

201442025A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患実用化研究事業

プリオノイド蛋白質の凝集・伝播を標的とした
神経コンフォメーション病の治療法開発
(H26-委託(難) 一般-025)

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 永井 義隆

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の難治性疾患実用化研究委託事業による委託業務として、独立行政法人国立精神・神経医療研究センターが実施した平成26年度「プリオン蛋白質の凝集・伝播を標的とした神経コンフォメーション病の治療法開発」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患実用化研究事業

プリオノイド蛋白質の凝集・伝播を標的とした
神経コンフォメーション病の治療法開発
(H26－委託（難）－一般－025)

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 永井 義隆

平成27（2015）年 3月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

プリオノイド蛋白質の凝集・伝播を標的とした
神経コンフォメーション病の治療法開発
永井 義隆

----- 1

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. プリオノイド蛋白質の凝集阻害による治療法開発

小野寺 理

----- 5

2. プリオノイド蛋白質の伝播阻害による治療法開発

長谷川 隆文

----- 9

3. プリオノイド蛋白質の高感度検出による

疾患バイオマーカー開発

徳田 隆彦

----- 11

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 15

III. 研究成果の刊行物・別刷

----- 21

プリオノイド蛋白質の凝集・伝播を標的とした神経コンフォメーション病の治療法開発

業務主任者：永井 義隆（独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所 室長

研究要旨

本研究では、ポリグルタミン（PolyQ）病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病（PD）などの神経コンフォメーション病に共通する疾患横断的な視点から、プリオノイド蛋白質の凝集・伝播を標的とした分子標的治療薬、またその薬効評価のための疾患バイオマーカーを開発することを目的として研究を行っている。今年度は、1）プリオノイド蛋白質の凝集阻害：プリオノイド阻害ペプチド QBP1 が TDP-43 発現 ALS モデルショウジョウバエに有効である可能性を示した。また、FDA 認可化合物ライブラリーからのスクリーニングを行い、新規の PolyQ 凝集阻害化合物 X を同定した。2）プリオノイド蛋白質の伝播阻害：培養細胞モデルを用いて、分子シャペロン Hsp40 が PolyQ 蛋白質の細胞外分泌を抑制することを明らかにした。3）疾患バイオマーカーの開発：既に関連している α Syn オリゴマーの高感度 ELISA アッセイ系に、heterophilic antibody が重大な影響を与えることを明らかにした。

業務項目：

- ①プリオノイド蛋白質の凝集阻害による治療法開発
- ②プリオノイド蛋白質の伝播阻害による治療法開発
- ③プリオノイド蛋白質の高感度検出による疾患バイオマーカー開発

担当責任者：

- 小野寺 理 新潟大学脳研究所・教授 項目①②
- 徳田 隆彦 京都府立医科大学・教授 項目③
- 長谷川 隆文 東北大学・講師 項目②

A. 研究目的

加齢に伴って発症する難治性神経変性疾患の克服は、我が国の厚生労働行政上の重要な課題である。近年、ポリグルタミン（PolyQ）病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病（PD）などの神経変性疾患では、蛋白質の高次構造（コンフォメーション）の異常により発症することが明らかになり、コンフォメーション病と総称されている。これらの神経コンフォメーション病では、PolyQ、TDP-43、 α シヌクレイン（ α Syn）など様々な原因蛋白質がいずれも共通にプリオン様性質

を獲得（プリオノイド蛋白質）して凝集し、細胞・組織間を伝播することにより神経変性を惹起・進展させると考えられているが、そのメカニズムは未解明である。本研究では、神経コンフォメーション病に共通する疾患横断的な視点から、プリオノイド蛋白質の凝集・伝播を標的とした分子標的治療薬、またその薬効評価のための疾患バイオマーカーを開発することを目的として、以下の研究を行った。

B&C&D. 研究方法、結果および考察

①プリオノイド蛋白質の凝集阻害による治療法開発

a. プリオノイド阻害ペプチド QBP1 の応用

本研究では、迅速な薬効評価に適したショウジョウバエモデルを用いて、PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1（SNWKWWPGIFD、US 特許）の PolyQ 病、ALS、PD モデルに対する治療効果を検討した。

ハンチントン病モデルショウジョウバエ Htt-Q97 Fly と QBP1 発現ショウジョウバエを交配させた結果、QBP1 の発現により Htt-Q97 Fly の複眼変性が有意に改善することを明らかにした。TDP-43 を発現する ALS モデルショウジョウバエに対する QBP1 の治療効果は検討中である。

b. 凝集阻害化合物のスクリーニング

本研究では、既存医薬品を用いたドラッグ・リポジショニング研究により、より短期間・効率的に臨床応用できる治療薬候補のスクリーニングを行った。

Thio-PolyQ 蛋白質の凝集濁度アッセイ系 (US 特許) を用いて、FDA 認可化合物ライブラリー (1,262 化合物) の 1 次スクリーニングを行った結果、新規の PolyQ 凝集阻害化合物 X を同定した。

一方、Protein-fragment complementation assay (PCA) 法による細胞内での Ataxin-3 蛋白質の重合体形成アッセイを用いて、FDA 認可の低分子化合物ライブラリー (2,140 化合物) のスクリーニングを行った結果、重合体形成阻害効果を示す 51 化合物を同定した。

②プリオノイド蛋白質の伝播阻害による治療法開発

a. プリオノイド蛋白質の分泌・取込み阻害

今年度は、野生型/変異型 TDP-43 蛋白質の精製系を樹立し、培養細胞系での細胞内取込みの検討を開始した。また、家族性 PD の原因遺伝子である DNAJC13 の安定発現細胞株を樹立し、変異型 DNAJC13 発現細胞では α Syn の細胞内小胞輸送が障害されることを明らかにした。

b. 細胞外分子シャペロンの応用

本研究では、細胞外分子シャペロンによるプリオノイド蛋白質の細胞間伝播の抑制効果について、培養細胞を用いて検討した。その結果、分子シャペロン Hsp40 の発現により、PolyQ 蛋白質の細胞外分泌が抑制されることを明らかにした。さらに、Hsp40 自身がエクソソーム経路を介して細胞外に分泌され、周辺細胞に非細胞自律的な効果を発揮することを明らかにした。

c. プリオノイド蛋白質の生体内伝播機序の解明

今年度は、ALS 患者脊髄の病理切片において、1 細胞レベルでの蛋白質、核酸変化の検出法の開発を行った。

③プリオノイド蛋白質の高感度検出による疾患バイオマーカー開発

a. 髄液中プリオノイド蛋白質の高感度検出

PolyQ 病患者の CSF、血清サンプルの収集を行い、アッセイ系を構築中である。また、既に開発している α Syn の高感度 ELISA アッセイ系に、heterophilic antibody が重大な影響を与えることを明らかにした。

b. オミックス解析による新規疾患バイオマーカーの開発

変異 ataxin-3 遺伝子を導入した PolyQ 病モデルトランスジェニックマウスモデルの病態解析を行い、経時的な運動障害、筋力低下などを明らかにした。CSF の採取方法を検討中である。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒトを対象とした研究は、国の法律・指針を遵守して遂行し、各研究機関の倫理審査委員会により承認を受けている。また、実験動物の取り扱いにあたっては国の法律・指針および各研究機関の動物実験倫理指針を遵守した。

E. 結論

本研究の結果から、PolyQ 病、ALS、PD など神経コンフォメーション病に対して、プリオノイド蛋白質の凝集阻害治療薬候補として、QBP1、新規凝集阻害化合物 X を同定した。一方、Hsp40 が PolyQ 蛋白質の細胞外分泌を抑制することを明らかにした。さらに、疾患バイオマーカー候補となる α Syn オリゴマーのアッセイ系を改善した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saitoh Y., Fujikake N., Okamoto Y., Popiel H.A., Hatanaka Y., Ueyama M., Suzuki M., Gaumer S., Murata M., Wada K., *Nagai Y. p62 plays a protective role in the autophagic clearance of polyglutamine aggregates in polyglutamine disease model flies. *J. Biol. Chem.* 290(3): 1442-1453 (2015)
- 2) Miura E., Hasegawa T., Konno M., Suzuki M., Sugeno N., Fujikake N., Geisler S., Tabuchi M.,

Oshima R., Kikuchi A., Baba T., Wada K., Nagai Y., Takeda A., Aoki M. VPS35 dysfunction causes retromer depletion and impairs lysosomal degradation of α -synuclein, leading to exacerbation of α -synuclein neurotoxicity in *Drosophila*. *Neurobiol. Dis.* 71: 1-13 (2014)

- 3) Azuma Y., Tokuda T., Shimamura M., Kyotani A., Sasayama H., Yoshida T., Mizuta I., Mizuno T., Nakagawa M., Fujikake N., Ueyama M., Nagai Y., Yamaguchi M. Identification of *ter94*, *Drosophila VCP*, as a strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of *Caz*, *Drosophila FUS*. *Hum. Mol. Genet.* 23(13): 3467-3480 (2014)
- 4) Takeuchi T., Popiel H.A., Futaki S., Wada K., *Nagai Y. Peptide-based therapeutic approaches for treatment of the polyglutamine diseases. *Curr. Med. Chem.* 21(23): 2575-2582 (2014)
- 5) 上山盛夫、藤掛伸宏、永井義隆。その他のFTLD—異常蛋白の視点から。 *Clinical Neuroscience* 33 (3): 312-314 (2015)
- 6) 永井義隆。ポリグルタミン病における神経変性。 *BRAIN MEDICAL* 26 (3): 225-229 (2014)

2. 学会発表

- 1) Nagai Y. Misfolding and aggregation of the polyglutamine protein and its suppression by intercellular transmission of molecular chaperone. *Hungary-Japanese Symp on Mechanism and regulation of aberrant protein aggregation* (Nov 17-21, 2014, Osaka, Japan)
- 2) Minakawa et al. Investigating the role of ubiquilin-2 in the pathomechanism of ALS/FTD. *GRC on Neurobiol Brain Dis* (Jul 27-Aug 1, 2014, Girona, Spain)
- 3) Nagai Y., et al. Dysfunction of microtubule-dependent transport triggers oligomerization and cytoplasmic accumulation of TDP-43, leading to neurodegeneration. *CSHL 2014 Neurodeg Dis meeting* (Dec 3-6, 2014, CSH, NY, USA)
- 4) Saitoh Y., et al. p62 plays a protective role in the autophagic degradation of polyglutamine protein oligomers in polyglutamine disease model flies. *CSHL 2014 Neurodeg Dis meeting* (Dec 3-6, 2014, CSH, NY, USA)
- 5) Ishiguro T., et al. Expanded UGGAA repeat RNA associated with SCA31 causes progressive neurodegeneration in *Drosophila*. *CSHL 2014 Neurodeg Dis meeting* (Dec 3-6, 2014, CSH, NY, USA)
- 6) 永井義隆、他。2光子 in vivo イメージング解析による SCA1 マウスにおけるシナプス異常の解明。 **第55回 日本神経学会学術大会** (H26.5.21-24、福岡)
- 7) 藤掛伸宏、他。DCTN1 依存的輸送の障害は TDP-43 のオリゴマー形成を促進する。 **第55回 日本神経学会学術大会** (H26.5.21-24、福岡)
- 8) 鈴木マリ、他。ポリグルタミン病モデルシ

ョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する。 **第55回 日本神経学会学術大会** (H26.5.21-24、福岡)

- 9) 斉藤勇二、他。ポリグルタミン病モデルにおいて p62 はオートファジー分解系を介して保護的に作用する。 **第55回 日本神経学会学術大会** (H26.5.21-24、福岡)
 - 10) Minakawa E.N., et al. Investigating the Role of Ubiquilin-2 in the Pathomechanism of ALS/FTD. **第55回 日本神経学会学術大会**(H26.5.21-24、福岡)
 - 11) 東裕美子、他。FUS-ALS モデルショウジョウバエの表現型を修飾する因子の探索。 **第55回 日本神経学会学術大会** (H26.5.21-24、福岡)
 - 12) 三浦永美子、他。VPS35 障害はカテプシン D 活性低下を介し α シヌクレイン蓄積・神経変性を惹起する。 **第55回 日本神経学会学術大会** (H26.5.21-24、福岡)
 - 13) 石黒太郎、他。SCA31 (UGGAA)_n リピートはショウジョウバエで進行性神経障害を引き起こす。 **第55回 日本神経学会学術大会** (H26.5.21-24、福岡)
 - 14) 鈴木マリ、他。神経変性疾患モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する。 **第37回 日本神経科学会** (H26.9.11-13、横浜)
 - 15) 斉藤勇二、他。p62/SQSTM1 はポリグルタミン病モデルショウジョウバエにおいて、ポリグルタミン蛋白質凝集体をオートファジー分解系で除去することで保護的役割を果たす。 **第37回 日本神経科学会**(H26.9.11-13、横浜)
 - 16) Minakawa et al. Investigating the role of ubiquilin-2 in the pathomechanism of ALS/FTD. **第37回 日本神経科学会**(H26.9.11-13、横浜)
 - 17) 石黒太郎、他。異常伸長 UGGAA リピート RNA はショウジョウバエにおいて神経毒性を引き起こす。 **第37回 日本神経科学会** (H26.9.11-13、横浜)
 - 18) 上山盛夫、他。GGGGCC リピート RNA を発現する新規 ALS モデルショウジョウバエの樹立と病態解析。 **第86回 日本遺伝学会大会** (H26.9.17-19、長浜)
 - 19) 永井義隆、他。微小管依存的 TDP-43 輸送の障害はオリゴマー形成を促進し、神経変性を惹き起こす。 **第33回 日本認知症学会学術集会** (H26.11.29-12.1、横浜)
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
- 1) 発明者名：石川欽也、水澤英洋、永井義隆、横田隆徳、石黒太郎、佐藤望、和田圭司
発明の名称：ALS の原因タンパク毒性を軽減

する核酸

特許出願番号：特願 2014-244034

出願日：2014年12月2日

出願人：東京医科歯科大学、国立精神・神経医療研究センター

- 2) 発明者名：石川欽也、水澤英洋、永井義隆、石黒太郎、佐藤望、和田圭司

発明の名称：脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31 治療剤)

特許出願番号：特願 2014-244350

出願日：2014年12月2日

出願人：東京医科歯科大学、国立精神・神経医療研究センター

- 3) 発明者名：武内敏秀、永井義隆、中川慎介、丹羽正美、道具伸也、片岡泰文

発明の名称：血液脳関門透過性ペプチド

特許出願番号：特願 2015-052967

出願日：2015年3月17日

出願人：京都大学、国立精神・神経医療研究センター、長崎大学・ファーマコセル株式会社、福岡大学

プリオノイド蛋白質の凝集阻害による治療法開発

担当責任者 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 教授

研究要旨 神経コンフォメーション病(筋萎縮性側索硬化症, アルツハイマー病, パーキンソン病, ポリグルタミン病など)において, 変異蛋白質の重合体形成は病態初期の中核的イベントであり, 重合体形成阻害を標的とした治療はコンフォメーション病全般に応用できる治療戦略である. 本研究では, ポリグルタミン病の新規治療薬の開発を目的として, 変異蛋白質の重合体形成を阻害する低分子化合物のスクリーニングを可能とする新たな細胞系を確立した. 本細胞系を用いて, 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実施し, 複数の有望な化合物を選定した. 今後, モデル線虫やモデル動物を用いてその有効性を検証する.

研究協力者:

他田 正義 新潟大学脳研究所神経内科 助教

Henry L. Paulson ミシガン大学神経内科 教授

A. 研究目的

ポリグルタミン (PolyQ) 病では, 伸長 PolyQ 鎖を持つ変異蛋白質が構造変化 (conformational change) を生じて自己重合し, その結果, 難溶性のアミロイド様凝集体を形成し, 神経細胞内に封入体として認められる. この封入体形成は細胞の防御的反応の結果であり, 初期に生じる可溶性の重合体(二量体や多量体)に強い細胞障害性があると考えられ(重合体毒性仮説), 我々もそれを明らかにしてきた (Takahashi T, *et al. Human Mol Genet* 17:345-356, 2008). この PolyQ 鎖の重合特性と細胞障害性の関係から, 本症において重合体形成を阻害するような分子標的治療の開発が期待できる. 本研究では, ポリグルタミン病の新規治療薬の開発を目的として, 変異蛋白質の重合体形成を阻害する低分子化合物のスクリーニングを可能とする新たな細胞系を確立する. 本細胞系を用いて, 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実施し, 候補化合物を選定する.

B. 研究方法

Protein-fragment complementation assay (PCA) 法を応用し, 本邦で最も多い PolyQ 病であるマチャド・ジョセフ病の原因蛋白質 Ataxin-3 の重合体形成のモニタリングを可能とする新たな細胞系を確立した. PCA 法は, 生細胞内で蛋白質間結合を鋭敏な感度で検出できる優れた手法で, 近年様々な研究領域で応用されている. 二つに断片化された N 末側と C 末側のリポーター蛋白質 (例えば, 黄色蛍光蛋白質 YFP やホタル・ルシフェラーゼ蛋白質) を各々融合した Ataxin-3 蛋白質を一つの細胞内で共発現させ, Ataxin-3 が重合体(二量体~多量体)を形成すると, 不活性な断片型リポーター蛋白質が会合して活性型となり, Ataxin-3 の重合体形成を検出できるという原理に基づいている (図 1). ホタル・ルシフェラーゼ (firefly luciferase) をリポータータンパク質とした細胞系を用いて, FDA 認可の低分子化合物ライブラリ (MS2,000 および NCC450, 計 2,140 化合物) の中から重合体形成を阻害する化合物のスクリーニングを行った (図 2).

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験, 動物実験は, 新潟大学当該

委員会に研究計画を提出の上、実験の承認を得た上で、法令を遵守して実施した。

C&D. 研究結果および考察

ホタル・ルシフェラーゼ断片をリポーターとして用いたPCA法 (Firefly luciferase-PCA法) において、(1) 異常伸長したポリグルタミン鎖を有する変異Ataxin-3蛋白は野生型Ataxin-3に比べ重合体を形成しやすいことを確認した(図3)。さらに、(2) ポリグルタミン病の動物モデルで神経変性を抑制することが報告されている既知化合物が、Ataxin-3の総蛋白量に影響することなく、分子シャペロンの発現誘導を介して重合体形成を阻害した。

本法を用いて、FDA承認済み化合物ライブラリー (MS2,000およびNCC450)の大規模スクリーニングを行い、重合体形成阻害効果を示す複数の候補化合物を選定した(図4)。

E. 結論

ポリグルタミン病の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阻害する化合物のスクリーニングを可能とする新たな細胞系を確立した。本法を用いてFDA認可の低分子化合物の大規模スクリーニングを実施し、複数の有望な化合物を選定した。今後、モデル線虫やモデル動物を用いてその有効性を検証する。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tada M, Nishizawa M, Onodera O. Redefining cerebellar ataxia in degenerative ataxias: lessons from recent research on cerebellar systems. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015 Jan 30. doi: 10.1136/jnnp-2013-307225.

- 2) 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.
- 3) 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.

2. 学会発表

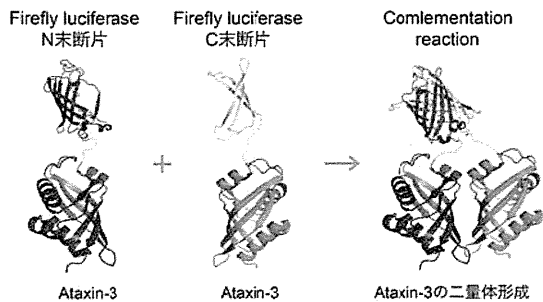
- 1) 他田正義, 付永娟, 会田泉, 他田真理, 武田茂樹, 豊島靖子, 中島孝, 内藤明彦, 高橋均, 小野寺理, 西澤正豊. SCARB2 変異を認めた進行性ミオクロームステんかん 2剖検例の臨床病理・生化学的解析. 第55回日本神経学会学術大会. 福岡, 2014年5月23日.
- 2) 徳永純, 他田正義, 永井貴大, 小野寺理, 西澤正豊. iPatax: 小脳性運動失調の新たな定量評価法. 第55回日本神経学会学術大会. 福岡, 2014年5月21日.
- 3) Tada M, Tokunaga J, Nagai T, Nishizawa M, Onodera O. iPatax: A new method for quantitative assessment for motor coordination of ataxia. *AAN Annual Meeting 2014*. Philadelphia, PA, 2014/05/01.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

(特許取得・実用新案登録・その他)

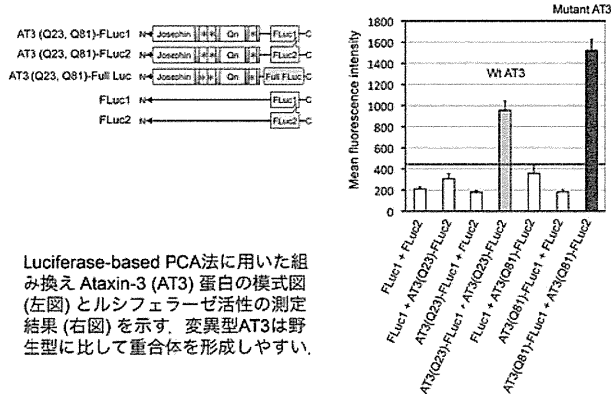
とくになし

図1. Protein-fragment complementation assay (PCA) 法の原理



Ataxin-3 の二量体形成により Firefly luciferase の N末および C末断片が会合して活性型 Firefly luciferase となり、リポーター活性を発揮する。

図3. Luciferase-based PCA 法による培養細胞内での重合体形成の検出

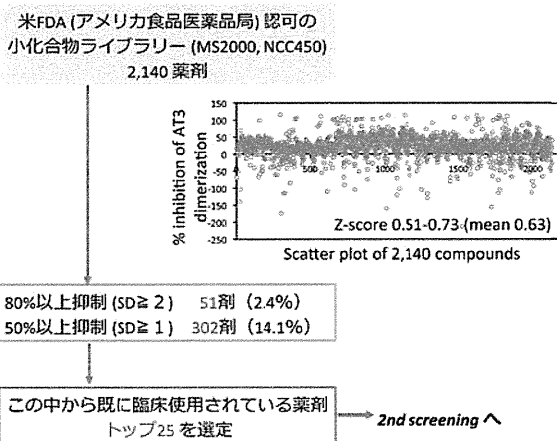


Luciferase-based PCA法に用いた組み換え Ataxin-3 (AT3) 蛋白の模式図(左図)とルシフェラーゼ活性の測定結果(右図)を示す。変異型AT3は野生型に比して重合体を形成しやすい。

図2. Luciferase-PCA法を用いた一次スクリーニングの概要

- ✓ Luciferase-based PCA system
 - stable HEK293 cell lines,
- ✓ 384-well plate format; Cell density, 20,000 cells/well
- ✓ Compounds library,
 1. MS2,000 Spectrum (FDA approved drug collection)
 - 70 (3.5%) 農業使用
 - 343 (17.15%) 実験レベルでの生物学的活性
 - 629 (31.45%) 天然生成物・その誘導体
 - 958 (47.9%) ヒトで臨床使用
 2. NIH Clinical Collection (NCC) 450
 - 450 (100%) ヒトで臨床使用
- ✓ Control drug, 5 μM 17-AAG, 4-h treatment
- ✓ Luciferase assay, Steady-Glo (Promega)
- ✓ Viability/Cytotoxicity assay, CellTiter-Fluor (Promega)

図4. PCA法を用いた一次スクリーニングの結果



プリオノイド蛋白質の伝播阻害による治療法開発

担当責任者：長谷川 隆文 東北大学大学院医学系研究科 講師

研究要旨

プリオノイド蛋白の凝集・伝播現象に着目し、近年明らかとなった家族性パーキンソン病（PD）遺伝子のうち、エンドソーム機能と関連すると予想される DNAJC13 遺伝子異常による小胞輸送・ α シヌクレイン蛋白吸収・分泌への影響を観察した。

A. 研究目的

パーキンソン病（PD）や筋萎縮性側索硬化症（ALS）などの神経コンフォメーション病を対象とし、異常凝集（プリオノイド）蛋白伝播の分子機構を解明するとともに、同蛋白の凝集・伝播を標的とした分子標的治療薬を開発することを目的とする。

B. 研究方法

②プリオノイド蛋白質の伝播阻害による治療法開発

a. プリオノイド蛋白質の分泌・取込み阻害

今年度は、大腸菌にて野生型/変異型 TDP-43 蛋白質を発現させ、アフィニティー精製を行った。培養細胞実験系にて、精製組換え TDP-43 蛋白質の細胞内取込みの検討を開始した。

野生型および N855S 変異型 GFP タグ付き DNAJC13 発現コンストラクトを作成し、電気穿孔法により同遺伝子を導入した COS7 細胞を作成した。これらの細胞を用い、(1) OptiPrep 密度勾配遠心分離により、エンドソーム画分での分布変化を観察した。続いて (2) 共焦点レーザー顕微鏡下に、トランスフェリン、EGF、Shiga toxin B subunit などのレファレンス分子の挙動を観察し、小胞輸送異常を評価した。併せて、(3) Alexa555 標識組換えヒト α シヌクレイン (α S) 蛋白を培地に添加し (5 μ M, 0-2 時間) 上記細胞へ取り込ませ、DNAJC13 変異による α S 分子の吸収・分泌への影響を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞を用いた基礎研究であるため、特別な配慮は行っていない。

C. 研究結果

②プリオノイド蛋白質の伝播阻害による治療法開発

a. プリオノイド蛋白質の分泌・取込み阻害

今年度は、野生型/変異型 TDP-43 蛋白質の精製系を樹立した。細胞内への取込みは検討中である。

密度勾配遠心下において、N855S 変異型 DNAJC13 蛋白は野生型と比べ、高密度分画側に分布が変異し、これと併せてエンドソーム関連分子 Rab7、Rab11 の分布も変動していた。また、変異 DNAJC13 発現細胞では、トランスフェリン、 α S の初期エンドソームから細胞表面へのリサイクリングが停滞していた。

D. 考察

DNAJC13 遺伝子異常は細胞内小胞輸送系のうち、リサイクリング経路を障害すること、さらに同異常により、 α S の細胞内蓄積を誘導する可能性が示唆された。

E. 結論

DNAJC13 遺伝子変異は小胞輸送系の変調をもたらし、細胞毒性を有する α S の蓄積により神経変性に関与する可能性が考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shoji Y, Nishio Y, Baba T, Uchiyama M, Yokoi K, Ishioka T, Hosokai Y, Hirayama K, Fukuda H, Aoki M, Hasegawa T, Takeda A, Mori E. Neural Substrates of Cognitive Subtypes in Parkinson's Disease: A 3-Year Longitudinal Study. *PLoS One*9(10), e110547, (2014).
- 2) Sugeno N, Hasegawa T, Tanaka N, Fukuda M, Wakabayashi K, Oshima R, Konno M, Miura E, Kikuchi A, Baba T, Anan T, Nakao M, Geisler S, Aoki M, Takeda A. Lys-63-linked Ubiquitination by E3 Ubiquitin Ligase Nedd4-1 Facilitates Endosomal Sequestration of Internalized α -Synuclein. *J Biol Chem* 289: 18137-51 (2014)

2. 学会発表

- 1) 長谷川隆文. Retromer dysfunction as an emerging mechanisms of Parkinson's disease. 第 37 回 日本神経科学会 (H26.9.11-13、横浜)
- 2) 長谷川隆文. Functional ESCRT machinery is required for the clearance of aggregate-prone proteins associated with neurodegenerative diseases. *4th Asian and Oceanian Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress* (2014.11.28, Pattaya, Thailand)
- 3) 長谷川隆文. How does exogenous alpha-synuclein get access to the endogenous alpha-synuclein proteins? *MDS course Alpha-Synuclein: The Gateway to Parkinsonism* (2015.2.12, Innsbruck, Austria)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

プリオノイド蛋白質の高感度検出による疾患バイオマーカー開発

担当責任者：徳田 隆彦 京都府立医科大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

α -シヌクレイン(α S)を定量する ELISA 系の confounding factor として heterophilic antibody(HA)の重要性を検討した。HA は我々の開発した α S-ELISA 系における α S の定量値に大きく影響し、とくに血漿中の α S を測定する場合にその影響が大きかった。今後、髄液・血漿などの生体試料中の α S および α S オリゴマーのバイオマーカーとしての有用性を検討する場合は、常に HA の影響を考慮する必要がある。また、HA の影響を適切に除外すれば、血漿中 α S 値は PD の診断バイオマーカーとして有用である可能性がある。

A. 研究目的

α -シヌクレイン(α S)および α Sオリゴマーを定量する ELISA 系の confounding factor として heterophilic antibody(HA)の重要性を検証する。

(倫理面への配慮)

対象とした患者からは、京都府立医科大学倫理委員会で承認された方法によりインフォームドコンセントを得た上で、検体の採取を行った。

B. 研究方法

③プリオノイド蛋白質の高感度検出による疾患バイオマーカー開発

a. 髄液中プリオノイド蛋白質の高感度検出

1) 対象

京都府立医科大学神経内科で確定診断された PD 患者 30 例および 58 例の age-match した疾患対照者から採取した血漿および髄液を用いて検討を行った。

2) 方法

i) 既に徳田らが開発している α S 定量 ELISA 系において、まずはリコンビナント α S の希釈系列を用いて、HA 阻害薬(HAI)が我々のサンドイッチ ELISA 系自体を阻害しないかどうかの検討をおこなった。

ii) 68 例(PD 群 23 例、対照群 45 例)のサンプルを用いて、5%HAI を添加したものとしなもので、 α S-ELISA の信号が変化するか否かを検討した。

iii) 5%HAI を添加して HA を阻害した条件下で、髄液および血漿中の α S 濃度を PD 群と対照群とで比較検討した。

C. 研究結果

③プリオノイド蛋白質の高感度検出による疾患バイオマーカー開発

a. 髄液中プリオノイド蛋白質の高感度検出

方法 i)の検討で、最終測定サンプル中の HAI の濃度が 50%,16.7%の場合は ELISA で得られる信号強度が低下したが、5%の場合は信号強度が低下せず、 α S-ELISA の反応を阻害しないことがわかった。

また、方法 ii)の検討により、5%HAI の添加によって、我々の α S-ELISA で定量した髄液での α S 信号強度は 68 例中 48 例で上昇し、20 例で低下した。HAI なしで 50ng/ml 以上の α S 値をとったサンプルでは全例で低下した。

血漿中の α S 信号に関しては、68 例中 66 例で低下した。上昇した 2 例はいずれも PD 群でかつ 40ng/ml 以下のサンプルであった。

方法 iii)の検討では、血漿中 α S 値は PD 群では、対照群と比較してに有意に低値であった($p=0.03$)。髄液中 α S 値の比較では、PD 群では対照群と比較して平均値は低値であったが、有意ではなかった($p=0.25$)。

D. 考察

今回我々は、 α S 定量系において、微量タンパク質定量を行う上で考慮しなければならない HA の影響について検討を行った。今回の検討では、この分野で標準的な試薬となっている MABTECH 社の HAI(ELISA diluent)を使用した、濃度が 5% であれば、我々の ELISA の反応を阻害することなく α S の定量が可能であった。HAI を用いる場合には、個々の ELISA 系において、その適切な濃度を検討する必要があると考えられた。HAI 添加の有無によって我々の α S-ELISA 系で信号強度が変化するか否かの検討では、とくに血漿では α S 信号強度がほとんどのサンプルで低下し、これは HA による偽陽性反応が HAI によって阻害されたことによると考えられた。HAI 添加なしで測定した結果が 50ng/ml 以上の α S 値をとったサンプルでは全て信号強度が減少し、その結果、髄液および血漿中の α S 濃度は、全て 0 ng/ml から 60ng/ml までの間に収まることとなった。さらに、HAI を添加して HA による偽陽性反応を抑制した条件下では、血漿中の α S 濃度は、対照群と比較して、PD 群で有意に低値であった。したがって、HA の影響を適切に除外すれば、血漿中 α S 値は PD の診断バイオマーカーとして有用である可能性が考えられた。

E. 結論

HA は α S-ELISA 系における α S の定量値に大きく影響し、とくに血漿中の α S を測定する場合にその影響が大きかったが、髄液中 α S の定量においても HA は重要な confounding factor であった。今後、髄液・血漿などの生体試料中の α S および α S オリゴマーを定量して、バイオマーカーとしての有用性を検討する場合は、常に HA の影響を考慮する必要がある。また、HA の影響を適切に除外すれば、血漿中 α S 値は PD の診断バイオマーカーとして有用である可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kasai T, Tokuda T, Ishii R, Ishigami N, Tsuboi Y, Nakagawa M, Mizuno T, El-Agnaf OMA: Increased α -synuclein levels in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol.* 2014; 261(6): 1203-1209.
- 2) Ishii R, Tokuda T, Tatebe H, Ohmichi T, Kasai T, Nakagawa M, Mizuno T, El-Agnaf OMA: Decrease in plasma levels of α -synuclein is evident in patients with parkinson's disease after elimination of heterophilic antibody interference. *PLoS ONE* 2015 (in press)
- 3) Tsujimura A, Taguchi K, Watanabe Y, Tatebe H, Tokuda T, Mizuno T, Tanaka M: Lysosomal enzyme cathepsin B enhances the aggregate forming activity of exogenous α -synuclein fibrils. *Neurobiol Dis.* 2014; 73C: 244-253.
- 4) Takeuchi T., Popiel H.A., Futaki S., Wada K., *Nagai Y. Peptide-based therapeutic approaches for treatment of the polyglutamine diseases. *Curr. Med. Chem.* 21(23): 2575-2582 (2014)

2. 学会発表

- 1) Tokuda T: Biochemical biomarkers for Parkinson's disease and related disorders, 13th International Parkinson's Disease Symposium in Takamatsu, 高松, 2014.2.22. Minakawa et al. Investigating the role of ubiquitin-2 in the pathomechanism of ALS/FTD. *GRC on Neurobiol Brain Dis* (Jul 27-Aug 1, 2014, Girona, Spain)
- 2) Tokuda T: Which biomarkers may be useful as objective outcome measures for clinical trials? 18th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Stockholm, 2014.6.12.
- 3) 徳田隆彦: 神経疾患をバイオマーカーで診断? 第44回新潟神経学夏期セミナー, 新潟, 2014.8.2.
- 4) Tatebe H, Tokuda T, Ishi R, Kasai T, Mizuno T: α -Synuclein is present as a monomer in CSF. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 横浜, 2014.9.13.
- 5) Tokuda T: Extracellular α -synuclein species: usefulness as a biomarker for Parkinson's disease, and their degradation system. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 横浜, 2014.9.13.
- 6) 徳田隆彦, 近藤正樹, 松島成典, 水野敏樹, 中川正法: [F-18]-FDDNP-PET によるパーキンソン症候群の鑑別診断. 日本認知症学会学術集会(第33回), 横浜, 2014.12.1.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「プリオノイド蛋白質の凝集・伝播を標的とした神経コンフォメーション病の治療法開発」

国立精神・神経医療研究センター 永井 義隆

1. 学会等における口頭・ポスター発表

| 発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別） | 発表者氏名 | 発表した場所（学会等名） | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|--|---|--|-------------|--------|
| Misfolding and aggregation of the polyglutamine protein and its suppression by intercellular transmission of molecular chaperone. (口頭) | <u>Nagai Y.</u> | Hungary-Japanese Symposium on Mechanism and regulation of aberrant protein aggregation | 2014.11.19. | 国外 |
| Investigating the Role of Ubiquilin-2 in the Pathomechanism of ALS/FTD. (ポスター) | Minakawa E.N., Sharkey L.M., Chen K.-C., Thayer M., Lyons J., Ivanova M., Wada K., <u>Nagai Y.</u> , Paulson H.L. | Gordon Research Conference on Neurobiology of Brain Disorders | 2014.7.27. | 国外 |
| Dysfunction of microtubule-dependent transport triggers oligomerization and cytoplasmic accumulation of TDP-43, leading to neurodegeneration. (ポスター) | <u>Nagai Y.</u> , Fujikake N., Kimura N., Saitoh Y., Hatanaka Y., Onodera O., Wada K. | CSHL 2014 Neurodegenerative Diseases meeting: Biology & Therapeutics | 2014.12.4. | 国外 |
| p62 plays a protective role in the autophagic degradation of polyglutamine protein oligomers in polyglutamine disease model flies. (ポスター) | Saitoh Y., Fujikake N., Okamoto Y., Wada K., <u>Nagai Y.</u> | CSHL 2014 Neurodegenerative Diseases meeting: Biology & Therapeutics | 2014.12.4. | 国外 |
| Expanded UGGAA repeat RNA associated with SCA31 causes progressive neurodegeneration in <i>Drosophila</i> . (ポスター) | Ishiguro T., Fujikake N., Sato N., Ueyama, M., Mizusawa H., Wada K., <u>Nagai Y.</u> , Ishikawa K. | CSHL 2014 Neurodegenerative Diseases meeting: Biology & Therapeutics | 2014.12.4. | 国外 |
| 2光子 in vivo イメージング解析による SCA1 マウスにおけるシナプス異常の解明(口頭) | <u>永井義隆</u> 、畑中悠佑、和田圭司 | 第 55 回 日本神経学会学術大会 | 2014.5.21. | 国内 |
| DCTN1 依存的輸送の障害は TDP-43 のオリゴマー形成を促進する(口頭) | 藤掛伸宏、木村展之、長野清一、斉藤勇二、横関明男、小野寺理、和田圭司、 <u>永井義隆</u> | 第 55 回 日本神経学会学術大会 | 2014.5.21. | 国内 |
| ポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する(口頭) | 鈴木マリ、藤掛伸宏、和田圭司、 <u>永井義隆</u> | 第 55 回 日本神経学会学術大会 | 2014.5.21. | 国内 |

| | | | | |
|---|---|--------------------|-------------|----|
| ポリグルタミン病モデルにおいて p62 はオートファジー分解系を介して保護的に作用する(口頭) | 斉藤勇二、藤掛伸宏、岡本佑馬、和田圭司、 <u>永井義隆</u> | 第 55 回 日本神経学会学術大会 | 2014.5.21. | 国内 |
| Investigating the Role of Ubiquilin-2 in the Pathomechanism of ALS/FTD. (口頭) | Minakawa E.N., Sharkey L.M., Chen K.-C., Thayer M., Lyons J., Ivanova M., Wada K., <u>Nagai Y.</u> , Paulson H.L. | 第 55 回 日本神経学会学術大会 | 2014.5.21. | 国内 |
| FUS-ALS モデルショウジョウバエの表現型を修飾する因子の探索(ポスター) | 東裕美子、徳田隆彦、京谷茜、吉田誠克、水田依久子、水野俊樹、中川正法、藤掛伸宏、上山盛夫、 <u>永井義隆</u> 、山口政光 | 第 55 回 日本神経学会学術大会 | 2014.5.21. | 国内 |
| VPS35 障害はカテプシン D 活性低下を介し α シヌクレイン蓄積・神経変性を惹起する(ポスター) | 三浦永美子、長谷川隆文、今野昌俊、菅野直人、大嶋龍児、菊池昭夫、鈴木マリ、 <u>永井義隆</u> 、武田篤、青木正志 | 第 55 回 日本神経学会学術大会 | 2014.5.21. | 国内 |
| SCA31 (UGGAA)n リピートはショウジョウバエで進行性神経障害を引き起こす(ポスター) | 石黒太郎、石川欽也、藤掛伸宏、上山盛夫、 <u>永井義隆</u> 、和田圭司、水澤英洋 | 第 55 回 日本神経学会学術大会 | 2014.5.21. | 国内 |
| 神経変性疾患モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する(口頭) | 鈴木マリ、Anne-Marie Neumann、斉藤勇二、藤掛伸宏、和田圭司、 <u>永井義隆</u> | 第 37 回 日本神経科学学会 | 2014.9.11. | 国内 |
| p62/SQSTM1 はポリグルタミン病モデルショウジョウバエにおいて、ポリグルタミン蛋白質凝集体をオートファジー分解系で除去することで保護的役割を果たす(口頭) | 斉藤勇二、藤掛伸宏、岡本佑馬、和田圭司、 <u>永井義隆</u> | 第 37 回 日本神経科学学会 | 2014.9.11. | 国内 |
| Investigating the Role of Ubiquilin-2 in the Pathomechanism of ALS/FTD. (口頭) | Minakawa E.N., Sharkey L.M., Chen K.-C., Thayer M., Lyons J., Ivanova M., Wada K., <u>Nagai Y.</u> , Paulson H.L. | 第 37 回 日本神経科学学会 | 2014.9.11. | 国内 |
| 異常伸長 UGGAA リピート RNA はショウジョウバエにおいて神経毒性を引き起こす(口頭) | 石黒太郎、藤掛伸宏、佐藤望、水澤英洋、和田圭司、 <u>永井義隆</u> 、石川欽也 | 第 37 回 日本神経科学学会 | 2014.9.11. | 国内 |
| GGGGCC リピート RNA を発現する新規 ALS モデルショウジョウバエの樹立と病態解析(口頭) | 上山盛夫、石黒太郎、藤掛伸宏、今野卓哉、小山哲秀、小野寺理、和田圭司、 <u>永井義隆</u> | 第 86 回 日本遺伝学会大会 | 2014.9.17. | 国内 |
| 微小管依存的 TDP-43 輸送の障害はオリゴマー形成を促進し、神経変性を惹き起こす(ポスター) | <u>永井義隆</u> 、藤掛伸宏、木村展之、長野清一、斉藤勇二、小野寺理、和田圭司 | 第 33 回 日本認知症学会学術集会 | 2014.11.29. | 国内 |

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

| 掲載した論文（発表題目） | 発表者氏名 | 発表した場所 （学会誌・雑誌等名） | 発表した 時期 | 国内・外 の別 |
|---|---|---------------------------------|------------|------------|
| p62 plays a protective role in the autophagic clearance of polyglutamine aggregates in polyglutamine disease model flies. | Saitoh Y., Fujikake N., Okamoto Y., Popiel H.A., Hatanaka Y., Ueyama M., Suzuki M., Gaumer S., Murata M., Wada K., <u>Nagai Y.</u> | J Biol Chem 290(3): 1442-1453 | 2015 | 国外 |
| VPS35 dysfunction causes retromer depletion and impairs lysosomal degradation of α -synuclein, leading to exacerbation of α -synuclein neurotoxicity in <i>Drosophila</i> . | Miura E., Hasegawa T., Konno M., Suzuki M., Sugeno N., Fujikake N., Geisler S., Tabuchi M., Oshima R., Kikuchi A., Baba T., Wada K., <u>Nagai Y.</u> , Takeda A., Aoki M. | Neurobiol Dis 71: 1-13 | 2014 | 国外 |
| Identification of <i>ter94</i> , <i>Drosophila VCP</i> , as a strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of <i>Caz</i> , <i>Drosophila FUS</i> . | Azuma Y., Tokuda T., Shimamura M., Kyotani A., Sasayama H., Yoshida T., Mizuta I., Mizuno T., Nakagawa M., Fujikake N., Ueyama M., <u>Nagai Y.</u> , Yamaguchi M. | Hum Mol Genet 23(13): 3467-3480 | 2014 | 国外 |
| Peptide-based therapeutic approaches for treatment of the polyglutamine diseases. | Takeuchi T., Popiel H.A., Futaki S., Wada K., <u>Nagai Y.</u> | Curr Med Chem 21(23): 2575-2582 | 2014 | 国外 |
| その他の FTLD—異常蛋白の視点から | 上山盛夫、藤掛伸宏、 <u>永井義隆</u> | Clin Neurosci 33 (3): 312-314 | 2015 | 国内 |
| ポリグルタミン病における神経変性 | <u>永井義隆</u> | BRAIN MEDICAL 26 (3): 225-229 | 2014 | 国内 |

学 会 等 発 表 実 績

委託業務項目「プリオノイド蛋白質の凝集阻害による治療法開発」

新潟大学脳研究所 小野寺 理

1. 学会等における口頭・ポスター発表

| 発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別） | 発表者氏名 | 発表した場所（学会等名） | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|---|--|-------------------------|-----------|--------|
| SCARB2 変異を認めた進行性ミオクローヌステんかん 2 剖検例の臨床病理・生化学的解析（口演） | 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 | 第 55 回日本神経学会学術大会 | 2014.5.23 | 国内 |
| iPatax : 小脳性運動失調の新たな定量評価法 | 徳永純, 他田正義, 永井貴大, 小野寺理, 西澤正豊 | 第 55 回日本神経学会学術大会 | 2014.5.21 | 国内 |
| iPatax: A new method for quantitative assessment for motor coordination of ataxia | Tada M, Tokunaga J, Nagai T, Nishizawa M, Onodera O. | AAN Annual Meeting 2014 | 2014.5.1 | 国外 |

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

| 掲載した論文（発表題目） | 発表者氏名 | 発表した場所（学会誌・雑誌等名） | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|---|--------------------------------|--|-----------|--------|
| Redefining cerebellar ataxia in degenerative ataxias: lessons from recent research on cerebellar systems | Tada M, Nishizawa M, Onodera O | J Neurol Neurosurg Psychiatry | 2015.1.30 | 国外 |
| IP3 Receptors in Neurodegenerative Disorders: Spinocerebellar Ataxias and Huntington's and Alzheimer's Diseases | Tada M, Nishizawa M, Onodera O | Norbert Weiss, ed. in Pathologies of Calcium Channels579-600 | 2014; | 国外 |