

氏 名	ヘレナ アキコ ポピエル Helena Akiko Popiel
学位の種類	博士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 544 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	Role of the conformation of the expanded polyglutamine stretch in polyglutamine diseases and establishment of a molecular therapy using the inhibitor peptide QBP1 (ポリグルタミン病における異常伸長ポリグルタミン鎖のコンフォメーションの役割と阻害ペプチド QBP1 を用いた治療法の研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 山 和 久 教 授 川 寄 敏 祐 教 授 伊 藤 信 行

論 文 内 容 の 要 旨

ポリグルタミン (polyQ) 病は、原因遺伝子内のグルタミンをコードする CAG リピートの異常伸長という共通の遺伝子異常により発症する、9つの遺伝性神経変性疾患の総称である。これらは共通の分子機構により発症すると考えられており、異常伸長した polyQ 鎖自身が病的コンフォメーションを獲得することにより難溶性の凝集体を形成し細胞毒性を引き起こすと考えられているが、これまで十分には立証されていない。さらに、現時点で polyQ 病には有効な治療法は確立されていない。そこで著者は異常伸長 polyQ 鎖の病的コンフォメーション獲得と凝集体形成、さらに細胞毒性との関連を解析した。さらに治療法の確立という視点から、異常伸長 polyQ 鎖の病的コンフォメーション獲得を阻害するペプチド QBP1 を用いた分子治療について検討を行った。

第一章 異常伸長 polyQ 蛋白質の凝集体形成、細胞毒性における polyQ 鎖のコンフォメーションの役割

蛋白質の構造に大きく影響を与えるプロリン残基を用いて、異常伸長 polyQ 鎖のコンフォメーションの破壊を試みた。円偏光二色性分散 (CD) 解析及び異常伸長 polyQ 鎖特有のコンフォメーションを認識する 1C2 抗体を用いたウエスタンブロット解析により、挿入プロリン数依存的に異常伸長 polyQ 鎖特有のコンフォメーションが破壊されていることを示した。次いで濁度法を用いた *in vitro* 凝集体形成実験では、polyQ 鎖に挿入されたプロリン残基の数依存的に凝集体形成が抑制された。COS-7 細胞に異常伸長 polyQ 蛋白質を発現させた培養細胞モデルでは、polyQ 鎖に挿入されたプロリンの数依存的に凝集体形成と細胞死が抑制された。さらに治療分子という視点から、プロリン挿入を持つ正常鎖長 polyQ 蛋白質が異常伸長 polyQ 蛋白質の凝集体形成を遅延させることを *in vitro* の凝集体実験にて示した。以上の結果から、異常伸長 polyQ 鎖は病的コンフォメーションを獲得することにより凝集体を形成して細胞毒性を発揮すること、さらにこの病的コンフォメーションが治療の標的となることが示唆された。

第二章 polyQ 鎖の病的コンフォメーション獲得を阻害するペプチド QBP1 を用いた polyQ 病に対する分子治療法の解析

第一章の結果から明らかであるように、異常伸長 polyQ 鎖に特異的に結合するペプチドを用いてこのような病的作用を阻害する目的で、以前に著者の研究室で異常伸長 polyQ 鎖結合ペプチド (QBP1) が同定された。これまでに QBP1 は異常伸長 polyQ 鎖の病的コンフォメーション獲得を阻害し、そして *in vitro*、及び培養細胞において異常伸長 polyQ 蛋白質の凝集体形成と細胞毒性を抑制することが明らかとなっている。さらに著者らは QBP1 トランスジェニックショウジョウバエを作成し、polyQ 病ショウジョウバエとの遺伝的交配により複眼変性と凝集体形成の抑制、及び寿命の短縮の改善を示し、QBP1 の *in vivo* での神経変性抑制効果を明らかにしている。治療法確立へ向けた次のステップとして、著者は QBP1 を用いた polyQ 病モデルマウスの分子治療を試みた。QBP1 の最小活性部位は 8 アミノ酸であるが、このままでは細胞透過効率が低いので、Protein Transduction Domain (PTD) と呼ばれる細胞膜透過シグナルを用いて QBP1 の細胞内移行を効率化することを考えた。PTD-QBP1 を COS-7 細胞細胞培養液に添加したところ、ほぼすべての細胞に導入され、さらに異常伸

長polyQ蛋白質の凝集体形成・細胞毒性が抑制された。次いで野生型マウスの脳室内にPTD-QBP1を注射したところ、高効率で脳室内周辺の細胞に導入できることを明らかにした。さらにpolyQ病モデルマウスの脳室内に浸透圧ポンプを用いてPTD-QBP1を7週間持続投与したところ、カニユーラ挿入付近の神経細胞の凝集体形成が抑制されており、異常伸長polyQ蛋白質が細胞内にびまん性に分布していた。これらの結果から、異常伸長polyQ鎖の病的コンフォメーションを阻害するペプチドQBP1が、polyQ病モデルマウスの分子治療に有用であることが示唆された。

以上、著者は異常伸長polyQ鎖が病的コンフォメーション獲得することにより凝集体形成・細胞毒性を引き起こすことを明らかにし、この病的コンフォメーションが治療の標的となることを示した。さらに、PTD-QBP1の持続投与によりpolyQ病モデルマウス脳の組織学的表現型の改善がみられたことから、分子治療薬としての期待が示された。本研究は、現在有効な治療法のないpolyQ病の治療標的を明らかにしたものであり、polyQ病に対する分子治療法の確立に寄与するものである。

論文審査の結果の要旨

ハンチントン舞蹈病に代表されるポリグルタミン（polyQ）病は、現時点で有効な治療法が存在せず、その発症機構の解明と治療法の確立が急務である。polyQ病は原因遺伝子の異なる9種類の疾患の総称であるが、原因遺伝子内でグルタミンをコードするCAGリピートの異常伸長という共通の遺伝子異常を示すことから、共通の分子機構により発症すると考えられている。その発症機序として、異常伸長したpolyQ鎖自身が病的コンフォメーション獲得することにより難溶性の凝集体を形成し、細胞毒性を引き起こすという説が提唱されているが、これまで十分には立証されていない。そこで著者は、異常伸長polyQ鎖が病的コンフォメーションを獲得する最初のステップがその病態発症に重要であると仮説を立てこれを検証すると共に、病的コンフォメーション形成を標的とした分子治療の可能性について検討を行い、以下の成果を得た。

著者は、まず異常伸長polyQ蛋白質が病的コンフォメーションの獲得、凝集体形成、細胞毒性の発揮、の順に毒性を発揮する点に注目して、その根元となる病的コンフォメーションの破壊を期待してプロリン残基を挿入した。その結果、①polyQ鎖へのプロリン挿入は、そのプロリン残基数依存的に異常伸長polyQ鎖特有のコンフォメーションの系背を阻害すること、②polyQ鎖へのプロリン挿入は、その数依存的に凝集体形成を阻害すること、③polyQ鎖へのプロリン挿入は、強発現系における異常伸長polyQ蛋白質の凝集体形成を細胞死を抑制すること、④プロリン挿入を持つ正常鎖長polyQ蛋白質が、異常伸長polyQ蛋白質の凝集体形成を遅延させることを発見した。これらの成果は、異常伸長polyQ鎖の病的コンフォメーション形成が凝集体形成と細胞毒性の発揮に共に必須であることを証明し、これが治療の標的となることを示した初めての例である。

次いで、著者は異常伸長polyQ鎖への特異的結合により病的コンフォメーション形成を阻害するペプチドQBP1がpolyQ病モデルマウスに対して治療効果を発揮するかを検討した。まずペプチド性薬物を脳内へ効率的に送達するために、細胞膜透過シグナルであるProtein Transduction Domain（PTD）をQBP1に結合させ、その効果を調べた。その結果、PTD-QBP1は、①培養細胞評価系では、効率よく細胞導入され、異常伸長polyQ蛋白質の凝集体形成と細胞毒性を抑制すること、②脳室内投与により、高効率で脳室周辺細胞に導入できること、③polyQ病モデルマウスへの持続投与により、神経細胞における凝集体形成を抑制することなどの成果を得た。これらの成果は、異常伸長polyQ鎖の病的コンフォメーションを阻害するペプチドQBP1が、polyQ病モデルマウスの分子治療に有用であることが示唆された。

以上の成果は、異常伸長polyQ鎖の病的コンフォメーションがpolyQ病の治療標的となりうることを初めて示したものであり、有効な治療法のないpolyQ病に対する分子治療法の確立に寄与するものである。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成16年3月1日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。