

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461272

研究課題名(和文) 重合体毒性仮説に基づくポリグルタミン病の病態解明と新規治療薬開発

研究課題名(英文) Developing new therapeutic drugs that inhibit oligomer formation of polyglutamine disease proteins based on the hypothesis of oligomer toxicity 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ポリグルタミン病において原因タンパクの重合体形成が強い細胞障害性を有し神経変性を惹起するという「重合体毒性仮説」に基づき、重合体形成阻害を分子標的とした新規治療薬の開発を行った。培養細胞システムを用いた大規模薬剤スクリーニングとモデル線虫を用いた二次スクリーニングにより、ポリグルタミン病変異蛋白の重合体形成を阻害し、神経変性を抑制する可能性のある薬剤を見出した。また、臨床試験を成功させるために、iPadを用いた上肢運動機能評価システムを開発し、小脳性運動失調の評価における有用性を明らかにした。さらに、脊髄小脳変性症に対するvareniclineの安全性と有効性を検討する臨床試験を開始した。

研究成果の概要(英文)：We developed new therapeutic drugs that inhibit oligomer formation of polyglutamine disease proteins based on the hypothesis of oligomer toxicity in polyglutamine diseases. Using a disease nematode model, we found a small compound that inhibit oligomer formation of disease proteins and ameliorate motor function of the nematode model. We also developed a novel system using iPad for the quantitative assessment of cerebellar ataxia. In addition, we started a clinical trial to investigate the safety and efficiency of varenicline (Champix), a prescription medication used to treat nicotine addiction, in the treatment of spinocerebellar degenerations.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脊髄小脳変性症 ポリグルタミン病 治療 重合体

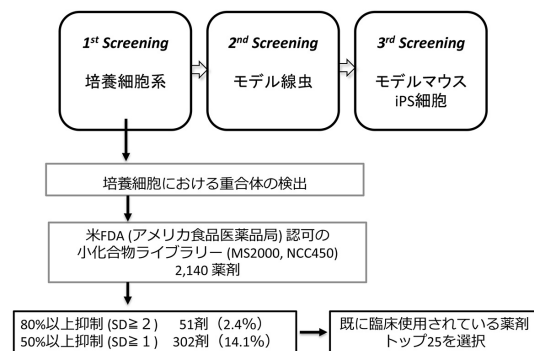
### 1. 研究開始当初の背景

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、難溶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。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とされる「重合体毒性仮説」が、これまで多くの研究により支持されてきた (Takahashi *et al. Hum Mol Genet* 2008;17:345- 356)。変異蛋白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、ポリグルタミン病の原因蛋白の重合体形成を細胞内で監視できる培養細胞システムを確立した。この培養細胞システムを用いて米国食品医薬品局 (FDA) 承認済み化合物ライブラリーの大規模スクリーニングを行い、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 見出した (図 1)。

図1. 研究デザイン



一方、脊髄小脳変性症 (SCD) の基礎研究領域において、これまで様々な治療候補薬が報告されているにもかかわらず、臨床試験で有効性を示したものは少ない。臨床研究が成功しない大きな原因の一つは評価法にあるとされ、新規治療薬の臨床試験を成功させるためには鋭敏で信頼性の高い小脳性運動失調の定量評価法の開発が欠かせない。研究代表者は、「いつでもどこでも・誰でも簡単に」実施可能な小脳性運動失調の定量評価法の確立を目的として、iPad 端末で作動する検査プログラム (iPatax: iPad Application for Evaluating Ataxia) を独自に開発してきた (図 2)。

図2. iPatax 検査の概要



さらに、米国の研究グループの報告によると、マチャド・ジョセフ病 (MJD/SCA3) 患者 13 例を対象とした二重盲検無作為比較試験において、バレニクリン酒石酸塩 (varenicline) が 8 週間の短期間で歩行・立位などの体幹失調を改善した。MJD/SCA3 以外の病型の脊髄小脳変性症 (SCD) においても小脳性運動失調に対する同薬剤の治療効果が示されており、varenicline は脊髄小脳変性症全般に効果を示す可能性があり、治療薬として期待される。

### 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。

[1] 薬剤スクリーニング: 培養細胞システムを用いた大規模スクリーニング (一次スクリーニング) から抽出した小化合物の重合体形成阻害効果を検証するために、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。

[2] 小脳性運動失調の定量評価法の開発: 鋭敏で安定性の高い定量評価法を開発するために、iPatax 検査システムの小脳性運動失調評価における有用性を検証する。

[3] 脊髄小脳変性症に対する varenicline (Champix) の安全性と有効性の検討: MJD/SCA3 以外の病型を含む SCD 日本人患者を対象として、varenicline の有効性および安全性を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) モデル線虫を用いた薬剤スクリーニング: 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。

(2) 小脳性運動失調の定量評価法の開発: iPatax の視標追跡法による等速直線反復運動試験では、直線上 (15 cm 長) を等速 (15 cm/2~

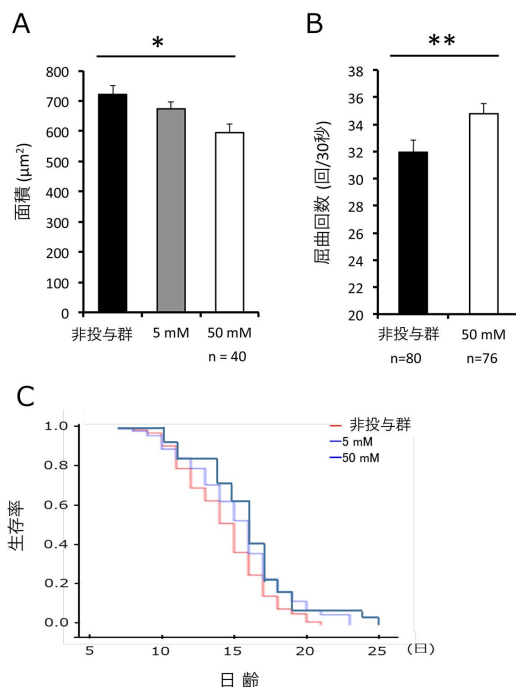
3 秒)で反復移動する視標を利き手示指で1分間追跡し、視標と指の距離(空間的ずれ)、速度、加速度を測定し、変動係数(CV=母集団の標準偏差/平均値)を算出した。また、視標追跡法による等速曲線反復運動試験(絵は、直径10cmの円周上等速(1周/3~6秒)で反復または周回移動する視標を利き手第1指で1分間追跡し、視標と指の距離、速度、加速度を測定した。対象は、健常者36例、SCD患者51例を対象に、臨床項目(発症年齢、罹病期間、ポリグルタミン病原因遺伝子のCAGリピート数)、SARA、iPatax検査項目の測定値を解析した。

(3) 脊髄小脳変性症に対する varenicline (Champix)の安全性と有効性の検討: 試験デザインは、低用量と高用量のクロスオーバー試験で、評価者盲検法により行った。対象は脊髄小脳変性症(SCA3, SCA6, SCA1, SCA2, 皮質小脳萎縮症)の成人患者で、試験薬を低用量0.5mgまたは高用量2mg/日を経口投与した。10週間の投与期間の後、2週間のwashout期間を経て、低用量と高用量をクロスオーバーした。主要評価項目はSARA合計とSARA各項目で、副次評価項目としてiPatax、重心動揺検査、TUGTなどが含まれた。本院の試験審査委員会IRBの承認を得て、書面で患者の同意を取得して行った。平成28年3月31日時点で29例が登録され、開始された。

#### 4. 研究成果

(1) モデル線虫を用いた薬剤スクリーニング: 培養細胞システムを用いた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トップ25を抽出し(図1)、Q40線虫において治療効果を検討した。25剤を対象とした封入体解析において、6つの薬剤がQ40線虫の封入体面積(および総数)を有意に減少させた。こ

図3. QAI-39095の治療効果



の6候補薬の中で PolyQ Aggregation Inhibitor 39095 (QAI-39095) に着目し、解析を進めた。QAI-39095は高血圧治療薬として既に広く臨床使用されている薬剤であり、長期内服が可能で副作用が少ないという利点がある。QAI-39095は、Q40線虫の封入体数・面積の減少(図3A)、運動能の改善(図3B)、寿命の延長(図3C)、重合体量の減少をもたらすことが示された。また、この効果発現にHSPの発現誘導が関係していた。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。

(2) 小脳性運動失調の定量評価法の開発: 臨床重症度SARAと視標追跡課題における速度の変動係数が高い正の相関を示すことを明らかにした(図4)。運動課題条件の検討から、非連続な、ゆっくりとした視標追跡課題が小脳性運動失調の検出に適していることを示した。さらに、速度の変動係数は課題遂行の後半に低下し、運動学習の効果を反映している可能性が示唆された。学習効率は健常群に比してSCD疾患群で低値であった(図5)。iPataxは小脳性運動失調の定量評価法として有用であることに加え、小脳機能として重要な運動学習を評価できる可能性が示唆された。今後、治療研究での実用化に向けて、日内変動・日差変動、同一例での経時的変化等のデータを蓄積すること、時間測定異常や運動学習の障害といった小脳機能をより直接的に検出する解析法を検討することが必要である。

図4. 等速直線反復運動課題における速度の変動係数とSARAとの相関

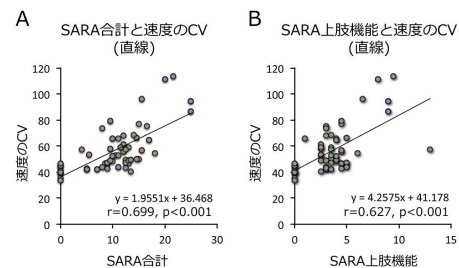
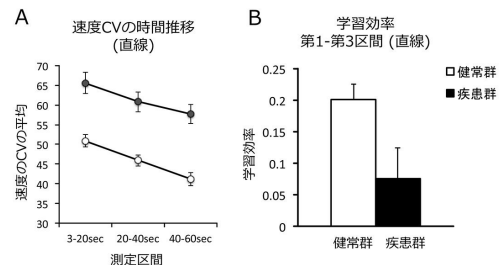


図5. 運動学習(速度CVの時間推移)



(3) 脊髄小脳変性症に対する varenicline (Champix)の安全性と有効性の検討: 29例が登録され、試験が開始された。このうち5例は開始後2~8週までに強い嘔気のために試験を中止した。これまでのところ、重篤な有害事象は認めなかった。試験終了後に解析を進める。

## 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 16 件)

1. 他田正義, 西澤正豊, 小野寺理. 小脳症状をどう捉えるか: 小脳機能に基づく小脳症状の再構築. MDSJ Letters. 2016;9(1):4-5. (査読なし)
2. 高橋茉那, 他田正義, 下畑享良, 西澤正豊. 高齢者における小脳失調症に対する診断アプローチ. Geriatr Med. 2016;54:217-223. (査読なし)
3. Tada M, Nishizawa M, Onodera O. Roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in spinocerebellar ataxias. Neurochem Int. 2016;94:1-8. (査読有り)
4. Tada M, Nishizawa M, Onodera O. Redefining cerebellar ataxia in degenerative ataxias: lessons from recent research on cerebellar systems. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2015;86(8):922-928. (査読有り)
5. 他田正義, 小野寺理. 【小脳の最新知見-基礎研究と臨床の最前線】小脳の病態小脳疾患の診療の最前線 劣性遺伝性脊髄小脳変性症(解説/特集). 医学のあゆみ. 2015;255(10):1040-1046. (査読なし)
6. 山田舞乃, 他田正義, 西澤正豊, 小野寺理. 【神経変性疾患への新しい視点 プリオン仮説】ポリグルタミン病: ポリグルタミン病とは. Clinical Neuroscience 2015;33(3):327-331. (査読なし)
7. Tamiya G, Makino S, Hayashi M, Abe A, Numakura C, Ueki M, Tanaka A, Ito C, Toshimori K, Ogawa N, Terashima T, Maegawa H, Yanagisawa D, Tooyama I, Tada M, Onodera O, Hayasaka K. A mutation of COX6A1 causes a recessive axonal or mixed form of Charcot-Marie-Tooth disease. Am J Hum Genet 2014;95(3):294-300. (査読有り)
8. Konno T, Tada M, Tada M, Nishizawa M, Ikeuchi T. [Hereditary Diffuse Leukoencephalopathy with Spheroids (HDLS): A Review of the Literature on its Clinical Characteristics and Mutations in the Colony-Stimulating Factor-1 Receptor Gene]. Brain Nerve 2014;66:581-590. (査読有り)
9. 今野卓哉, 他田正義, 他田真理, 西澤正豊, 池内健. 軸索スフェロイド形成を伴う遺伝性びまん性白質脳症(HDLS)と CSF-1R 遺伝子変異. BRAIN and NERVE:神経研究の進歩 2014;66(5):581-590. (査読なし)
10. 他田正義, 池内健. 【医学・医療のいまがわかるキーワード 2014】神経内科 HDLS. 医学のあゆみ 2014;249:435. (査読なし)
11. 柳村文寛, 下畑享良, 他田正義, 野崎洋明, 西澤正豊. クロイツフェルト・ヤコブ病における病名告知, 治療の検討. 臨床神経学 2014;54:298-302. (査読有り)

12. 他田正義, 西澤正豊. 【神経症候群(第 2 版)-その他の神経疾患を含めて-】変性疾患 脊髄小脳変性症 劣性遺伝性脊髄小脳変性症 セナタキシン欠損症. 日本臨床 別冊神経症候群 II 2014:389-393. (査読なし)
13. Konno T, Tada M (co-first author), Tada M, Koyama A, Nozaki H, Harigaya Y, Nishimiya J, Matsunaga A, Yoshikura N, Ishihara K, Arakawa M, Isami A, Okazaki K, Yokoo H, Itoh K, Yoneda M, Kawamura M, Inuzuka T, Takahashi H, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A, Ikeuchi T. Haploinsufficiency of CSF-1R and clinicopathologic characterization in patients with HDLS. Neurology 2014;82:139-148. (査読有り)
14. Fu YJ, Aida I, Tada M (co-first author), Tada M, Toyoshima Y, Takeda S, Nakajima T, Naito H, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Progressive myoclonus epilepsy: extraneuronal brown pigment deposition and system neurodegeneration in the brains of Japanese patients with novel SCARB2 mutations. Neuropathol Appl Neurobiol 2014;40(5):551-63. (査読有り)
15. 徳永純, 他田正義, 永井貴大, 西澤正豊, 小野寺理. 小脳の神経学: 治療研究に向けた小脳機能評価法の将来. 神経内科 2013;78(6): 687-694. (査読なし)
16. 他田正義, 今野卓哉, 西澤正豊, 池内健, 小野寺理. 神経軸索 spheroid を伴う遺伝性白質脳症(HDLS); 遺伝性脳小血管病と HDLS. 神経内科 2013;78(4):388-395. (査読なし)

(学会発表) (計 6 件)

1. 他田正義, 小野寺理, 西澤正豊. 小脳は何をしているのか? 基礎から病態まで小脳症状をどう捉えるか 小脳機能に基づく小脳症状の再構築. 第 9 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres. 2015 年 10 月 17 日, 品川プリンスホテル (東京都品川区).
2. 他田正義, 徳永純, 小野寺理, 西澤正豊. Kinect を用いた 3 次元歩行解析システムによる小脳性歩行障害の解析. 第 56 回日本神経学会学術大会. 2015 年 5 月 21 日, 朱鷺メッセ (新潟県新潟市).
3. 他田正義, 付永娟, 会田泉, 他田真理, 武田茂樹, 豊島靖子, 中島孝, 内藤明彦, 高橋均, 小野寺理, 西澤正豊. SCARB2 変異を認めた進行性ミオクロノスアテンカン 2 剖検例の臨床病理・生化学的解析. 第 55 回日本神経学会学術大会. 2014 年 5 月 24 日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市).
4. 徳永純, 他田正義, 永井貴大, 小野寺理, 西澤正豊. iPatax: 小脳性運動失調の新たな定量評価法. 第 55 回日本神経学会学術大会. 2014 年 5 月 23 日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

5. Tada M, Tokunaga J, Nagai T, Nishizawa M, Onodera O. iPatax: A new method for quantitative assessment for motor coordination of ataxia. AAN Annual Meeting 2014. 2014/05/01 Philadelphia, PA (USA).
6. 徳永純, 他田正義, 永井貴大, 小野寺理, 西澤正豊. 等速直線運動の速度変動に着手した小脳性運動失調の新たな定量評価法. 第54回日本神経学会学術大会 2013年5月30日, 東京国際フォーラム (東京都千代田区).

(図書) (計2件)

1. Tada M, Nishizawa M, Onodera O. IP3 Receptors in Neurodegenerative Disorders: Spinocerebellar Ataxias and Huntington's and Alzheimer's Diseases. Norbert Weiss, ed. in Pathologies of Calcium Channels. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 2014;579-600. 総ページ数731.
2. 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 アクチュアル脳・神経疾患の臨床. 中山書店 2013年 p200-214.

(産業財産権)

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

他田 正義 (Masayoshi Tada)  
新潟大学・脳研究所・助教  
研究者番号: 10467079

(2)研究分担者

小野寺 理 (Osamu Onodera)  
新潟大学・脳研究所・教授  
研究者番号: 20303167

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号: