parkinsonism-predominant spinocerebellar ataxia type 2 family. *J Hum Genet* 56 (4): 330-334 (2011)
2. Rahman MS, Nagai Y, Popiel HA, Fujikake N, Okamoto Y, Ahmed MU, Islam MA, Islam MT, Ahmed S, Rahman KM, Uddin MJ, Dey SK, Ahmed Q, Hossain MA, Jahan N, Toda T. Genetic Testing for Huntington's Disease in Parkinsonism. *Mymensingh Med J* 19 (4): 510-514 (2010)
3. Mizuno H, Fujikake N, Wada K, *Nagai Y. α -Synuclein transgenic *Drosophila* as a model of Parkinson's Disease and related synucleinopathies. *Parkinsons Dis* 2011: 212706 (2011)
4. Bauer PO, Goswami A, Wong HK, Okuno M,

- Kurosawa M, Yamada M, Miyazaki H, Matsumoto G, Kino Y, Nagai Y, Nukina N. Novel gene therapy for polyglutamine diseases to degrade selectively the pathogenic protein. *Nat Biotechnol* 28 (3): 256-263 (2010)
5. *Nagai Y, Fujikake N, Popiel HA, Wada K. Induction of molecular chaperones as a therapeutic strategy for the polyglutamine diseases. *Curr Pharm Biotechnol* 11 (2): 188-197 (2010)
 6. Naiki H, *Nagai Y. Molecular pathogenesis of protein misfolding diseases: Pathological molecular environments versus quality control systems against misfolded proteins. *J Biochem* 146 (6): 751-756 (2009)
 7. Tomita K, Popiel HA, *Nagai Y, Toda T, Yoshimitsu Y, Ohno H, Oishi S, Fujii N. Structure-activity relationship study on polyglutamine binding peptide QBP1. *Bioorg Med Chem* 17 (3): 1259-1263 (2009)
 8. Okamoto Y, *Nagai Y, Fujikake N, Popiel HA, Yoshioka T, Toda T, Inui T. Surface plasmon resonance characterization of specific binding of polyglutamine aggregate inhibitors to the expanded polyglutamine stretch. *Biochem Biophys Res Commun* 378 (3): 634-639 (2009)
 9. Kanagawa M, Nishimoto A, Chiyonobu T, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y, Wang F, Fujikake N, Taniguchi M, Lu Z, Tachikawa M, Nagai Y, Tashiro F, Miyazaki J, Tajima Y, Takeda S, Endo T, Kobayashi K, Campbell KP, Toda T. Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum Mol Genet* 18 (4): 621-631 (2009)
 10. Popiel HA, *Nagai Y, Fujikake N, Toda T. Delivery of the aggregate inhibitor peptide QBP1 into the mouse brain using PTDs and its therapeutic effects on polyglutamine disease mice. *Neurosci Lett* 449 (2): 87-92 (2009)
 11. *Nagai Y, Popiel HA. Conformational changes and aggregation of expanded polyglutamine proteins as therapeutic targets of the polyglutamine diseases: Exposed β -sheet hypothesis. *Curr Pharm Des* 14 (30): 3267-3279 (2008)
 12. Tsuji S, Onodera O, Goto J, Nishizawa M, the Study Group on Ataxic Diseases. Sporadic ataxias in Japan - a population-based epidemiological study. *Cerebellum* 7 (2): 189-197 (2008)
 13. Nakayama H, Hamada M, Fujikake N, Nagai Y, Zhao J, Hatano O, Shimoke K, Isosaki M, Yoshizumi M, Ikeuchi T. ER stress is the initial response to polyglutamine toxicity in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377 (2): 550-555 (2008)
 14. Fujikake N, *Nagai Y, Popiel HA, Okamoto Y, Yamaguchi M, Toda T. Heat shock transcription factor 1 (HSF1)-activating compounds suppress polyglutamine-induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones. *J Biol Chem* 283 (38): 26188-26197 (2008)
 15. Kaminosono S, Saito T, Oyama F, Ohshima T, Asada A, Nagai Y, Nukina N, Hisanaga S. Suppression of mutant huntingtin aggregate formation by Cdk5/p35 through the effect on microtubule stability. *J Neurosci* 28 (35): 8747-8755 (2008)
 16. 永井義隆. TDP-43 プロテノパチーの動物モデル. *最新医学* 65 (7): 1603-1613 (2010)
 17. 永井義隆. ポリグルタミン病に対する蛋白質ミスフォールディング・凝集を標的とした分子治療 *臨床神経学* 49 (11): 913-916 (2009)
 18. 永井義隆, 藤掛伸宏. 神経疾患と分子シャペロン *Clinical Neuroscience* 27 (4): 368-369 (2009)
 19. 永井義隆, ポピエル明子. 脊髄小脳変性症—What's new? 「遺伝子治療」 *Clinical Neuroscience* 27 (1): 95-98 (2009)
- [学会発表] (計 26 件)
1. Nagai Y, et al. 17-AAG, an HSF1-activator, suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration via induction of molecular chaperones. 4th Int Cong Stress Responses Biology & Medicine (Oct 6th, 2009, Sapporo, Japan)
 2. Nagai Y, et al. Surface plasmon resonance as a useful technique for screening for specific polyglutamine aggregation inhibitors. 5th Gordon Conf CAG Triplet Repeat Disorders (May 31st, 2009, NH, USA)
 3. 永井義隆, 他. AAV5 を用いた分子シャペロンの遺伝子治療によるポリグルタミン病モデルマウスの封入体形成と神経症状の抑制効果. 第 5 回臨床ストレス応答学会 (2010. 11. 20、徳島)
 4. 永井義隆. 神経変性疾患の発症分子メカニズムに基づいた治療法開発 - 目的指向型研究の進め方 -. 第 53 回日本神経化学会 (2010. 8. 31、兵庫)
 5. 永井義隆. ポリグルタミン蛋白質のアミロイド線維形成と細胞毒性獲得メカニズム—露出 β シート仮説の提唱—. 第 82 回日本生化学会 (2009. 10. 21、神戸)
 6. 永井義隆, 他. 凝集阻害ペプチドQBP1 を

- 用いたポリグルタミン病に対する分子標的治療法の開発. 第 54 回日本人類遺伝学会 (2009. 9. 23、東京)
7. 永井義隆. 神経変性疾患克服への挑戦 - 目的指向型研究の進め方 -. 第 52 回日本神経化学会 (2009. 6. 22、群馬)
 8. 永井義隆. ポリグルタミン病に対する蛋白質ミスフォールディング・凝集を標的とした分子治療. 第 50 回日本神経学会 (2009. 5. 20、仙台)
 9. 永井義隆、他 ポリグルタミン蛋白質の毒性構造変移の捕捉 - 露出 β シート仮説の提唱 - 第 31 回日本神経科学会 (2008. 7. 9、東京)
 10. 永井義隆、他 蛍光相関分光法を用いた細胞内ポリグルタミン蛋白質オリゴマーの検出とその阻害 第 49 回日本神経学会 (2008. 5. 15、横浜)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r4/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 義隆 (NAGAI YOSHITAKA)

(独) 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第四部・室長

研究者番号：60335354

(2) 研究分担者

ポピエル ヘレナ明子 (POPIEL HELENA AKIKO)

(独) 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第四部・流動研究員

研究者番号：40467593