

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790837

研究課題名（和文）新技術 SPR&FCS を用いたオリゴマー阻害薬効率的選択によるポリグルタミン病治療

研究課題名（英文）Therapy for the polyglutamine diseases via selection of oligomer inhibitors using new technologies SPR & FCS

研究代表者

ポピエル ヘレナ・明子（Popiel Helena Akiko）

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・科研費研究員

研究者番号：40467593

研究成果の概要（和文）：

ポリグルタミン（PolyQ）病は、原因蛋白質が脳内に蓄積することが原因で発症する神経疾患である。近年 PolyQ 病の原因蛋白質が蓄積する過程でできるオリゴマーという複合体が毒性を発揮する本体であることが明らかとなった。そこで我々は PolyQ 病の治療薬開発を目指し、PolyQ 病の原因蛋白質に特異的に結合しさらにオリゴマー形成を阻害する化合物を、我々が樹立した、新技術 SPR と FCS を用いてスクリーニングした。試験管内、さらに培養細胞で効果を確認した化合物 QSI-1 をまず PolyQ 病モデルショウジョウバエに経口投与し、神経変性および蛋白質の蓄積が抑制されることを示した。さらに QSI-1 を PolyQ 病モデルマウスに投与し、神経症状の抑制を確認した。本研究は PolyQ 病の治療薬開発に向けた大きな進歩である。さらに我々の示した治療薬候補化合物の探索方法は、PolyQ 病のみならず蛋白質のオリゴマー形成を原因とする他の神経変性疾患の治療法開発へ向けた道筋も示している。

研究成果の概要（英文）：

The polyglutamine (polyQ) diseases are neurological diseases caused by the accumulation of proteins in the brain. Recent studies show that protein complexes named oligomers that are formed prior to their accumulation are the toxic species. Towards establishing a therapy against the polyQ diseases, we screened for chemicals that specifically bind to the disease-causing protein of the polyQ diseases and also inhibit oligomer formation, using the new technologies SPR and FCS. We found that QSI-1, which exerted effects *in vitro* and in cell culture also exerted therapeutic effects against the neurological phenotypes and protein accumulation of a polyQ disease fly model. Furthermore, administration of QSI-1 to polyQ disease mouse models resulted in amelioration of the neurological symptoms. Our results demonstrate a great advancement towards establishing a therapy for the polyQ diseases. Furthermore, our strategy of screening for therapeutic candidates can be utilized for other neurological diseases that are caused by oligomer formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：分子生物学 生化学 神経内科学

科研費の分科・細目：神経内科学・神経分子病態学

キーワード：脳神経疾患、蛋白質、薬剤スクリーニング、バイオテクノロジー、オリゴマー

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、原因蛋白質のミスフォールディング (構造異常)・凝集が神経変性を引き起こすと考えられるようになった。PolyQ 病はハンチントン病、種々の脊髄小脳失調症などの9つの遺伝性神経変性疾患の総称で、これらの疾患では変異遺伝子から翻訳される異常伸長 (>40) PolyQ 鎖を持つ変異蛋白質がミスフォールディングを起こし、その結果神経細胞内に難溶性の凝集体を形成し、このような過程を経て最終的に神経変性を引き起こすと考えられている。したがって申請者らは、異常伸長 PolyQ 蛋白質のミスフォールディング・凝集が治療標的として最適であると考えて、PolyQ 凝集阻害活性を持つ低分子化合物のハイスループットスクリーニングを行っている。そしてこれまでに、約 46,000 化合物から約 100 種類の新規 PolyQ 凝集阻害低分子化合物を同定した。しかしながら様々な化合物スクリーニングにおいて、ケミカルアグリゲーターと呼ばれる化合物が標的蛋白質への非特異的な結合により擬陽性となる問題が最近明らかになり (*Nat Chem Biol* 4:197, 2008)、これまでに同定した化合物の中から異常伸長 PolyQ 蛋白質に特異的に結合する凝集阻害化合物を選択する必要性が示された。一方、最近 PolyQ 蛋白質の凝集体はむしろ毒性が低く、微細なオリゴマーが神経毒性を発揮するのではないかと考えられるようになったが、その実態は不明であった。そこで申請者らは詳細な構造解析により、PolyQ 蛋白質は凝集する前の β シート構造へ変移したモノマー・オリゴマーの段階で細胞毒性を獲得することを示し (*Nat Struct Mol Biol*, 2007)、PolyQ 病の治療標的は凝集体形成そのものではなくオリゴマー形成であることを明らかにした。したがって PolyQ 凝集阻害化合物の中から毒性 PolyQ オリゴマーを抑制する化合物を選択する必要性が生じた。

2. 研究の目的

我々がこれまでに同定した PolyQ 凝集阻害化合物について、標的蛋白質への非特異的な結合により擬陽性となるケミカルアグリゲーターを除くため、異常伸長 PolyQ 蛋白質に特異的に結合する化合物を選択する。さらにそれらの中から細胞内の毒性 PolyQ オリゴマーを阻害する化合物を選択し、その中から細胞に対する化合物自身の毒性が低いものを同定する。厳選された化合物については PolyQ 病モデルショウジョウバエやマウスに対する *in vivo* の治療効果を明

らかにし、PolyQ 病の治療薬開発を目指す。

3. 研究の方法

現在までに同定している約 100 種類の PolyQ 凝集阻害化合物について、(1) 我々が樹立した表面プラズモン共鳴法 (SPR; BIAcore システム) を応用したアッセイで異常伸長 PolyQ 蛋白質に特異的に結合する化合物をまず選択した。具体的には、異常伸長 PolyQ 鎖を持つ Thio-Q62、正常鎖長の Thio-Q19、および PolyQ 鎖を持たない Thio-Q0 をそれぞれ固定した SPR センサーチップに化合物を添加し、Thio-PolyQ 蛋白質に対する結合性を解析した。(2) さらにヒット化合物については、我々が樹立した蛍光相関分光法 (FCS) を応用したアッセイにより、細胞内の毒性 PolyQ オリゴマーを阻害する化合物を選択した。具体的には、Q45-GFP を発現させた COS-7 細胞に上記 (1) で選択した化合物を添加し、その後細胞溶解液を FCS で計測することにより細胞内オリゴマーの大きさに対する影響を検討した。選択された化合物については細胞に対する化合物自身の毒性を WST アッセイにより検討し、そして最も PolyQ オリゴマー形成の抑制が強く、なおかつ細胞毒性の少なかった化合物、PolyQ Specific Inhibitor “QSI-1” を厳選した。

さらに QSI-1 については、PolyQ 病モデル動物に対する *in vivo* の効果を検討した。まずは PolyQ 病モデルショウジョウバエに化合物を餌に混ぜることにより経口投与し、神経変性に対する効果を複眼の顕微鏡観察により評価し、封入体形成に対する効果を複眼原基の PolyQ 蛋白質に対する免疫染色により評価した。さらに PolyQ 病モデルマウスに対する効果を検討した。QSI-1 を自由飲水を用いて経口投与し、神経症状に対する効果を、ロータロッド、マウス運動量測定システム、握力測定装置により評価した。さらに経時的な体重減少および寿命短縮に対する効果も評価した。これらの解析を2種類の PolyQ 病モデルマウスに対して行った。

4. 研究成果

まず我々が現在までに同定している約 100 種類の PolyQ 凝集阻害化合物について、SPR を用いて、正常鎖長の Thio-Q19 や PolyQ を持たない Thio-Q0 には結合せず、異常伸長した Thio-Q62 に結合する化合物を選択した。さらにこれらの化合物については、FCS を用いて COS-7 細胞に発現させた Q45-CFP のオリゴマー形成に対する効果を検討し、高効率でオリゴマー形成を阻害する約 10 種類の化合物を選択した。さらにこれらの化合物

については、PolyQ を発現していない COS-7 細胞の培養液に添加し、各化合物自身の毒性を WST アッセイで評価し、毒性が低い約 5 種類の化合物に薬剤候補を絞ることに成功した。

次に上記の厳しいスクリーニングより厳選された化合物の一つ QSI-1 について、*in vivo* での治療効果を検討した。まず PolyQ 病モデルショウジョウバエの餌に QSI-1 を混ぜることにより経口投与した結果、複眼変性が抑制されることを確認した。さらに複眼原基の免疫染色により異常伸長 PolyQ 蛋白質の封入体形成も抑制されることを明らかにした。続けて PolyQ 病モデルマウスに対する効果を検討した。まず QSI-1 を濃度をふってマウスに 1 ヶ月間経口投与し、毒性が出ない最高濃度を確認した。そしてその濃度を用いて PolyQ 病モデルマウスに投与し、運動障害に対する効果を検討した。一種類のモデルマウスに対しては、ロータロッド試験およびバランスビーム試験における障害が QSI-1 により抑制されることを確認した。このマウスの運動量、立ち上がり回数、握力、体重、および寿命は QSI-1 の投与により変わらなかった。さらに別の PolyQ 病モデルマウスにも経口投与したところ、運動量と立ち上がり回数の障害に対する治療効果を確認した。こちらのマウスではロータロッド、握力、体重、寿命に対する効果は確認されなかった。これらの結果から、QSI-1 は PolyQ 病の治療薬候補として有望な化合物であることが示された。本研究は PolyQ 病の治療薬開発に向けた大きな進歩である。さらに我々のとった治療薬候補化合物探索ストラテジーは、PolyQ 病のみならずアルツハイマー病やパーキンソン病など、蛋白質のオリゴマー形成を原因とする他の神経変性疾患の治療法開発へ向けた道筋も示している。

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] (計 2 件)

- 1) Popiel HA, Burke JR, Strittmatter WJ, Oishi S, Fujii N, Takeuchi T, Toda T, Wada K, Nagai Y, The aggregation inhibitor peptide QBP1 as a therapeutic molecule for the polyglutamine neurodegenerative diseases, *J. Amino Acids*, 2011:265084, 2011, 査読有
DOI: 10.4061/2011/265084
- 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, 510-514, 2010, 査読有

<http://www.banglajol.info/index.php/MMJ/article/view/6708>

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 武内敏秀, エクソソームを介した Hsp40 の細胞外分泌, 第 6 回臨床ストレス応答学会大会, 2011.11.4, 名古屋大学医学部, 名古屋
- 2) 武内敏秀, Hsp40 は新規の細胞外分泌機序によりポリグルタミン病モデルに対して細胞非自律的な治療効果を発揮する, 第 34 回日本神経科学大会, 2011.9.15, パシフィコ横浜, 横浜
- 3) Nagai Y, Molecular mechanism of novel unconventional secretion of Hsp40 to function extracellularly, 6th Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders, 2011.6.8, Il Ciocco Tuscany Resort, Italy
- 4) Popiel HA, Hsp40 exerts non-cell autonomous therapeutic effects on polyglutamine disease mice via its unconventional secretion, 6th Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders, 2011.6.8, Il Ciocco Tuscany Resort, Italy
- 5) ポピエル ヘレナ 明子, 凝集阻害分子の遺伝子治療によるポリグルタミン病モデルマウスに対する治療効果, 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011.5.19, 名古屋国際会議場, 名古屋
- 6) 永井義隆, 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, 2010.11.19, 徳島大学, 徳島
- 7) Popiel HA, Molecular chaperone gene therapy ameliorates neurological phenotypes and protein aggregation in polyglutamine neurodegenerative disease mice, 3rd International Symposium on Protein Community, 2010.9.15, ホテル日航奈良, 奈良
- 8) ポピエル明子, 凝集阻害分子を用いた遺伝子治療によるポリグルタミン病も出るマウスの神経症状と封入体形成の抑制, 第 33 回日本神経科学会・第 53 回日本神経化学会合同大会, 2010.9.3, 神戸コンベンションセンター, 兵庫

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔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

ポピエル ヘレナ・明子 (Popiel Helena Akiko)

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・科研費研究員

研究者番号：40467593

(2)研究分担者

(0)

(3)連携研究者

(0)