

主論文の要約

**Paeoniflorin eliminates a mutant AR  
via NF-YA-dependent proteolysis in  
spinal and bulbar muscular atrophy**

〔 Paeoniflorin は球脊髄性筋萎縮症モデルにおいて  
NF-YA に依存するタンパク質分解を介して変異 AR を除去する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻  
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)

藤内 玄規

## 【目的】

ポリグルタミン病は原因遺伝子の翻訳領域内に存在するグルタミンをコードする CAG リピートの異常伸長に起因する遺伝性神経変性疾患の総称である。球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) はポリグルタミン病として初めて同定された神経変性疾患でアンドロゲンレセプター (AR) 遺伝子の第 1 エクソン内の CAG リピートの伸長に起因する運動ニューロン病である。変異 AR タンパク質が神経細胞核内で封入体を形成、あるいは蓄積する過程で神経毒性を発揮し病態を形成するとされている。SBMA を含む神経変性疾患の共通の特徴に異常タンパク質の蓄積がある。この蓄積は病原性タンパク質を除去するタンパク質分解機構である分子シャペロン-ユビキチンプロテアソーム機構 (UPS) やオートファジーの障害を反映していると考えられる。熱ショックタンパク質 (Hsp) はストレスによって誘導される分子シャペロンで、病原性タンパク質分解機構に重要な役割を果たしていると考えられる。Paeoniflorin (PF) は様々な薬理作用を持つ化合物であり Hsp70 の発現を誘導する事が知られている。そこで、分子シャペロン-UPS とオートファジーを分子標的とし、タンパク質分解系の活性化による神経変性疾患の治療法の開発を視野に入れて、SBMA の細胞モデルとマウスモデルに対して PF を用いた治療的介入実験を行った。

## 【方法及び結果】

正常 AR (AR-24Q) 及び変異 AR (AR-97Q) を含有する AR 安定発現 NSC34 細胞モデルに PF を投与しウェスタンブロットを用いたタンパク質発現解析を行うと容量依存的に AR の発現レベルは低下した。低下レベルは正常 AR より変異 AR で有意に大きく、この結果は PF の変異 AR に対する選択性を示唆する。分子シャペロンである Hsp70、Hsp40、ユビキチンリガーゼである carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP)、転写因子である nuclear factor-YA (NF-YA)、transcription factor EB (TFEB) の発現レベルは PF の濃度依存的に増加した。また PF による AR の分解はプロテアソーム阻害剤である Lactacystin、オートファジー阻害剤である Bafilomycin A1 により抑制され、PF による AR の分解は UPS とオートファジーの双方によるものである事が示唆された。PF の投与は AR の mRNA 濃度を変化させなかった事から AR の RNA 発現に影響を与える事無く AR を分解すると考えられる (図 1)。

AR-97Q 安定発現 NSC34 細胞で NF-YA を一過性強制発現させると AR タンパク質は有意に減少し、Hsp70、CHIP、TFEB タンパク質の発現レベルは増加した。また AR-97Q 安定発現 NSC34 細胞で NF-YA をノックダウンすると PF による効果は抑制された (図 2)。この結果 PF は NF-YA の発現増加を通して AR を分解しタンパク質分解機構に関わるタンパク質を広範に活性化する事が示唆された。

TFEB を SBMA 細胞モデルに一過性強制発現すると正常 AR、変異 AR の発現は減少しオートファジー形成の指標となる LC3-II の発現が増加した。この結果から TFEB の高発現がオートファゴソーム形成を誘導し AR タンパク質の分解を促進すると考えられる (図 3)。

次に正常 (AR-24Q) 及び伸長した (AR-97Q) ヒトの全長 AR を含有する SBMA マウスモデルに生後 5 週令より 6.7mg/kg (PF1) または 13.4mg/kg (PF2) の PF を毎日腹腔内投与しその効果を検討した。AR-97Q マウスの病態進行は体重変化、生存率、Rotarod、Cage activity の 4 つのパラメーター全てで PF 投与により有意に改善した (図 4)。また、16 週令の AR-97Q マウスの脊髄及び骨格筋で抗ポリグルタミン抗体である 1C2 を用いて免疫染色を行うと 1C2 陽性細胞数は PF 投与で減少した。ウェスタンブロット解析においても PF の投与により AR の発現レベルの低下が確認された。PF 投与により脊髄前角細胞の抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 染色で反応性アストログリオシスの減少が見られ、骨格筋の組織診断においても筋萎縮の改善がみられた (図 5)。PF 投与群では脊髄及び骨格筋において NF-YA の mRNA レベルが増加し NF-YA、Hsp70、Hsp40、CHIP、TFEB 各タンパク質の発現レベルも増加し (図 6)、リソソームに含まれるプロテアーゼや LC3-II タンパク質の発現レベルも増加した (図 7)。これらの結果から PF による分子シャペロン、CHIP と TFEB の増加が分子シャペロン-UPS とオートファジー分解を経て変異 AR の減少を促す事が示唆された。

#### 【考察】

本研究により SBMA マウスモデルにおいて PF の投与は変異 AR を減少させ病態を改善する事を示した。PF は、モノマー及び凝集体の変異 AR の発現レベルを低下させた。ポリグルタミン病、パーキンソン病、Alzheimer 病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患では一般的に病原性タンパク質の異常な蓄積と核および細胞質の封入体形成が認められる。病的な条件下では、ミスフォールドタンパク質、有毒なタンパク質の蓄積が、タンパク質分解機構の能力を上回る可能性がある。本研究において PF が NF-YA を介した分子シャペロン-UPS とオートファジーを強く誘導し変異 AR の蓄積を減少させ SBMA マウスモデルの表現型を改善した。

本研究で NF-YA は分子シャペロンとともに CHIP と TFEB の発現も調節し、病原性タンパク質の除去とタンパク質の恒常性の持続に重要な役割を果たすことが示された。SBMA マウスにおいては、NF-YA の mRNA レベルの減少と内因性 NF-YA の封入体へのトラップにより NF-YA の発現レベルの低下が見られた。これに対応して脊髄、骨格筋で CHIP、TFEB の発現が低下していた。これらの分子の減少はタンパク質の分解機構の機能を低下させポリグルタミンによる毒性を強めると考えられた。SBMA 患者の運動ニューロンと骨格筋においても変異 AR 核内封入体に NF-YA の共局在が確認された。PF による NF-YA の発現増加がタンパク質分解機構を改善する可能性が考えられる。

CHIP は Hsp90、Hsp70 と相互作用し UPS の分解に関わり、変異タンパク質や伸長したポリグルタミン鎖は CHIP によってよりユビキチン化されやすい事が報告されている。本研究でも PF 投与は分子シャペロン、CHIP の発現を増加し変異

AR を UPS により選択的に分解する可能性が示唆された。

また PF の投与により TFEB の発現レベルの増加も確認された。TFEB はリソソームのバイオジェネシスを促進する転写因子である。PF の投与で TFEB とプロテアーゼの発現は増加し変異 AR の分解を促進することで、SBMA マウスの表現型の障害は回復したと考えられる。

以上のことから PF は分子シャペロン-UPS とオートファジー 2 つのタンパク質分解機構を活性化し変異 AR を分解する事が示唆された。

#### 【結論】

PF の SBMA 細胞モデルと SBMA モデルマウスへの投与は、有意な治療効果を示した。モデルマウスへの長期連続投与に、明らかな副作用は確認されなかった。PF は強力に分子シャペロン-UPS とオートファジー両者のタンパク質分解機構を活性化し、変異 AR の分解を促進した。これらの結果から PF の投与は SBMA を含む異常タンパク質の蓄積によって引き起こされる神経変性疾患に対する安全で有望な治療と考えられる。