

主論文の要旨

Chemical chaperone 4-phenylbutylate reduces mutant protein accumulation in the endoplasmic reticulum of arginine vasopressin neurons in a mouse model for familial neurohypophysial diabetes insipidus

ケミカルシャペロン 4-PBA は家族性中枢性尿崩症モデルマウスにおいてバソプレシンニューロンの小胞体内の変異蛋白の蓄積を減少させる

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：有馬 寛 教授)

椽谷 昌佳

【緒言】

バゾプレシン (AVP) は抗利尿ホルモンであり、視床下部の視索上核 (SON) および室傍核の大細胞で産生されたのちに下垂体後葉へ軸索輸送にて運ばれ、体循環へ分泌される。

家族性中枢性尿崩症 (FNDI) は生後数ヶ月から数年にかけて緩徐に進行する多尿を呈する常染色体優性遺伝性疾患で、原因となる遺伝子変異の大部分はバゾプレシン (AVP) の担体タンパクであるニューロフィジン II 領域に認められる。我々が作出した FNDI モデルマウスの解析にて、変異タンパクが小胞体に蓄積することによる小胞体ストレスが病態の進行に関与していることを明らかにした。FNDI マウスの AVP ニューロンにおいて変異タンパクの蓄積は細胞内封入体として観察され、電子顕微鏡において凝集体が小胞体の一部に変異タンパクが隔離された区画 (ERAC: Endoplasmic reticulum-associated compartment) として観察された。さらに、脱水負荷による AVP 産生刺激後は ERAC の形成が破綻し凝集体が小胞体全域に広がることで小胞体ストレスが増大し、多尿が進行すると共に最終的には AVP ニューロンのオートファジー関連細胞死が誘導されることが示された。

小胞体はタンパク質の合成や折りたたみの役割を担っている細胞内小器官である。正常に折り畳まれなかった構造の異常なタンパク質が小胞体内に蓄積することで小胞体ストレスが惹起される。小胞体ストレスに対する細胞内の恒常性維持機構が小胞体ストレス応答であり、小胞体ストレスを軽減するために immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP) をはじめとする小胞体シャペロンが誘導され、慢性的な小胞体ストレスは最終的に細胞死を導く。小胞体ストレスは神経変性疾患、うつ病、悪性腫瘍、糖尿病といった様々な疾患で関与が指摘されている。ケミカルシャペロン 4-phenylbutylate (4-PBA) は各疾患動物モデルにおいて小胞体ストレスを軽減すること、さらに *in vitro* において小胞体内に蓄積する蛋白を減少させることが報告されている。本研究では 4-PBA の FNDI マウスの多尿の進行および AVP ニューロンの細胞死に対する効果、また FNDI マウスの AVP ニューロンにおける小胞体ストレスマーカーとしての BiP の発現量および小胞体内に蓄積する変異タンパクに対する効果について検討した。

【対象および方法】

2ヶ月齢の雄性 FNDI マウスをコントロール群と 4-PBA 群に割り付けた。4-PBA 群には通常飼育下で 4-PBA (1 g/kg/day) を 28 日間経口投与した。代謝ケージにて飼育し尿量、飲水量、体重変化および尿中 AVP を測定した。深麻酔下に灌流固定を施行後、脳を摘出し 16 μm 厚の連続凍結切片を作成し、視索上核 (SON) の AVP ニューロン数や AVP ニューロンにおける封入体数の評価、*in situ hybridization* 法による AVP mRNA および BiP mRNA の発現量の評価に用いた。また、灌流固定後に切り出した 100 μm 厚の脳切片に対して後固定・エタノール脱水・包埋を行った後に 70 μm 厚の超薄切片を作成し、電子顕微鏡法による超微形態学的評価を行った。

また3ヶ月齢のFNDIマウスをコントロール群と4-PBA群に割り付け、脱水負荷として7日間の2%食塩水経口負荷を行った。4-PBA群には4-PBA (1 g/kg/day) を経口投与しその効果を検討した。

【結果】

通常飼育下での検討では4-PBA群はコントロール群と比して尿量と飲水量の減少を認め、その効果は観察期間中継続して認められた (Fig. 1A, B)。体重は両群間で差を認めなかった (Fig. 1C)。尿中AVPはコントロール群と比較し、4-PBA群で増加を認めた (Fig. 1D)。AVPニューロンにおける封入体数の検討では4-PBA群でコントロール群と比して減少し (Fig. 1E, F)、超微形態学的評価では4-PBA投与により凝集体が縮小していることが示唆された (Fig. 1G, H)。SONにおけるAVP mRNA及びBiP mRNAの検討では、AVP mRNAは両群で差を認めなかったものの、BiP mRNAはコントロール群と比較し4-PBA群で減少していた (Fig. 1I, J)。

3ヶ月齢のFNDIマウスに2%食塩水負荷を行うとコントロール群と4-PBA群は共に尿量および飲水量の増加と体重減少を認めたが、4-PBA投与によりその変化は有意に改善を認めた (Fig. 2A-C)。尿中AVPは両群共に投与初日に著明に増加し、2日目以降減少したが、4-PBA群はコントロール群と比較し高値だった (Fig. 2D)。投与3日目の時点においてAVPニューロン数は両群で差を認めなかったが、封入体数は4-PBA群と比較しコントロール群で少なかった (Fig. 2E, F)。超微形態学的評価ではコントロール群のいくつかのAVPニューロンでは凝集体が小胞体全体に散在していたものの (Fig. 2G)、4-PBA群では部分的にERACの形成が維持されていた (Fig. 2H)。AVP mRNA及びBiP mRNAは2%食塩水負荷によりコントロール群で増加を認めたが、4-PBA投与によりこの増加が有意に減少した (Fig. 2I, J)。コントロール群は7日間の2%食塩水負荷により40%が死亡したが、4-PBA群では全例が生存した (Fig. 3A)。また7日目のAVPニューロン数を検討するとコントロール群は4-PBA群と比較し細胞数の減少を認めた (Fig. 3B, C)。

【考察】

本研究にて、ケミカルシャペロン4-PBAはFNDIマウスにおいてAVP分泌を増加させ、尿量を減少し、AVPニューロンの細胞死を抑制することが示された。また*in vivo*において4-PBAがAVPニューロンの小胞体内に蓄積する変異タンパクを減少させることが示唆された。

4-PBAがAVPニューロンの封入体数を減少させたことから、4-PBAが小胞体内に蓄積する変異タンパクを減少させたことが示唆された。その結果としてFNDIマウスのAVPニューロンの小胞体ストレスが軽減しAVP分泌が増加し、多尿が抑制されたと考えられた。

以前の研究でFNDIマウスは加齢や脱水負荷によりERACの形成が破綻し凝集体が小胞体全域に広がることで小胞体ストレスが増大し、AVPニューロンのオートファジ

一関連細胞死が誘導されることを示した。本研究でも FNDI マウスに 2%食塩水負荷を行うと多尿の進行が加速すること、負荷 3 日目で ERAC 形成が破綻することが明らかになった。このような状況でさえ、4-PBA は ERAC の形成や AVP の分泌を保持した。さらに 7 日目での検討では AVP ニューロン数も 4-PBA 群がコントロール群と比較し有意に多く、4-PBA が脱水下での FNDI マウスの AVP ニューロンの細胞死を抑制することが示された。

4-PBA 投与により FNDI マウスの AVP ニューロンにおいて BiP mRNA 発現が減少し、AVP 分泌が増加したことから、4-PBA が変異タンパクの蓄積を減少させることで翻訳後の AVP プロセッシングを促進したことが示された。

【結語】

4-PBA は FNDI マウスの AVP ニューロンにおける変異タンパクの蓄積を抑制することで小胞体ストレスを軽減し、FNDI マウスの病態進行を抑制することが示された。