

疾患モデル線虫を用いたポリグルタミン病の新規治療薬の開発

研究分担者	小野寺 理（新潟大学脳研究所 分子神経疾患資源解析学分野）
共同研究者	他田 正義（新潟大学脳研究所 神経内科）
	徳永 純（新潟大学脳研究所 神経内科）
	藤田 菜摘（新潟大学脳研究所 神経内科）
	西澤 正豊（新潟大学脳研究所 神経内科）
	山中 邦俊（熊本大学発生医学研究所 分子細胞制御分野）

研究要旨

ポリグルタミン病において原因蛋白の構造変化とそれに引き続く凝集体形成は中核的な初期分子病態であり、凝集体形成カスケードの中間体である可溶性重合体に強い細胞毒性があると考えられている。私たちはこれまでに、ポリグルタミン病蛋白の重合体形成を阻害する新規治療薬の開発を目的として、変異蛋白の重合体形成を生細胞内で検出する培養細胞システムを樹立し、アメリカ食品医薬品局 FDA 認可の小化合物ライブラリーを用いて大規模薬剤スクリーニングを行ってきた。本年度は、初期スクリーニングで得られた約 300 の候補薬の中から既に本邦で臨床使用されている 25 薬剤を抽出し、ポリグルタミン病モデル線虫を用いて治療効果を検討した。その結果、6 薬剤がモデル線虫の封入体面積（および総数）を有意に減少させた。この中で、既に広く臨床使用され安全性の確認されている高血圧治療薬 PolyQ Aggregation Inhibitor 39095 (QAI-39095) に注目し、モデル線虫の表現型解析および生化学的解析を行った。QAI-39095 投与により、封入体数・面積の減少、運動能の改善、寿命の延長、重合体量の減少が生じることが示された。今後、QAI-39095 を含む有望な薬剤についてはモデル動物を用いて治療効果を検討する。

A. 研究背景・目的

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，原因蛋白の構造変化とそれに引き続く凝集体形成は中核的な初期分子病態と考えられている。この凝集体形成カスケードの最終産物である封入体形成は保護的な細胞動態の結果

であり，中間体である可溶性重合体に強い細胞毒性があるという「重合体毒性仮説」が，多くの先行研究で示されてきた。変異蛋白の重合体は，転写障害，軸索輸送障害，シナプス機能障害，ミトコンドリア障害，DNA 修復障害といった様々な中間病態を介して細胞の機能障害，神経細胞死を引き起こす。有効な病態抑止療

法の存在しない polyQ 病の治療戦略において、より上流の初期病態を治療標的とすることは理想的と考えられ、(1) 変異蛋白の発現抑制、(2) 変異蛋白の分解促進、(3) 重合体形成阻害、などの分子標的治療が想定される。これまで数多くの治療研究がなされてきたが、重合体形成阻害を標的とした治療研究の報告は少ない。

本研究の目的は、polyQ 病蛋白の重合体形成を阻害する新規治療薬を開発することである。私たちはこれまでに、protein-fragment complementation assay という手法を用いて変異 polyQ 蛋白の重合体形成を生細胞内で検出する培養細胞システムを樹立し、アメリカ食品医薬品局 FDA 認可の小化合物ライブラリーを用いて大規模薬剤スクリーニングを行った。その結果、2,140 を越える薬剤の中で、51 剤が 80% 以上の重合体形成阻害効果を示し、302 剤が 50% 以上の阻害効果を示した。本年度は、この候補薬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、ポリグルタミン病モデル線虫を用いて治療効果を検討した。

B. 研究方法

モデル線虫の樹立: 異常伸長した polyQ 鎖 (40 リピート) を有する断片型 DRPLA 蛋白を体壁筋に恒常発現するモデル線虫 (Q40 線虫) を用いた。組替え蛋白は蛍光蛋白 GFP が融合され、蛍光顕微鏡により線虫の体壁に封入体を観察することができる。Q40 線虫では封入体形成、運動能低下、寿命短縮が観察され、生化学的に (弱変性条件下アガロースゲル電気泳動とウ

エスタンプロット法により) 変異蛋白の重合体を検出することが可能である。

線虫の同調培養と薬剤負荷: 通常の方法で同調培養を実施した。日齢 1 日に線虫を分散し、薬剤を 2 段階の濃度で餌に混ぜて投与した。

表現型解析: 成虫に達する日齢 4 日に線虫を回収し、まず封入体数・面積を解析した。封入体数・面積の減少が認められた薬剤については、運動能 (液体中の 30 秒あたりの虫体の屈曲回数) を解析し、寿命測定を実施した。

生化学的解析: 虫体を溶解して蛋白を抽出し、生化学的に変異蛋白の総量および重合体量を解析した。寿命測定以外は日齢 4 日に解析を行った。統計解析は SPSS ver.12.0 を使用した。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験、動物実験は、本学の当該委員会の承認を得た上で、関係省庁の法令および本学の安全管理規定を遵守して実施した。

C. 研究結果

(1) 封入体解析によるスクリーニング: 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。この 6 候補薬の中で私たちは 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。動物実験で血液脳関門を通過することも示されている。

(2) QAI-39095 の治療効果の検討: 日齢

4日の封入体面積は、非投与群に比べ低濃度投与群で6.2%減少し(有意差なし)、高濃度投与群で17.6%減少した($p < 0.01$)。運動能は、非投与群(31.9回/30秒)に比して高濃度投与群(34.8回/30秒)で改善した($p = 0.018$)。さらに、寿命は、非投与群に比して低濃度投与群・高濃度投与群において有意に延長した(Log Rank検定 $p < 0.01$, $p = 0.043$)。生化学的解析では、非投与群に比して高濃度投与群において、polyQ蛋白の総量に有意な変化を認めなかったが、一方、重合体量の減少が認められた($p < 0.01$)。QAI-39095はラット腎において熱ショック蛋白(HSP)の発現を誘導することが知られている。HSP70はHSP40と共同してpolyQ鎖蛋白の異常凝集を抑制し、神経変性を抑制する。非投与群に比して高濃度投与群においてHSP70の発現亢進を認めた($p < 0.01$)。以上の結果から、QAI-39095はQ40線虫において、封入体数・面積の減少、運動能の改善、寿命の延長、重合体量の減少をもたらすことが示された。この効果発現にHSPの発現誘導が関係している可能性が示唆された。

D. 結論と展望

PolyQ病モデル線虫を用いた表現型解析および生化学的解析により、重合体形成阻害効果を示す薬剤を同定した。今後、他の候補薬についても効果の検討を行い、有望な薬剤についてはモデル動物を用いて治療効果を検討する。

E. 健康危険情報

とくになし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fu YJ, Aida I, Tada M, 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* 2013 doi:10.1111/nan.12057.
- 2) Tada M, Nishizawa M, Onodera O: IP3 Receptors in Neurodegenerative Disorders: Spinocerebellar Ataxias and Huntington's and Alzheimer's Diseases. In *Pathologies of Calcium Channels*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg ed. 2014
- 3) 他田正義, 小野寺理: 劣性遺伝性小脳失調症. アクチュアル脳・神経疾患の臨床「小脳と運動失調 小脳はなにをしているのか」. 西澤正豊編集. p200-214, 中山書店 2013
- 4) 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;78:687-694.

2. 学会発表

- 1) 小野寺理: 進化する脊髄小脳変性症治療 新たなステージへ 脊髄小脳変性症の治療薬開発に向けて 本邦の治療の歴史から学ぶ. 第31回日本神経治療学総会, 2013/11/22 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

とくになし。

図1. 培養細胞系による一次スクリーニング
Protein-fragment complementation assay (PCA) の原理

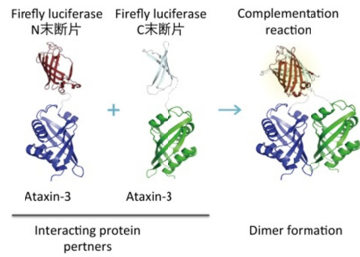


図2. 研究デザイン

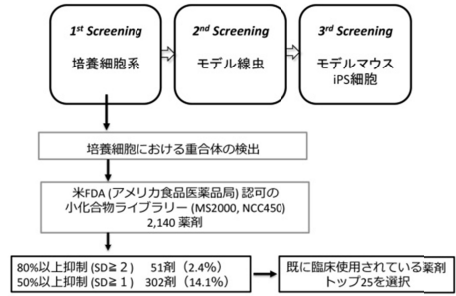


図3. QAI-39095の治療効果

