

神経変性疾患の克服を目指して



医療と技術

永井義隆*

Toward establishment of therapy for neurodegenerative diseases

Key Words : Neurodegenerative diseases, Protein misfolding, Aggregation, Noncoding repeat diseases, Repeat Associated Non-ATG translation

はじめに

大阪大学大学院医学系研究科 神経難病認知症探索治療学寄附講座は、神経内科学（望月秀樹教授）を親講座として、難治性神経変性疾患や認知症に対する病態解明、診断治療法の開発研究を推進するために、平成28年1月に開設された寄附講座です。

本講座の特徴としては、医学系以外に、理学系、薬学系、農学系など様々なバックグラウンドのメンバーが集い、医学的視点のみならずより広い視野から研究を推進できる点が挙げられます。さらに実験技術も、タンパク質構造解析、培養細胞などの分子細胞生物学的 *in vitro* 解析、様々な疾患モデル動物（ショウジョウバエ、マウス、マーマセット）を用いた *in vivo* 解析、さらに化合物スクリーニングなど多彩な技術を駆使して、幅広く研究を行っています。特にショウジョウバエは国内最大規模の100種以上の疾患モデルバンクを整備して、全国的に共同研究を展開しています。開設当初は、10名でスタートしましたが、今年4月には教授1名、講師1名、特任助教3名、特任研究員2名、大学院生6名、技術員4名、秘書1名の総勢18名を数えるまでになりました。前所属の国立精神・神経医療研究センターにもグループがあり、研究員1名、技術員1名が一緒に研究を行っています。もちろん親講座である神経内科学とも協力して、臨床的な視点も踏まえて幅

広く神経変性疾患の研究を行っています。

神経変性疾患とタンパク質ミスフォールディング・凝集

アルツハイマー病、パーキンソン病、脊髄小脳変性症、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭葉変性症などに代表される神経変性疾患は、それぞれ特有の領域の神経細胞が原因不明で進行性に変性・脱落し、様々な神経・精神症状を呈する一群の疾患群と定義されていました。従来の病理学的・生化学的解析から、アルツハイマー病では老人斑および神経原線維変化、パーキンソン病ではレビー小体など様々なタンパク質封入体が脳内に蓄積することが明らかにされました。しかし、これらの脳内のタンパク質封入体が神経変性発症の原因であるのか、単なる神経変性の結果にすぎないのかは長い間未解明でした。

1990年代からの分子遺伝学的解析の飛躍的な進展により、遺伝性神経変性疾患の原因遺伝子が次々に同定され、引き続き変異遺伝子の分子生物学的解析から、実に驚くべきことに、産生される変異タンパク質の多くがミスフォールディングし易く凝集性の高い性質を持つことが明らかにされました。これらの遺伝性疾患のみならず、孤発性疾患においても様々な凝集タンパク質が封入体として神経細胞内外に蓄積していることから、タンパク質のミスフォールディング・凝集により共通に神経変性が引き起こされると考えられるようになりました。注目すべきことに、このような凝集タンパク質はアミノ酸配列が全く異なるにも関わらず、いずれも β シート構造に富んだアミロイド線維状凝集体を形成することが明らかにされました。さらに、これらの疾患原因タンパク質を発現する様々な遺伝子改変動物モデルにおいても、やはり原因タンパク質が凝集・蓄積して神経変性を再現できることが実験的に証明されまし



* Yoshitaka NAGAI

1965年11月生まれ
大阪大学大学院 医学系研究科
(1995年)

現在、大阪大学大学院 医学系研究科
神経難病認知症探索治療学 寄附講座
教授 医学博士

TEL : 06-6879-3564

FAX : 06-6879-3569

E-mail : nagai@neurother.med.osaka-u.ac.jp

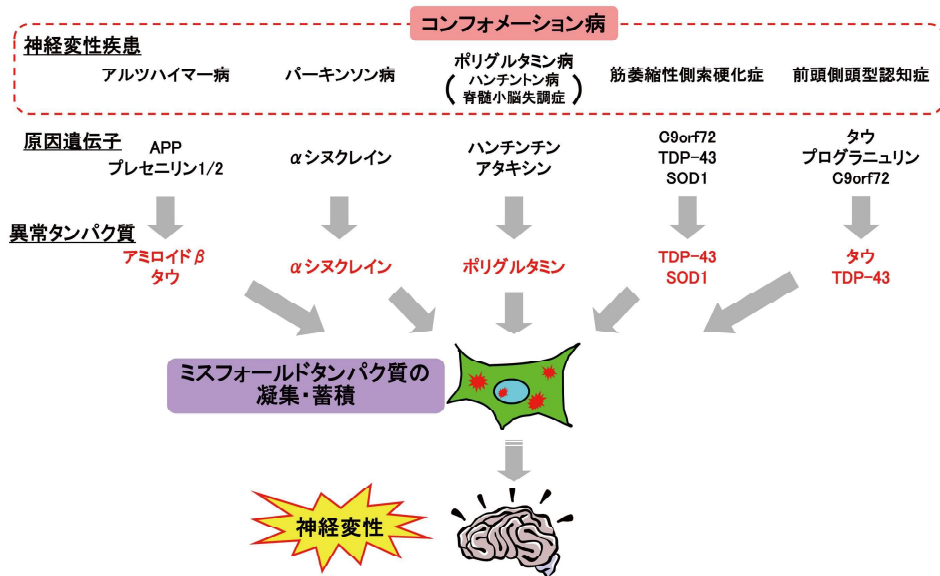


図1. 神経変性疾患共通の発症分子メカニズムとしてのタンパク質ミスフォールディング・凝集

た。以上のことから、これらの多彩な神経変性疾患において、いずれもタンパク質のミスフォールディング・凝集により毒性を獲得し、神経変性を引き起こすという広く共通の発症分子メカニズムが想定され、コンフォメーション病もしくはミスフォールディング病と総称されるようになりました (図1)。

ポリグルタミン病に対するタンパク質ミスフォールディング・凝集を標的とした治療法開発

上述のように、遺伝性神経変性疾患の原因遺伝子が次々に同定された結果、実に驚くべきことに、ハンチントン病、脊髄小脳失調症 (SCA) 1、2、3、6、7、17型、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、球脊髄性筋萎縮症の9疾患において、それぞれ別の原因遺伝子内にあるグルタミンをコードするCAGリピート配列の異常伸長という共通の遺伝子変異が発見され、これらはポリグルタミン (PolyQ) 病と総称されています。このCAGリピート配列は、健常人では約4-35回のリピートですが、PolyQ病患者では約35-40リピートから100リピート以上と異常伸長しており、その閾値はこれらの疾患でおおむね共通しています。そして、CAGリピート数と疾患の発症年齢・重症度とが強く相関することが知られています。また、これらの原因タンパク質は、PolyQ鎖以外には一次構造的、機能的にも相同性が認められません。さらに多くの疾患が優性遺伝性で一つの対立遺伝子の変異のみで発症することから、PolyQ病で

は異常伸長PolyQ鎖自身が原因タンパク質の生理的機能とは無関係に神経毒性を獲得 (gain of toxic function) して、共通のメカニズムで発症すると考えられています。

その発症メカニズムとしては、PolyQ鎖の異常伸長により変異タンパク質がミスフォールディング・凝集しやすくなり、神経細胞内に封入体として蓄積し、その結果、細胞レベル・個体レベルで様々な機能異常を引き起こし、最終的に神経変性を引き起こすと考えられています。私は、1) 環境要因の寄与が少なくほぼ遺伝的要因のみにより発症することから、遺伝子変異に基づく分子生物学的な解析に適しており、2) さらにPolyQ鎖長が神経毒性と強く相関することから、早期に発症する遺伝子改変実験モデルの作製に適しているという特徴から、PolyQ病に着目し、タンパク質ミスフォールディング・凝集による共通の神経変性メカニズムの解明、治療法の開発を目指して研究を行っています (Takeuchi et al. *Brain Sci* 2017)。

1997年に、アメリカ・ノースカロライナ州にあるDuke大学神経内科にポスドク研究員として留学するチャンスを得て、本格的な基礎研究を開始しました。私は、PolyQ病の発症カスケードの最も上流に位置する異常伸長PolyQタンパク質のミスフォールディング・凝集が治療標的として最適であると考え、異常伸長PolyQ鎖に特異的に結合する分子によって阻害できる可能性を考えました。ファージディスプレイ

プレイ法を用いてランダムペプチドライブラリーからのスクリーニングを行った結果、異常伸長 PolyQ 鎖に特異的に結合するペプチド QBP1 (SNWKWWPGIFD) を同定しました (Nagai et al. *J Biol Chem* 2000)。そして、QBP1 が実際に異常伸長 PolyQ タンパク質の凝集体形成を阻害して、細胞毒性を抑制することを明らかにしました。帰国後、2001 年に大阪大学大学院医学系研究科 臨床遺伝学 (戸田達史教授) に助手として着任し、ショウジョウバエモデル実験系を立ち上げ、QBP1 の発現により PolyQ 病モデルショウジョウバエの神経変性が抑制されることを示し、*in vivo* での治療効果を明らかにしました (Nagai et al. *Hum Mol Genet* 2003)。そして、QBP1 に細胞膜透過性ペプチド PTD を付加した PTD-QBP1 を体外から投与することにより、PolyQ 病モデルショウジョウバエ、マウスに対する治療効果を明らかにし、実験的分子治療の可能性を示しました (Popiel et al. *Mol Ther* 2007)。さらに、QBP1 の作用メカニズムを明らかにするために、異常伸長 PolyQ タンパク質の詳細な構造解析を行いました。その結果、異常鎖長 PolyQ タンパク質はモノマーレベルで β シート構造への異常コンフォメーション変移を生じてアミロイド線維状凝集体を形成し、 β シート構造への構造変移により細胞毒性を獲得することを見出しました (Nagai et al. *Nat Struct Mol Biol* 2007)。そして、QBP1 は異常伸長 PolyQ タンパク質の毒性 β シート構造変移を阻害することを明らかにしました。これらの結果から、ミスフォールドタンパク質は、露出した β シート構造を介して神経毒性を獲得する一方で、難溶性アミロイド状凝集体への重合により分解抵抗性を獲得して、両者が神経変性疾患の発症に寄与するという、露出 β シート仮説を提唱しました (Nagai et al. *Curr Pharm Des* 2008)。

これまで得られた知見を基に、より高い生体内・脳内移行性が期待される低分子化合物からの創薬を目指して、PolyQ 凝集阻害化合物のスクリーニングを行いました。約 46,000 化合物から約 100 種類の新規 PolyQ 凝集阻害化合物を同定し、このうち既存薬である QAI1 は、PolyQ 病モデルショウジョウバエにおける神経変性抑制効果を確認することができました。2008 年に国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第四部 (和田圭司部長) の

室長として異動後、さらに PolyQ 病モデルマウスを用いた有効性の検証を進め、QAI1 のヒト認可容量における治療効果を明らかにし、さらに神経症状の発症後からの投与でも有効性が確認できたことから (Minakawa et al. in submission)、現在新潟大学神経内科・小野寺理教授らと共に臨床応用を目指して PolyQ 病患者さんへの医師主導治験の準備を進めています。

一方、ペプチドや化合物などの体外からの投与による治療法に加えて、生体内のタンパク質ミスフォールディング・凝集に対する防御機構である分子シャペロンを応用した治療研究も行っています。実際に、PolyQ 病モデルマウス、ショウジョウバエに対する分子シャペロンの有効性が示されていることから、私たちは分子シャペロンの発現誘導を試みました。そして、熱ショック転写因子活性化剤 17-AAG が Hsp70 や Hsp40 などの分子シャペロン群の発現を誘導し、PolyQ 病モデルショウジョウバエの神経変性を抑制することを明らかにしました (Fujikake et al. *J Biol Chem* 2008)。さらに、PolyQ 病モデルマウスに対するウイルスベクターを用いた Hsp40 遺伝子治療の結果、ウイルス感染細胞のみならず、周囲の非感染細胞でも非細胞自律的 (non-cell autonomous) な治療効果も認めました (Popiel et al. *PLoS One* 2012)。引き続き、この分子シャペロンの非細胞自律的治療効果のメカニズムを解明するために、培養細胞、ショウジョウバエモデルを用いた細胞間相互作用解析を行ったところ、Hsp40 や Hsp70 などの分子シャペロンがエクソソームを介して細胞外に分泌され、別の細胞内の PolyQ 凝集体形成を抑制することを見出しました。さらに PolyQ 病モデルショウジョウバエにおいて、筋肉や脂肪などの末梢組織における Hsp70 や Hsp40 の発現により複眼変性が抑制されたことから、分子シャペロンはエクソソームを介した細胞間伝播により PolyQ 病に対する非細胞自律的な治療効果を発揮し、さらには個体レベルのプロテオスターシス維持機構に寄与することが示唆されました (Takeuchi et al. *PNAS* 2015)。

他方、ミスフォールドタンパク質凝集体の分解による治療へ向けて、オートファジーに着目した研究も行っています。タンパク質凝集体の分解には、基質タンパク質の解きほぐしが必要なユビキチン・プ

ロテアソーム系経路よりも、オートファゴソーム内に取り囲んで分解するオートファジー・リソソーム系経路の方がより適していると考えられます。私たちは、PolyQ病モデルショウジョウバエを用いて、オートファジー分解に関わるp62がPolyQタンパク質のオリゴマー様凝集体の分解に関わることを示しました (Saitoh et al. *J Biol Chem* 2015)。また、理化学研究所・貫名信行先生 (現同志社大学) との共同研究により、QBP1を応用して異常伸長PolyQタンパク質を選択的にシャペロン介在性オートファジーにより分解することで、PolyQ病モデルマウスへの有効性を明らかにしました (Bauer et al. *Nat Biotechnol* 2010)。今後、ミスフォールドタンパク質の選択的分解促進はPolyQ病のみならず、神経変性疾患の治療法開発へ向けて重要な治療戦略であると考えられます。

また、このような研究成果から将来的に導出される治療薬候補のより信頼性の高い前臨床レベルの薬効評価のために、霊長類モデルの創出が望まれています。前任の国立精神・神経医療研究センターは国内有数の霊長類実験施設を有しており、私たちは小型霊長類のマーマセットを用いて、世界初のPolyQ病遺伝子改変霊長類モデルの作出に成功しました (Tomioka et al. *eNeuro* 2017)。

ノンコーディングリピート病におけるリピート関連非ATG依存性に着目した病態解明と治療法開発

上述のように、多くの神経変性疾患に共通する発症メカニズムとして、タンパク質ミスフォールディング・凝集に着目し、ポリグルタミン病を中心にアルツハイマー病 (Minakawa et al. *Neurosci.Lett* 2017)、パーキンソン病 (Suzuki et al. *Hum Mol.Genet* 2015)、筋萎縮性側索硬化症などの研究を進めてきましたが、一部の遺伝性神経変性疾患においてタンパク質をコードしない非翻訳領域内の遺伝子変異が見つかっています。原因遺伝子の非翻訳領域内にあるリピート配列の異常伸長という共通の遺伝子変異により発症する、第9番連鎖性筋萎縮性側索硬化症/前頭側頭型認知症 (C9-ALS/FTD:GGGGCCリピート)、いくつかの脊髄小脳失調症 (SCA8:CTG、SCA31:TGGAA、SCA36:GGCCTG) などの一群の神経変性疾患はノンコーディングリピート病と総称されています。ノンコーディングリピート病では、転写された異常伸

長リピート配列を持つRNAが様々なRNA結合タンパク質と結合してRNA fociとして神経細胞内で凝集・蓄積し、異常RNA自身による毒性獲得 (RNA gain of function) もしくはRNA結合タンパク質の機能喪失によるRNA代謝障害 (RBP loss of function) による発症メカニズムが想定されています。さらに驚くべきことに、これらリピート配列は非翻訳領域に存在するにもかかわらず、この異常伸長リピートRNAを鋳型としてポリペプチドが翻訳されることが発見され、リピート関連非ATG依存性 (RAN: Repeat Associated Non-ATG) 翻訳と名付けられました。そして、RAN翻訳より産生されるポリペプチドが神経毒性を発揮することが明らかにされました。

私たちは、ノンコーディングリピート病の病態メカニズムの解明、治療法の開発を目指して、東京医科歯科大学神経内科・水澤英洋教授 (現国立精神・神経医療研究センター・理事長)、石川欽也講師 (現同ゲノム健康医療学分野・教授) らと共にSCA31の原因となる異常伸長UGGAAリピートRNAを発現するショウジョウバエモデルを作製しました。その結果、UGGAAリピートRNAはSCA31患者と同様にRNA fociを形成し、リピート関連翻訳による異常ペプチドの蓄積を伴って神経変性を引き起こすことを示しました。そして驚くべきことに、ALS/FTDの原因となるRNA結合タンパク質TDP-43がUGGAAリピートRNAと結合して、RNA凝集、リピート関連翻訳を抑制するRNAシャペロンとして働き、神経変性を抑制することを見出しました。一方、TDP-43を発現するALSモデルショウジョウバエにおいて、短いUGGAAリピートRNAの発現により、TDP-43の凝集、神経変性を抑制することを明らかにし、以上の結果から、RNAとRNA結合タンパク質間クロストークのバランスの破綻によりSCA31とALSの両病態が発症することが示唆されました (Ishiguro et al. *Neuron* 2017)。

おわりに

上述のように、神経変性疾患の研究は分子遺伝学的解析の発展を機に爆発的に進み、引き続き分子生物学解析から分子レベルでの病態が徐々に明らかになりつつあり、それらに基づいた様々な分子標的治療法の開発が進んでいます。私は、その中でも遺伝性疾患であるPolyQ病に着目して研究を進め、そ

これらの知見を基に孤発性疾患が多いアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの研究を展開してきました。一方で、孤発性疾患の病態には遺伝的要因のみならず環境要因が大きく寄与していますが、環境要因の研究は立ち遅れています。

当研究室では、これまで取り組んできた基礎的研究から得られた分子標的治療薬候補について、臨床研究へと展開して実用化を目指すと共に、今後は環境要因の中でも特に食事、運動、睡眠などのライフ

スタイル環境要因に着目して、患者の大多数を占める孤発性疾患の発症メカニズムの解明を進めていきたいと考えています。一方、これまで培ってきた経験をもとに、次代を担う人材の育成にも取り組んでいきたいと考えております。そして近い将来に、これまで有効な治療法に乏しかった神経変性疾患に対する治療薬が開発され、神経変性疾患を患っている多くの患者さんに福音がもたらされることを願っています。

