

主論文の要旨

Pioglitazone suppresses neuronal and muscular degeneration caused by polyglutamine-expanded androgen receptors

ピオグリタゾン、アンドロゲン受容体の
ポリグルタミン伸長による神経・筋変性を抑制する

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)

飯田 円

【目的】

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は、アンドロゲン受容体 (AR) の CAG リピートの異常伸長により運動ニューロン変性を呈する神経筋疾患である。ポリグルタミンを含む異常 AR が、アンドロゲン依存性に核内に移行することで病態が発現すると考えられている。現時点では根本的な治療法は開発されていない。Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) は転写因子である PPAR family の一つであり、脂質代謝、糖質代謝、炎症反応、NF κ B シグナル、ミトコンドリア機能等における幅広い役割が知られている。本研究では SBMA における神経変性の分子病態を解明し、PPAR γ アゴニストである pioglitazone (PG) の効果を検討した。また PG の薬効を分子レベルで解明することにより、SBMA の新規標的分子を同定した。

【方法及び結果】

神経細胞 (NSC34 細胞) と筋細胞 (C2C12 細胞) に対して、伸長した (AR-97Q) もしくは正常 (AR-24Q) の CAG リピートを有する N 末 AR 断片を一過性強制発現させ、SBMA 細胞モデルとそのコントロールを作成した。ウエスタンブロットを用いてそれぞれの PPAR γ の発現量を定量したところ、AR-97Q 断片を発現する SBMA 細胞モデルではコントロールに比べ減少していた (図 1)。また PPAR γ のプロモーター活性も SBMA 細胞モデルで低下していた。全長の変異 AR を発現する安定細胞株でも同様の結果であり、dihydrotestosterone 添加による AR の核内移行により PPAR γ のプロモーター活性はさらに低下した。PPAR γ を一過性強制発現させることにより細胞の viability が改善し、PPAR γ のノックダウンでは viability が低下した。これらの結果は PPAR γ の SBMA 細胞モデルに対する保護的な役割を示唆した。さらに SBMA 細胞モデルに PG を投与したところ PPAR γ の発現量が増加し、細胞の viability やミトコンドリア機能の改善、および細胞死の減少がみとめられた。

次にヒトの full length AR を有する SBMA モデルマウス (AR-97Q) (n=20) に、生後 6 週齢から PG を粉末飼料に混和して ad libitum に経口投与し、対照群 (n=21) と運動機能や寿命などの表現型を比較した (図 2)。実際に経口摂取された PG の量は 8 週齢で $26.5 \pm 1.04 \text{mg/kg/day}$ 、12 週齢で $24.3 \pm 4.44 \text{mg/kg/day}$ であった。AR-97Q マウスの病態進行は、体重、Rotarod、握力、生存率の全てのパラメーターにおいて PG 投与により有意に改善した。さらに、神経症状発症後 (8 週齢) に治療を開始した場合の効果も検討したところ、6 週齢からの治療開始よりは効果が弱かったものの、PG 投与により有意な運動機能・寿命の改善をみとめた。SBMA マウスモデルの脊髄・骨格筋の双方において、コントロール (野生型) と比較して PPAR γ の発現量は低下し、PG 投与により上昇した。病理学的には、脊髄と骨格筋における変異 AR の核内集積は治療前後で変化がなかったものの、運動ニューロンと骨格筋の萎縮改善、アストログリア増生の抑制をみとめた (図 3)。さらにウエスタンブロット・免疫組織化学等の手法を用いて解析したところ、SBMA モデルマウスでは野生型マウスと比較

して、ミトコンドリア機能の低下、酸化ストレスの上昇（図 4）、運動ニューロンや骨格筋における NFκB シグナルの活性化（図 5,6）、グリア細胞機能の変化（図 7）がみとめられたが、これらの分子変化は PG 投与により改善した。マイクロアレイ解析を用いてマウス脊髄と骨格筋における遺伝子発現を治療群と無治療群で比較したところ、免疫機能に関与する遺伝子の変化を多くみとめ、細胞・動物実験において PG が NFκB シグナルを抑止したと矛盾しない結果であった（図 8）。

【考察】

本研究では、SBMA の細胞、マウスモデルにおいて異常 AR がミトコンドリア機能に重要な PPARγ の転写を抑制していることが示された。ミトコンドリア機能の改善を期待して PG を投与したところ、SBMA モデル細胞の viability 改善、モデルマウスの病態改善をみとめ、さらにその分子基盤として酸化ストレス、NFκB シグナルの活性、グリア細胞の形態・機能の改善をみとめた。これらは SBMA の病態の一部であり、治療の標的になる可能性が考えられた。PPARγ アゴニストは神経変性疾患、外傷、脳梗塞などの疾患モデルへの効果が示唆されている。ALS のモデルマウスでは運動機能改善、寿命延長が報告されており、ハンチントン病ラットモデルでも PG 投与により運動機能と酸化ストレスの改善が示されている。PG は神経変性疾患などのモデル動物において、iNOS、NFκB、ニトロチロシンを低下させることが報告されており、本研究でもその一部が示された。

本研究でも、SBMA マウスモデルの脊髄と骨格筋において、酸化ストレスや NFκB シグナルの活性化において類似した分子学的変化をみとめた。また神経細胞と筋細胞を用いた細胞実験でも同様の結果を得た。さらに PG が神経と筋双方に直接的な薬理効果を及ぼしていることが示され、神経のみならず骨格筋も重要な治療の対象であることが示された。また今回の研究により、NFκB シグナルが SBMA の病態に深く関与していることが示された。NFκB 活性化は様々な神経変性疾患と関連していることが報告されており、NFκB シグナルは神経疾患に共通した治療の標的である可能性がある。既報告によると酸化ストレス、NFκB シグナルの活性、グリア細胞の機能はお互い結び付いており、変性疾患の病態の複雑さを示しているとともに、これらの複数の経路に作用する治療法の必要性を示唆している。

PG は現在糖尿病薬として使用されており、SBMA を含め神経変性疾患の安全かつ効果的な治療薬の候補であると考えられる。ただし、マウスレベルで効果が示されている ALS については臨床試験では有効性が示されておらず、SBMA 患者に対する本治療法の有効性については更なる解析が必要と思われる。

【結論】

SBMA では PPARγ の発現が低下しており、そのアゴニストである PG は脊髄および骨格筋において SBMA の病態を抑止することが示された。また、SBMA では NFκB シグナルの活性化がみとめられたことから、今後 NFκB シグナルが治療の標的分子となる可能性が考えられた。