

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21229011

研究課題名(和文) 分子標的を介するポリグルタミン病の根本治療法の開発

研究課題名(英文) Development of Molecular Targeted Disease Modifying Therapy for Polyglutamine Diseases

研究代表者

祖父江 元 (Sobue, Gen)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20148315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 122,100,000円、(間接経費) 36,630,000円

研究成果の概要(和文)：球脊髄性筋萎縮症(SBMA)はアンドロゲン受容体遺伝子におけるCAG繰り返し配列の異常延長を原因とする神経変性疾患であり、変異ARが運動ニューロンの核内に集積して神経変性を惹起することが知られている。本研究により、オートファジーが病態に寄与していること、およびシャペロンとオートファジーを活性化する低分子化合物がSBMAにおける神経変性を抑制することが明らかになった。また、SBMAにおいて発現が亢進しているマイクロRNAを外因性に投与することにより、運動ニューロン変性が抑止されることが示された。

研究成果の概要(英文)：Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) is a motor neuron disease caused by an expansion of CAG trinucleotide expansion within the androgen receptor (AR) gene. Nuclear accumulation of mutant AR triggers the degeneration of motor neurons in SBMA. Our results indicate that autophagy plays a protective role in SBMA, and that a small compound activating both molecular chaperones and autophagy suppresses the motor neuron degeneration in this disease. We also demonstrated that exogenous supplementation of miRNA that is up-regulated in SBMA mice attenuates mutant AR-mediated motor neuron degeneration.

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：ポリグルタミン病 球脊髄性筋萎縮症 神経変性 細胞周期 JNK

## 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は特定の細胞が機能障害および死に至る難病であり、最近の基礎・臨床研究の進歩により、細胞内への異常な蛋白質蓄積が神経細胞の機能障害や細胞死を惹起することが明らかとされてきているが、ほとんどの神経変性疾患では有効な根本治療が見出されず今日に至っている。ポリグルタミン病はハンチントン病 (HD)・球脊髄性筋萎縮症 (SBMA)・脊髄小脳失調症 (SCA) など 9 つの疾患の総称であり、いずれも翻訳領域における CAG 繰り返し塩基配列の異常伸長による単一遺伝子疾患であり、変異蛋白質が神経細胞内に異常凝集し、機能障害・細胞死を招くという病態仮説が確立されており、異常蛋白質の制御が根本治療 (disease-modifying therapy) の鍵を握ると考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究は神経変性疾患の一群であるポリグルタミン病について、病態に根ざした根本的治療法を開発し、臨床応用することにより、本疾患の克服を目指すものである。とくに、ポリグルタミンによる神経変性におけるオートファジーの役割の解明、分子シャペロンやオートファジーを活性化する低分子化合物の探索・同定、新たな病態関連分子の探索・同定とその機能を調節する分子標的治療法の開発を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) SBMA におけるオートファジーの役割

SBMA の細胞モデルに対し、薬剤によるオートファジー阻害およびオートファジー調節因子である p62 のノックダウンを行い、変異 AR の凝集や細胞毒性に与える影響を検討した。また、SBMA マウスモデルにおいて、p62 をノックアウトおよび過剰発現した系を作成し、*in vivo* における効果について表現型・病理所見・生化学的変化を解析した。

### (2) 分子シャペロン・オートファジー活性化治療法の開発

分子シャペロンである Hsp70 を誘導する化合物として知られるペオニ抽出物 Paeoniflorin (PF) を SBMA の細胞モデルに投与し、変異 AR の分解および神経毒性に与える効果について生化学的に解析した。また、SBMA マウスにも同化合物を投与し、その効果について表現型・病理所見・生化学的変化を解析した。

### (3) マイクロ RNA を介した治療法の開発

SBMA および野生型マウス脊髄を用いて miRNA の網羅的発現解析を行い、SBMA において特異的に発現が変化している miRNA を同定した。さらに、この miRNA を SBMA の細胞モデルに導入することにより、変異 AR 蛋白質の代謝に与える影響を解析するとともに、標的となる RNA を同定し、作用機序の解明を行った。さらに、AAV ベクターを用いてこの miRNA を SBMA マウスに投与し、その効果につ

いて表現型・病理所見・生化学的変化を解析した。

### (4) SBMA の iPS 細胞モデルの確立

SBMA 患者から文書による同意を得て皮膚生検を行い、得られた皮膚線維芽細胞を用いて iPS 細胞を作成し、運動ニューロンに分化し、AR 蛋白質の凝集や細胞毒性について解析した。

## 4. 研究成果

### (1) SBMA におけるオートファジーの役割

変異 AR を tet-on で inducible に発現する PC12 細胞にオートファジー阻害剤である bafilomycin A1 を投与したところ、細胞質において変異 AR 蛋白質の凝集が誘導された。この凝集体にはオートファジーマーカーである LC3 や、ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジーを連携する p62 が共存しており、オートファジーの機能障害により変異 AR の凝集が亢進することが示された。

次に SBMA マウスモデルにおいて p62 をノックアウトしたところ、変異 AR の高分子量複合体とモノマーの両方が増加し、マウスの運動機能・生存期間の悪化が認められた (図 1)。

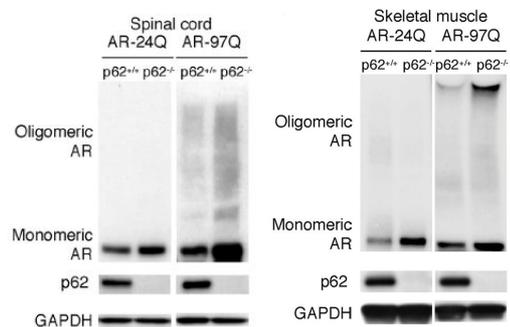


図 1. SBMA マウスにおける p62 ノックアウトの効果

脊髄・骨格筋において p62 の発現抑制により変異 AR の集積亢進が認められた

一方、p62 の過剰発現マウスと SBMA マウスを交配したところ、運動ニューロンや骨格筋における変異 AR のびまん性核内集積が減少し、細胞保護的と考えられる核内封入体の形成が促進され、マウスの運動機能の改善が得られた。以上から、SBMA においてオートファジーは変異 AR の分解を促進し病態を抑制する作用を有していることが明らかとなった (Doi et al., *J Neurosci* 2013)

### (2) 分子シャペロン・オートファジー活性化治療法の開発

正常 AR (AR-24Q) 及び変異 AR (AR-97Q) を含有する AR 安定発現 NSC34 細胞モデルに PF を投与したところ、容量依存的に AR の発現レベルが低下した。分子シャペロンである Hsp70、Hsp40、ユビキチンリガーゼである carboxyl terminus of Hsc70-interacting

protein (CHIP)、転写因子である nuclear factor-YA (NF-YA)、transcription factor EB (TFEB) の発現レベルは PF の濃度依存的に増加した(図2)。また PF による AR の分解はプロテアソーム阻害剤である Lactacystin、オートファジー阻害剤である Bafilomycin A1 により抑制された。さらに、AR-97Q 安定発現 NSC34 細胞で NF-YA や TFEB を強制発現すると変異 AR の発現が減少した。以上から、PF による AR の分解は UPS とオートファジーの双方によるものである事が示唆された。

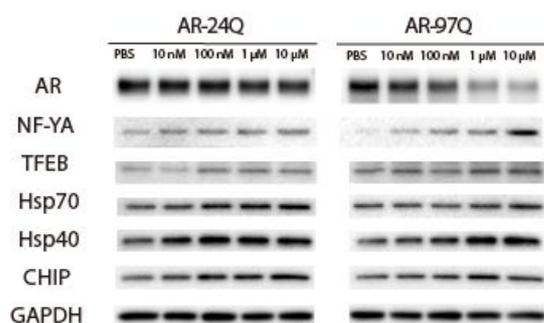


図2. PF による蛋白質分解系の誘導  
PF の投与により NF-YA、TFEB、熱ショック蛋白質が誘導され、変異 AR の分解が促進された。

次に SBMA マウスモデルに PF を投与したところ、体重変化、生存率、Rotarod、Cage activity の4つのパラメーター全てで PF 投与により有意に改善した。また、PF 投与群では脊髄及び骨格筋において NF-YA の mRNA レベルが増加し NF-YA、Hsp70、Hsp40、CHIP、TFEB 各タンパク質の発現レベルも増加し、変異 AR の核内集積が抑制された。これらの結果から PF 投与による分子シャペロン、CHIP と TFEB の増加が分子シャペロン-UPS とオートファジー分解を経て変異 AR の減少を促す事が示唆された(Tohnai et al. *Hum Mol Genet* 2014)。

### (3) マイクロ RNA を介した治療法の開発

AR-97Q マウス脊髄から抽出したマイクロ RNA を用いて網羅的解析を行い、AR-97Q マウスにおいて高発現を認める miR-196a を同定した。miR-196a を培養細胞モデルに過剰発現させると AR の mRNA 及び蛋白質発現量が低下し、そのメカニズムとして、miR-196a が AR の mRNA を安定化させる CUGBP2、Elav-like family member 2 (CELF2) の発現を抑制することで AR の mRNA の分解が促進することが明らかとなった。miR-196a と Green fluorescent protein (GFP) を発現するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV-miR-196a) を作成し、5週齢の SBMA マウス下肢の筋肉に投与したところ、筋注された AAV は血行性に全身へ播種し効率よく中枢神経系に感染し、AAV-miR-196a を投与された SBMA マウスでは運動機能の有意な改善がみられ、病理学的に

も異常 AR の蓄積や神経原性筋萎縮ならびに反応性グリオシスの有意な改善を認めた(図3)。

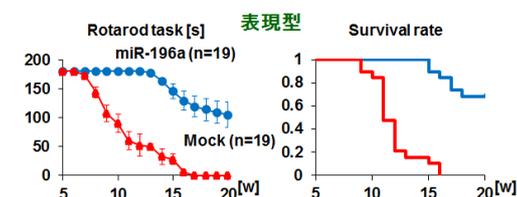


図3. SBMA マウスモデルにおける miR-196a の効果

AAV ベクターによる miR-196a の投与により、SBMA マウスの運動機能(左)および生存期間(右)が改善した。

以上より、miR-196a 投与により SBMA の原因蛋白質の発現を抑制し、神経変性の病態を抑制できるものと考えられた(Miyazaki et al. *Nat Med* 2012)。

### (4) SBMA の iPS 細胞モデルの確立

連携研究機関である慶応大学において4名の SBMA 患者から文書による同意を得て皮膚を採取し、線維芽細胞を得た。この繊維芽細胞に、レトロウイルスにより Sox2、Oct4、Klf4、c-Myc を、またはエピソーマルベクターにより Sox2、Oct4、Klf4、L-Myc、shp53 を導入することにより、SBMA 疾患特異的ヒト iPS 細胞を樹立し、運動ニューロンへの分化誘導系を構築した。SBMA 患者 iPS 由来運動ニューロンではテストステロン依存性の細胞毒性および TGF-シグナル異常が観察され、SBMA の病態を再現するモデルとしての妥当性が確認された。

### 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 18 件)

1. Renier KJ, Troxell-Smith SM, Johansen JA, Katsuno M, Adachi H, Sobue G, Chua JP, Sun Kim H, Lieberman AP, Breedlove SM, Jordan CL. Anti-androgen flutamide protects male mice from androgen-dependent toxicity in three models of spinal bulbar muscular atrophy. *Endocrinology*. 2014 [in press] 査読有
2. Tohnai G, Adachi H, Katsuno M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Nakatsuji H, Qiang Q, Ding Y, Watanabe H, Yamamoto M, Ohtsuka K, Sobue G. Paeoniflorin eliminates a mutant AR via NF-YA-dependent proteolysis in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2014 [in press] 査読有
3. Chua JP, Reddy SL, Merry DE, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Robins DM,

- Lieberman AP. Transcriptional activation of TFEB/ZKSCAN3 target genes underlies enhanced autophagy in spinobulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2014 [Epub ahead of print] doi: 10.1093/hmg/ddt527 査読有
4. Mano T, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Suga N, Hashizume A, Araki A, Watanabe H, Tanaka S, Yamamoto M, Sobue G. Tongue pressure as a novel biomarker of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Neurology* 82: 255-262, 2014. doi: 10.1212/WNL.000000000000041 査読有
  5. Doi H, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Qiang Q, Tanaka F, Yanagawa T, Warabi E, Ishii T, Sobue G. p62/SQSTM1 differentially removes the toxic mutant androgen receptor via autophagy and inclusion formation in a spinal and bulbar muscular atrophy mouse model. *J Neurosci*. 33: 7710-7727, 2013. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3021-12.2013. 査読有
  6. Katsuno M, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G. Translational research on disease-modifying therapies for neurodegenerative diseases. *Neurology and Clinical Neuroscience* 1: 3-10, 2013. doi: 10.1002/ncn3.7 査読有
  7. Qiang Q, Adachi H, Huang Z, Jiang YM, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Sobue G. Genistein, a natural product derived from soybeans, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *J Neurochem*. 126: 122-130, 2013. doi: 10.1111/jnc.12172. 査読有
  8. Kondo N, Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Ishigaki S, Fujioka Y, Watanabe H, Tanaka F, Nakai A, Sobue G. Heat shock factor-1 influences pathological lesion distribution of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Nat Commun*. 4:1405, 2013. doi: 10.1038/ncomms2417 査読有
  9. Rinaldi C, Bott L, Chen K, Harmison G, Katsuno M, Sobue G, Pennuto M, Fischbeck KH. IGF-1 administration ameliorates disease manifestations in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Mol Med*. 18: 1261-1268, 2012. doi: 10.2119/molmed.2012.00271 査読有
  10. Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Jiang YM, Huang Z, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Tanaka F, Muramatsu S, Sobue G. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat Med*. 18: 1136-1141, 2012. doi: 10.1038/nm.2791 査読有
  11. Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Doi H, Kondo N, Iida M, Ishigaki S, Fujioka Y, Matsumoto S, Miyazaki Y, Tanaka F, Kurihara H, Sobue G. Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by expanded polyglutamine. *Nat Med*. 18: 1531-1538, 2012. doi: 10.1038/nm.2932 査読有
  12. Katsuno M, Tanaka F, Adachi H, Banno H, Suzuki K, Watanabe H, Sobue G. Pathogenesis and therapy of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Prog Neurobiol*. 99: 246-256, 2012. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.05.007 査読有
  13. Tanaka F, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Adachi H, Sobue G. Current status of treatment of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neural Plast*. 2012:369284, 2012. doi: 10.1155/2012/369284 査読有
  14. Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Adachi H, Tanaka F, Sobue G. Molecular pathophysiology and disease-modifying therapies for spinal and bulbar muscular atrophy. *Arch Neurol*. 69: 436-440, 2012. doi: 10.1001/archneurol.2011.2308 査読有
  15. Katsuno M, Tanaka F, Sobue G. Perspectives on molecular targeted therapies and clinical trials for neurodegenerative diseases. *J Neuro Neurosurg Psychiatry* 83: 329-335, 2012. doi: 10.1136/jnnp-2011-301307 査読有
  16. Ikenaka K, Katsuno M, Kawai K, Ishigaki S, Tanaka F, Sobue G. Disruption of axonal transport in motor neuron diseases. *Int J Mol Sci*. 13: 1225-1238, 2012. doi: 10.3390/ijms1301122 査読有
  17. Yu Z, Wang AM, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Yue Z, Robins DM, Lieberman AP. Macroautophagy is regulated by the UPR-mediator CHOP and accentuates the phenotype of SBMA mice. *PLoS Genet*. 7: e1002321, 2011. doi: 10.1371/journal.pgen.1002321 査読有
  18. 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 TGF-beta signaling in spinal and bulbar muscular atrophy. *J Neurosci*. 30: 5702-5712, 2010. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0388-10.2010. 査読有
- [学会発表](計 11 件)
1. Adachi H, Qiang Q, Hunag Z, Jinag YM, Katsuno M, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Sobue G.

- Genistein, a natural product derived from soybeans, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *Neuroscience* 2013, San Diego, USA, Nov 9-13, 2013.
2. Sobue G. What can we learn from Kennedy's disease for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. World Congress of Neurology 2013, Vienna, Sep 21-26, 2013.
  3. Sobue G. Molecular targeted therapy for spinal and bulbar muscular atrophy. Gordon Research Conference CAG Triplet Repeat Disorders, Waterville Valley, USA, Jun 23-28, 2013.
  4. Katsuno M, Adachi H, Kondo N, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Miyazaki Y, Iida M, Nakatsuji H, Tanaka F, Sobue G. Cell cycle dysregulation in motor neurons of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). 23rd International Symposium on ALS/MND. Chicago, USA, Dec 5-7, 2012.
  5. Adachi H, Doi H, Katsuno M, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Tohnai G, Iida M, Tanaka F, Sobue G. p62/SQSTM1 removes toxic mutant androgen receptor in spinal bulbar muscular atrophy model mouse. *Neuroscience* 2012, New Orleans, USA, Oct 13-17, 2012.
  6. Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Muramatsu SI, Sobue G. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Neuroscience* 2012, New Orleans, USA, Oct 13-17, 2012.
  7. Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Doi H, Kondo N, Iida M, Ishigaki S, Fujioka Y, Matsumoto S, Miyazaki Y, Tanaka F, Kurihara H, Sobue G. Naratriptan ameliorates SBMA pathology by the repression of CGRP1-activated JNK pathway. *Neuroscience* 2012, New Orleans, USA, Oct 13-17, 2012.
  8. Sobue G. Molecular pathogenesis and translational research in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). 22th International Symposium on ALS/MND, Sydney, Australia, Nov 30-Dec 2, 2011.
  9. 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 enhances protein degradation systems and exerts therapeutic effects in the polyglutamine-mediated motor neuron disease. *Neuroscience* 2011, Washington DC, USA, Nov 11-16, 2011.
  10. Kondo N, Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S-J, Miyazaki Y, Tanaka F, Sobue G. Heat shock factor-1(Hsf-1) influences distribution of pathogenic androgen receptor aggregations in model mouse of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). Gordon conference on CAG triplet repeat disorders, Il Ciocco, Italy, Jun 5-10, 2011.
  11. Katsuno M, Adachi H, Kondo N, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S-J, Miyazaki Y, Tanaka F, Sobue G. Cell cycle dysregulation in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). Gordon conference on CAG triplet repeat disorders, Il Ciocco, Italy, Jun 5-10, 2011.
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
祖父江 元 (Sobue Gen)  
名古屋大学・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)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号：30378012  
(平成 21 年度～平成 24 年度)
- 足立 弘明 (Adachi Hiroaki)  
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座准教授  
研究者番号：40432257
- 勝野 雅央 (Katsuno Masahisa)  
名古屋大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：50402566
- 飯島 正博 (Iijima Masahiro)  
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座講師  
研究者番号：40437041
- 小池 春樹 (Koike Haruki)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師  
研究者番号：80378174
- (3)連携研究者  
岡田 洋平 (Okada Youhei)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：30383714
- 岡野 栄之 (Okano Hideyuki)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：60160694
- 田中 啓二 (Tanaka Keiji)  
東京都医学総合研究所・所長  
研究者番号：10108871