

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号:13101

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2011~2012

課題番号:23790982

研究課題名(和文)オリゴマー形成阻害を標的としたポリグルタミン病の新規治療薬の開発

研究課題名(英文)Toward developing novel therapeutic drugs that suppress oligomerization of disease-causing proteins in polyglutamine diseases

研究代表者

他田 正義(TADA MASAYOSHI)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号:10467079

研究成果の概要(和文): ポリグルタミン病変異蛋白の重合体形成を阻害する新規薬剤の開発を目的として,既に実施した大規模化合物スクリーニングにおいて 50%以上の重合体形成阻害効果を示した化合物について,以下の方法でその有効性を検証し,複数(~15)の有望な薬剤を明らかにした. [1] Protein fragment complementation assay (PCA) 法を応用した細胞系を用いた薬剤スクリーニング:蛍光蛋白-PCA 細胞系の確立と有用性の検討,薬剤の有効性の検討,[2] ポリグルタミン病モデル線虫を用いた薬剤スクリーニング:野生型と比較したモデル線虫の特性解析,薬剤の治療効果の検討,[3] 病態研究・創薬研究のための MJD 患者由来 iPS 細胞の樹立. 今後,モデル動物や iPS 細胞を用いて薬剤の治療効果の検討を進める.

研究成果の概要(英文): Oligomerization of misfolded disease proteins plays a critical role in the pathogenesis of polyglutamine diseases. Increasing evidence suggests that soluble, nonfibrillar oligomers formed early in the pathogenic cascade are more toxic species than insoluble, mature amyloid fibrils or inclusions. To seek novel therapeutic drugs for polyglutamine diseases, we have already done a primary, high-throughput screen using a luciferase-based protein-fragment complementation analysis (PCA) that can detect polyglutamine protein oligomers in living cells. In this study, we evaluated efficacies of compounds that showed more than 50% suppression of oligomerization in the primary screen, using the following methods: [1] a fluorescence-based PCA system to directly visualize polyglutamine protein oligomerization in living cells, and [2] a *Caenorhabditis elegans* model of polyglutamine disease. We found several promising compounds that suppress oligomer formation of polyglutamine proteins. We also tried to establish iPS cell lines from skin fibroblasts of patients with Machado-Joseph disease [3].

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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:脊髄小脳変性症,ポリグルタミン病,重合体,治療

1. 研究開始当初の背景

ポリグルタミン病は,原因遺伝子内のグルタミン鎖をコードする CAG リピートの異常伸長により生じる遺伝性神経変性疾患である. 中年以降に発症して緩徐進行性の経過をとるが,有効な病態抑止療法は未だない.

ポリグルタミン病では,異常伸長したポリグルタミン鎖を持つ変異蛋白が自己重合する特性を有し,難容性のアミロイド様凝集体を形成して神経細胞内に蓄積する. この細胞内凝集体はポリグルタミン病に共通する特徴的な病理所見の一つである. これまで,不溶性の封入体形成は細胞

の防御的反応の結果であり、凝集体形成過程の初期に生じる可溶性の重合体に強い細胞障害性がある(「重合体毒性仮説」と報告され、研究代表者の研究班でもそれを明らかにしてきた(Takahashi *et al. Hum Mol Genet* 2008;17:345-356)。この重合体形成を抑制することは、ポリグルタミン病の有効な治療となりうるのみならず、原因蛋白の凝集体形成が疾患病態に深く関わっているとされるアルツハイマー病やパーキンソン病、プリオン病などの他の神経変性疾患においても有望な分子標的治療となる可能性を秘めている。

研究代表者は、変異ポリグルタミン蛋白の重合体形成を阻害する薬剤の開発を目的として、Protein fragment complementation assay (PCA) 法を応用し、本邦で最も頻度の高いポリグルタミン病である Machado-Joseph 病 (MJD) の原因蛋白 ataxin-3 (AT3) の重合体形成を細胞内で監視できる細胞系を確立した。PCA 法は生きた細胞内で蛋白質間結合を鋭敏な感度で監視できる優れた手法で、近年様々な分野で研究応用されている。二つに断片化された N 末側と C 末側のリポーター蛋白を各々融合した AT3 蛋白を一つの細胞内で共発現させ、AT3 が重合すると不活性な断片型リポーター蛋白が近接・会合して活性型となり、AT3 の二量体形成・重合体形成を検出できるという原理に基づいている。理論上は AT3 の二量体形成を検出するため、MJD の極めて初期の分子病態イベントを生細胞内で解析することが可能である点で価値が高い。

研究代表者は、リポーターとしてルシフェラーゼ断片を用いた PCA 解析系 (ルシフェラーゼ-PCA 系) を確立し、この細胞解析系を用いて MS2,000 spectrum (FDA 承認済みの化合物ライブラリー) および NCC450 (NIH collection, 既にヒトで臨床使用されている化合物ライブラリー) の大規模化合物スクリーニングを行った。その結果、50%以上の重合体形成阻害効果を示す化合物を約 300、80%以上の阻害効果を示す化合物を約 50 選別した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「重合体毒性仮説」に基づき、ポリグルタミン病変異蛋白の重合体形成を阻害する新規薬剤を開発することである。そこで本研究では、大規模薬剤スクリーニング (一次スクリーニング) から選別された化合物の重合体形成阻害効果を検証するために、以下の研究を実施する。

[1] リポーター蛋白として蛍光蛋白 (yellow fluorescence protein) を用いた PCA 細胞系 (蛍光蛋白-PCA 系) を確立する。ルシフェラーゼ-PCA 系とは異なる蛍光蛋白-PCA 系を用いた細胞解析系により、一次スクリーニングで選別された化合物の絞り込みを図る。ただし、線虫やモデル動物でのスクリーニングも控えていることから、この過程は必須ではない。

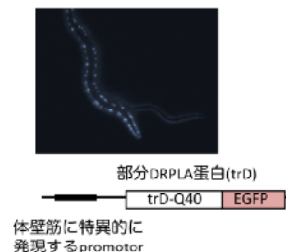
[2] ポリグルタミン病変異蛋白を発現するモデル線虫を用いて、化合物の有効性を明らかにする。

[3] MJD 患者および健常者由来の線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、病態研究と創薬研究に使用する準備を行う。

3. 研究の方法

[1] 培養細胞系を用いた薬剤スクリーニング: 一次スクリーニングにより選別された数百の薬剤について、独自の蛍光蛋白-PCA 系を用いてさらに絞り込みを図る。この細胞解析系は、ポリグルタミン鎖変異蛋白が重合体を形成すると蛍光を発する安定発現細胞株を用いたもので、フローサイトメーターを用いて生きた細胞内で重合体形成を定量化できる。培養液中に薬剤を投与し、濃度・時間依存的な重合体形成阻害効果および細胞毒性を解析する。

[2] モデル線虫を用いた薬剤スクリーニング: 熊本大学発生医学研究所との共同研究により作製したポリグルタミン病モデル線虫を用いて、候補薬剤の効果判定を行う。この線虫は、蛍光蛋白を融合した異常伸長ポリグルタミン鎖を恒常的に発現する変異体 (Q40 線虫) で、蛍光顕微鏡下で虫体の体壁筋に封入体を可視できる。同調培養し、餌に薬剤を混ぜて経口投与し、運動能、封入体数、生存率を解析する。さらに、虫体から蛋白を抽出し、弱変性条件下アガロースゲル電気泳動およびウエスタンブロットにより生化学的に変異蛋白の重合体量を解析する。



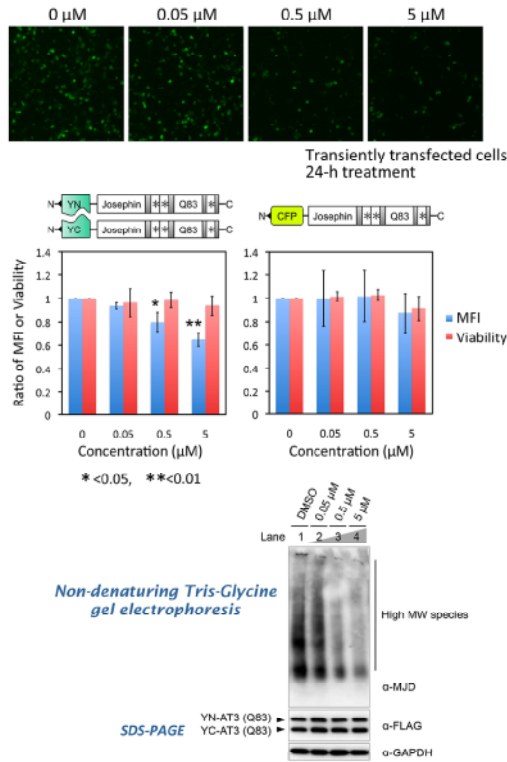
[3] SCA3 患者由来線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立: SCA3 患者および家族から同意を得た上で、患者皮膚を採取し、線維芽細胞を分離培養する。共同研究機関である熊本大学発生医学研究所 (江良研究室) の協力を得て iPS 細胞を樹立する。

4. 研究成果

[1] 培養細胞系を用いた薬剤スクリーニング: 異常伸長したポリグルタミン鎖 (Q83) を有する変異 AT3 蛋白を発現する蛍光蛋白-PCA 系を確立した。安定発現細胞では十分な蛍光値を発する細胞株を樹立することができず、一過性発現細胞系での実験になるが、本解析系を用いて薬剤 A を含む複数の薬剤の重合体形成阻害効果を検討することが可能となった (図 1)。この薬

剤 A では, AT3 の総蛋白量に影響を与えることなく, 重合体量を減少させることを細胞の蛍光値および生化学的解析により確認した.

[図 1]. 蛍光蛋白-PCA 系を用いた重合体形成阻害効果の検討



[2] モデル線虫を用いた薬剤スクリーニング:

まず, 非治療下でのモデル線虫 (Q40 線虫) の自然歴の特性を解析した. その結果, 野生型に比べ, Q40 線虫では成虫以降, 加齢とともに運動能が低下し, 封入体数は日齢 6~8 で最大数約 100 でプラトーとなり, 寿命が短縮することを明らかにした (図 2). 次に, 一次スクリーニングにおいて 50%以上の重合体形成阻害効果を示した化合物の中から既に臨床使用されている薬剤を約 40 抽出し, Q40 線虫において治療効果を検討した. 現時点で約 30 の化合物の解析が終了したが, ~15 の化合物において封入体形成阻害効果, あるいは寿命延長効果を認め

[図 2] Q40 線虫の特性: 野生型との比較

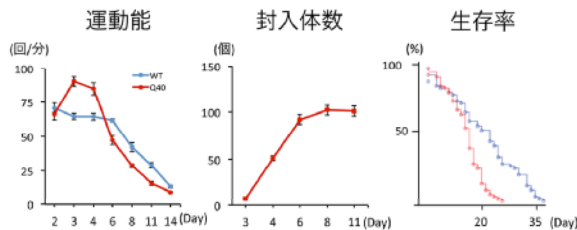
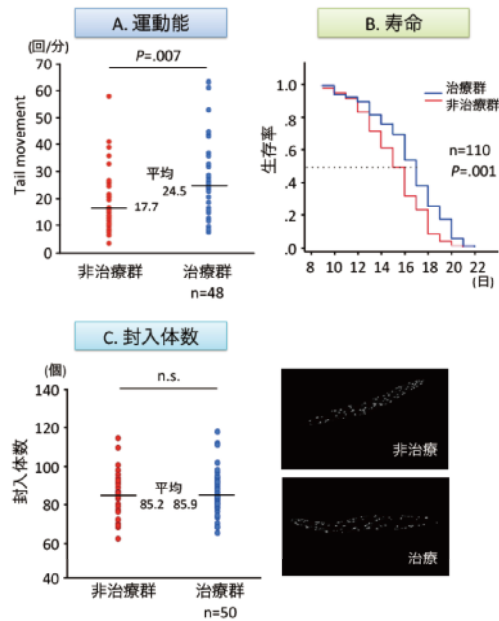
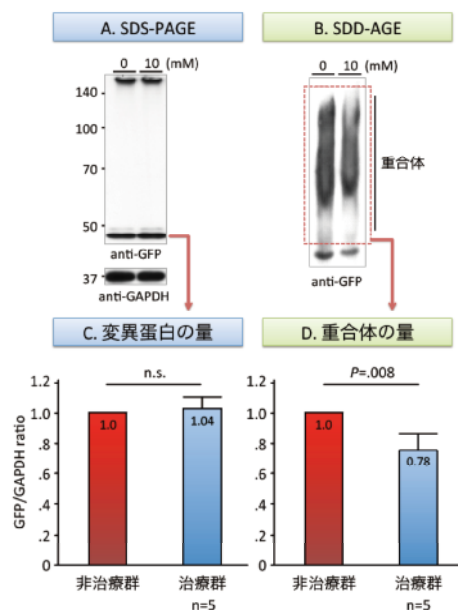


図 3 および図 4 に Q40 線虫における薬剤 B の治療効果を示した. 非治療群に比べ治療群において運動能の改善, 生存率の改善を認めた. ただし, 日齢 7 日目の封入体数に有意差は認めなかった. また, 弱変性条件下のアガロースゲル電気泳動およびウエスタンブロットによって生化学的に検出される変異蛋白の重合体量の有意な減少を認め, 本薬剤の Q40 線虫における有効性が確認された. 現在, 残りの化合物についても有効性の検討を行っている.

[図 3] Q40 線虫における薬剤 B の治療効果: 表現型解析



[図 4] Q40 線虫における薬剤 B の治療効果: 生化学的解析



[3] SCA3 患者由来線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立: 本学の遺伝子倫理委員会の承認を受け(承認番号 474), 2 名の MJD 患者から皮膚を採取し, 熊本大学発生医学研究所(江良研究室)の協力を得て現在 iPS 細胞を樹立中である。今後, さらに 2 名(計 4 名)からの樹立を行う予定である。

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)

Tada M, Coon EA, Osmand AP, Kirby PA, Martin W, Wieler M, Shiga A, Shirasaki H, Tada M, Makifuchi T, Yamada M, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H, Paulson HL. Coexistence of Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis: a clinicopathologic study. Acta Neuropathol. 2012;124:749-760.

Yokoseki A, Ishihara T, Koyama A, Shiga A, Yamada M, Suzuki C, Sekijima Y, Maruta K, Tsuchiya M, Date H, Sato T, Tada M, Ikeuchi T, Tsuji S, Nishizawa M, Onodera O. Genotype-phenotype correlations in early onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminaemia. Brain 2011;134:1387-1399.

(学会発表) (計 4 件)

他田正義, 徳永純, Maksimova N, Varlamova M, 堅田慎一, 高橋俊昭, Nikolaeva I, Sukhomyasova A, 土屋美由紀, 池内健, 小野寺理, 西澤正豊. ロシア・ヤクート人との比較による SCA1 発症に関わる環境・遺伝学的要因の検討. 日本神経学会学術大会 2012 年 5 月

徳永純, 他田正義, 高橋俊昭, 高橋有香, 鹿野智美, 小山哲秀, 堅田慎一, 山中邦俊, 小野寺理, 西澤正豊. ポリグルタミン重合体形成阻害剤のスクリーニングを目的としたモデル線虫の構築. 日本神経学会学術大会 2012 年 5 月

高橋俊昭, 石平悠, 堅田慎一, 他田正義, 他田真理, 佐藤俊哉, 柿田明美, 高橋均, 小野寺理, 西澤正豊. ヒト疾患脳におけるポリグルタミン病重合体の検出. 日本神経学会学術大会 2011 年 5 月

他田正義, 高橋俊昭, 小野寺理, 西澤正豊, Paulson Henry L. 重合体形成阻害を標的としたポリグルタミン病の新規治療法開発. 日本神経学会学術大会 2011 年 5 月

(図書) (計 2 件)

Tada M, Nishizawa M, and Onodera M. IP3 Receptors in Neurodegenerative Disorders: Spinocerebellar Ataxias and Huntington's and Alzheimer's Diseases. In Pathologies of Calcium Channels. Springer (in press)

他田正義, 小野寺理. 劣性遺伝性小脳失調症. 小脳と運動失調: 小脳はなにをしているのか. 中山書店 2013 年 p.200-214.

(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.bri.niigata-u.ac.jp/neuroweb/laboratory/research_001.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

他田 正義 (Tada Masayoshi)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号:10467079

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし