

機関番号：13901

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2010

課題番号：21689024

研究課題名（和文） ポリグルタミン病の細胞内シグナルと病変選択性の機構解明と臨床応用

研究課題名（英文） Elucidation of cellular signaling defect and mechanism of cell-specific degeneration in polyglutamine diseases

研究代表者

勝野 雅央（KATSUNO MASAHISA）

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：50402566

研究成果の概要（和文）：球脊髄性筋萎縮症（SBMA）は成人発症の運動ニューロン疾患であり、アンドロゲン受容体における CAG 繰り返し配列の異常延長を原因とするポリグルタミン病である。一般にポリグルタミン病では変異遺伝子産物である病因蛋白質が神経細胞内に集積し、ヒストンのアセチル化障害を介して転写障害を惹起すると考えられているが、その下流の分子イベントについては不明な点が多い。本研究では、ヒストンアセチル化の影響を受けやすいことが知られている TGF- $\beta$ シグナルについて、SBMA における異常の有無を解析した。その結果、TGF- $\beta$ シグナルにおける最終ステップである Smad2/3 のリン酸化は SBMA モデルマウスや患者の脊髄運動ニューロンにおいて低下していた。変異アンドロゲン受容体（AR）蛋白質は NF- $\kappa$ B や P/CAF（p300/CBP-associated factor）を凝集体に取り込むことによって TGF- $\beta$ 受容体（T $\beta$ RII）の転写を抑制した。一方、T $\beta$ RII の共発現により培養神経系細胞における変異 AR の毒性が軽減された。以上より、TGF- $\beta$ シグナルの障害が SBMA の病態に深く寄与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) is a late-onset lower motor neuron disease caused by the expansion of a trinucleotide CAG repeat in androgen receptor (AR). Although it is commonly held that the pathogenic polyglutamine proteins induce transcriptional dysregulation, the down-stream molecular events have remained elusive. Here we examined whether TGF- $\beta$  signaling is dysregulated in SBMA. Nuclear translocation of phosphorylated Smad2/3 is suppressed in the spinal motor neurons of male transgenic mice carrying the mutant human AR. The pathogenic AR inhibits the transcription of TGF- $\beta$  receptor type II (T $\beta$ RII), via abnormal interactions with NF- $\kappa$ B and p300/CBP-associated factor (P/CAF). Furthermore, overexpression of T $\beta$ RII dampens the cytotoxicity of the pathogenic AR. The present study thus indicates that disruption of TGF- $\beta$  due to the transcriptional dysregulation of T $\beta$ RII is associated with polyglutamine-induced motor neuron damage in SBMA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
2010年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
年度			
年度			
年度			
総計	21,400,000	6,420,000	27,820,000

研究分野：神経内科学・神経科学

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・運動ニューロン・TGF- $\beta$ シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

ポリグルタミン病は遺伝子の翻訳領域における CAG 繰り返し塩基配列の異常延長を原因とする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、脊髄小脳失調症などが含まれる。これらの疾患では異常伸長ポリグルタミン鎖を有する病因蛋白質が神経細胞の核内に蓄積し、転写因子や転写調節因子などの正常蛋白質を巻き込んで凝集することにより、ヒストンのアセチル化を阻害し転写障害を惹起すると考えられている。しかし、転写障害によってどのようにニューロンが機能障害・細胞死に至るのかについては不明な点が多い。一方、これまでにポリグルタミン病における神経細胞機能障害の分子メカニズムとして報告されているものにはミトコンドリア機能不全・軸索輸送障害・シナプス機能障害・蛋白質分解系障害などがあり、その一部は転写障害との関連が示唆されているが、治療法の開発に直結する知見はほとんど得られていない。

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は成人発症の運動ニューロン疾患であり、アンドロゲン受容体 (AR) 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ポリグルタミン病であり、テストステロン濃度依存性に変異 AR 蛋白質が核内集積することが知られている。SBMA の動物モデルとして、CAG リピートが 97 に延長したヒト全長 AR を発現するトランスジェニックマウス (AR-97Q) を作製したところ、本疾患の特徴である症状の性差が再現され、変異 AR 蛋白質のテストステロン依存性核内集積がその分子基盤であることが明らかとなった。雄の SBMA マウスに LHRH アナログであるリュープロレリンを投与したところ、血清テストステロン濃度が低下し、脊髄運動ニューロンの核内に集積する変異 AR の量が著しく減少するとともに、運動障害などの症状も劇的に改善した。この結果を基に SBMA 患者に対しリュープロレリンのプラセボ対照比較試験 (第 II 相試験) を実施したところ、陰嚢皮膚における変異 AR の核内集積が有意に抑制され、血清 CK も有意に減少した。また、リュープロレリン投与を受けた SBMA 患者の剖検標本を検討したところ、橋・頸髄においても変異 AR の核内集積が低下していることが示唆された。さらに検証的臨床試験として 200 例の患者を対象とした多施設共同試験を実施したところ、発症 10 年未満の被験者を対象としたサブグループ解析においてリュープロレリンによる嚙下機能悪化の抑制効果が示唆されたが、被験者全体を対象とした解析では本剤の有効性が統計学的には証明されなかった。このことは、発症からの期間が長い患者においては、変異蛋白質の集積抑制を目的とした治療法だけでは十分な効果が得られない可能性を示唆して

おり、変異蛋白質集積の下流で生じる分子イベントを明らかにし、それに対する治療法も開発していく必要があると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、SBMA において転写障害が運動ニューロンの変性を誘導する際の細胞内シグナルの異常を明らかにし、治療の標的を同定することを目的とした。とくに、ヒストンアセチル化による遺伝子発現の影響を強く受けることが知られている TGF- $\beta$ シグナル分子、サイクリン/サイクリン依存性キナーゼ、TNF  $\alpha$ シグナル分子、カスパーゼシグナル分子のうち、神経細胞の生存や軸索伸長などに寄与していることが知られている TGF- $\beta$ シグナルに着目して研究を行った。

## 3. 研究の方法

SBMA モデルマウス (AR-97Q) および患者剖検組織の免疫組織化学・ウェスタンブロット解析を行った。培養細胞における解析ではヒト neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) を用い、24 もしくは 97CAG を含むヒト AR の N 末断片をプラスミドベクターを用いて一過性強制発現させた。II 型 TGF- $\beta$ 受容体 (T $\beta$ R $\text{II}$ ) プロモーターの下流でルシフェラーゼを発現するベクターを用いたレポーターアッセイを行った。変異 AR と内在性転写因子等との相互作用については免疫細胞化学・フィルタートラップ・免疫沈降法を行った。細胞毒性の解析には propidium iodide 染色を用いた。

## 4. 研究成果

SBMA モデルマウス脊髄の免疫組織化学およびウェスタンブロットを解析したところ、核内へのリン酸化 smad2 の移行は、正常マウスに比べ発症前から有意に低下しており (図 1A-B)、その傾向はとくに変異 AR の核内集積を認める細胞において顕著にみられた。

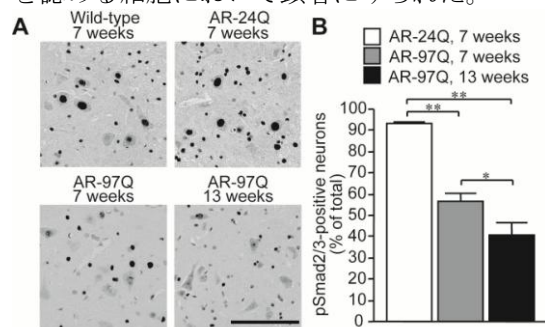


図1. SBMAマウス脊髄におけるpSmad2/3の発現

脊髄内の TGF- $\beta$ 濃度は低下していなかったため、TGF- $\beta$ 受容体の発現を解析したところ、SBMA モデルマウスの脊髄運動ニューロンでは発症前から II 型 TGF- $\beta$ 受容体 (T $\beta$ R $\text{II}$ ) の発現が低下しており、その傾向は変異 AR の核

内集積を認める細胞において顕著にみられた (図 2A)。また、リン酸化 smad2/3 がしている運動ニューロンほどサイズが小さく、機能障害の程度を反映していると考えられた (図 2B)。リン酸化 smad2/3 の核内染色性低下や TβRII の発現低下は患者剖検組織においても脊髄運動ニューロンで認められたが、非病変部である小脳プルキンエ細胞では認められなかった。定量 RT-PCR では SBMA マウスにおける TβRII の mRNA レベルの低下が認められた。

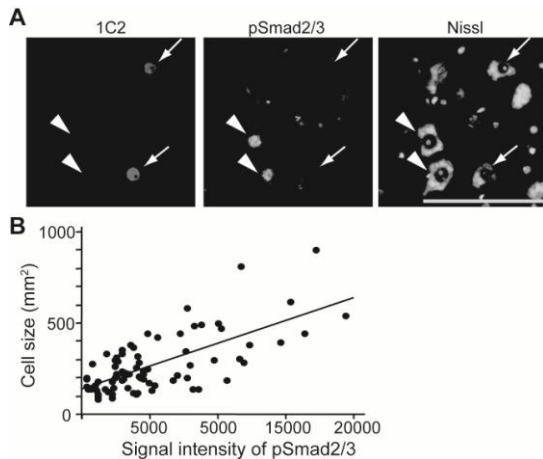


図2. 運動ニューロン障害とpSmad2/3の発現の関係

次に、AR の N 末断片を SH-SY5Y 細胞に強制発現させたところ、ポリグルタミンが延長した AR により TβRII の mRNA レベルが低下し、核内へのリン酸化 smad2 の移行が阻害された (図 3A)。ルシフェラーゼによるレポーターアッセイを行ったところ、変異 AR による TβRII のプロモーター活性の低下が示された (図 3B)。

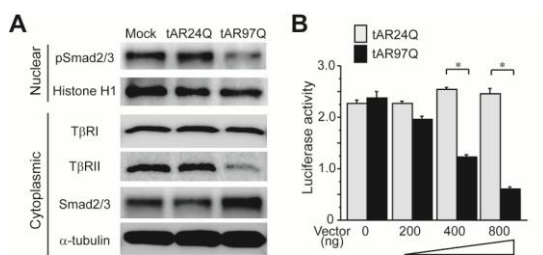


図3. 変異アンドロゲン受容体によるTβRIIの転写障害

このモデルに対し免疫細胞化学を行ったところ、TβRII 遺伝子の転写に必要なとされる転写因子 NY-YA および転写調節因子 P/CAF (p300/CBP-associated factor) が、核内に凝集した変異 AR に取り込まれていることが示された。こうした異常な蛋白質相互作用はフィルタートラップや免疫沈降法においても同様に示された (図 4A-D)。

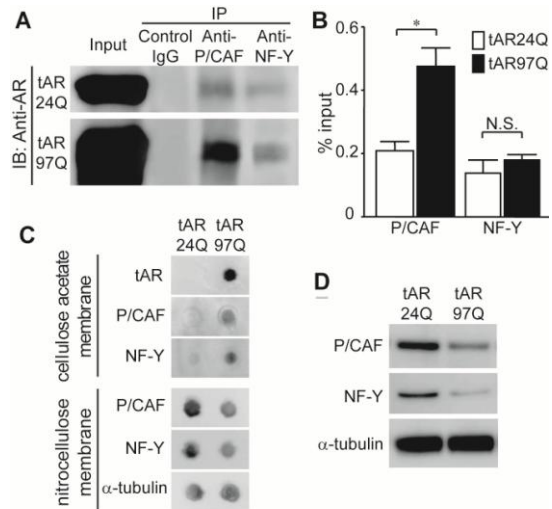


図4. 変異アンドロゲン受容体と転写因子との共存

SH-SY5Y 細胞への変異 AR の強制発現によって誘導される細胞死は、抗 TGF 抗体 (中和抗体) によって増加し、TβRII の強制発現により抑制されたが、変異 AR の凝集は TβRII の影響を受けなかった (図 5A-C)。また、SH-SY5Y 細胞において TβRII の発現を siRNA によりコックダウンすると、細胞死が誘導された。これらの結果は、TβRII の発現低下が細胞障害の原因に寄与していることを示唆していると考えられた。

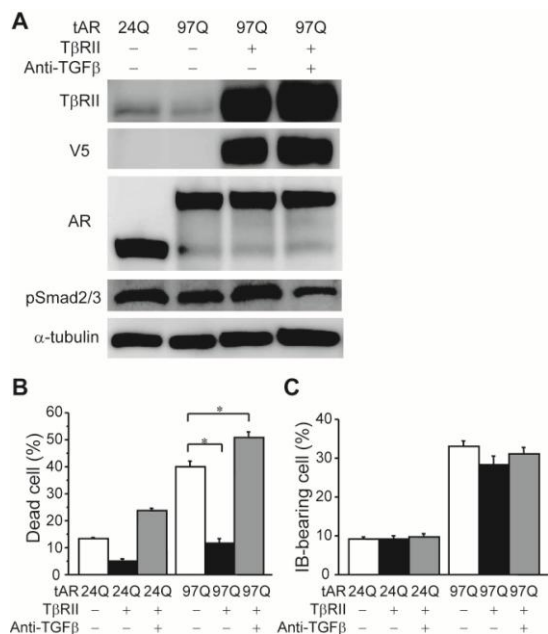


図5. TβRIIによる変異アンドロゲン受容体の毒性軽減

TGF-βシグナル阻害剤である SD-208 を SH-SY5Y に投与すると、変異 AR による細胞死が増強した。浸透圧ポンプを用いて SD-208 を脳室内に持続投与すると、SBMA マウスの神経障害が増強し、寿命が短縮することが示さ

れた。さらに、SBMAと同様にCAG繰り返し配列の異常延長を病因とするほかの疾患（ポリグルタミン病）についても解析を広げたところ、脊髄小脳失調症3型（SCA3）の患者組織においてもリン酸化 smad2 の核内集積およびTβRIIの発現が低下しており、SCA3の培養細胞モデルにおいても同様の現象がみられることが示された。

以上の結果から、TβRIIの転写障害によるTGF-βシグナルの障害がSBMAの病態に深く寄与していると考えられたSBMA。TGF-βシグナルは発がんやアルツハイマー病や家族性京成対麻痺など他の神経変性疾患などの研究においても注目されており、ポリグルタミン病の新規の治療標的となりうると考えられた。

#### 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14件）

1. Banno H, Katsuno M, Suzuki K, Sobue G. Dutasteride for spinal and bulbar muscular atrophy: another advance towards disease-modifying therapy. *Lancet Neurol.* 10: 113-115, 2011.
2. Katsuno M, Adachi H, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G. Transforming growth factor-β signaling in motor neuron diseases. *Current 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. Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Morita M, Nakano I, Kanai K, Ito S, Ishikawa K, Mizusawa H, Yamamoto T, Tsuji S, Hasegawa K, Shimohata T, Nishizawa M, Miyajima H, Kanda F, Watanabe Y, Nakashima K, Tsujino A, Yamashita T, Uchino M, Fujimoto Y, Tanaka F, Sobue G; for the Japan SBMA Interventional Trial for TAP-144-SR (JASMITT) study group. Efficacy and safety of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy (JASMITT study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 9: 875-884, 2010.
5. 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.

6. Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Kawashima M, Suga N, Hashizume A, Hama T, Uchida K, Yamashita F, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G. The profile of motor unit number estimation (MUNE) in spinal and bulbar muscular atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81: 567-571, 2010.

7. 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.

8. 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.

9. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata K, 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.

10. Katsuno M, Adachi H, Sobue G. Getting a handle on Huntington's disease: the case for cholesterol. *Nat Med.* 15: 253-254, 2009.

11. 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.

12. Banno H, Katsuno M, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G. Neuropathology and therapeutic intervention in spinal and bulbar muscular atrophy. *Int J Mol Sci.* 10: 1000-1012, 2009.

13. 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.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Doi H, Kondo N, Matsumoto S, Miyazaki Y, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G. Disrupted TGF- $\beta$  signaling in spinal and bulbar muscular atrophy. 21st International Symposium on ALS/MND. Orlando, USA, Dec 11-13, 2010.
2. Adachi H, Tohnai G, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Tanaka F, Sobue G. A peony extract alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. Neuroscience 2010, San Diego, USA, Nov 13-17, 2010.
3. Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Sobue G. Oxidative stress induces TDP-43 modification, recapitulating its pathological feature. Neuroscience 2010, San Diego, USA, Nov 13-17, 2010.
4. Banno H, Katsuno M, Suzuki K, Tanaka S, Kawashima M, Suga N, Hashizume A, Fujimoto Y, Sobue G. Videofluorography in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). 62nd American Academy of Neurology Annual Meeting, Tronto, Canada, Apr 10-17, 2010.
5. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata K, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, Sobue G. TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases. Neuroscience 2009, Chicago, USA, Oct 17-21, 2009.
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. 61st American Academy of Neurology Annual Meeting, Seattle, USA, Apr25-May2, 2009.
7. 勝野雅央. 球脊髄性筋萎縮症に対する臨床治験の取組. 平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「今後の難病対策に関する研究」シンポジウム, 東京, 2010. 8. 28. [招待講演]
8. 勝野雅央, 足立弘明, 南山 誠, 土井英樹, 近藤直英, 松本慎二郎, 田中章景, 祖父江 元, 運動ニューロン変性における TGF- $\beta$  シグナルの役割. 第 6 回宮崎サイエンスキャンプ. 宮崎, 2010. 2. 26-28. [招待講演]

〔図書〕(計 1 件)

1. Katsuno M\*, Banno H, Suzuki K, Adachi

H, Tanaka F, Sobue G\*. Clinical features and Molecular Mechanisms of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). In Diseases of DNA Repair. Shamim I. Ahmad ed. Landes Bioscience, Austin, USA, pp64-74, 2010.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: 球脊髄性筋萎縮症治療薬  
発明者: 祖父江 元・南山 誠・勝野 雅央  
権利者: 未定  
種類: 特許  
番号: 特願 2009-277101  
出願年月日: 2009 年 12 月 5 日  
国内外の別: 国内

○取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝野 雅央 (KATSUNO MASAHISA)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任准  
教授  
研究者番号: 50402566

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし