

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293207

研究課題名(和文) 神経変性疾患における病因蛋白質の選択的分解の促進による治療法の開発

研究課題名(英文) Selective protein degradation with the aim of developing therapies for neurodegenerative diseases

研究代表者

足立 弘明 (Adachi, Hiroaki)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：40432257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、オートファジーと分子シャペロン-ユビキチン・プロテアソーム系(UPS)などの細胞内の蛋白質分解処理機構において、TFEB(転写因子EB)やHIKESHI等の調節因子の発現を増強してオートファジーと分子シャペロン-UPSの両者を活性化することにより、ターゲットの病因蛋白質に対して特異性が高く、強力な病因蛋白質の除去効果のある治療法を探索した。本研究により、TFEBの高発現によって変異した病因蛋白質の分解が選択的に促進されることを見出した。TFEBは既存のオートファジーのアダプター分子とは関係しないことが判明し、TFEBは別な機構で変異蛋白質特異的な分解を行っていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The transcription factor EB (TFEB) has been reported to regulate autophagy by upregulating genes that belong to the coordinated lysosomal expression and regulation (CLEAR) network, thereby controlling lysosomal biogenesis. Hikeshi is essential for the entry of the Hsc70/Hsp70 (Hsp70s) to the nucleus under stress condition. We examined the effects of the overexpression of TFEB and Hikeshi in cultured cell models of neurodegenerative diseases. Neuronal cells were transfected with plasmids encoding mutant androgen receptor, huntingtin, ataxin-1, ataxin-3, Hikeshi and TFEB. The overexpression of TFEB and Hikeshi decreased the expression of each causative protein in the neuronal cell models. Hikeshi could interact with TFEB and enhance the degradation of the disease-causative proteins. On the other hand, reduction of TFEB and Hikeshi slows the turnover of mutant proteins. These findings demonstrated that TFEB and Hikeshi influence the degradation of the disease-causative proteins.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経変性疾患 オートファジー 分子シャペロン ユビキチン・プロテアソーム系 TFEB HIKESHI ポリグルタミン病 球脊髄性筋萎縮症

1. 研究開始当初の背景

(1) 変異蛋白質分解系と神経変性疾患：オートファジーと分子シャペロン-ユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) は、細胞内の変異蛋白質を分解するシステムとして重要であるが、多くの神経変性疾患では、神経変性の原因となる変異蛋白質が、このオートファジーと UPS の機能を凌駕して神経組織内で不溶性の凝集体を形成したり、あるいは蓄積する過程で細胞毒性をもたらす、神経細胞が変性し細胞死に至る。多くの神経変性疾患は、中年期以降に発症し、加齢と共にこれらの蛋白質分解系の機能が衰えてくること成人発症の一つの原因と考えられている。このように、オートファジーや分子シャペロン-UPS の機能の増強あるいは維持は、神経変性疾患の治療の戦略として重要であるが、これらのシステムを利用した有効な治療法は未だ確立されていない。我々はこれまでに、神経変性疾患の一つである SBMA のトランスジェニックモデルマウスを作成し、このマウスでオートファジーのアダプター分子である p62 の発現量を変化させたり、分子シャペロン Hsp70, Hsp90, Hsp105 などの発現を増加させたり、その機能を調節したりすることによって、神経変性疾患モデルマウスの神経機能障害の改善や神経細胞内への変異蛋白質の蓄積が押さえられることを明らかにしてきた。本研究では、これらをさらに発展させて、オートファジーと分子シャペロン-UPS の協働による強力な治療法の開発を目指した。

(2) 変異蛋白質分解系の調節促進因子と治療への展開：転写因子 TFEB (転写因子 EB) は、オートファゴソームの形成を促進したり、リソソーム内の多くのプロテアーゼの発現を上昇させてオートファジーを活性化するマスターレギュレーターとされ、注目されていた。この TFEB の活性化機序は、従来から知られている mTORC を含めいくつかの経路が

あると考えられていたが、十分に明らかにされていなかった。また、オートファジーによる蛋白質の分解は強力であるが、病因蛋白質の選択的な分解を誘導する治療法も開発途上であった。一方、Heat shock protein (Hsp) あるいは分子シャペロンと呼ばれている蛋白質は、生体 (細胞) が熱ショックに曝されると活性化され、変性して凝集しやすくなった蛋白質を refold、あるいは分解する。また、近年、分子シャペロンを核内へ運搬する役割を果たす HIKESHI が熱ストレスに対する細胞の防御機構を増強して、細胞死を抑制することも明らかになり、分子シャペロンの細胞内での局在変化も細胞の機能改善に重要と考えられていた。従って、オートファジーと分子シャペロン-UPS の重要な調節因子を探索して、これらの調節因子の誘導による 2 つの経路を協働して利用した、病因蛋白質を選択的に強力に分解する治療法を開発することは、従来にない神経変性疾患の治療や予防法として新たな展開になると考えられていた。研究対象は遺伝性神経変性疾患であるポリグルタミン病とし、変異蛋白質分解系の分子標的を探索同定することを目的とした。球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) の原因はアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子の、脊髄小脳変性症 1 型 (SCA1) は ataxin-1 遺伝子の CAG リピートの異常延長である。今回は、これらの遺伝子改変モデルを使用して研究した。

2. 研究の目的

(1) オートファジー活性化による神経変性疾患の治療-特に TFEB の役割

オートファジーでは、TFEB がマスターレギュレーターとしてその活性化にかかわり、また、p62, neighbor of BRCA1 gene 1 (NBR1)、optineurin などの蛋白質が、ユビキチン化蛋白質、ユビキチン化蛋白質凝集体、ユビキチン化ミトコンドリア、ユビキチン化バクテリアをオートファゴソームに選択的に輸送するレセプター、ないしはユビキチン化基質をオ

オートファゴソーム形成部位に集めるアダプター分子として機能して、病因蛋白質を選択的に分解する機構が提唱されてきた。そこで、AR、ataxin-1 を分子標的とし、TFEB 誘導による治療法の開発を視野に入れて、それぞれの病因蛋白質に対して TFEB 高発現による治療的効果の有無を検討した。私たちは、芍薬の抽出物であるペオニフロリンを用いて、TFEB の発現量が増加してオートファジーが活性化されている現象を見い出しており、神経変性疾患の治療法として実現可能な治療法となる可能性があると考えられた。さらに、それぞれの病因蛋白質の減少効果のメカニズムを探るために、各分子の分解課程におけるオートファジーのアダプター蛋白などの相互作用について調べ、病因蛋白質の選択的分解に関わる分子機構を探索し、副作用の少ない治療法の開発へつなげる。

(2) HIKESHI の高発現による治療効果の検討

近年、神経変性疾患の発症機構として、細胞内の蛋白質の品質管理、特に蛋白質の立体構造の正常と異常を区別して、損傷蛋白質を選択的に分解し除去する機構が破綻していることが示唆されている。UPS は、細胞内の変異蛋白質を処理して無毒化する品質管理機構として重要であり、この UPS が効率よく働くには、蛋白質の立体構造の異常を認識する分子シャペロンが介在することが必要である。分子シャペロンを核内へ運搬する役割を果たす HIKESHI は熱ストレスに対する細胞の防御機構を増強して細胞死を抑制する。そこで、HIKESHI の高発現による分子シャペロンの細胞内発現分布の変動や部位特異的なシャペロン機能の増強が病態の改善につながるかをポリグルタミン病の培養細胞及びマウスモデルを用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) 神経培養細胞モデルにおける TFEB 高

発現による効果の検討

ヒト神経培養細胞モデルでは、様々なTFEBの発現量で、変異したAR、ataxin-1の発現量の減少効果を検討した。減少効果のメカニズムを探るために、それらの分子の分解課程におけるオートファジーのアダプター蛋白質である p62, neighbor of BRCA1 gene 1 (NBR1)、optineurinなどとの相互作用について調べた。神経細胞の培養実験に当たっては、P1レベルの実験室で、ベクターの構築から培養までの一連の実験を行った。各培養細胞モデルは、正常および異常延長したポリグルタミン鎖を含有するAR遺伝子発現ベクター、正常および異常延長したポリグルタミン鎖を含有するataxin-1遺伝子発現ベクターを発現するヒト神経培養細胞 (Neuro2a) モデルを使用する。逆にsiRNAなどの核酸解析法を用いてTFEBの発現量を低下させて、AR、ataxin-1の発現量に及ぼす影響もウエスタンブロット法で検討した。

(2) マウスモデルにおける TFEB 高発現による治療効果の検討

オートファジー活性化による治療法を開発するために、私たちはプリオンプロモーターの調節下で TFEB を高発現するマウスを作製した。SBMA マウスモデルは、chicken β -actin プロモーターの調節下で異常延長した CAG リピートをもつヒトの全長の AR 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (SBMA マウス) を用いた。SBMA マウスは、表現形に性差があり、進行性の運動障害を来たす。SBMA マウスモデルと TFEB 高発現マウスを交配して、TFEB 高発現の効果を解析する。さらに、免疫組織化学などの病理学的検索、ウエスタンブロットなどを用いた蛋白発現解析および電子顕微鏡による凝集体の形態観察などにより分子生物学的に検討する。特に、ウエスタンブロットや病理学的解析により変異蛋白質の細胞内凝集体の形状や蓄積の程度を定性、定量的に解析する。

(3) 神経培養細胞モデルにおけるHIKESHI 高発現による治療効果の検討

ヒト神経培養細胞モデルでは、HIKESHI を様々な量で高発現させて、分子シャペロンの細胞内局在変化による変異したAR、ataxin-1の発現量について調べた。

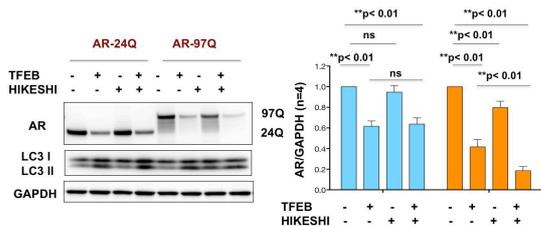
(4) マウスモデルにおける HIKESHI 高発現

HIKISHI 高発現の治療効果を検討するために、chicken β -actin プロモーターの調節下で HIKISHI を高発現するマウスモデルを作成した。HIKISHI 高発現の効果も、同様に解析する。

4. 研究成果

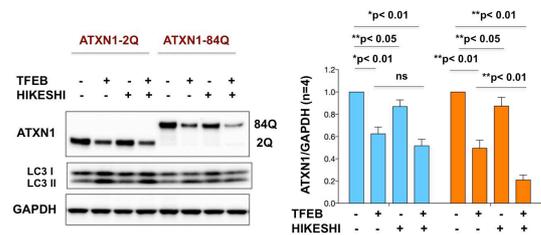
(1) TFEB の高発現によって変異した AR の分解が促進され、HIKESHI との両者の高発現ではさらに促進された。

TFEB enhances reduction in mutant AR with HIKESHI



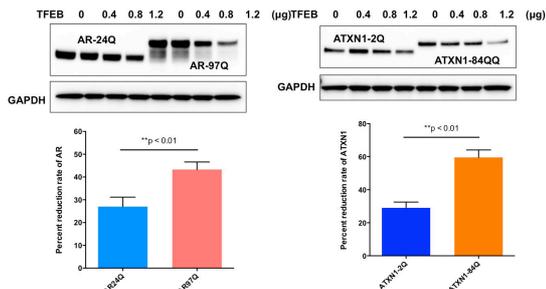
(2) TFEB の高発現によって変異した SCA-1 の分解が促進され、HIKESHI との両者の高発現ではさらに促進された。

TFEB enhances reduction in mutant ATXN1 with HIKESHI



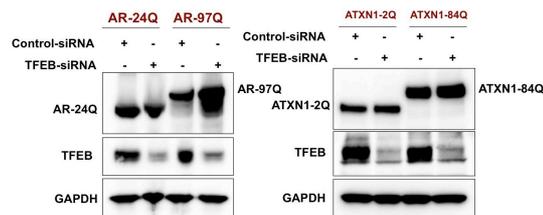
(3) TFEB の高発現によって変異した AR と SCA-1 の分解が選択的に促進された。

TFEB preferentially degrades the mutant proteins



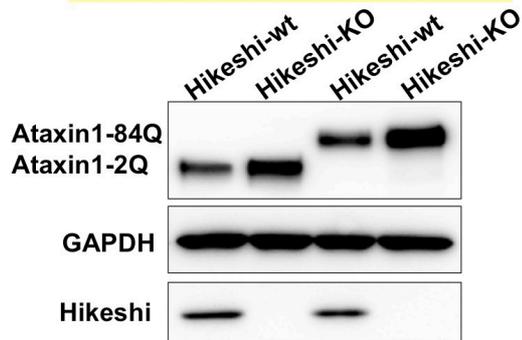
(4) TFEB の発現の低下によって変異した AR と ataxin-1 が蓄積した。

Depletion of TFEB influences the turnover of mutant proteins

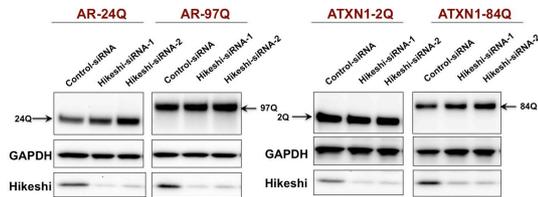


(5) HIKESHI の発現の消失や低下によって変異した AR と ataxin-1 が蓄積した。

HIKESHI knockout influences the turnover of mutant proteins

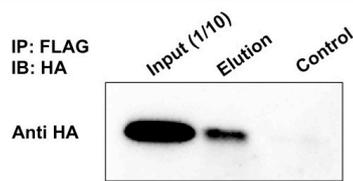


Depletion of HIKESHI influences the turnover of mutant proteins



(6) TFEB と HIKESHI は相互作用した。

TFEB interacts with HIKESHI



TFEB と p62, neighbor of BRCA1 gene 1 (NBR1)、optineurin などのオートファジーのアダプター分子との相互関係を見て、ユビキチン化蛋白質、ユビキチン化蛋白質凝集体をオートファゴソームに選択的に輸送するメカニズムを見いだす実験を行うと、TFEB は既存のオートファジーのアダプター分子との特異的な関係を神経変性疾患の病因蛋白質の特異的な分解に関連しては関係しないことが判明し、TFEB は別な機構で変異蛋白質特異的な分解を行っていることが考えられた。そこで、SBMA マウスモデルに対して TFEB 高発現による治療的介入実験を行っている。今後は、オートファジーと分子シャペロンの重要な調節因子をマウスモデルでも探索して、これらの調節因子の誘導による蛋白質分解経路を利用した、病因蛋白質を選択的に強力に分解する治療法を開発する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件) すべて査読あり

1. Ding Y, Adachi H, Katsuno M, Sahashi K, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Sobue G. BIIB021, a synthetic Hsp90 inhibitor, induces mutant ataxin-1 degradation through the activation of heat shock factor 1. *Neuroscience* 327:20-31, 2016. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.03.064.
2. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H et al. Guidelines for the use and interpretation of

assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12:1-222, 2016.

3. Huang Z, Adachi H. Natural compounds preventing neurodegenerative diseases through autophagic activation. *J UOEH* 38:139-148, 2016. doi: 10.7888/juoeh.38.139.
4. Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Doi H, Takumi T, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Hicks G, Hattori N, Shimogori T, Nukina N. FUS/TLS acts as an aggregation-dependent modifier of polyglutamine disease model mice. *Sci Rep* 6: 35236, 2016. doi: 10.1038/srep35236.
5. Iida M, Katsuno M, Nakatsuji H, Adachi H, Kondo N, Miyazaki Y, Tohnai G, Ikenaka K, Watanabe H, Yamamoto M, Kishida K, Sobue G. Pioglitazone suppresses neuronal and muscular degeneration caused by polyglutamine-expanded androgen receptors. *Hum Mol Genet* 24:314-329, 2015. doi: 10.1093/hmg/ddu066.
6. Sahashi K, Katsuno M, Hung G, Adachi H, Kondo N, Nakatsuji H, Tohnai G, Iida M, Bennett F, Sobue G. Silencing neuronal mutant androgen receptor in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 24: 5985-5994, 2015. doi: 10.1093/hmg/ddv300.
7. Ding Y*, Adachi H* (* double first author), Katsuno M, Huang Z, Jiang YM, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Funakoshi H, Nakamura T, Sobue G. Overexpression of hepatocyte growth factor in SBMA model mice has an additive effect on combination therapy with castration. *Biochem*

Biophys Res Commun 468: 677-683, 2015.
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.015.

[学会発表] (計 9 件)

1. Adachi H et al. TFEB and Hikeshi influence the degradation of the disease-causative proteins in cellular models of neurodegenerative diseases. Neuroscience 2016, San Diego (米国) (12-16) November, 2016.
2. 足立弘明ら. オートファジーによる変異アンドロゲン受容体の分解とその治療への応用. 第 11 回 臨床ストレス応答学会大会、山口大学医学部霜仁会館 (山口・山口)、2016. 11. 11~12.
3. Adachi H et al. Effects of the overexpression of TFEB in cellular models of neurodegenerative diseases. 第 39 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)、2016. 7. 20~22.
4. Adachi H et al. Effects of the overexpression of TFEB in cellular models of neurodegenerative diseases. 第 57 回日本神経学会学術大会、神戸コンベンションセンター (兵庫・神戸)、2016. 5. 18~21.
5. Adachi H et al. The enhancement of protein degradation systems via autophagy in cellular models of neurodegenerative diseases. Neuroscience 2015, Chicago (米国) (17-21) October, 2015.
6. 足立弘明. 蛋白質分解システムの強化による球脊髄性筋萎縮症の病態の改善. 第 57 回日本小児神経学会学術集会. シンポジウム「オートファジーと小児神経疾患」、帝国ホテル大阪 (大阪・大阪) 2015. 5. 27~30.
7. Adachi H et al. The enhancement of protein degradation systems via autophagy in cellular models of

neurodegenerative diseases. 第 56 回日本神経学会学術大会、朱鷺メッセ (新潟・新潟)、2015. 5. 20~23.

8. 足立弘明. 変異蛋白質の分解と封入体形成の治療的意義. 第 87 回日本生化学会大会シンポジウム. 細胞ストレス応答の病態と治療の新基軸、国立京都国際会館 (京都・京都)、2014. 10. 15~18.
9. 足立弘明ら. オートファジーによる変異アンドロゲン受容体の分解とその治療への応用. 第 55 回日本神経学会学術大会、福岡国際会議場 (福岡・福岡)、2014. 5. 21~24.

[図書] (計 1 件)

1. 勝野雅央、足立弘明、祖父江元: 球脊髄性筋萎縮症に対する分子標的治療法の開発. すべてがわかる ALS・運動ニューロン疾患 辻 省次、祖父江 元編、2013. 6. 10, 384(288-294), 中山書店

[その他]

ホームページ等

<http://uoeh-neurology.org>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 弘明 (ADACHI, Hiroaki)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40432257

(2) 研究分担者

黄 哲 (KOU, Tetsu)

産業医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30745112

岡田 和将 (OKADA, Kazumasa)

産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 30341499

橋本 智代 (HASHIMOTO, Tomoyo)

産業医科大学・医学部・学内講師
研究者番号: 70425685

岩中 行己男 (IWANAKA, Yukio)

産業医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60590461

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし