

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16484

研究課題名（和文）脊髄小脳失調症6型の病態メカニズム解析とケミカルバイオロジーによる創薬開発研究

研究課題名（英文）Analysis of pathological mechanism of Spinocerebellar Ataxia type 6 (SCA6) by chemical biology.

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では脊髄小脳失調症6型（SCA6）の原因遺伝子産物であるCav2.1-polyQと1ACT-polyQの発現が、オートファジーにより制御されているかについて解析を行った。Cav2.1-polyQと1ACT-polyQをそれぞれ発現させた細胞に、本研究で同定したオートファジー誘導化合物(TMD-6)を投与した結果、両polyQの発現低下が確認された。さらに、SCA6のモデルマウスの脳内にTMD-6を注入したところ、ポリグルタミン病症状の緩和が確認された。これらの結果から両PolyQがオートファジーにより制御されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、SCA6原因遺伝子産物であるCav2.1-polyQおよび1ACT-polyQの両polyQタンパク質がオートファジー誘導により減少することが明らかになった。この結果から、これまで治療法の確立されていないSCA6に対してオートファジー誘導が有効であり、治療薬開発に応用できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined whether the expression of Cav2.1-polyQ and 1ACT-polyQ, the causative gene products of spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) are regulated by autophagy. Cells were transfected with Cav2.1-polyQ and 1ACT-polyQ and we could identify both of polyQ protein expression were reduced by autophagy inducer, TMD-6. Moreover, after administration of TMD-6 to SCA6 mice, polyglutamine symptoms have been confirmed to be relieved. These observations suggest that polyQ protein expression in SCA6 and SCA6-associated pathological features were reduced by autophagy.

研究分野：病態細胞生物学

キーワード：脊髄小脳失調症6型 SCA6 新規オートファジー

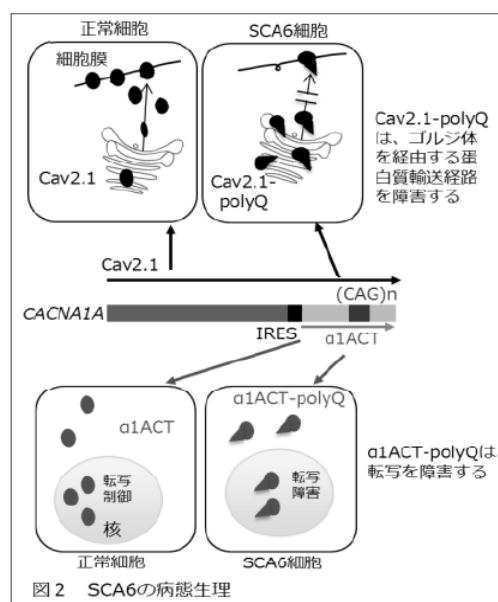
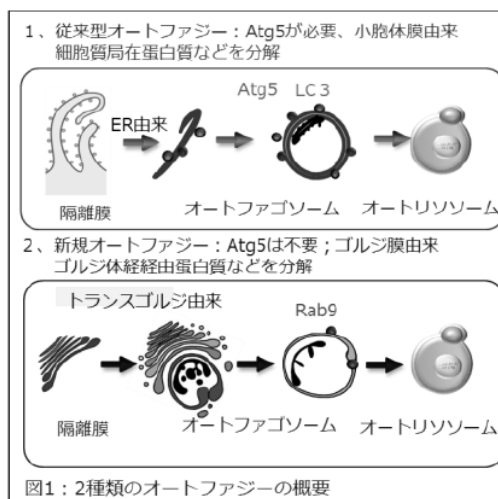
1. 研究開始当初の背景

生体内には少なくとも 2 種類のオートファジー機構が存在する。しかしながらその使い分けやお互いの関連性、および病態との関連については未だ不明な点が多い。我々はこれまでにポリグルタミン病の 1 種、脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) の原因遺伝子産物である Cav2.1-polyQ と α 1ACT-polyQ の発現が、オートファジーを誘導することで減少することを見出している。本研究では、実際にこれらがそれぞれのオートファジーによって分解制御されているのかを、細胞及び個体レベルで解析を行う。さらに、オートファジー誘導化合物を開発し、SCA6 モデルマウスへの添加による病態の改善を解析する。本研究で得られる結果は、SCA6 を含むポリグルタミン病の治療薬開発の礎となるだけでなく、SCA6 の疾患発症メカニズムを明らかにすると考えられる。

2. 研究の目的

オートファジーは自己構成成分をオートファゴソームと呼ばれる膜で包み、リソソームを利用して分解する機構であり、Atg5 を必要とする従来型オートファジーと、我々のグループが発見した Atg5 に依存しない新規オートファジー (nature 2009) の少なくとも 2 種類が存在する (図 1)。これら 2 種類のオートファジー機構は、全ての細胞に存在し、多くの場合、異なる物質を分解している。例えば、従来型オートファジーは、主に細胞質のタンパク質を基質とするのに対し、新規オートファジーは、ゴルジ体に蓄積したタンパク質を主に分解する。また、タンパク質の分解機構として、プロテアソーム系も知られており、プロテアソーム系とオートファジーの関連は広く解析されている。しかしながら 2 種類のオートファジー間での関連に関しては未だ明らかになっていない。一方、プロテアソーム系が単分子の分解を主とするのに対し、オートファジーはタンパク質の複合体やオルガネラを除去できるため、細胞の恒常性維持に寄与するだけでなく、疾患の原因となる異常タンパクの蓄積を除去する際にも有効と考えられる。

脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) は、CACNA1A 遺伝子内の CAG の異常伸長を原因とする単一遺伝子希少疾患である。CACNA1A 遺伝子からは、全長の翻訳による細胞膜カルシウムチャンネル Cav2.1 と、転写因子 α 1ACT が翻訳される。CAG 配列は両タンパク質共通部分に存在するため、疾患発症には両者のポリグルタミン (polyQ) 付加タンパク質の関与が示唆されている。これまでの解析から、Cav2.1-polyQ の発現は、ゴルジ体から細胞膜へのタンパク質輸送系を障害し、 α 1ACT-polyQ の発現は核での転写を障害することで細胞障害を引き起こし、神経細胞の脱落・発症に至ると考えられている (図 2)。



3. 研究の方法

本研究では以下の研究を行った。

(1) SCA6 のモデルマウスにおいて、Cav2.1-polyQ と α 1ACT-polyQ の発現量を比較した。

具体的には、マウスの全脳を摘出し、Lysate にしたのち、polyQ に対する抗体を用いて、Western blotting にて解析を行なった。

(2) ハイスループット・スクリーニングにより同定したオートファジー誘導化合物を用いて、細胞レベルで Cav2.1-polyQ と α 1ACT-polyQ の発現を抑制できるか検討した。

【1】Cav2.1-polyQに関する研究

Cav2.1などの細胞膜タンパク質は、小胞体で合成されてゴルジ体を経由して細胞膜に輸送されるが、異常タンパク質が生じると、この輸送経路が障害されて、ゴルジ体ストレスがかかる。この時、輸送され損なったタンパク質は、オートファジーによって分解され、これによって細胞の健全性が保たれる。

本研究では、オートファジー活性を上下させた時のCav2.1-polyQの発現量をモニターすることにより、当該分子の発現がオートファジーによって調節されることを解析する。具体的には、Cav2.1-polyQを発現したNeuro2a細胞において、オートファジーの活性を変化させ、その影響を観察する。

【2】 α 1ACT-polyQに関する研究

1ACT-polyQは、リボソームで合成され、核に移行する。 α 1ACT-polyQもオートファジーで分解されることが予想される。

本研究では、オートファジー活性を上下させた時の α 1ACT-polyQの発現量をモニターすることにより、当該分子の発現がオートファジーによって調節されることを解析する。具体的には、 α 1ACT-polyQを発現したNeuro2a細胞において、オートファジーの活性を変化させ、その影響を観察する。

(3) SCA6のモデルマウスに対する、オートファジー誘導化合物(TMD-6)の有効性の検証

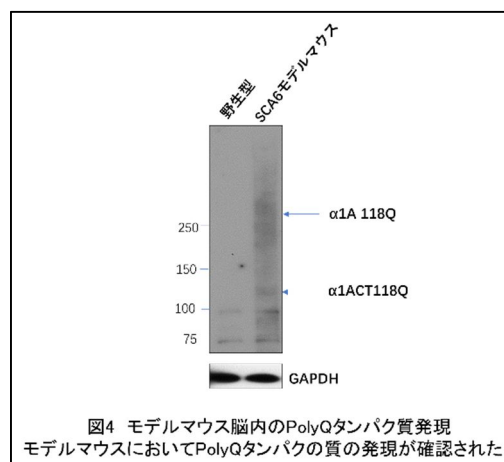
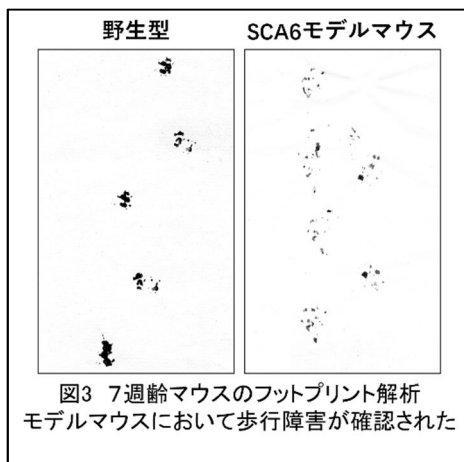
SCA6マウスの脳内に、浸透圧ポンプを用いて、持続的に化合物(TMD-6)を投与(250 μ M/ μ L)し、1ヵ月後に行動解析並びに、神経病理を解析した。

4. 研究成果

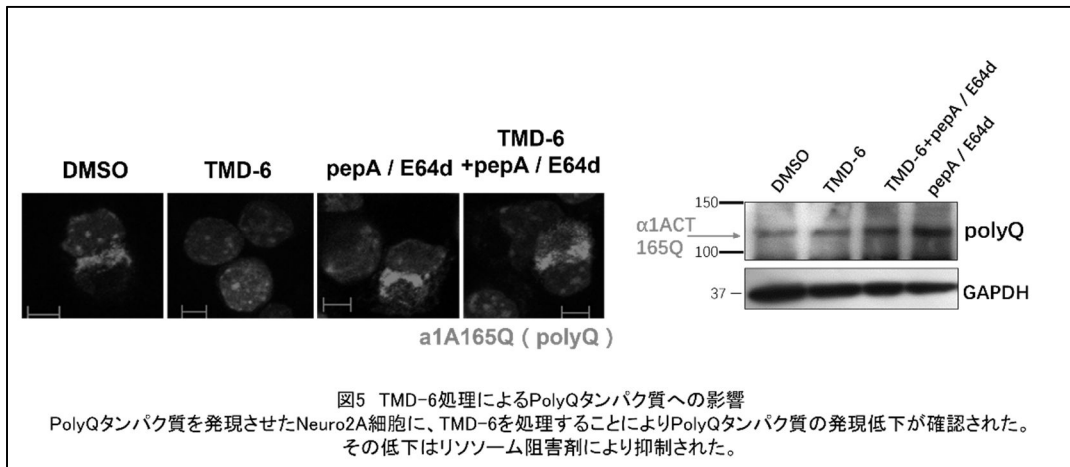
(1) SCA6のモデルマウスにおける、Cav2.1-polyQと α 1ACT-polyQの発現量比較

SCA6のモデルマウスとして、CACNA1A遺伝子内のCAGを118リピートにしたマウスを用いた。このマウスは、小脳のプルキンエ細胞が変性・脱落し、歩行障害などの運動機能の低下を示す(図3)。

このマウスの脳におけるCav2.1-polyQと α 1ACT-polyQの発現量をpolyQに対する抗体を用いてWestern blot法にて解析した。その結果、主たる発現産物はCav2.1-polyQであったが、一部 α 1ACT-polyQの発現も認められた(図4)。



(2) 脊髄小脳失調症6型(SCA6)のポリグルタミンタンパク質の発現制御メカニズムの解明
本研究ではまず、ハイスループットスクリーニングにより、オートファジーを誘導できる化合物、TMD-6を同定した。さらに、この化合物を、SCA6の原因遺伝子産物であるCav2.1-polyQと α 1ACT-polyQをそれぞれ発現させた細胞に添加し、その効果を検討した。Cav2.1-polyQに関しては細胞免疫染色により、 α 1ACT-polyQに関しては、Western blot法にて解析を行った。その結果、TMD-6処理により、Cav2.1-polyQ及び α 1ACT-polyQの両タンパク質の減少が確認された。さらに、この減少は、リソソーム阻害剤pepstatin A/E64dを同時に処理することにより抑制された(図5)。これらのことから、Cav2.1-polyQと α 1ACT-polyQはどちらもオートファジーによって調節されることが明らかになった。

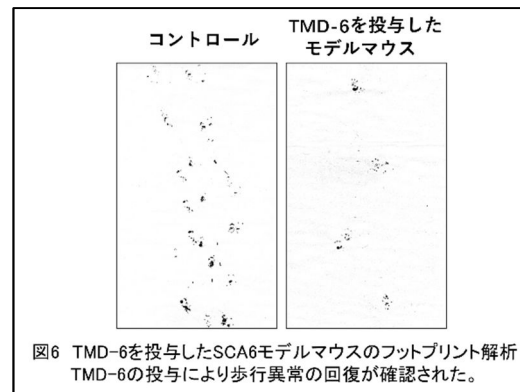


(3) SCA6 モデルマウスに対する、オートファジー誘導化合物 (TMD-6) の有効性の検証

本研究では SCA6 モデルマウスの脳内に、オートファジーを誘導できる低分子化合物 (TMD-6) を注入した。その結果、神経変性症状・神経病理学所見・神経細胞内のポリグルタミン蓄積のいずれの点に関しても、ポリグルタミン病症状が緩和されることを確認した (図 6)。

【まとめ】

本研究では、SCA6 の原因遺伝子産物 Cav2.1-polyQ と α 1ACT-polyQ がオートファジーにより制御されていることを見出した。そして、ポリグルタミン病モデルマウスにおいて、症状改善にも有効な化合物を開発した。今後、本研究で得られた知見を応用した新たな治療薬の開発へと発展が見込まれる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

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