

多系統萎縮症のモデル動物作製と分子病態解明

業務担当責任者：若林孝一 弘前大学大学院医学研究科脳神経病理学講座

研究協力者：三木康生、丹治邦和、森文秋

弘前大学大学院医学研究科脳神経病理学講座

研究要旨

Sigma-1 receptor (SIGMAR1) は小胞体シャペロンの1つであり、小胞体関連分解を介した異常タンパク質分解に関わることが知られている。最近、我々はSIGMAR1 が種々の神経変性疾患の核内封入体に蓄積すること、核内と細胞質を行き来することを示し、SIGMAR1 が核内異常タンパク質の分解に関わること示唆した。そこで今回、HeLa 細胞に CAG リピートが異常に伸長したハンチンチン遺伝子を導入したハンチントン病モデル細胞を作製し、siRNA によるSIGMAR1 の機能抑制あるいはSIGMAR1 遺伝子の過剰発現が核内の異常タンパク質分解に及ぼす影響を検討した。さらに、核輸送阻害剤、選択的プロテアソーム阻害剤を用いた際の核内異常タンパク質の蓄積、そしてこれらの処理を行った際のユビキチン・プロテアソーム系(UPS)およびオートファジー・ライソソーム系の変化について評価した。

SIGMAR1 siRNA、選択的プロテアソーム阻害剤、核輸送阻害剤の投与で核内凝集物が有意に増加した。SIGMAR1 siRNA 投与群の LC3-II および p62 量には変化がなかったが、SIGMAR1 siRNA 投与群では有意にプロテアソーム活性が低下していた。さらに、SIGMAR1 の過剰発現で細胞内凝集物の形成は有意に抑制された。

SIGMAR1 は小胞体関連分解を介した核内の異常タンパク質の分解に関わり、その分解には UPS が重要であることが示唆された。既に臨床で使用されている Fluvoxamine をはじめとする抗うつ薬のいくつかは、SIGMAR1 に強い親和性を持つことが知られている。Fluvoxamine が UPS を活性化することが判明すれば、ハンチントン病を含むポリグルタミン病の薬物治療へ通ずる可能性がある。

A. 研究目的

核内封入体の形成を病理学的特徴とするポリグルタミン病などの神経変性疾患では、細胞内分解機能の異常が認められ、タンパク質分解酵素に不溶性のタンパク質が神経細胞死に関与している。Sigma-1 receptor

(SIGMAR1) は小胞体(ER)に存在する分子シャペロンであり、異常タンパク質をERからユビキチン・プロテアソーム系(UPS)に逆輸送し、分解する(ER関連分解)ことにも関わっている。我々は昨年度、SIGMAR1 が核内封入体を形成する神経変性疾患に特異

的に関与していることを報告した¹⁾。そこで今回、SIGMAR1 が核内封入体として不溶化したタンパク質の分解に関与しているか否かについてハンチントン病の細胞モデルを用い検討した。

B. 研究方法

HeLa 細胞に、ハンチンチン遺伝子の第1エクソン内にある CAG リピートが異常に伸長した遺伝子(Q74)およびリピート数が正常な遺伝子(Q23)を導入し、核内に異常タンパク質が蓄積する細胞モデルと正常対照を

作成した。それらを用い、SIGMAR1 siRNA による SIGMAR1 の機能抑制あるいは SIGMAR1 遺伝子の過剰発現が核内の異常タンパク質分解に及ぼす影響、SIGMAR1 遺伝子を過剰発現させる時期が核内異常タンパク質の分解に及ぼす影響、SIGMAR1 の agonist、antagonist、核輸送阻害剤 (leptomycin B)、選択的プロテアソーム阻害剤 (epoxomicin) 投与が核内異常タンパク質の蓄積に及ぼす影響、これらの処理を行った培養細胞の UPS およびオートファジー・ライソソーム系の変化について、免疫染色、ウェスタンブロット法、プロテアソームアクティビティアッセイにて評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は倫理審査が必要な研究に該当しない。

C. 研究結果

Q74 を遺伝子導入した培養細胞においてのみ細胞質内および核内に変異型ハンチンチンの凝集物が認められた。SIGMAR1 siRNA と epoxomicin の投与で細胞質内および核内凝集物が有意に増加した。Leptomycin B の投与でも核内凝集物が増加した。さらに、変異型ハンチンチンは SIGMAR1 siRNA と epoxomicin 投与群で不溶化した。Control siRNA 投与群と比較して、SIGMAR1 siRNA 投与群の LC3-II および p62 量には変化がなかったが、SIGMAR1 siRNA 投与群では有意にプロテアソーム活性が低下していた。SIGMAR1 の過剰発現で細胞内凝集物の形成は有意に抑制された。

D. 考察

SIGMAR1 は核内の異常タンパク質の分解に関わり、その分解には UPS が重要であることが示唆された。

Fluvoxamine をはじめとする抗うつ薬の

いくつかは臨床的に既に使用されており、SIGMAR1 に強い親和性を持つことが知られている。Fluvoxamine が UPS を活性化することが確認できれば、核内異常タンパク質の蓄積を抑制できる可能性があり、ハンチントン病を含むポリグルタミン病の薬物治療へ通ずるものと思われる。

E. 結論

SIGMAR1 は核内の異常タンパク質の分解に ER 関連分解を介し、関わっている可能性がある。

[参考文献]

1. Miki Y, Mori F, Kon T, Tanji K, Toyoshima Y, Yoshida M, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Accumulation of the sigma-1 receptor is common to neuronal nuclear inclusions in various neurodegenerative diseases. *Neuropathology* 2014; 34: 148-158.

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Miki Y, Tanji K, Mori F, Wakabayashi K. Sigma-1 receptor is involved in degradation of intranuclear inclusions in a cellular model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 2014; 74C: 25-31.
- 2) Wakabayashi K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H. Analysis of microRNA from archived formalin-fixed paraffin-embedded specimens of amyotrophic lateral

sclerosis. Acta Neuropathol Comm 2014; 2: 173.

- 3) Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Maruyama A, Nikaido Y, Mimura J, Mori F, Warabi E, Yanagawa T, Ueno S, Itoh K, Wakabayashi K. p62 deficiency enhances α -synuclein pathology in mice. Brain Pathol (in press)

2. 学会発表

- 1) 若林孝一. MSA とオートファジー. 第 55 回日本神経学会総会(福岡、2014 年 5 月 21 ~ 24 日)
- 2) 森文秋、豊島靖子、丹治邦和、柿田明美、高橋均、若林孝一. 脊髄小脳失調症 2 型脳に認められた 2 種類の核内封入体. 第 55 回日本神経病理学会総会(東京、2014

年 6 月 5 ~ 7 日)

- 3) 若林孝一、森文秋、柿田明美、高橋均、内海潤、佐々木秀直. ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた神経変性疾患の microRNA 解析. 第 55 回日本神経病理学会総会(東京、2014 年 6 月 5 ~ 7 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他