

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461275

研究課題名(和文) Charcot-Marie-Tooth病の分子病態の解析と治療薬探索

研究課題名(英文) Analysis of molecular pathology of Charcot-Marie-Tooth disease and search for therapeutic drugs

研究代表者

岡本 裕嗣 (Okamoto, Yuji)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：60709658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：クルクミン治療の有効性と作用機序を同定した。クルクミンは、異常タンパク蓄積による小胞体ストレス反応を軽減させアポトーシスを軽減する。クルクミンの問題はバイオアベイラビリティの低さにあるが、我々はそれが高い薬剤を同定し試験を行う体制を整えた。また、我々はCMT原因遺伝子の包括的遺伝子診断を行った。その結果、182例中42例(23%)に原因遺伝子を同定し、新規原因遺伝子も発見した。

研究成果の概要(英文)：We identified the effectiveness and mechanism of action of curcumin treatment in CMT model mice. It was also confirmed in model mice that curcumin reduces the endoplasmic reticulum stress response caused by abnormal protein accumulation with genetic mutation and alleviates apoptosis. In this study, we examined the administration of curcumin to humans. The primary problem in curcumin therapy is the low bioavailability, but we identified drugs with high bioavailability. We have prepared a system to conduct clinical trials for human during this research period. Most clinical trials other than CMT 1A are not done. We are also planning other types of CMT trials taking into account the efficacy of curcumin. It is also important to identify the causative gene for treatment. We conducted comprehensive genetic diagnosis of CMT causative genes using next generation sequencers. As a result, 42 causative genes were identified in 23 (18%) of the 182 patients. I also found a new causative gene.

研究分野：神経内科学、分子生物学

キーワード：Charcot-Marie-Tooth病 次世代シーケンサー クルクミン

## 1. 研究開始当初の背景

Charcot-Marie-Tooth 病 (以下 CMT) は、有病率は 1/2,500 人とも言われる発症頻度の高い遺伝性ニューロパチーである。CMT は、臨床的、遺伝的に多様であり、これまでに 80 種類近くの CMT 関連原因遺伝子が特定されている。遺伝子診断を確実につけることは、治療にむけて非常に重要なステップである。我々は、次世代シーケンサーを用いて、日本全国の遺伝子診断を行い、1000 例以上の CMT 患者の遺伝子診断を行い成果を上げている。一方で、治療については、いまだ根治的な治療法はない。さらに CMT1A 以外のタイプの CMT に対する治療はほとんど行われていないのが実情である。CMT1A 以外の治療法の開発は、極めて重要な課題である。

## 2. 研究の目的

**CMT に有効性のある治療薬の候補の選定とメカニズムの解析。そしてヒトへの治療に向けて。**

遺伝子治療を含む新規治療法として、各病型の分子病態の解明に基づいて、1) 蛋白発現のコントロール 2) 変異アレルの発現抑制 3) 欠損遺伝子・蛋白の補充 4) たんぱく凝集体形成抑制:凝集体形成や蛋白折りたたみ異常の阻害物質の探索 5) 神経再生因子の開発などが期待される。

ポリフェノール的一种であるクルクミンは秋ウコン等に多く含まれる黄色色素であり、カレー粉にも多く含まれている。古来よりインド、東南アジア、中国などでは生薬、漢方薬などとして利用されてきた。近年では抗炎症、抗酸化、抗腫瘍機能などが注目され、各種疾患での臨床応用が検討されている。Khajavi らは、クルクミンが変異 PMP22 蛋白を細胞膜へ解放し、変異 PMP22 発現によるアポトーシスを減少させることを報告した。研究代表者は、米国テキサス州 Baylor 医科大学 Lupski 研究室において Khajavi らと共同して研究し、CMT 1 のモデルマウスで

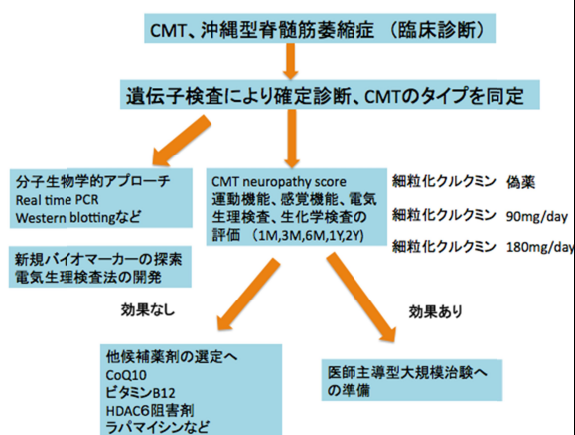
ある変異 pmp22 をもつ TremblerJ マウスにおけるクルクミンの効果およびそのメカニズムを明らかにしてきた。クルクミンは最初に述べた治療法のうちたんぱく凝集体の抑制が期待される。タンパクの恒常性を維持するための調節機構として細胞内小器官である小胞体 (Endoplasmic reticulum: ER) が重要な働きをすることが分かっている。異常な折りたたみ構造のタンパク質が小胞体内に凝集、蓄積することにより小胞体ストレス (ER stress) が起こる。この調節機構の活性化は小胞体内の異常なタンパク質の量に比例するため、この反応は小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR) ともいわれている。異常たんぱくが凝集した時の小胞体のストレス応答を制御し、アポトーシスを抑制することがクルクミンによりもたらされることが基礎実験により確認され、クルクミンの CMT モデルマウスへ投与したところ Pmp22 の変異をもつ CMT1 モデルマウスの運動機能が改善することが判明した。この結果がヒトにも応用できるかが本研究の一番の目的である。

## 3. 研究の方法

**CMT (HMSN-P を含む) へのクルクミン投与研究の開始環境整備と投与開始**

当施設、関連病院の患者の本研究への登録と投与開始を行う。また同時に他施設の倫理委員会通過をはかり、協力施設を増やす。評価方法:基本的にこれまで世界中で行われた CMT に対する臨床研の評価法に準ずる。具体的な方法の例として、主要評価項目 Charcot-Marie-tooth neuropathy score (CMTNS)、副次的評価項目 Charcot-Marie-tooth examination score (CMTES)、Neuropathy Impairment score (NIS)、36-Item Short Form Health Survey (SF-36)、上肢、下肢の神経伝導検査などを用いて評価する。また薬剤の血中濃度を評価する。評価は投与前、投与 1 か月後、

3ヶ月後、6ヶ月後、9ヶ月後、1年後とする。(以降3ヶ月毎に評価) 評価時に採血(一般生化学、血算、胸部レントゲン、心電図など)を行い副作用のチェックを行う。本研究の有効性について評価する。評価については短期、長期の評価が必要である。またわずかな効果改善を評価するためのバイオマーカーの探索も目指す。



#### 4. 研究成果 診断効率の上昇

2007年からCMT原因遺伝子の包括的遺伝子診断を実践し、2012年5月から、次世代シーケンサーを利用して対象遺伝子を増やすと共に治療法探索のための研究をすすめている。これまで、コマーシャルベースで検査が可能なCMT1A以外の23%に原因遺伝子を同定した。また、確定診断の精度を上げていくことにより新規原因遺伝子MMEの発見や、新しいアプローチとしてのミトコンドリアニューロパチーの原因遺伝子の発見。それ以外の遺伝子においても、本邦初症例の確認。またGDAP1,MFN2など既報告遺伝子においても新しい知見を得られた。分子生物学的確定診断をつけることは、治療薬の効果判定、どの病型に効果があるかを知るためにも重要な成果である。今後さらに診断精度を上げていく予定である。

#### 薬剤の選定

クルクミンは安全域の広い薬剤とされているが、腸管からの吸収が低く、バイオアベ

イラビリティが低いことが投与における、一番の問題点と考えられている。我々は、様々な剤型、投与方法を検討した中で、2009年に国内の株式会社セラバリューズが開発した細粒化クルクミン(セラクルミン®)に注目した。本剤は人において、通常クルクミンに比較して約27倍に吸収力があがることを健康成人での検査で確認されている。本研究期間内に開発会社と連携し、医師主導型治験を行う体制を整え、当大学、関連施設における倫理委員会を通過し平成29年度から治験を開始できる体制が整った。また、本剤の効果を確認するために、CMT類縁疾患の中で患者数の多い、沖縄地域に多く発症するHMSN-Pに対する治験の準備も進めている。HMSN-Pは脊髄性筋萎縮症に感覚ニューロパチーを合併した臨床像をもつ疾患で、TRKfused gene(TFG)が原因である。TFG遺伝子は、小胞体からGolgi体を通じて細胞内外に蛋白が分泌される小胞輸送に関与しており、病態の関与に小胞体ストレスの増悪が考えられ、クルクミンが有効である可能性がある。他のCMTと同様に有効な治療法が開発されておらず、本研究の継続による結果が待たれる。CMTの原因遺伝子の一部は、難知性疾患である筋萎縮性側索硬化症の家族性のタイプと重なる。同疾患への治療の光明ともなりうる。また小胞体ストレス応答を介した異常タンパクの凝集を是正する治療法の確立は、異常タンパク凝集を原因とするアルツハイマー病、パーキンソン病、脊髄小脳変性症など多くの神経変性疾患への治療応用も期待される。

<引用文献> Curcumin facilitates a transitory cellular stress response in Trembler-J mice. **Okamoto Y**, Pehlivan D, Wiszniewski W, Beck CR, Snipes GJ, Lupski JR, Khajavi M.

Hum Mol Genet. 2013 Jul 25.

#### 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8件)

Yuan JH, Hashiguchi A, Yoshimura A, Sakai N, Takahashi MP, Ueda T, Taniguchi A, Okamoto S, Kanazawa N, Yamamoto Y, Saigoh K, Kusunoki S, Ando M, Hiramatsu Y, Okamoto Y, Takashima H.

WNK1/HSN2 Founder Mutation in Patients with Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy: a Japanese cohort study.

Clin Genet. 2017 Apr 19. [Epub ahead of print]、査読有り、doi: 10.1111/cge.13037.

Yoshimura A, Yuan JH, Hashiguchi A, Hiramatsu Y, Ando M, Higuchi Y, Nakamura T, Okamoto Y, Matsumura K, Hamano T, Sawaura N, Shimatani Y, Kumada S, Okumura Y, Miyahara J, Yamaguchi Y, Kitamura S, Haginoya K, Mitsui J, Ishiura H, Tsuji S, Takashima H.

Clinical and mutational spectrum of Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease caused by GDAP1 variants.

Clin Genet. 2017 Feb 28. [Epub ahead of print]、査読有り、doi: 10.1111/cge.13002.

③ Yuan JH, Hashiguchi A, Yoshimura A, Yaguchi H, Tsuzaki K, Ikeda A, Wada-Isoe K, Ando M, Nakamura T, Higuchi Y, Hiramatsu Y, Okamoto Y, Takashima H.

Clinical diversity caused by novel IGHMBP2 variants.

J Hum Genet. 2017 Feb 16. [Epub ahead of print]、査読有り、doi: 10.1038/jhg.2017.15.

④ Pehlivan D, Beck CR, Okamoto Y, Harel T, Akdemir ZH, Jhangiani SN, Withers MA, Goksungur MT, Carvalho CM, Czesnik D, Gonzaga-Jauregui C, Wiszniewski W, Muzny DM, Gibbs RA, Rautenstrauss B, Sereda MW, Lupski JR.

The role of combined SNV and CNV burden in patients with distal symmetric polyneuropathy.

Genet Med. May;18(5):443-51. 2016、査読有り、doi: 10.1038/gim.2015.124.

⑤ Higuchi Y, Hashiguchi A, Yuan J, Yoshimura A, Mitsui J, Ishiura H, Tanaka M, Ishihara S, Tanabe H, Nozuma S, Okamoto Y, Matsuura E, Ohkubo R, Inamizu S, Shiraishi W, Yamasaki R, Ohyagi Y, Kira J, Oya Y, Yabe H, Nishikawa N, Tobisawa S, Matsuda N, Masuda M, Kugimoto C, Fukushima K, Yano S, Yoshimura J, Doi K, Nakagawa M, Morishita S, Tsuji S, Takashima H.

Mutations in MME cause an autosomal-recessive Charcot-Marie-Tooth disease type 2.

Ann Neurol. Apr;79(4):659-72. 2016、査読有り、doi: 10.1002/ana.24612.

⑥ Gonzaga-Jauregui C, Harel T, Gambin T, Kousi M, Griffin LB, Francescatto L, Ozes B, Karaca E, Jhangiani SN, Bainbridge MN, Lawson KS, Pehlivan D, Okamoto Y, Withers M, Mancias P, Slavotinek A, Reitnauer PJ, Goksungur MT, Shy M, Crawford TO, Koenig M, Willer J, Flores BN, Padiadittrakis I, Us O, Wiszniewski W, Parman Y, Antonellis A, Muzny DM, Katsanis N, Battaloglu E, Boerwinkle E, Gibbs RA, Lupski JR.

Exome Sequence Analysis Suggests that Genetic Burden Contributes to Phenotypic Variability and Complex Neuropathy.

Cell Rep. 2015 Aug 18;12(7):1169-83. 査読有り、doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.023.

⑦ Okamoto Y, Goksungur MT, Pehlivan D, Beck CR, Gonzaga-Jauregui C, Muzny DM, Atik MM, Carvalho CM, Matur Z,

Bayraktar S, Boone PM, Akyuz K, Gibbs RA, Battaloglu E, Parman Y, Lupski JR.

Exonic duplication CNV of NDRG1 associated with autosomal-recessive HMSN-Lom/CMT4D.

Genet Med. May;16(5):386-94. 2014、査読有り、doi: 10.1038/gim.2013.155.

⑧Hashiguchi A, Higuchi Y, Nomura M, Nakamura T, Arata H, Yuan J, Yoshimura A, Okamoto Y, Matsuura E, Takashima H. Neurofilament light mutation causes hereditary motor and sensory neuropathy with pyramidal signs. J Peripher Nerv Syst. Dec;19(4):311-6. 2014、査読有り doi: 10.1111/jns.12102.

〔学会発表〕(計 4 件)

Yuji Okamoto, Junhui Yuan, Akiko Yoshimura, Yu Hiramatsu, Masahiro Ando, Akihiro Hashiguchi, Hiroshi Takashima. Next-generation sequencing analysis for mitochondrial disorders in adult Japanese patients. American society of human genetics Annual meeting 2016, 2016.10.18-22 Vancouver, Canada

岡本裕嗣, 平松 有, 吉村明子, 袁 軍輝, 安藤匡宏, 樋口雄二郎, 橋口昭大, 石浦浩之, 三井純, 辻 省次, 高嶋 博. 次世代シーケンサーを用いたミトコンドリア病の原因遺伝子の同定. 第57回日本神経学会学術大会, 2016.10.18-21 神戸コンベンションセンター, 神戸市、兵庫県

岡本裕嗣, シャルコー・マリー・トゥース病の診療のポイント. 第57回日本神経学会学術大会, 2016.10.20 神戸コンベンションセンター, 神戸市、兵庫県

岡本裕嗣, Charcot-Marie-Tooth 病の遺伝子診断の進歩と 治療法の開発、第26 回日本末梢神経学会学術集会、2015.9.18 ホテルブエナビスタ、長野

県、松本市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕  
特記事項なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡本 裕嗣 (Okamoto, Yuji )

鹿児島大学学術研究院 医歯学域医学系  
講師

研究者番号 : 60709658

(2)研究分担者

高嶋 博 (Takashima, Hiroshi )

鹿児島大学大学院 医歯学域医学系 教授

研究者番号 : 80372803

(3) 研究分担者

京都府立医科大学 医学研究科 教授

中川 正法 (Nakagawa, Masanori )

研究者番号 : 50198040