

総説

ポリグルタミン病における分子シャペロンを用いた治療

藤内玄規^{1, 2)}, 足立弘明²⁾, 大塚健三^{1, 3)}, 祖父江元²⁾¹⁾中部大学応用生物学部, ²⁾名古屋大学大学院医学系研究科神経内科, ³⁾中部大学生物機能開発研究所

要 旨

神経変性疾患では、特定の神経細胞に不溶性のタンパク凝集体を形成し、異常タンパク質が蓄積する。この過程で細胞毒性をもたらす、神経細胞が変性し、細胞死に至り、脱落していく神経変性を主病態とする疾患群である。分子シャペロンは、タンパク質凝集を防ぎ、正しい折りたたみの手助けをする機能を有している。球脊髄性筋萎縮症(SBMA)はアンドロゲン受容体(androgen receptor: AR)内のポリグルタミン鎖が異常伸長し、この変異 AR が神経細胞内で凝集体を形成する。ヒト全長 AR を発現させた SBMA トランスジェニックマウスと Hsp70 高発現マウスを交配したり、SBMA モデルマウスに分子シャペロン誘導剤である GGA や Hsp90 阻害剤の 17-AAG を投与すると、変異 AR の細胞内蓄積が減少して、病態が改善する。このような分子シャペロン治療は SBMA などの神経変性疾患の病態抑止療法に応用できる可能性がある。

はじめに

神経細胞は非分裂細胞であるため終生にわたって生存維持をすることが必要である。しかし神経細胞が遺伝子変異や環境ストレスを過剰に感受すると、神経変性を誘発し最終的には神経細胞は死滅する。神経変性疾患とは、神経細胞の維持機構が破綻し、特定の神経細胞の機能が失われて変性し、死に至り、脱落していく疾患の総称である。神経変性疾患であるポリグルタミン病は、原因遺伝子の CAG リピートがタンパク質に翻訳され、異常伸長したポリグルタミン鎖になることで、変異タンパク質が形成される。ポリグルタミン病では変異タンパク質からなる核内封入体と変異タンパク質の集積が病理的特徴であり、異常伸長したポリグルタミン鎖を持つ異常タンパク質が神経細胞内で不溶性の凝集体を形成、蓄積する過程で細胞毒性を獲得し、神経細胞が変性し細胞死に至ると考えられている。ポリグルタミン鎖の異常伸長した病因タンパク質は折りたたみ構造に異常を持ち、三次元構造が変化してしまうことで病原性を発揮していると考えられている。この病因タンパク質の蓄積による選択的な神経細胞変性死のメカニズムには、核内の転写因子の枯渇や異常タンパク質を分解するユビキチン・プロテアソームシステム(UPS)の障害など多くの機序が関与していることが明らかになってきている。

生体(細胞)が熱・重金属などの環境ストレスや生理学的、化学的ストレス状況下におかれた時、熱ショックタンパク質(heat shock protein, HSPs)あるいは分子シャペロンと呼ばれているタンパク質が誘導、合成される。分子シャペロンは、熱ショックによって変性したタンパク質の再折りたたみ、あるいは修復不能の場合には分解課程へ誘導する機能を持っている。近年、分子シャペロンの発現量が多い神経細胞ではポリグルタミン鎖の伸長した変異タンパクへの耐性が強く変性を起こさないことが報告されており、病変組織の選択性に分子シャペロンの発現量が関わっている可能性も指摘されている(Tagawa et al., 2007)。従って、毒性のない分子シャペロン誘導剤および誘導補助剤を探索することは、神経変性疾患の治療や予防にとって有用であると考えられる。神経変性疾患の病変組織の残存ニューロン内に存在するタンパク凝集体に Hsp70 や Hsp40、また UPS の成分などが共存していることが判明し、分子シャペロン-UPS が変異タンパク質の折りたたみや分解に関わっていることが示唆された(Cummings et al., 1998)。ミスフォールドされた異常タンパク質が蓄積し神経細胞機能障害、さらには神経細胞死をもたらすという現象はポリグルタミン病などの神経変性疾患に共通した病態の一つであり、構造異常を修復する試みとして、分子シャペロンの機能を増強する治

療が有効と考えられている(Adachi et al.,2007) . 本稿では，ポリグルタミン病における神経細胞障害のメカニズムや分子シャペロンを利用した治療法などを紹介したい .

ポリグルタミン病

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 リピートの伸長を起因とする . 繰返し病因となるタンパク質内にアミノ酸であるグルタミンの繰返し(ポリグルタミン鎖)が存在した場合に，このポリグルタミン鎖が異常に延長することが原因となる遺伝性神経変性疾患の総称で，いずれの疾患にも現在のところ根本的な治療法が存在しない . 現在までに9つのポリグルタミン病(球脊髄性筋萎縮症:SBMA，ハンチントン病:HD，歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症:DRPLA，脊髄小脳失調症 1 型:SCA1，2 型:SCA2，Machado-Joseph 病/3 型:MJD / SCA3，6 型:SCA6，7 型:SCA7，17 型:SCA17)が報告されている . 概ね常染色体優性遺伝であり，青年期あるいは成人期に発症する . CAG リピート数は，健常者，患者ともに多型性があり，およそ 35～40 リピートを境としてこれよりも伸長した場合に発症し，伸長した CAG リピート数が長いほど発症年齢が若くなる . ポリグルタミン病では，運動・知的能力が低下したり，神経組織が変性したりする現象が，10 から 50 年の間の経過で進行する . ポリグルタミン病の異常遺伝子の遺伝子産物は，メッセンジャーRNA やタンパク質が神経組織(大脳，小脳，脳幹部，脊髄など)やその他の多くの一般臓器に広範に発現しているにもかかわらず，神経組織内で変性の生じる部位は各疾患で異なっている .

球脊髄性筋萎縮症 (spinal and bulbar muscular atrophy; SBMA)はポリグルタミン病としてはじめて同定された遺伝性の神経変性疾患で，アンドロゲン受容体 (androgen receptor:AR)遺伝子内の CAG リピートの異常伸長を原因とする . SBMA では筋萎縮，筋力低下，線維束攣縮および球症状などの下位運動ニューロン神経症状，病理学的には主に脊髄前角細胞，舌下神経核，疑核，顔面神経核などの運動ニューロンの脱落と，異常伸長したポリグルタミンタンパク質を特異的に認識する抗体 (1C2 抗体)で検出される核内封入体，凝集体の存在

を特徴とする(Adachi et al.,2005;Atsuta et al.,2006) . この異常伸長したポリグルタミン鎖を含む凝集体は分子シャペロンやユビキチンで修飾されており，変異 AR に対する防御機構として分子シャペロン-UPSが機能していると考えられる . これらの所見は男性のみで見られ，女性の保因者は症状が出ないかあっても軽症である . SBMA では変異 AR が男性ホルモンであるテストステロン依存性に神経細胞の核内へ移行し，蓄積することが病態形成に必須であり，抗アンドロゲン療法で血清テストステロン濃度を低下させることにより，変異タンパク質の核内凝集体形成は抑制され SBMA の運動機能障害を強力に抑止できる(Katsuno et al.,2002;Katsuno et al.,2003) . 抗アンドロゲン療法を用いた SBMA 患者に対する臨床試験でも，陰囊皮膚での変異 AR 蓄積の低下，血清 CK 値の低下などの効果が認められた(Banno et al.,2006) . 現在は抗アンドロゲン療法の SBMA に対する多施設共同臨床試験が日本国内・海外で行われている .

ポリグルタミン病と分子シャペロン

最近では，神経変性疾患の発症機構として，細胞内のタンパク質の品質管理機構が破綻していることが示唆されている . 神経変性疾患の病変組織のポリグルタミン鎖によって形成される凝集体には，一部の分子シャペロンや，UPS の成分が共存しているという報告があり，伸長ポリグルタミン鎖のコンフォメーション変化に対しての UPS による分解処理が完了せずに凝集体として沈着するのではないかと考えられている . UPS が十分に働くには，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 . 従って分子シャペロンの機能低下が神経変性の原因のひとつとも考えられる . 実際に SBMA モデルマウスおよびハンチントン病モデルマウスの神経組織では Hsp70 の発現量の低下が確認できることから Hsp70 の発現量低下は病態進展に関与していることが示唆される (Katuno et al.,2005;Hay et al.,2004) .

分子シャペロン過剰発現

ポリグルタミン鎖の伸長した異常タンパクは三次元構造が変化している，細胞はこのような変性タンパク(ミスフォ

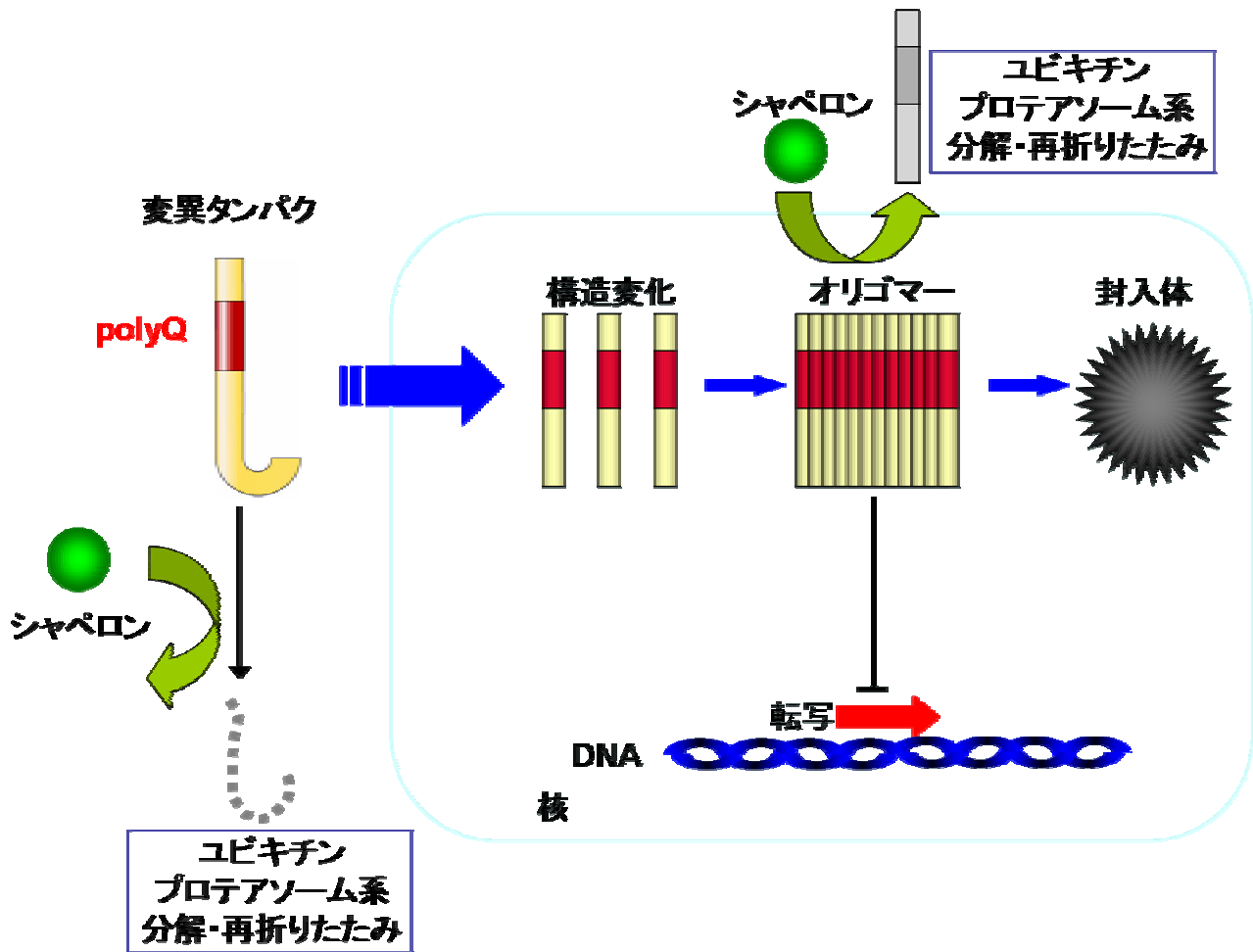


図1 ポリグルタミン病の病態機序と分子シャペロン・UPS の作用

ールドタンパク)に対し、分子シャペロンによる再折りたたみ反応や UPS によるタンパク分解反応で恒常性を維持しようとする(図1)。タンパク質の分解過程にはミスフォールドタンパクを UPS に受け渡す品質管理を行うタンパクも報告されている。このタンパク質の品質管理機構に障害が起こると、神経細胞機能障害や細胞死につながると考えられている。CAG リピートの伸長した AR 遺伝子を発現させた培養神経細胞モデルを用いて Hsp70、Hsp40、Hsp105 などを過剰発現させると、変異タンパク質の凝集体形成や細胞死が抑制される (Kobayashi et al.,2000)。さらに SBMA モデルマウスと Hsp70 高発現マウスとを交配してダブルトランスジェニックマウスを作製すると、Hsp70 の高発現によって SBMA モデルの運動機能障害は軽減し、変異タンパク質の核内蓄積も減少した (Adachi et al.,2003)。Hsp70 の働きは変異タンパク質を

再折りたたみすることで毒性を軽減するだけでなく、UPS などを介した分解を促進する。この働きにより核内に蓄積する変異タンパク質の量は減少し病態は改善する。

分子シャペロン誘導療法

分子シャペロン過剰発現による毒性軽減効果を踏まえ、分子シャペロンの発現を増強する化合物を用いた治療法開発研究が行われてきた。抗潰瘍薬としてすでに臨床応用されているセルベックス[®] (Geranylgeranylacetone: GGA)は Heat shock transcriptional factor 1(HSF-1)の活性化を介して Hsp70 などの分子シャペロンの発現を安全に誘導する。GGA を前投与するとストレス時の分子シャペロン誘導が著明に増強されることが知られており、胃以外の臓器においても外傷、放射線、移植手術等のストレス時に臓器保護作用を発揮する。SBMA モデルマウス

にGGAを経口投与すると,神経組織においてHSF-1のリン酸化によりHsp70, Hsp40, Hsp104分子シャペロンの発現量が増加し,運動機能や生存率が改善し,変異ARの核内蓄積は有意に抑制された(Katsuno et al.,2003). GGAと同様にHSF-1の活性化を介してシャペロンの発現を増強させるArimoclomolは,その強力なHsp70誘導作用により家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS,G93A型SOD1)モデルマウスの表現型を改善し,ヨーロッパで多施設共同による第Ⅲ相試験が行われた結果,ALS治療薬として希少疾患医薬品に指定されている.また以前より抗炎症作用を有することが知られているシャペロン誘導剤,Celastrolも複数の神経変性疾患動物モデルで,その神経細胞保護効果が明らかにされている(Cleren et al.,2005;Kiaei et al.,2005;Zhang et al.,2007).こうした分子シャペロン誘導療法は幅広い神経変性疾患に応用できる可能性が高く,有力な治療法のひとつになると思われる(Muchowski et al.,2005).

シャペロン依存性ユビキチンリガーゼ過剰発現

ユビキチンリガーゼは分子シャペロンと相互作用しタンパク質の品質管理を行なう.シャペロン依存性ユビキチンリガーゼの一つであるCHIP(carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein)はHsp90やHsp70と結合し,これらの分子シャペロンが認識したミスフォールディングタンパク質をユビキチン化しUPSによる分解へと導く.CHIPは多岐にわたるタンパク質に基質特異性を持ち,ユビキチンリガーゼの中でも最も強力な活性を持つ.また中枢神経系に高発現していることも知られ神経変性疾患との関与も示唆されている(Dickey.,2007).

CHIPの高発現マウスとSBMAモデルマウスとを交配したところ,変異ARは減少し,有意にモデルマウスの運動機能も改善し,治療効果が認められた(Adachi et al.,2007).これらの結果は,CHIP高発現により変異ARの分解が促進された結果と考えられた.

Hsp90阻害剤による神経変性疾患の治療

分子シャペロンの中でも,Hsp90は特定のタンパク質を選んで介添えをするという特徴を持つ.生理的な機能の発揮と安定化にHsp90を必須とするタンパク質はクライ

アントプロテインと呼ばれる.Hsp90はHop(Hsp90/Hsp70 organizing protein),p23,cdc37などのコシャペロンとともにHsp90複合体を形成している.Hsp90阻害剤はこうした複合体の構造変化をもたらし,クライアントプロテインのUPSでの分解を促進する(Neckers.,2002).腫瘍細胞の増殖に関与するタンパク質の多くはクライアントプロテインに属することが明らかにされ,選択的な減少効果が明らかにされている.また以前よりHsp90阻害剤は腫瘍細胞に対して高い選択性を示すことも知られており(Kamal et al.,2003),悪性腫瘍に対する優れた分子標的治療薬としてその臨床応用が期待されている.

17-AAG(17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin)はHsp90阻害剤,geldanamycin(GA)の誘導体であるが,GAに認められる肝腎毒性を大幅に抑えながら,ほぼ同等の薬理効果を有する優れた誘導体である.SBMAの病因タンパク質であるARがHsp90のクライアントプロテインのひとつであるためその薬理作用を検討したところ,SBMA培養細胞においてポリグルタミン鎖が伸長した変異型ARをプロテアソーム依存性に選択的に分解した.またSBMAモデルマウスにおいて17-AAGの投与により運動機能障害は改善され,生存率の有意な延長が見られた.また投与したマウスには薬剤による副作用は見られない(Waza et al.,2005).さらに17-AAGの誘導剤で経口投与の可能な17-DMAGでも同様にSBMA培養細胞およびSBMAモデルマウスにおいて病態改善効果が見られた(Tokui et al.,2009).Hsp90阻害剤はHsp70やHsp40の発現の誘導作用もあり変異ポリグルタミンタンパクの凝集体形成を抑制するため,他の神経変性疾患モデルにおいても効果が報告されている(Sittler et al.,2001).また,新しいHsp90阻害剤であるEC102は,幅広い神経変性疾患で蓄積が認められるリン酸化タウタンパクを選択的に減少させ,この減少効果はCHIPのHsp90複合体への結合に依存していた(Dickey et al.,2007).このようなAR以外のHsp90クライアントプロテインも神経疾患の病態形成に深く関与し,17-AAGによるHsp90クライアントプロテインを標的とした治療法は,神経変性疾患における新たな分子シャペロン治療になる可能性がある.

おわりに

分子シャペロンや UPS などのタンパク質の品質管理機構は、多くの神経変性疾患で共通性のあるタンパク質凝集体の形成や、異常タンパク質の蓄積などのメカニズムを改善する可能性が高いことから、分子シャペロンの活性化が有効な治療法の一つと考えられる。分子シャペロン機能を活性化する化合物が数多く同定されるようになり変性疾患の治療法の開発に臨床応用に向けた検証も行なわれている。また病因タンパク質の安定化、機能発現に必要な分子シャペロンを標的とした治療も神経変性疾患の新たな治療法となる可能性を秘める。シャペロン機能を増強する治療のみで神経変性疾患の病態をどこまで抑止できるかは不明であるが今後の更なる研究の発展が望まれる。

引用文献

- Adachi H *et al*: Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein. *J Neurosci* 23: 2203-2211, 2003
- Adachi H *et al*: Widespread nuclear and cytoplasmic accumulation of mutant androgen receptor in SBMA patients. *Brain* 128: 659-670, 2005
- Adachi H *et al*: CHIP overexpression reduces mutant androgen receptor protein and ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model. *J Neurosci* 27: 5115-5126, 2007
- Adachi H *et al*: Pathogenesis and molecular targeted therapy of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33: 135-151, 2007
- Atsuta N *et al*: Natural history of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): a study of 223 Japanese patients. *Brain* 129: 1446-1455, 2006
- Banno H *et al*: Mutant androgen receptor accumulation in spinal and bulbar muscular atrophy scrotal skin: a pathogenic marker. *Ann Neurol* 59: 520-526, 2006
- Cleren C *et al*: Celastrol protects against MPTP- and 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity. *J Neurochem* 94: 995-1004, 2005
- Cummings CJ *et al*: Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet* 19: 148-154, 1998
- Dickey CA *et al*: The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *J Clin Invest* 117: 648-658, 2007
- Dickey CA *et al*: Brain CHIP: removing the culprits in neurodegenerative disease. *Trends Mol Med*. 13:32-8,2007
- Hay DG *et al*: Progressive decrease in chaperone protein levels in a mouse model of Huntington's disease and induction of stress proteins as a therapeutic approach. *Hum Mol Genet* 13: 1389-1405, 2004
- Kamal A *et al*: A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 425: 407-410, 2003
- Katsuno M *et al*: Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 35: 843-854, 2002
- Katsuno M *et al*: Leuprorelin rescues polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Med* 9: 768-773, 2003
- Katsuno M *et al*: Pharmacological induction of heat-shock proteins alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16801-16806, 2005
- Kiaei M *et al*: Celastrol blocks neuronal cell death and extends life in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* 2: 246-254, 2005
- Kobayashi Y *et al*: Chaperones Hsp70 and Hsp40 suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J Biol Chem* 275:

8772-8778, 2000

Majeski AE *et al*: Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2435-2444, 2004

Muchowski PJ *et al*: Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci* 6: 11-22, 2005

Neckers L: Heat shock protein 90 inhibition by 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin: a novel therapeutic approach for treating hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 8: 962-966, 2002

Sittler A *et al*: Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 10: 1307-1315, 2001
Zhang YQ *et al*: Celastrol inhibits polyglutamine aggregation and toxicity through induction of the heat shock response. *J Mol Med* 85: 1421-1428, 2007

Tagawa K *et al*: The induction levels of heat shock protein 70 differentiate the vulnerabilities to mutant huntingtin among neuronal subtypes. *J Neurosci* 27: 868-880, 2007

Tokui K *et al*: 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in an SBMA model mouse. *Hum Mol Genet* 18:898-910, 2009

Waza M *et al*: 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration. *Nat Med* 11: 1088-1095, 2005

²Department of Neurology Nagoya University
Graduate School of Medicine

³Chubu University Institute for Biological
Function

Keywords : neurodegenerative disease,
polyglutamine disease, ubiquitin-proteasome
system, molecular chaperone, client protein

Title : Therapies for polyglutamine diseases by
modulating molecular chaperone function.

Author(s) : Genki Tohnai^{1,2)}, Hiroaki Adachi²⁾ Kenzo
Ohtsuka^{1,3)}, Gen Sobue²⁾

Address(es) : ¹⁾Department of Environmental
Biology, Chubu University College of Bioscience
and Biotechnology,