

分子標的を介するポリグルタミン病の根本治療法の開発 Development of Molecular Targeted Disease Modifying Therapy for Polyglutamine Diseases

祖父江 元 (SOBUE GEN)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授



研究の概要

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) 遺伝子の 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。本研究では変異 AR によるニューロン変性の分子メカニズムとして TGF-beta シグナルおよび CGRP1-JNK シグナルの異常を明らかにし、その是正が神経変性を抑制することを明らかにした。また、SBMA に対する根本治療として、芍薬 (*paeonia lactiflora*) の主成分のひとつである paeoniflorin が SBMA の動物モデルにおいて分子シャペロン・オートファジーを活性化し、変異 AR の運動ニューロン内への蓄積を抑制することが示された。また、疾患特異的に発現が亢進しているマイクロ RNA を同定し、しているマイクロ RNA を同定し、そのアデノウイルスを用いたマウス個体への誘導により、変異 AR の蓄積を阻害し神経変性を抑制することを明らかにした。また、治療薬のスクリーニング系として SBMA 患者線維芽細胞由来の iPS 細胞を樹立した。

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：神経変性疾患・ポリグルタミン病・運動ニューロン・マイクロ RNA

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は特定の細胞が機能障害および死に至る難病であり、その治療は現代医学における喫緊の課題となっている。最近の基礎・臨床研究の進歩により、細胞内への異常な蛋白質蓄積が神経細胞の機能障害や細胞死を惹起することが明らかとされてきているが、分子標的治療の開発と応用は悪性腫瘍に比べると遥かに遅れており、ほとんどの神経変性疾患では有効な根本治療が見出されず今日に至っている。

2. 研究の目的

本研究は神経変性疾患の一群であるポリグルタミン病について、病態に根ざした根本的治療法を開発し、臨床応用することにより、本疾患の克服を目指すものである。具体的な治療法の開発手段として、①患者皮膚由来の iPS 細胞からニューロンに分化したモデル系を作成し、②ユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) を活性化する低分子化合物の探索・同定、③分子シャペロン調節薬の開発と臨床応用、④新たな病態関連分子の探索・同定と、その機能を調節する低分子化合物の開発を4つの柱とし、ポリグルタミン病の分子標的治療の開発を目的とした包括的研究を展開

する。

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・ウエ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) およびマウス初代培養運動ニューロンを用い、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。

4. これまでの成果

1) SBMA における TGF-beta シグナルの異常：AR の N 末断片をヒト培養神経細胞 (SH-SY5Y) 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 TbetaRII のプロモーター活性が低下した。SH-SY5Y 細胞への変異 AR の強制発現による細胞死は、抗 TGF-beta 抗体 (中和抗体) によって増加し、TbetaRII の強制発現により抑制された。

2) SBMA における JNK シグナルの異常
SBMA モデルマウスの脊髄 mRNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、発症前から発

現の亢進のみられる 13 の遺伝子を同定し、そのうち多機能神経ペプチドである calcitonin/calcitonin-related polypeptide (CGRP1) が SH-SY5Y 細胞で過剰発現すると細胞死を誘導することを明らかにした。その分子機序として、CGRP1 が c-Jun のリン酸化を介して JNK シグナルを活性化すること、および変異アンドロゲン受容体の細胞毒性が JNK 阻害剤によって抑制されることを明らかにした。さらに、natriptan を SBMA モデルマウスに経口投与したところ、運動ニューロンにおける JNK シグナルが抑制され、神経原性筋萎縮および脊髄における反応性グリオシスが抑止され、マウス運動機能や寿命の有意な改善が認められた。

3) 分子シャペロン・オートファジー調節薬の開発

SBMA モデルマウスへ paeoniflorin(PF)を腹腔内へ投与したところ、治療群では投与量依存性に運動機能が改善し、変異 AR の集積が減少した。また、PF 投与により変異タンパクの分解に関わる分子シャペロンの発現増加やオートファゴソームとリソソームの機能を制御する転写制御因子である TFEB の発現量も増加した。

4) マイクロ RNA による根本治療の開発

SBMA マウス脊髄で高発現を認める miR-196a を同定し SBMA の病態形成における役割を検討し、miR-196a 高発現の効果を検討した。miR-196a を培養細胞モデルで過剰発現させると AR の mRNA 及び蛋白質発現量が低下した。バイオインフォマティクスのプログラム (TargetsScan 6.0) 上、miR-196a の標的となりうる mRNA はそれぞれ 200 種類近く存在し、これらの mRNA の中で CUGBP2, Elav-like family member 2 (CELF2) に着目した。CELF2 の発現は miR-196a によって抑制された。さらに、miR-196a と Green fluorescent protein (GFP) を発現するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV-miR-196a) を作成し、5 週齢の SBMA マウス下肢の筋肉に投与したところ、運動機能の有意な改善がみられ、病理学的にも異常 AR の蓄積や神経原性筋萎縮ならびに反応性グリオシスの有意な改善を認めた。

5) ポリグルタミン病 iPS 細胞の確立

連携研究機関である慶応大学において 4 名の SBMA 患者から文書による同意を得て皮膚を採取し、得られた線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、SBMA 疾患特異的ヒト iPS 細胞の樹立を進めている。一方、ヒト ES 細胞を用いて、運動ニューロンへの分化誘導系の構築を進めており、これまでに HB9 陽性、Isl-1 陽性の運動ニューロンへの分化誘導を確認している。

5. 今後の計画

SBMA 患者皮膚由来の iPS 細胞を運動ニューロンに分化させた系を用い、SBMA における運動ニューロンと骨格筋のクロストークの異常について解析するとともに、病態を抑止する低分子化合物をスクリーニングする。また、SBMA の病態におけるオートファジーの役割を明らかにするため、選択的オートファジーにおける主要なアダプタータンパク質である p62 を高発現するトランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスを SBMA と交配し、運動機能や病理学的変化に与える影響を解析する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Jiang YM, Huang Z, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Tanaka F, Muramatsu S, Sobue G: Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nature Medicine* [in press]
2. Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Adachi H, Tanaka F, Sobue G. Molecular Pathophysiology and Disease-Modifying Therapies for Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. *Arch Neurol.* 69: 436-440, 2012.
3. 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.
4. 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.
5. 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.

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/102/p10224.html>