

主論文の要旨

p62/SQSTM1 Differentially Removes the Toxic Mutant Androgen Receptor via Autophagy and Inclusion Formation in a Spinal and Bulbar Muscular Atrophy Mouse Model

p62/SQSTM1 は球脊髄性筋萎縮症マウスモデルにおいてオートファジーと封入体形成の二つの経路を介して変異アンドロゲン受容体の毒性を軽減させる

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
脳神経病態制御学講座 神経内科学分野

(指導：祖父江 元 教授)

土井 英樹

【目的】

球脊髄性筋萎縮症(SBMA)は、アンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子内の CAG リピートの異常延長により、運動ニューロンなどが特異的に変性死に陥る疾患である。SBMA での細胞障害機序は変異 AR が蓄積することが発端と考えられるが、その分子レベルでの機構は完全に明らかにされているとは言えない。当教室では、chicken β -actin のプロモーターの調節下で異常延長した CAG リピートを包含するヒトの全長の AR 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (Tg) を作成した。Tg では運動機能障害や病理学的な所見に明らかな性差がみられ、Tg に対する去勢術、Leuprorelin 投与は治療効果を示した。また、分子シャペロン (HSP70) やユビキチンリガーゼ (CHIP) の高発現も治療効果を示しユビキチン・プロテアソーム系を介した AR の分解の重要性を示してきた。p62/SQSTM1 (p62) は、オートファジーに関連する蛋白質で、ユビキチン化蛋白質との結合部位及びオートファゴソームの構成蛋白質である LC-3 との結合部位を有する。さらに、これまでに神経変性疾患で特異的な封入体に共存することが報告され、自己凝集作用を介して病因蛋白質の封入体形成に関連することも想定されている。

今回、SBMA について培養細胞及びマウスモデルを用いて病態形成における p62 の関与とオートファジー及び封入体形成の果たす役割を検証した。

【方法及び結果】

p62 ノックダウン及びノックアウトの効果

正常 (AR10Q) あるいは変異 AR (AR112Q) を発現する PC12 細胞モデル (stable cell line) にオートファジー阻害剤である Bafilomycin A1 を投与すると、AR10Q、AR112Q が共に蓄積した。次に AR と p62 の関係をみるため、免疫蛍光染色を行うと AR10Q と AR112Q は p62 及び LC-3 と共存した。免疫沈降法でも正常あるいは変異 AR は p62、LC-3 と interaction し、AR は p62 のポリユビキチン結合ドメインに mutation を入れても正常型 p62 と同程度に共沈した。この結果から AR は、ユビキチン化されなくても p62 と interaction しオートファジーで分解されることが示唆された。さらに p62 をノックダウンしても AR10Q、AR112Q が共に蓄積し、mouse neuroblastoma cell-line (Neuro2A) に正常 (AR24Q) あるいは変異 AR (AR97Q) を一過性強制発現したモデルで p62 をノックダウンしても、AR24Q、AR97Q が共に蓄積し、同様の結果を示した。pulse-chase 解析では p62 のノックダウンによって AR の分解が阻害されていた。以上の結果から p62 が減少すると AR の分解が阻害されて蓄積することが示唆された。そこで、SBMA モデルマウスと p62 ノックアウトマウスを交配し SBMA の病態形成における p62 の役割を検証した。p62 がノックアウトされた群 (homozygote 及び heterozygote) では、生存期間の短縮、体重減少及び運動機能低下を、対照群に対して認めた。また、脊髄及び骨格筋で抗ポリグルタミン抗体 (1C2) を用いて免疫染色を行うと、変異 AR が核内に蓄積した細胞数が増加し、Western blot 解析 (WB) でも変異 AR の発現増加を認めた。これらの結果から、p62 ノックアウトにおいても変異 AR の分解が阻害されて蓄積する事が示唆された。

p62 高発現の効果

次に、p62高発現の効果をみるため、chicken β -actinのプロモーターの調節下でヒトp62を高発現するマウスを作成してSBMAマウスと交配して、表現型の解析を行った。p62高発現群では生存期間の改善、体重減少及び運動機能低下の改善効果を対照群に対して認めた。p62高発現群の脊髄における1C2抗体での免疫染色では、核内にびまん性に蓄積するAR(diffuse nuclear staining : DNS)が減少する一方、核内封入体(nuclear inclusion : NI)が増加しており、p62は封入体形成を促進して、DNSを減少させていた。p62高発現群での変異ARは、mRNAレベルに発現変化は認めなかったが、蛋白質レベルでは、可溶性の変異ARの凝集体が減少していた。さらに、不溶性分画を尿素バッファで溶出するとARが増加していた。SBMA培養細胞モデル (Neuro2A) でp62を高発現してもARのsteady-stateレベルに影響を与えなかったことより、p62を高発現すると封入体形成を促進して細胞保護的に働くことが示唆された。

【考察】

本研究により、SBMAの細胞及び動物モデルにおいて、p62の発現を減少させると、変異ARが蓄積することによってSBMAの病態を悪化させることを示した。一方、p62高発現はマウス実験において、興味深いことに変異ARのNIを増加させて運動機能及び生存率を改善させた。p62はオートファジーで分解される基質として知られ、さらにN末端に自己凝集能を持つドメインが存在し、オートファジー不能マウスにおいては封入体形成に関連することが報告されている。また、ポリグルタミン病だけでなく他の神経変性疾患であるアルツハイマー病、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症でもp62陽性の封入体が残存神経細胞に存在することが報告され、p62は病因蛋白質の封入体形成に関係していることが考えられる。ポリグルタミン病であるハンチントン舞踊病のモデル細胞において、p62のリン酸化が変異蛋白の分解に重要であると報告された。本研究でも、Neuro2Aを用いた免疫沈降及びpulse-chase解析において、p62がユビキチン化を介さずに直接ARを認識してオートファジーで分解していることが判明した。

ポリグルタミン病の病態形成において、病因蛋白質がモノマー、オリゴマーそして封入体を形成していくと考えられているが、前二者が細胞毒性的に働いているとの報告がある。SBMAモデルマウスとp62高発現マウスの交配実験において、p62高発現群では、可溶性の変異ARの凝集体が減少し、病理学的にNIの増加及びDNSの減少が観察された。さらに、蛍光二重免疫染色においてp62は変異ARからなる封入体の中心に存在しており、p62の自己凝集作用を介して変異ARを封入し、細胞保護的に働いたと考えられた。SBMA患者の病理学的検索によって、DNSはCAGリピート数に相関し、逆にNIは相関せず、DNSが病態とより関連すると考えられている。本研究でもDNSの減少を病理学的検索で認めており、SBMAモデルマウスの表現型改善効果をもたらしたと考えられた。また、SBMA患者の脊髄運動神経細胞においてもp62はNIと共存しており、同様の機序が人でも起こっている可能性が示唆される。

【結論】

SBMA モデルマウスにおいて、p62 は AR との相互作用によりオートファジーで分解されることによって深く病態に関係しており、今後は変異蛋白質を特異的に分解するオートファジー活性化治療の開発が重要と考えられる。同時に p62 は自己凝集能により AR の封入体を増加させ深く病態に関与している。ポリグルタミン病において封入体は神経保護的に作用するとの報告があり、p62 は封入体形成を促進する分子の一つであると考えられた。