

硫酸雙醣分子可修復蛋白質增益毒性 漸凍人治療新思路

陳韻如研究員 / 張育仁博士
中央研究院基因體研究中心



中央研究院基因體研究中心陳韻如研究員暨副主任（前排左六）、張育仁博士（前排右二）與研究團隊。

肌萎縮性側索硬化症，俗稱漸凍症（Amyotrophic Lateral Sclerosis，簡稱 ALS），是一種罕見但致命的運動神經元退化性疾病。雖然說是罕見疾病，但是實際案例常常在生活周遭被提及。這種病症會逐漸削弱患者的肌肉控制能力，導致行動、說話、吞嚥甚至呼吸的困難，嚴重影響了患者生活的各個層面。隨著病情進展，它殘酷地奪走了患者控制自己身體的能力，卻又讓他們頭腦清晰地意識到這一切的發生，最終生命沉沒在一場凍結的悲劇之中。本文將簡介有關漸凍症的成因、病徵、與治療現狀，以及本團隊在這一領域的最新研究進展。

揭開漸凍症的神秘面紗

漸凍症是一種影響運動神經元的神經退化性疾病。運動神經元是負責傳遞大腦指令至身體肌肉的神經細胞，這些細胞的損失會直接導致肌肉的無力與萎縮。這意味著患者的每一個動作，甚至每一次呼吸，都可能變成奢侈。而根據受影響的神經元位置，這種病症的進展速度因人而異。但一般來說，患者在出現症狀後的存活期約為 2 至 5 年。然而，也有部分患者，例如著名物理學家史蒂芬·霍金能存活超過 10 年甚至更久。

漸凍症的病理特徵

蛋白質因錯誤折疊而產生的異常堆積是眾多神經退化疾

病（neurodegenerative diseases）的病理特徵。在漸凍症中，異常堆積的 TDP-43 蛋白會損害神經細胞的正常功能，進而導致神經元死亡。此外，氧化壓力、粒線體功能障礙以及細胞內鈣離子失衡也都是科學家們探討的病理機制。然而，目前漸凍症尚無有效的治療方法，只有一些藥物可以些微緩解症狀並延緩病情進展，例如銳力得（Riluzole）。它是一種抑制氫氨酸釋放的藥物，可減少神經的興奮性毒性，但也只能稍微延長患者 3-6 個月的壽命。另一種藥物為依達拉奉（Edaravone），它是藉由減少細胞的氧化壓力來減緩神經元損傷。在支持性療法方面，可以利用物理治療來改善肌肉狀況，減輕病人發生痙攣的情形。或是日常生活中患者利用輔具改善生活條件，以及隨著呼吸相關肌肉的衰退，氣切手術及呼吸維持器的使用，都有助於患者維持呼吸的正常功能，但也同時大大加重了患者的負擔以及照護的困難度。因此，漸凍症急需新穎藥物的開發，其藥物市場仍有著相當大未被滿足的醫療需求（unmet medical need）。

然而，漸凍症的成因至今仍未完全被解開，科學家們也面臨著巨大的挑戰。目前的研究顯示，大於 90% 以上的漸凍症病例為偶發型，意即沒有明顯的家族遺傳病史，使其致病機制更為複雜。也意味著疾病的觸發可能涉及多種環境和基因交互作用，病理特徵上明顯表現出異質性。且目前尚缺乏合適的動物模型和細胞模型來進行研究，這種種的原因使得對於漸凍症的理解和治療進展產生極大的挑戰。雖然大約

只有小於 10% 的漸凍症病例具有家族遺傳性 (familial ALS)，但家族型漸凍症的病因通常與已知的基因突變密切相關。這些基因的異常提供了明確的切入點，幫助研究者深入了解疾病的分子機制。在家族型漸凍症中最常見的基因突變是 C9ORF72 基因的異常，其他相關基因也包括 SOD1、TARDBP 和 FUS 等。此次研究中，本團隊即是針對 C9ORF72 這個基因突變來進行漸凍症的相關研究。

C9ORF72 基因突變與漸凍症的關聯

C9ORF72 基因突變是目前已知於漸凍症最常見的遺傳因素之一，在家族型漸凍症的案例中佔比高達 40%。此基因位於人類第 9 號染色體 (9p21.2)，其正常功能包括參與細胞內運輸、自噬作用和免疫調節功能。在 2011 年，研究首度發現 C9ORF72 基因中的六核苷酸重複擴增 (GGG-GCC, G4C2) 與 ALS 呈現顯著相關 [1, 2]，成為家族型漸凍症的主要致病因子之一。在正常情況下，健康個體的 G4C2 重複數量通常小於 20 次。然而在 C9ORF72 相關家族型漸凍症患者中，重複數量可達數百至數千次，導致基因表達和細胞功能的異常。關於精確會造成病理現象的 G4C2 重複次數目前仍尚待更多的人類基因體定序研究，然而可以發現到重複次數的增加會提高患病的風險，而 C9ORF72 基因突變的病理機制可能主要藉由三種病理途徑來產生。其一，G4C2 在 C9ORF72 基因中的重複擴增可能導致基因本身的表達下降或喪失，對神經元造成損傷。其二，G4C2 重複擴增的 RNA 轉錄後會形成異常的二級結構，這些結構能捕捉 RNA 結合蛋白，干擾正常的 RNA 代謝和細胞功能。其三，也是目前學界普遍認為的主因，G4C2 重複擴增會觸發一種非典型的蛋白質轉譯過程 (RAN translation)，因而產生五種異常的雙胜肽重複序列 (Dipeptide Repeats, DPRs)，包括了聚甘胺酸 - 丙胺酸 (poly-glycine-alanine, poly-GA)、聚甘胺酸 - 精胺酸 (poly-glycine-arginine, poly-GR)、聚甘胺酸 - 脯胺酸 (poly-glycine-proline, poly-GP)、聚脯胺酸 - 精胺酸 (poly-proline-arginine, poly-PR) 和聚脯胺酸 - 丙胺酸 (poly-proline-alanine, poly-PA)。在 C9ORF72 相關家族型漸凍症患者的海馬迴、額葉和運動皮質層、脊髓和小腦中，都可發現這些雙胜肽重複序列所造成的蛋白質異常堆積。先前，本團隊與國輻中心鄭有舜研究員合作 (TLS 23A1 BioSAXS/WAXS 光束線)，發現 poly-GA 會形成具有毒的類澱粉蛋白質纖維，而 poly-GA 的纖維化聚集會在細胞之間進行傳遞及擴散，這是首度發現 poly-GA 具有類澱粉蛋白的性質，為神經退化性疾病提供了一項有關蛋白質錯誤折疊的佐證，此論文已於 2016 發表在國際期刊 Journal of Biological Chemistry [3]。除了 poly-GA 之外，poly-GR 和 poly-PR 這兩種富含精胺酸的雙胜肽重複序列，被認為是最具毒性的兩種雙胜肽重複序列。目前有關於 poly-GR 和 poly-PR 的毒性機制仍在積極研究中，可能的機制包括引起核仁壓力、阻塞核仁孔的運輸、破壞核醣體與 RNA 的合成、降低粒線體功能和抑

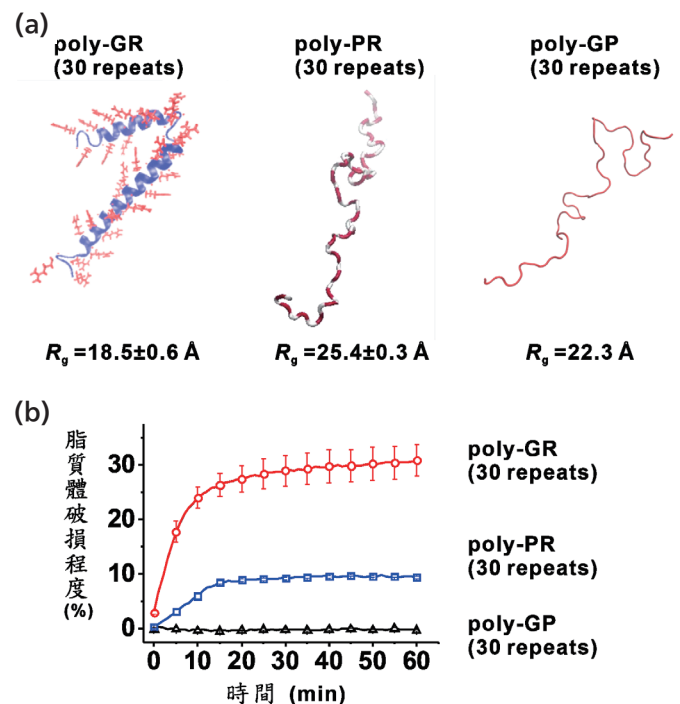
制蛋白質轉譯。然而關於 poly-GR 和 poly-PR 的長度與其細胞毒性之間的關聯也尚待釐清。

與國輻中心合作，解析雙胜肽重複序列的基本結構

為了闡明雙胜肽重複序列的毒理機制，本團隊在這次的研究中，使用化學合成的雙胜肽重複序列來檢驗 poly-GR 和 poly-PR 產生細胞毒性所需的最小長度。我們並再次與國輻中心鄭有舜研究員攜手合作，利用圓二色譜光譜和小角度 X 光散射 (SAXS) 結合分子模擬技術，首次發現了 poly-GR 在水溶液中產生了螺旋結構，而 poly-PR 的結構相較為之鬆散且不規則 (圖一)，由於 poly-GR 和 poly-PR 在胺基酸組成上高度重複，其結構的資訊更顯得來不易。並且 poly-GR 的螺旋結構暗示了其對於生物膜的穿透作用，於是本團隊利用脂質體泄漏 (liposome leakage) 和鈣流入 (Calcium influx) 兩項實驗證實了 poly-GR 對於細胞膜和核膜的破壞。此外，我們也進一步研究了 poly-GR 和 poly-PR 對 DNA 複製、RNA 轉錄或蛋白質轉譯的抑制以及在細胞中核質運輸的破壞。

成功篩選出可中和雙胜肽重複序列的硫酸雙醣分子

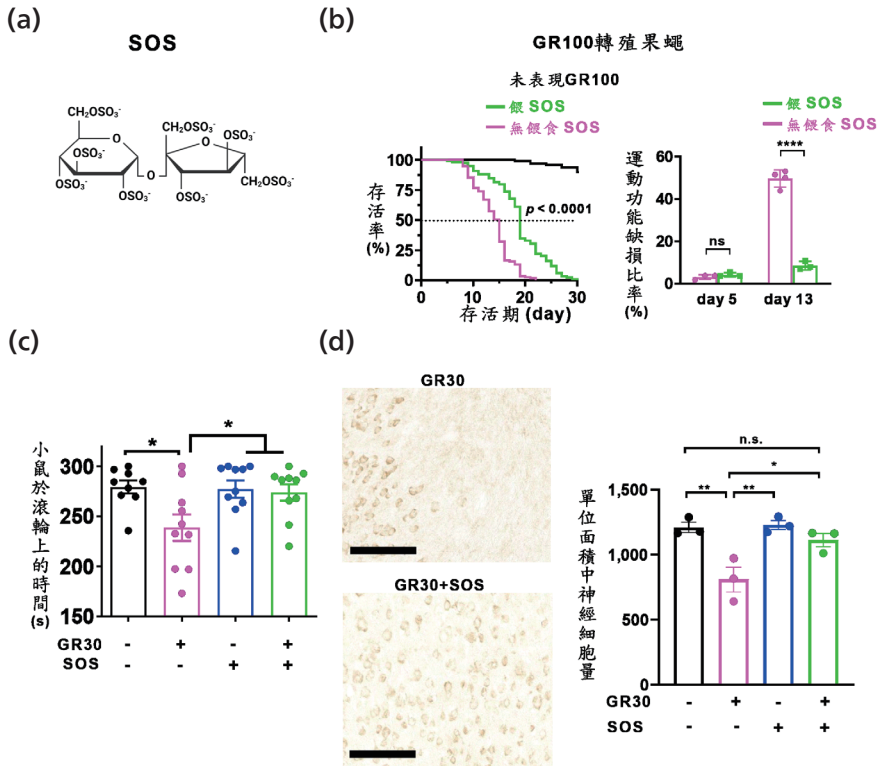
接著，本團隊利用中研院基因體中心洪上程特聘研究員獨有的雙醣分子庫及外購雙醣分子，篩選出了一種具硫酸化的雙醣可以中和上述提到的毒性，並在不同層級的生物模式



圖一 Poly-GR、poly-PR 及 poly-GP 以小角度 X 光散射結合分子模擬技術所得的結構與其破壞脂質膜的程度。(a) Poly-GR 於水溶液中呈現鬆散螺旋狀，相較於 poly-PR 及 poly-GP 的不規則的構型，可反應在 (b) 破壞脂質體的程度。[4]

中都證實這個硫酸化雙糖在醫藥方面的可能性，例如我們自漸凍症病人身上取得的多功能幹細胞分化而成的運動神經元，發現這個硫酸雙糖分子可以增加此類神經元存活率。我們在具有 poly-GR 和 poly-PR 基因轉殖的果蠅模型上，發

現這個硫酸雙糖分子可以延長其壽命和改善其運動功能（圖二）。最後，若我們在小鼠腦部運動皮層注射 poly-GR 會看到小鼠運動功能的退化，利用共同注射這個硫酸雙糖分子我們亦可以中和這個現象（圖三）。



圖二 硫酸雙糖分子 SOS 可延長果蠅壽命、改善果蠅和小鼠的運動功能。(a) 硫酸雙糖分子 SOS 的化學結構式。(b) SOS 可延長 poly-GR100 轉殖果蠅的壽命，並且改善因 poly-GR 所受損的運動功能。(c) SOS 可維持小鼠因注射 poly-GR 於腦部而受損的運動功能。(d) SOS 可保護小鼠因注射 poly-GR 於腦部而受損的神經細胞。[4]



圖四 陳韻如研究員（右）與國家同步輻射研究中心鄭有舜研究員（左）合影。

未來展望

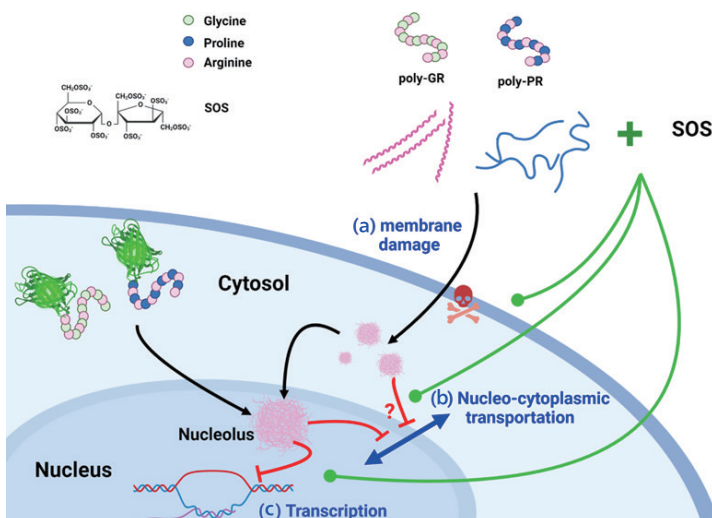
目前團隊正積極研發新穎硫酸醣分子，並改善疾病小鼠模式。我們期待更多的科學研究能為漸凍症帶來真正的突破，也為日後藥物的發展找尋契機，讓備受煎熬的漸凍症患者看到長久以來難得的曙光，也期許更多青年學子可以加入我們的行列。本研究成果已於 2024 年發表於國際頂尖期刊 Science Advances [4]。

致謝

我們衷心感謝國輻中心鄭有舜研究員及團隊，提供卓越精良的 TPS 13A 及 TLS 23A1 生物結構小角度 X 光散射 (SAXS) 光束線實驗站，以及在實驗站優秀的人員，包括林楷泰先生、施怡之博士、葉奕琪博士、廖桂芬小姐、林典樟先生、張哲璋博士及蘇群仁博士，一路以來在實驗及數據分析上給我們各項協助及指導，希望這樣的合作能持續產生新的火花，為造福神經退化性疾病的患者盡一份心力。

相關文獻

1. M. DeJesus-Hernandez *et al.*, *Neuron* **72**, 245 (2011).
2. A. E. Renton *et al.*, *Neuron* **72**, 257 (2011).
3. Y. J. Chang *et al.*, *J. Biol. Chem.* **291**, 4903 (2016).
4. Y. J. Chang *et al.*, *Sci. Adv.* **10**, ead0347 (2024).



圖三 Poly-GR、poly-PR 致病機制與硫酸雙糖分子藥物作用。Poly-GR 和 poly-PR 皆顯示會 (a) 破壞細胞膜，其中長鏈的 poly-GR 具螺旋狀構型，更增強此效應。進入細胞後，將 (b) 抑制核 - 質之間的運輸機制。poly-GR 和 poly-PR 最終會進入細胞核，尤其在核仁可看到大量 poly-GR 和 poly-PR，進而 (c) 抑制轉錄作用。而在加入硫酸雙糖分子 SOS 後，細胞毒性會因為 SOS 與 poly-GR/-PR 的結合而降低，增加細胞的存活率。