

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-209304

(43) 公開日 平成11年(1999) 8月3日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
A 6 1 K 45/00	A E D	A 6 1 K 45/00	A E D
	A A R		A A R
	A B J		A B J
31/195	A G Z	31/195	A G Z
38/00	A A A	37/02	A A A
審査請求 有 請求項の数 2 F D (全 19 頁)			

(21) 出願番号 特願平10-27739

(22) 出願日 平成10年(1998) 1月26日

(71) 出願人 596133441

新潟大学長

新潟県新潟市五十嵐2の町8050番地

(72) 発明者 辻 省次

新潟県新潟市小針1丁目10番45号

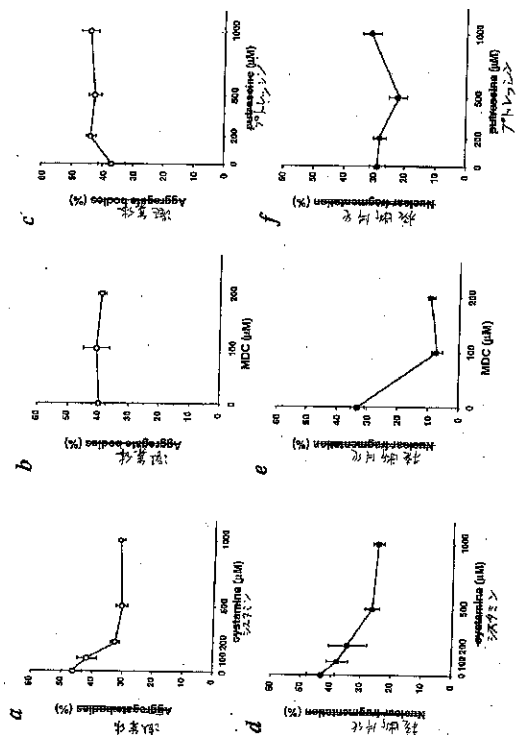
(74) 代理人 弁理士 杉村 暁秀 (外 8 名)

(54) 【発明の名称】 CAGリピート病の治療薬

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、CAGリピート病(CAG repeat expansion disease)において、ポリグルタミン鎖の伸長をもたらす「毒性機能の増加」の分子的機序を解明し、これによりCAGリピート病に対する治療薬を提供することを目的とする。

【解決手段】 前記目的を達成するため、本発明のCAGリピート病治療薬は、トランスグルタミナーゼの活性を阻害する活性を有する化合物を有効成分とする。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 トランスグルタミナーゼの活性を阻害する活性を有する化合物を有効成分とする、CAGリピート病の治療薬。

【請求項2】 トランスグルタミナーゼの活性を阻害する活性を有する化合物がシスタミンまたはモノダンシルカダベリンである、請求項1に記載の治療薬。

【請求項3】 CAGリピート病が、脊髄・延髄性筋萎縮症、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、マーシャード・ジョセフ病、1型脊髄小脳運動失調症、2型脊髄小脳運動失調症、6型脊髄小脳運動失調症、および7型小脳運動失調症からなる群より選択される、請求項1に記載の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、CAGリピート病の治療薬に関する。

【0002】

【従来の技術】ポリグルタミン鎖をコードするCAGトリヌクレオチド反復の伸長は、脊髄・延髄性筋萎縮症(SBMA)¹、ハンチントン病(HD)²、1型脊髄小脳運動失調症(SCA1)³、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)^{4,5}、アーシャード・ジョセフ病(MJD)⁶、SCA2⁷⁻⁹、SCA6¹⁰、およびSCA7¹¹という8種類の神経変成疾患に共通する病原性変異であることが確認されており、同じ機序に起因することが見いだされる疾患の数は今後さらに増えると予想される。この一連の疾患には多くの共通した特徴がある。第一に、中枢神経系が主に冒され、それぞれの疾患に特有な明瞭な分布の神経細胞損失を伴う。第二に、臨床像には同一家系内でも高度の不均一性が認められ、これにはCAG反復の伸長サイズが関係する。第三に、表現促進効果、すなわち世代を経るに連れて若年発症化する。これはCAG反復の伸長サイズに世代間の増加が生じる結果でもある。

【0003】遺伝子産物の間にはポリグルタミンの連鎖を除いて共通の相同ドメインはみられず¹⁻¹⁴変異遺伝子の産物の発現レベルは野生型遺伝子と類似することが示されている¹⁵⁻¹⁸。これらの観察結果は、ポリグルタミンの連鎖それ自体が「毒性機能の増加」の役目を果たす可能性が高いことを示している。この考え方を裏付ける所見として、伸長型CAG反復を含み、L7プロモーターの制御下にある完全長SCA1のcDNAを導入したトランスジェニックマウスは、小脳性運動失調、および小脳プルキンエ細胞の変性を来すことが示されている¹⁹。さらに興味深いことに、MJD1遺伝子の伸長したCAG反復が大部分を占める遺伝子²⁰、または伸長したCAG反復を含むhuntingtin遺伝子のエクソン1²¹を導入したトランスジェニックマウスは、神経疾患の表現型および神経変性を生じること示されている。ごく最

近になって、伸長したCAG反復を含むHD遺伝子のエクソン1を導入したマウスは神経細胞に核内封入体を生じることが示されている。また、MJD1蛋白質の伸長したポリグルタミン鎖が大部分を占めるペプチドが毒性を持つことは、COS細胞を用いた一時的発現系でも示されている²²。このように、伸長したポリグルタミン鎖が毒性機能を有することを示す所見は徐々に蓄積されつつある。

【0004】伸長したポリグルタミン鎖が毒性を及ぼす機序を説明するためにさまざまな仮説が提出されている。Perutzらは、ポリグルタミン鎖は水素結合を会して相補的な蛋白質同士を会合させることによって極性ジッパー(polar zipper)として機能し、ポリグルタミン鎖の伸長が起こると異常蛋白質の会合および凝集は強固になるとの仮説を提唱した^{23,24}。Kahlemらは最近、興味深い別の仮説を提出している²⁵。Kahlemらは、ポリグルタミン鎖の伸長部を有する蛋白質は、野性型の蛋白質よりもトランスグルタミナーゼの基質として優れており、ポリグルタミン鎖の伸長部はリジル基を含むポリペプチドとの架橋によって共有結合した凝集体を形成しやすいとの仮説を提唱した。

【0005】しかしながら、ポリグルタミン鎖の伸長を有する完全長または切断型の蛋白質が凝集体を形成し、細胞毒性を示すかどうか、またトランスグルタミナーゼが凝集体形成または細胞毒性に関与するかどうかについては何ら解明されていない。従って、また、変異型蛋白質の細胞毒性を軽減する方法についても何ら知見がないのが現状である。すなわち、CAGリピート病の治療法については今日まで全く存在しなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、CAGリピート(CAG repeat expansion disease)においてポリグルタミン鎖の伸長をもたらす「毒性機能の増加」の分子的機序を解明し、これによりCAGリピート病に対する治療薬を提供することを課題とする。すなわち、CAGリピート病においては、CAGリピートはタンパクへの翻訳領域に存在し、ポリグルタミン鎖をコードしている。CAGリピートが伸長すると、ポリグルタミン鎖が長くなり、その結果、細胞に対する毒性を発揮するようになる。この細胞毒性の機構を解明し、その毒性を緩和する方法を確立できれば、本疾患の治療法を開発することができる。本発明の目的は、このような方法によるCAGリピート病の治療法を開発することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)に関する完全長および切断型のcDNAの発現系を確立して検討を行った結果、ポリグルタミン鎖の伸長を有する切断型のDRPLA蛋白質が核周辺および核内に繊維性凝集体を形成するとともにアポトーシスを誘

発するが、完全型のDRPLAタンパク質ではこの現象は生じないことを見出した。また、検討した全てのDRPLA患者の小脳歯状核に繊維性凝集物が形成されていることを見出した。即ち、本発明者らは、切断型のDRPLAタンパク質とDRPLAとの相関関係を見出した。

【0008】さらに、本発明者らは、この繊維性凝集物の形成およびアポトーシスにおけるトランスグルタミナーゼ反応の関与も解明すべく、種々のトランスグルタミナーゼ阻害剤による抑制効果を検討した結果、いくつかのトランスグルタミナーゼ阻害剤が凝集物の形成やアポトーシス性細胞死の抑制効果を有することを見出し、これによりDRPLAにおいてトランスグルタミナーゼ反応が関与していることを解明した。

【0009】そして、この一連の結果から、DRPLAを始めとするCAGリピート病の治療にトランスグルタミナーゼの活性を阻害する化合物が有効に利用できることを見出した。即ち、本発明は、トランスグルタミナーゼの活性を阻害する活性を有する化合物のCAGリピート病の治療への利用に関し、より具体的には、(1)トランスグルタミナーゼの活性を阻害する活性を有する化合物を有効成分とする、CAGリピート病の治療薬、(2)トランスグルタミナーゼの活性を阻害する活性を有する化合物がシスタミンまたはモノダンシルカダベリンである。(1)に記載の治療薬、(3)CAGリピート病が、脊髄・延髄性筋萎縮症、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、マーシャード・ジョセフ病、1型脊髄小脳運動失調症、2型脊髄小脳運動失調症、6型脊髄小脳運動失調症、および7型脊髄小脳運動失調症からなる群より選択される、(1)に記載の治療薬、に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明は、トランスグルタミナーゼの活性を阻害する活性を有する化合物を有効成分とする、CAGリピート病の治療薬に関する。本発明において治療の対象となるCAGリピート病としては、例えば、脊髄・延髄性筋萎縮症、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、マーシャード・ジョセフ病、1型脊髄小脳運動失調症、2型脊髄小脳運動失調症、6型脊髄小脳運動失調症、および7型脊髄小脳運動失調症が挙げられる。本発明の治療薬の有効成分としての化合物は、トランスグルタミナーゼの活性を阻害する活性を有する限り特に制限はなく、例えば、シスタミン、モノダンシルカダベリンが挙げられる。本発明の治療薬は、トランスグルタミナーゼの活性を阻害する活性を有する化合物を有効成分とする限り、公知の製剤学的手法により製剤化されていてもよい。製剤化のための他の成分としては、例えば、薬理的に許容される担体または媒体、例えば、生理食塩水、滅菌水、植物油、乳化剤、懸濁剤、安定剤等が挙げられるが、これらに制限されない。

本発明の治療薬のCAGリピート病患者への投与は、公知の投与方法、例えば、動脈内投与、静脈内投与、皮下投与などの方法で投与することが可能である。

【0011】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に制限されるものではない。

(実施例1)ポリグルタミン鎖伸長部を含む切断型DRPLA蛋白質による凝集体形成およびアポトーシス性細胞死の誘発

完全長もしくは切断型のDRPLA変異蛋白質が凝集体形成などの構造異常または細胞毒性を示すかどうかを調べるために、完全長の野生型DRPLA(グルタミン19個をコードする)および変異型RPLA(グルタミン82個をコードする)のcDNAのさまざまな欠失変異体を作製した(図1)。これらcDNAを含むプラスミドの構築は以下に行った。

【0012】正常長のCAG反復(CAG反復15回)を含む完全長のヒトDRPLAcDNA(pDRPLAN)は、部分的DRPLAcDNAクローン(F1およびF15~20)¹⁸をpBluescriptSK(-)ベクターに連結することによって作製した。伸長型のCAG反復(CAG反復78回)を含む完全長のヒトDRPLAcDNA(pDRPLAE)はpDRPLAN中の963bpのEcoT221-Sp1[セグメントを、DRPLA患者のゲノムDNAから構築したゲノムコスミドライブラリーから単離したコスミドDRPLAゲノムクローン中の対応するEcoT221-Sp11セグメントと置換することによって作製した。pDRPLANまたはpDRPLAEまたはpDRPLAのNotI-BbsI断片を除去した後、FLAGタグおよびBbsI部分(配列番号:1/5-GCGGCCGCTCTAGAGCCGCCAZCCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGATGAAGACAC-3)をpBluescriptSK(-)ベクターと連結した(pSK-AFNおよびpSK-AFE)。転写開始メチオニン、FLAGタグおよびDRPLAcDNAの全体をコードするセグメントを含むpSK-AFNまたはpSK-AFEのNotI-BbsI断片を、哺乳類発現ベクターpEF-BOS³⁸にサブクローニングした(pEF-BOS-AFNおよびpEF-BOS-AFE)。DRPLAcDNAのCAG反復の上流には配列5'-CAG-CAA-CAG-CAA(この部分はCAG反復数には含めていない)が位置するため、pEF-BOS-AFNおよびpEF-BOS-AFEはそれぞれ19個および82個のグルタミンをコードする。

【0013】伸長型CAG反復および種々の長さの下流セグメントを含む欠失変異体の構築においては、まず、CAG反復の上流の21bp、CAG反復の下流305

b pの断片を含むpDRPLANのセグメントを、FLAGタグおよびNotIリンカー配列を含むプライマー（配列番号：2/5 - GGCGGCCGCTCTAGAGCCGCCACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCATCACCCACCAGCAACAGCAA - 3'）および配列（配列番号：3/5 - ACCGGTGGGAAAGGGTAGGGC - 3'）のプライマーを用いるPCRによってまず増幅した。このPCR産物をNotIおよびNorIによって消化した後、対応するNotIおよびNorI断片を除去したpDRPLA中にサブクローニングした（pBFE）。CAG反復の下流セグメントの欠失体を、ExoIII/Mung BeanヌクレアーゼによるpBFEの消化、またはpDRPLAをテンプレートとして用いるPCRによって作製した。この欠失型DNAセグメントを、3'端に複数停止部を持つリンカーとともにpFE-BOS発現ベクター中にサブクローニングした。この結果得られたプラスミドであるpEF-BOS-FQ82-447、pEF-BOS-FQ82-376、pEF-BOS-FQ82-174、pEF-BOS-FQ82-129、pEF-BOS-FQ82-101、pEF-BOS-FQ82-40およびpEF-BOS-FQ82-19は、ヒスチジン3個、グルタミン82個およびポリグルタミン鎖の下流に種々の長さのアミノ酸（それぞれ447、376、174、129、101、40および19アミノ酸）を含む。グルタミン19個をコードする欠失変異体も同様の方法を用いて作製した。

【0014】一方、CAG反復および種々の長さの上流セグメントを含む欠失変異体の構築においては、まず、伸長型のCAG反復およびさまざまな長さの上流セグメントを含むDNAセグメントを、以下のセンスプライマーのいずれか1つ「A1FLAG」（配列番号：4/5 - GGCGGCCGCTCTAGAGCCGCCACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGATGAAGACACGACAGAATAAA - 3'）、「C1FLAG」（配列番号：5/5 - GGCGGCCGCTCTAGAGCCGCCACCATGGACTACAAAGACGATGAGACAAGCCTCGACAGCCAGAGGCTAGC - 3'）または「C2FLAG」（配列番号：6/5 - GGCGGCCGCTCTAGAGCCGCCACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCCTACCTGGTCATCTGCC - 3'）およびセンスプライマー「EBR」（配列番号：7/5 - GGTCGACTTATCAGCCCTCCAGTGGGTGGGAAAT - 3'）を用いるPCRによって入手した。このPCR産物をNotIおよびSalIによって消化した後pEF-BOS発現ベクター中にサブクローニングした。この結果、得られたプラスミドであるpEF-BOS-F483-Q82、pEF-BOS-

F322-Q82およびpEF-BOS-F483-Q82は、FLAG I：グルタミン82個、ポリグルタミン鎖の下流の18個のアミノ酸、およびポリグルタミン鎖の上流に位置するそれぞれ483個、322個および174個のアミノ酸をコードするセグメントを含む。

【0015】これにより構築したプラスミドをCOS7細胞へ導入した。具体的には、遺伝子導入の前日に、10%牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）中に懸濁したCOS7細胞を、1ウェル当たり 3×10^4 個となるように8ウェル培養皿（Nunc Inc., Naperville, IL）に播いた。このCOS7細胞に対して、Superfect トランスフェクション試薬（Quiagen, Hilden, Germany）を製造者の指示に従って用いて、プラスミドDNA 0.5 μ gによる遺伝子導入を行った。

【0016】この遺伝子導入細胞に関して、導入から72時間後に抗FLAG M5モノクローン抗体を用いて上記のさまざまなDRPLA蛋白質の発現パターンを分析するとともに、アポトーシス性細胞死の起こりやすさを調べた。なお、細胞の抗FLAG M5モノクローン抗体を用いた免疫化学的染色においては、細胞を、0.1Mリン酸緩衝液（PBS）に溶解した4%パラホルムアルデヒドにて30分間固定し、0.02%Triton X-100を含むPBSによって透過処理を施した後、10%正常ヤギ血清を含むPBS中において室温（RT）で30分間インキュベートした。続いて細胞を1:500に希釈した抗FLAG M5モノクローン抗体（Eastman Kodak, New Haven, CT）とともに室温で2時間インキュベートした後、ローダミンを結合させた抗マウスIgG（Dako, Glostrup, Denmark）とともに1時間インキュベートし、蛍光顕微鏡を用いて観察した。アビジン・ビオチンペルオキシダーゼ複合体（ABC）法を用いて、3,3'-ジアミノベンジン・テトラヒドロクロライドによる免疫染色も実施した。細胞にヘマトキシリンによる対比染色を施した後、光学顕微鏡を用いて観察した。

【0017】その結果、正常長（グルタミン19個）のポリグルタミン鎖を含む完全長のDRPLA蛋白質をコードするpEF-BOS-AFNによる遺伝子導入を施した細胞では、DRPLA蛋白質は均一または微粒子状のパターンを示して細胞質中にひまんに発現したが（図2b）、偽遺伝子導入細胞では抗体による染色は認められなかった（図2a）。伸長したポリグルタミン鎖（グルタミンB2個）を含む完全長のDRPLA蛋白質をコードするpEF-BOS-AFNによる遺伝子導入を施した細胞（図2c）、および正常長のポリグルタミン鎖（グルタミン19個）が大部分を占める切断型のDRPLA蛋白質をコードするpEF-BOS-FQ82-19による遺伝子導入を施した細胞（図2d）も、pEF-BOS-AFNを導入した細胞（図2b）と同様の発現パターンを示した。しかし、伸長したポリグルタミ

鎖(グルタミン82個)が大部分を占める切断型蛋白質をコードするpEF-BOS-FQ82-19による遺伝子導入を施した細胞では、主に核周辺の細胞質領域に凝集体が認められた(図2e, f)。この凝集体は、一部の細胞集団ではコピキチンに関して免疫陽性であったが、ピメンチンおよびコンゴレッド染色に関しては陰性であった。時間の経過に従って、この凝集体を含む細胞は萎縮し、TUNELアッセイ(terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling)で陽染されるようになる(図2g)。遺伝子導入から72時間後にはこのようなTUNEL陽性細胞が高頻度に認められる(細胞の52%に凝集体が生じる)。これに対して、pEF-BOS-AFN、pEF-BOS-AFEまたはpEF-BOS-FQ19-19による遺伝子導入を施した細胞の中にアポトーシス性細胞は認められなかった(図2j)。また、切断型の変異蛋白質からなる凝集体の存在下において、伸長したポリグルタミン鎖を含む完全長の変異型DRPLA蛋白質が凝集体に組み込まれているかどうかを調べるために、伸長したポリグルタミン鎖とGFP(グリーン蛍光蛋白質)との融合物が大部分を占める切断型の変異蛋白質をコードするもう一つのプラスミド構築物(pEGFP-Q-19)を作製した。

【0018】その結果、pEF-BOS-AFEとpEF-BOS-FQ-19による同時遺伝子導入を施した細胞では、FLAGタグを付加した完全長の変異型DRPLA蛋白質が凝集体に組み込まれていることが明確に示された(図2h, i)。pEF-BOS-AFEのみを導入した細胞ではこのような凝集は全く認められなかった(図2c)。

【0019】凝集体の形成が変異蛋白質の長さによって決まるかどうかを明らかにするため、完全長の野生型DRPLAおよび変異型DRPLAのcDNAのさまざまな欠失変異体を作製した(図1)。ポリグルタミン鎖および129アミノ酸未満の下流領域(FQ-129、FQ-101、FQ-40またはFQ-129)を含む切断型DRPLA蛋白質を発現している細胞内では、高い頻度(71~88%)で凝集体形成が認められた(図3b)。頻度は低かったものの、さまざまな長さの上流領域および伸長したポリグルタミン鎖(F483-Q、F322-QまたはF174-Q)を発現している細胞内でも凝集体形成が認められた(図3a)。TUNEL反応によって染色された細胞の割合は、pEF-BOS-FQ82-129、pEF-BOS-FQ-101、pEF-BOS-FQ-40またはpEF-BOS-FQ82-129を導入した細胞で高かった。凝集体を生じた細胞では、TUNEL反応によって検出されるアポトーシス性細胞死が認められたことから、凝集体形成がアポトーシス性細胞死の原因となることが強く示された。

【0020】(実施例2)凝集体形成の時間依存性凝集体の形成の時間依存性につき検討した。免疫化学的染色は、実施例1と同様に細胞を固定して行った。その結果、pEF-BOS-FQ-19による遺伝子導入から24時間後に、FLAGエピトープを発現している細胞のうち53%で凝集体の形成が認められた(図4a, d)。凝集体を生じた細胞の割合は、遺伝子導入から48および72時間後には、それぞれ65%(図4a, d)および89%(図4b, d)に増加した。TUNEL陽性細胞の頻度は、遺伝子導入から24時間後にはわずか1%であったが、遺伝子導入から48および72時間後には、それぞれ9%および52%に増加した(図4d)。

【0021】(実施例3)凝集体の詳細な構造の解析凝集体の詳細な構造をさらに解明するために、pEF-BOS-FQ82-19による遺伝子導入を施した細胞を電子顕微鏡を用いて観察した。具体的には、まず、細胞を4%パラホルムアルデヒド-0.1%グルタルアルデヒドを含むpH7.4の0.1Mリン酸緩衝液中にて室温で15分間固定した。続いて、段階的ジメチルホルムアルデヒド処理による脱水の後、細胞をLR White樹脂(London Resin Company)中に包埋した。超薄切片を作成し、ニッケルグリッド上に載せた。10%正常ヤギ血清を含むPBS中にて室温で10分間インキュベートした後、切片を1:4000に希釈した抗FLAG M5モノクローン抗体とともに4で一晩インキュベートした。PBSで洗浄した後、切片を径10nmの金粒子を結合させたヤギ抗マウス1gG(British Biocell International, Cardiff, UK; 1:30希釈)とともに室温で30分間インキュベートした。続いて切片をPBSで洗浄し、2%グルタルアルデヒドを含むpH7.4の0.1Mカコジル酸緩衝液中にてインキュベートした。蒸留水で洗浄した後、切片を酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛によって染色し、日立H-7100電子顕微鏡を用いて観察した。

【0022】この免疫電子顕微鏡法による観察の結果、凝集体は繊維性凝集体からなり、主に核周辺の細胞質領域に存在することが判明した(図5a, b)。この繊維性凝集体は、分岐のない直線状またはわずかに湾曲した直径約10~12nmの繊維の放射状配列からなる(図5b, c)。凝集体の内部には特定の細胞内オルガネラは認められなかった。このような凝集体は核周辺領域だけでなく、核内にも時折認められた(図5b, c)。また凝集体の繊維と類似した形態を持つ非凝集性の繊維が細胞質にも核内にも散在していた。このような細胞内では、凝集体の繊維が核膜を貫通し、その一部が核孔を通過している像が比較的高い頻度で認められた(図5c)。この繊維性構造が認められたのはpEF-BOS-FQ82-19を導入した細胞のみであり、pEF-BOS-AFN、pEF-BOS-AFEおよびpEF-

BOS-FQ19-19による遺伝子導入を施した細胞ではこれは認められなかった。遺伝子導入後の培養時間が経過すると、凝集物を含むアポト-シス性構造体が多数認められるようになった(図5d)。

【0023】実施例4 DRPLA患者の小脳歯状核における核内封入体の検出

DRPLA患者の脳内に同じような凝集体が存在するかどうかを調べるために、抗DRPLA蛋白質ポリクローン抗体を用いて、DRPLA患者5例および対照例5例の小脳歯状核の免疫組織学的分析を行った。まず、剖検脳をリン酸緩衝4%パラホルムアルデヒド液中にて固定し、組織学的検査のためにパラフィン包埋した。免疫染色は、ウサギ抗ユビキチン抗体(Dakopatts; 1:200希釈)、またはDRPLA蛋白質の172~253アミノ酸残基を含むGST融合蛋白質に対して作製した後、GST-融合蛋白質を結合させたAffigel-10カラム(Bio-Rad)を用いてアフィニティ精製を施したウサギ抗DRPLA蛋白質ポリクローン抗体(1:300希釈)を用いて実施した。その結果、抗DRPLA蛋白質抗体(図6a)および抗ユビキチン抗体(図6b)によって染色される核内封入体が、DRPLA患者5例全例に存在することが確かめられた。同様の封入体は対照群(前吸収処理を受けた抗DRPLAタンパク質抗体)では全く認められなかった。

【0024】また、この核内封入体を電子顕微鏡を用いて検討した。具体的には、3%グルタルアルデヒド-1%パラホルムアルデヒドを含むpH7.4の0.1Mリン酸緩衝液によって細胞を固定し、1%四酸化オスミウム中にて後固定を行った後に、段階的エタノール処理によって脱水し、Epon812中に包埋した。超薄片を作成し、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛によって染色した後に、日立H-7100電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、この核内封入体は微粒子で構成され、繊維性構成を一部含むことが明らかになった(図6c)。以上の結果は、核内封入体の形成が神経変性疾患の発症に重要であるとの可能性が高いことを示す。

【0025】実施例5 トランスグルタミナーゼ阻害剤による凝集体形成およびアポト-シス性細胞死の抑制
凝集体の形成およびアポト-シス性細胞死に対するトランスグルタミナーゼ反応の関与を検討するために、遺伝子導入を施したCOS7細胞をトランスグルタミナーゼ阻害剤(シスタミン²⁸、モノダンシルカダベリン(MDC)²⁹およびプトレッシン³⁰)の存在下で培養した。この目的のために、本発明者らは切断製DRPLA蛋白質をグリーン蛍光蛋白質(GFP)との融合蛋白質として発現させ、生きた細胞を高感度で観察できるようにした。これはpEF-BOS-FQ82-19およびpEF-BOS-FQ19-19の挿入部を、GFPのコード領域を含むpEGFP中に移行することによって行った。この結果得られたプラスミドDNA(pEGFP-FQ

82-19およびpEGFP-FQ19-19)をCOS細胞に遺伝子導入した。このプラスミドDNAの作成方法は、次の通りであった。ヒスチジン3個、ポリグルタミン鎖およびポリグルタミン鎖の下流に位置する19アミノ酸をコードするDRPLA cDNAのセグメント(pDRPLAEまたはpDRPLAN)を、EcoRIのリンカー配列を含むプライマー(配列番号: 8/5 - GGG AATTCGGATGCACCATCAC CACCAGCAACAGCAACAG-3'、配列番号: 9/5 - GTGGATCCCCGCCCTCCAGTGGGTGGGAAATGCT-3')を用いるPCRによって増幅した。このPCR産物をEcoRIおよびBamHIによって消化した後、pEF-FQ19-19発現ベクター中にサブクローニングした(Clontech, Palo Alto, CA)。構築物の核酸配列はDNA自動シーケンサーを用いて確認した(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)。

【0026】pEGFP-Q19-19による遺伝子導入を施した細胞では、細胞質中にびまん性にGFP融合蛋白質が発現したが(図7a)、pEGFP-FQ19-19を導入した細胞では凝集体が形成され(図7c)、それぞれpEF-BOS-FQ19-19およびpEF-BOS-FQ82-19を導入した細胞と類似していた。シスタミンの投与により、pEGFP-FQ19-19導入細胞における融合蛋白質の発現パターンは変化しなかった(図7b)。しかし、1mMシスタミン中にてpEGFP-FQmz-19導入細胞を60時間培養すると、凝集体の形成は42%から33%に有意に抑制された($p < 0.01$)(図7c, d, e)。1mMシスタミンの存在下では、核断片化も38%から24%に抑制された($p < 0.01$)(図7f)。遺伝子導入から24および48時間後にも同様の結果が認められた(図7e, f)。これに対して、凝集体の形成を伴わずに細胞質中にびまん性の発現を認めた細胞の頻度は、遺伝子導入の60時間後では32%(シスタミン非投与)から55%(1mMシスタミン)に増加した($p < 0.01$)。凝集体形成および核断片化の抑制はシスタミン濃度が100 μ Mの場合にも認められ、この抑制効果は用量依存的な様式を示した(図8a, d)。

【0027】凝集体形成およびアポト-シス性細胞死に対するその他のトランスグルタミナーゼ阻害剤(MDCおよびプトレッシン)の作用も調べた。アポト-シス性細胞死の定量的アッセイには、in situ細胞死検出キット(Boehinger Mannheim, Mannheim, Germany)を製造者の指示に従って用いてTUNELアッセイを実施した。ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ反応には、FITCを結合させたdUTPを用いた。核断片化に関するアッセイは、5 μ MのWoechst33342を用いた細胞の染色によって行った。定量的評価はFLAGエピトープを発現している細胞100個を分析するこ

とによって実施した。統計的分析にはStudent の t 検定を用いた。

【0028】その結果、MDCにより、核断片化は用量依存的な様式で強く抑制された(図8a)。MDCの存在下で遺伝子導入細胞を培養した場合には、凝集体のサイズはMDC非投与時と比べて小さくなったが、凝集体の形成を伴う細胞の頻度には有意の変化はみられなかった(図8b)。プロテシンは、凝集体形成(図8c)

および核断片化(図8f)をいずれも抑制しなかった。

【0029】

【発明の効果】本発明によりトランスグルタミナーゼの活性を阻害する活性を有する化合物を有効成分とする、CAGリピート病に対する治療薬が提供された。

【0030】

【引用文献】

【表1】

1. La Spada, A.R., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., Harding, A.E. & Fischbeck, K.H.

Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy.

Nature **352**, 77-79 (1991).

2. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**, 971-983 (1993).

3. Orr, H.T. *et al.* Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet.* **4**, 221-226 (1993).

4. Koide, R. *et al.* Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA). *Nature Genet.* **6**, 9-13 (1994).

5. Nagafuchi, S. *et al.* Expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p in dentatorubral and pallidolusian atrophy. *Nature Genet.* **6**, 14-18 (1994).

6. Kawaguchi, Y. *et al.* CAG repeat expansion in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet.* **8**, 221-227 (1994).

7. Sanpei, K. *et al.* Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. *Nature Genet.* **14**, 277-284 (1996).

8. Pulst, S.M. *et al.* Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature Genet.* **14**, 269-276 (1996).

9. Imbert, G. *et al.* Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nature Genet.* **14**, 285-291 (1996).

10. Zhuchenko, O. *et al.* Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated

【0031】

【表2】

- with small polyglutamine expansions in the alpha 1a-voltage-dependent calcium channel. *Nature Genet.* **15**, 62-69 (1997).
11. David, G. *et al.* Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nature Genetics.* **17**, 65-70 (1997).
 12. Lubahn, D.B. *et al.* Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the x chromosome. *Science* **240**, 327-330 (1988).
 13. Nagafuchi, S. *et al.* Structure and expression of the gene responsible for the triplet repeat disorder, dentatorubral and pallidolusian atrophy (DRPLA). *Nature Genet.* **8**, 177-182 (1994).
 14. Mori, Y. *et al.* Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* **350**, 398-402 (1991).
 15. Yazawa, I. *et al.* Abnormal gene product identified in hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA) brain. *Nature Genet.* **10**, 99-103 (1995).
 16. Trottier, Y. *et al.* Cellular localization of the huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nature Genet.* **10**, 104-110 (1995).
 17. Servadio, A. *et al.* Expression analysis of the ataxin-1 protein in tissues from normal and spinocerebellar ataxia type 1 individuals. *Nat Genet.* **10**, 94-98 (1995).
 18. Onodera, O. *et al.* Molecular cloning of a full-length cDNA for dentatorubral-pallidolusian atrophy and regional expressions of the expanded alleles in the CNS. *Am. J. Hum. Genet.* **57**, 1050-1060 (1995).
 19. Burchright, E.N. *et al.* SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. *Cell* **82**, 937-948 (1995).
 20. Ikeda, H. *et al.* Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nature Genet.* **13**, 196-202 (1996).
 21. Mangiarini, L. *et al.* Exon 1 of the HD gene with an expanded cag repeat is

- sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* **87**, 493-506 (1996).
22. Davies, S.W. *et al.* Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90**, 537-548 (1997).
23. Perutz, M.F., Johnson, T., Suzuki, M. & Finch, J.T. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5355-5358 (1994).
24. Stott, K., Blackburn, J.M., Butler, P.J. & Perutz, M.F. Incorporation of glutamine repeats makes protein oligomerize: implications for neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6509-6513 (1995).
25. Kahlem, P., Terre, C., Green, H., & Djian, P. Peptides containing glutamine repeats as substrates for transglutaminase-catalyzed cross-linking: relevance to diseases of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14580-14585 (1996).
26. Naito, H. & Oyanagi, S. Familial myoclonus epilepsy and choreoathetosis: hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *Neurol.* **32**, 798-807 (1982).
27. Ikeuchi, T. *et al.* Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA): Clinical features are closely related to unstable expansions of trinucleotide (CAG) repeat. *Ann. Neurol.* **37**, 769-775 (1995).
28. Lorand, L. *et al.* Specificity of guinea pig liver transglutaminase for amine substrates. *Biochemistry* **18**, 1756-1765 (1979).
29. Dickson, R.B., Willingham, M.C., & Pastan, I. Binding and internalization of ¹²⁵I- α_2 -macroglobulin by cultured fibroblast. *J. Biol. Chem.* **256**, 3454-3459 (1981)
30. Kleman, J.-P., Aeschlimann, D., Paulsson, M. & van der Rest, M.

- Transglutaminase-catalyzed cross linking of fibrils of collagen V/XI in A 204 rhabdomyosarcoma cell. *Biochemistry* **34**, 13768-13775 (1995)
31. Paulson, H.L. *et al.* Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* **19**, 333-334 (1997)
32. Scherzinger, E., *et al.* Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* **90**, 549-558 (1997)
33. Onodera, O. *et al.* Oligomerization of expanded-polyglutamine domain fluorescent fusion proteins in cultured mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (In the press).
34. Jackson, M., *et al.* The cortical neuritic pathology of Huntington's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **21**, 18-26 (1995).
35. DiFiglia, M. *et al.* Aggregation of Huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* **277**, 1990-1993 (1997)
36. Paulson, H.L. *et al.* Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann. Neurol.* **41**, 453-462 (1997).
37. Goldberg, Y.P. *et al.* Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nature Genet.* **13**, 442-449 (1996).
38. Mizushima, S. & Nagata, S. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5322 (1990).

【図面の簡単な説明】

【図 1】さまざまな長さの欠失を伴う完全長の DRPLA cDNA および切断型の DRPLA cDNA の構造を示す図である。FLAG エピトープおよびポリグルタミン鎖はそれぞれ黒く塗りつぶした部分および斜線部分で示した。蛋白質コード配列は塗りつぶしていない部分として示した。

【図 2】COS7 細胞で発現した完全長および切断型の DRPLA 蛋白質の免疫組織化学的分布を示す顕微鏡写真(図 2 a ~ 2 i)、並びに凝集体陽性細胞および TUNEL 陽性細胞の割合を示す(グラフ図 2 j) 図である。(a) 偽遺伝子導入、(b) pEF-BOS-AFN、(c) pEF-BOS-AFN、(c) pEF-COS-AFE、(d) pEF-BOS-FQ19-19、(e) pEF-BOS-FQmz-19 による遺伝子導入を施し、導入から 72 時間後に抗 FLAG MS モノクローン抗体による染色を施した。(e) はローダミン結合抗マウス IgG 染色または (f) は ABC 法によって検出した。(g) は、FITC 結合 dUTP を用いる TU

NEL 反応による陽染を示す。(h) は、pEF-BOS-AFE および pEFFP-Q82-19 を導入した細胞の GFP 像、(i) は抗 FLAG 抗体による検出を示す。(j) は凝集体を含む細胞の割合(塗りつぶしていない部分)、および凝集体を有する細胞の中で TUNEL 反応で染色された細胞の割合(塗りつぶした部分)を平均値 ± SEM (n = 3) として示した。

【図 3】凝集体を生じた細胞の割合、および凝集体を有する細胞の中で TUNEL 反応で染色された細胞の割合を示す図である。COS7 細胞に、DRPLA cDNA のさまざまな欠失変異体を含む pEGFP ベクターによる遺伝子導入を施した後、凝集体の形成(塗りつぶしていない部分)および TUNEL 反応(ぬりつぶした部分)に関してアッセイした。各数値は平均 ± SEM (n = 3) として示した。

【図 4】凝集体の時間依存的発現を示す顕微鏡写真である。COS7 細胞に pEF-BOS-FQ82-19 による遺伝子導入を施した後、抗 FLAG MS モノクローン抗体を用いて免疫組織学的分析を行った。(a) は遺

伝子導入から 24 時間後の COS7 細胞、(b, c) はそれぞれ遺伝子導入から 48 および 72 時間後の COS7 細胞を示す。(d) は各時間における凝集体陽性細胞および TUNEL 陽性細胞の割合を示す図である。各数値は平均 ± SEM (n = 3) として示した。

【図 5】 pEF-BOS-FQ82-19 による遺伝子導入を施した COS7 細胞に生じた凝集体の電子顕微鏡写真を示す。(a) は抗 FLAG M5 モノクローン抗体を用いたイムノゴールド染色像であり、抗体が COS7 細胞内で凝集体を形成する放射状に配列した繊維と結合することが観察される。(b, c) では、凝集体は核内で形成される頻度は低いが、核周辺の細胞質には高い頻度で認められ、直径約 10 ~ 12 nm の直線状またはわずかに彎曲した繊維から構成されていることが観察される。(c) では凝集体形成性繊維が核膜を貫通する像も認められた。(d) ではアポトーシス性構造体の一部は周囲の細胞によって包み込まれていた。スケールバー = 200 nm (a)、1 μm (b)、400 nm (c) および 2 μm (d)。

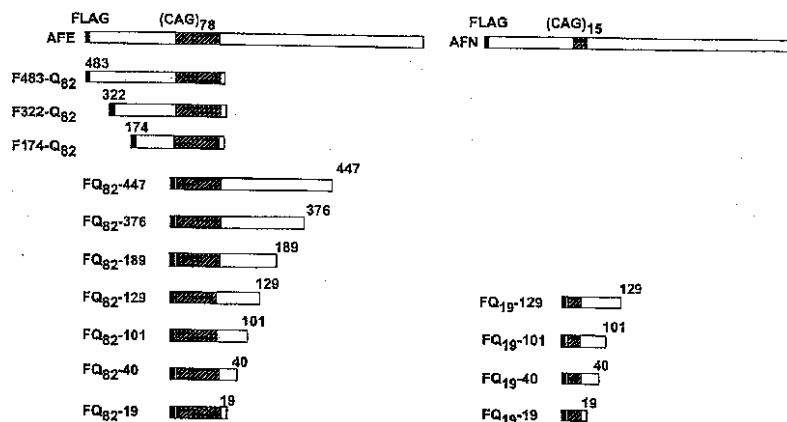
【図 6】 DRPLA 患者の小脳歯状核における核内封入体の顕微鏡像である。(a) は DRPLA 患者の小脳歯状核における神経細胞核内封入体を、DRPLA 蛋白質の 172 ~ 253 残基に対して作製した抗 DRPLA 蛋白質ポリクローン抗体によって染色したものである。(b) は抗ユビキチン抗体で染色したものである。(c) は電子顕微鏡写真である。スケールバー = 1 μm (a, b, c)。核内封入体は矢印で示した。

【図 7】 pEF-BOS-Q82-19 による遺伝子導入

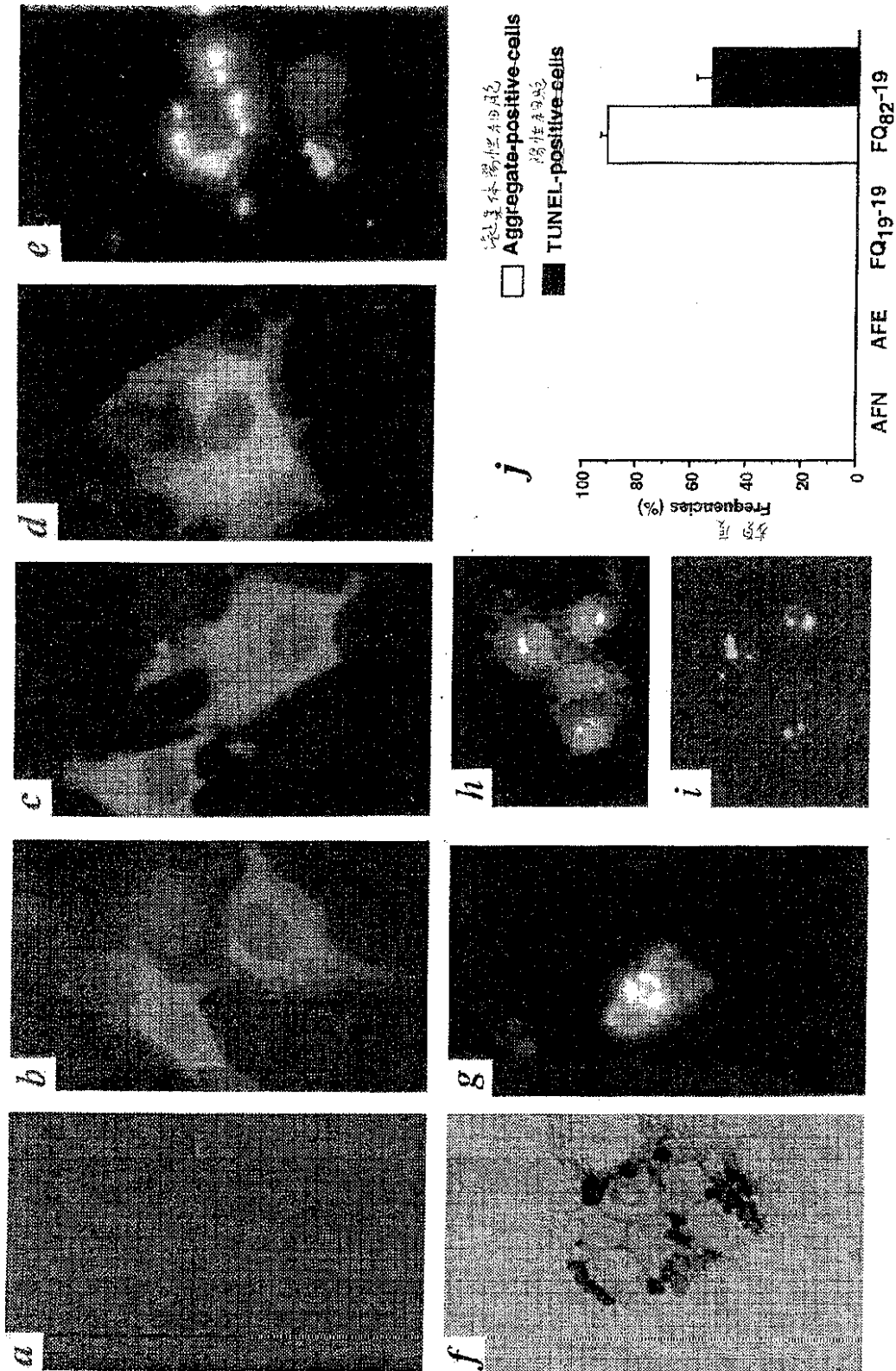
を施した COS7 細胞の凝集体形成およびアポトーシス性細胞死に対するシスタミンの作用を示す顕微鏡写真、並びにグラフを示す。(a) は 1 mM シスタミンの非存在下、(b) は存在下において pEGFP-FQ19-19 による遺伝子導入を施した COS7 細胞を 50 時間培養し、凝集体形成および Hoechst 33342 による染色で検出したものである。(c) は 1 mM シスタミンの非存在下、(d) は存在下において pEGFP-FQ82-19 による遺伝子導入を施した COS7 細胞を 50 時間培養し、凝集体形成および Hoechst 33342 による染色で検出したものである。(e) は pEF-BOS-Q82-19 による遺伝子導入を施した COS7 細胞における凝集体形成の程度に対するシスタミンの作用を示すグラフである。(f) は pEF-BOS-Q82-19 による遺伝子導入を施した COS7 細胞における核断片化の程度に対するシスタミンの作用を示すグラフである。各数値は平均 ± SEM (n = 5) として示した。

【図 8】 pEF-BOS-Q82-19 による遺伝子導入を施した COS7 細胞の凝集体形成およびアポトーシス性細胞死に対するシスタミン、モノダンシルカダベリン (MDC) および プトレッシンの作用を示すグラフである。pEGFP-FQ82-19 による遺伝子導入を施した COS7 細胞を、さまざまな濃度のシスタミン (a, d)、MDC (b, e) または プトレッシン とともにインキュベートし、凝集体形成 (a, b, c) および核断片化 (d, e, f) に関してアッセイした。各数値は平均 ± SEM (n = 5) として表示した。

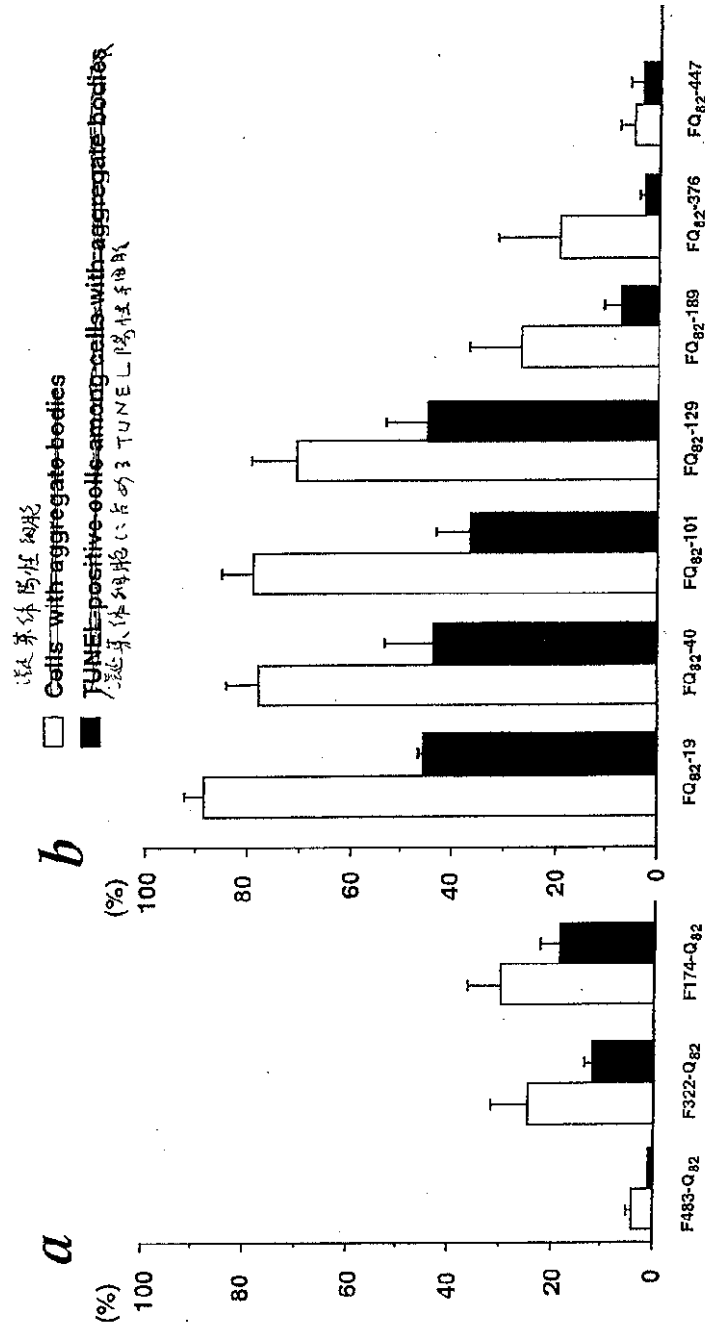
【図 1】



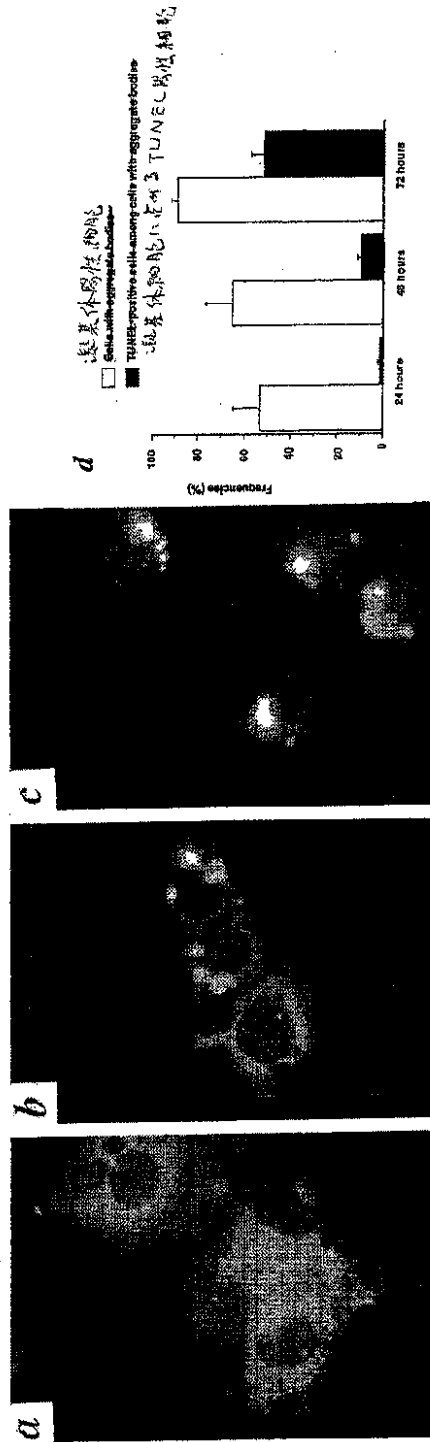
【図2】



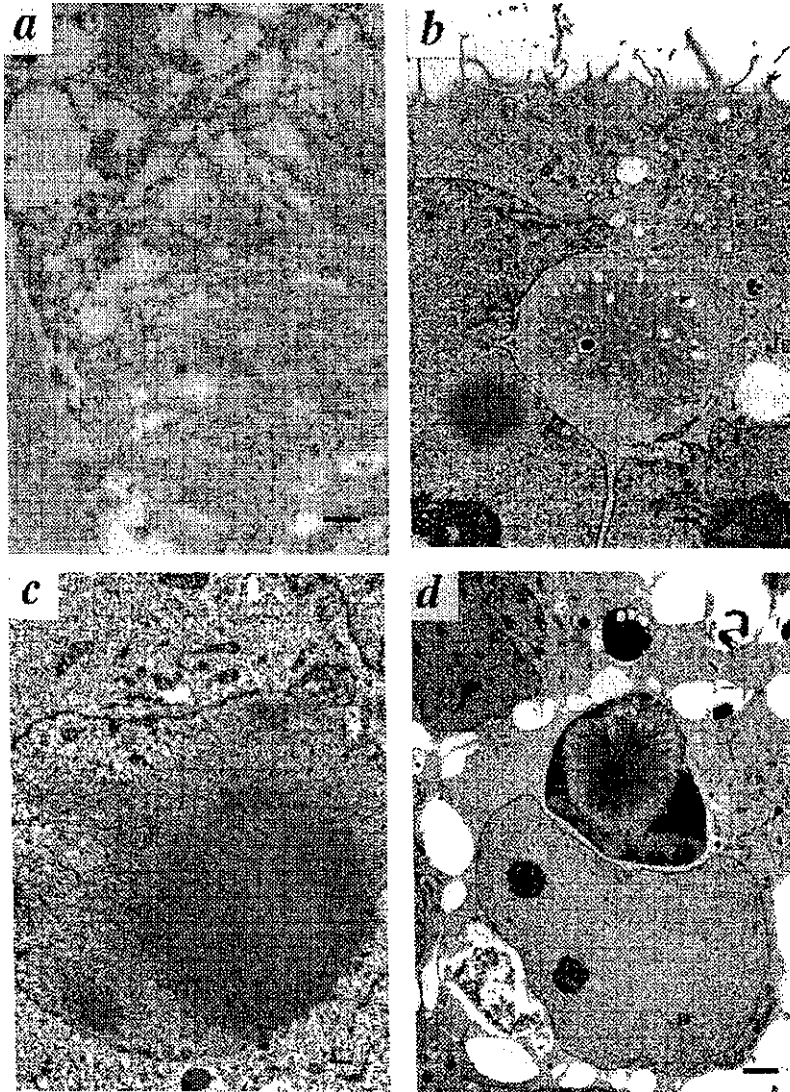
【図 3】



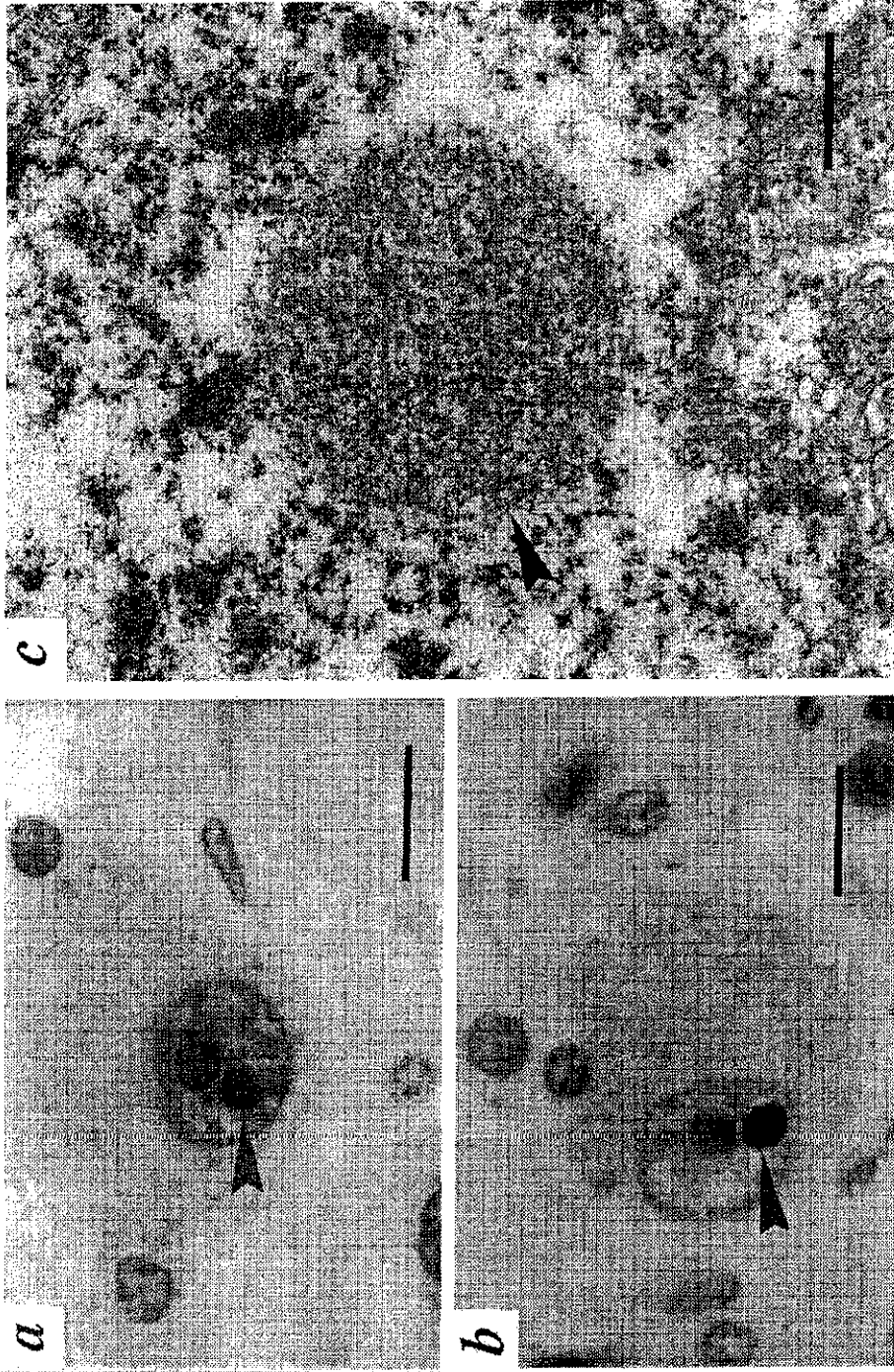
【図4】



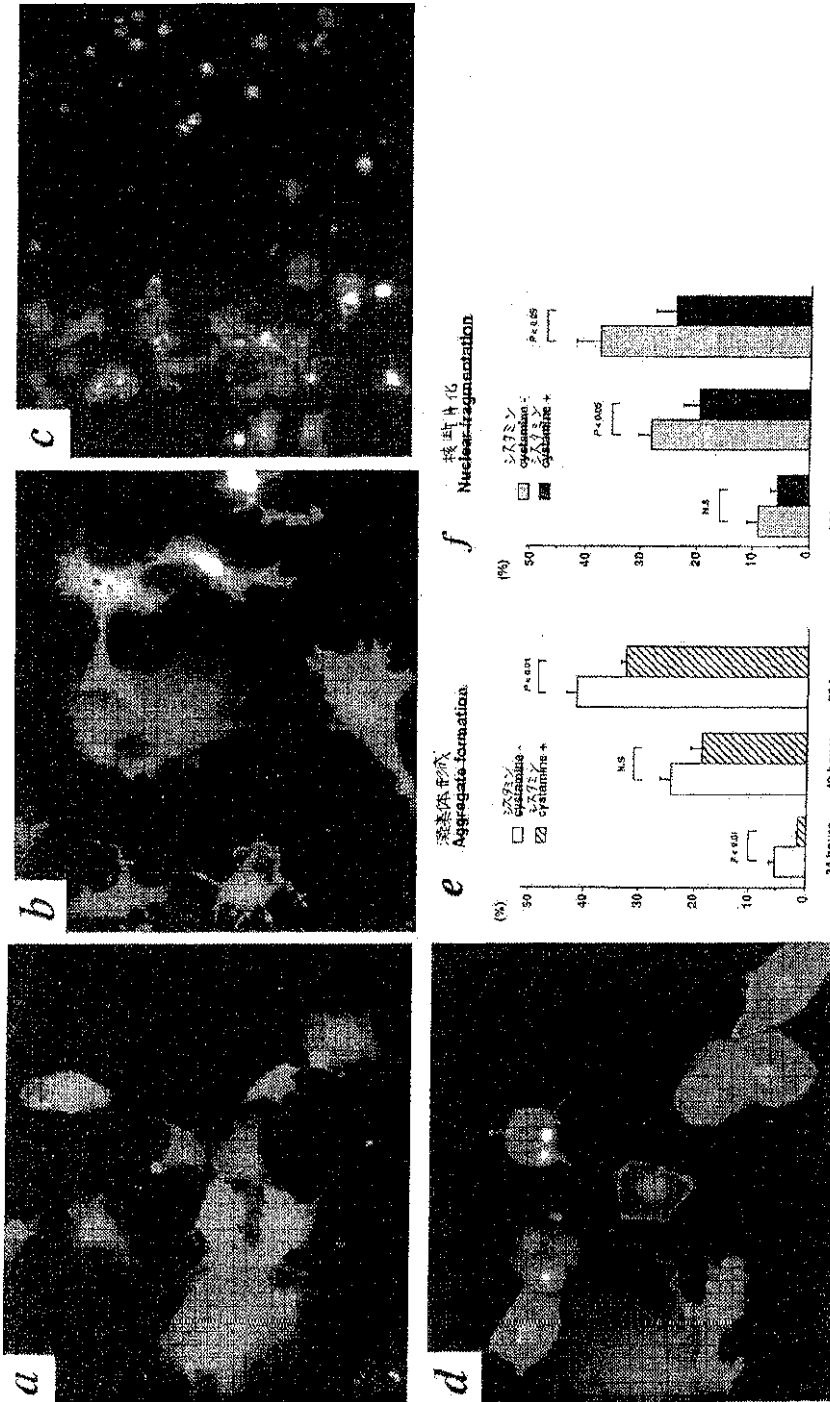
【図5】



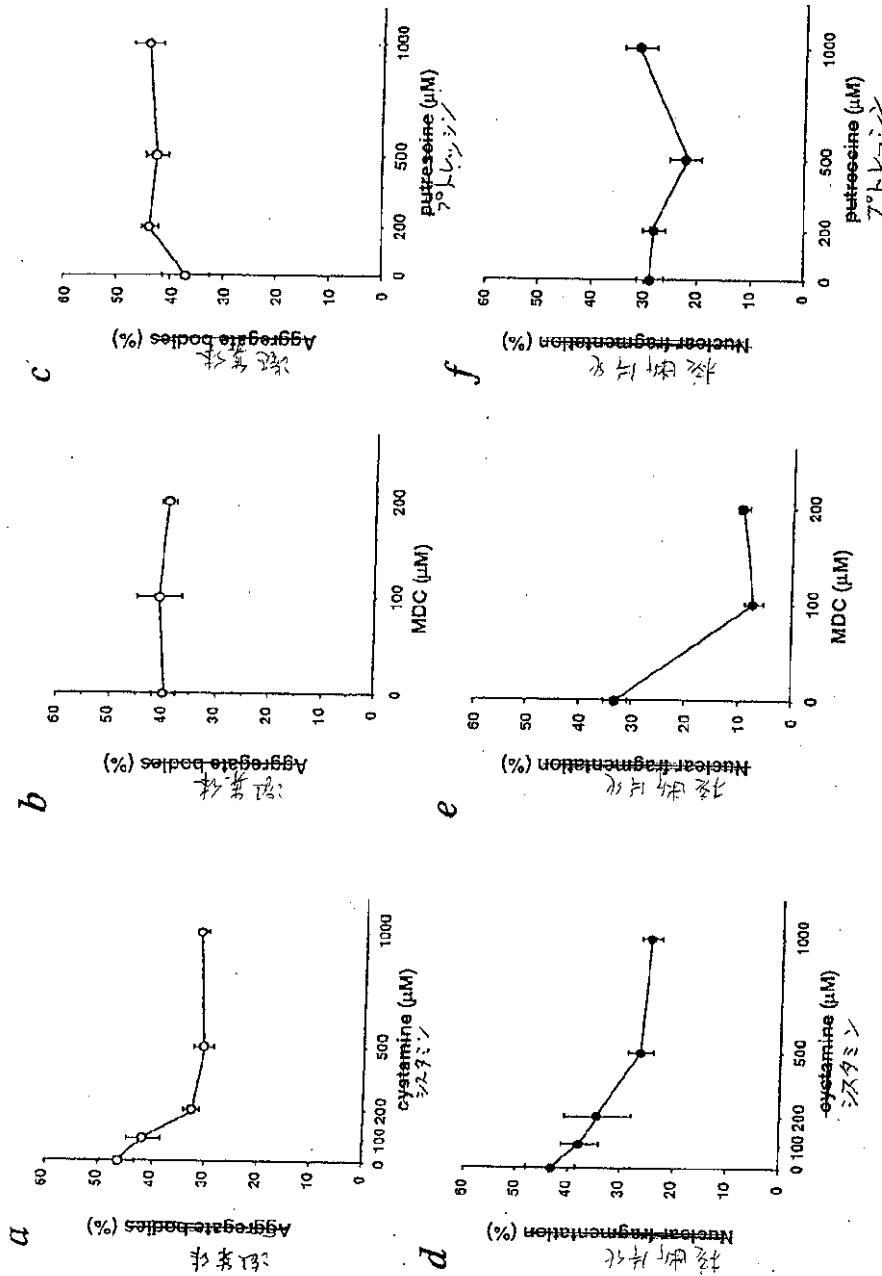
【図6】



【図7】



【図8】



【手続補正書】

【提出日】平成11年1月28日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 シスタミンまたはモノダシルカダベリンを有効成分とする、CAGリピート病の治療薬。

【請求項2】 CAGリピート病が、脊髄・延髄性筋萎縮症、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、マーシャード・ジョセフ病、1型脊髄小脳運動失調症、2型脊髄小脳運動失調症、6型脊髄小脳運動失調症、および7型小脳運動失調症からなる群より選択される、請求項1に記載の治療薬。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正内容】

【0008】さらに、本発明者らは、この繊維性凝集物の形成およびアポトーシスにおけるトランスグルタミナーゼ反応の関与も解明すべく、トランスグルタミナーゼ阻害活性を有する、シスタミンおよびモノダンシルカダベリンによる抑制効果を検討した結果、これらの薬物が凝集物の形成やアポトーシス性細胞死の抑制効果を有することを見出し、これによりDRPLAにおいてトランスグルタミナーゼ反応が関与していることを解明した。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正内容】

【0009】そして、この一連の結果から、DRPLAを始めとするCAGリピート病の治療にトランスグルタミナーゼの活性阻害剤であるシスタミンおよびモノダンシルカダベリンが有効に利用できることを見出した。即ち、本発明は、シスタミンおよびモノダンシルカダベリンのCAGリピート病の治療への利用に関し、より具体的には、

(1) シスタミンまたはモノダンシルカダベリンを有効成分とする、CAGリピート病の治療薬。

(2) CAGリピート病が、脊髄・延髄性筋萎縮症、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、マーシャル・ジョセフ病、1型脊髄小脳運動失調症、2型脊髄小脳運動失調症、6型脊髄小脳運動失調症、および7型脊髄小脳運動失調症からなる群より選択される、

(1)に記載の治療薬、
に関する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】

【発明の実施の形態】本発明は、トランスグルタミナーゼの活性の阻害剤である、シスタミンまたはモノダンシルカダベリンを有効成分とする、CAGリピート病の治療薬に関する。本発明において治療の対象となるCAGリピート病としては、例えば、脊髄、延髄性筋萎縮症、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、マーシャル・ジョセフ病、1型脊髄小脳運動失調症、2型脊髄小脳運動失調症、6型脊髄小脳運動失調症、および7型脊髄小脳運動失調症が挙げられる。本発明の治療薬は、シスタミンまたはモノダンシルカダベリンを有効成分とする限り、公知の製剤学的方法により製剤化されていてもよい。製剤化のための他の成分としては、例えば、薬理学的に許容される担体または媒体、例えば、生理食塩水、滅菌水、植物油、乳化剤、懸濁剤、安定剤等が挙げられるが、これらに制限されない。本発明の治療薬のCAGリピート病患者への投与は、公知の投与方法、例えば、動脈内投与、静脈内投与、皮下投与などの方法で投与することが可能である。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正内容】

【0029】

【発明の効果】本発明によりシスタミンまたはモノダンシルカダベリンを有効成分とする、CAGリピート病に対する治療薬が提供された。