

## 低分子ストレスタンパク質関連疾患とアセチル化チューブリン

## 三 部 篤

低分子熱ショックタンパク質 (HSP) の遺伝子変異 (点変異, 欠損変異など) は, 筋原線維性ミオパシー (myofibrillar myopathy: MFM) などの神経筋疾患, 白内障などの眼疾患, 遺伝性末梢性運動性ニューロパシー (distal hereditary motor neuropathy: HMN) およびシャルコー・マリー・トゥース病 (Charcot-Marie-Tooth disease: CMT 病) などの神経変性疾患の原因であることが知られている。しかし, 低分子 HSP 変異を原因とするそれぞれの疾患の詳細な病態発症機序は明らかではない。低分子 HSP 異常により発症する疾患の病態解明とその治療法の開発を目的として, 心筋特異的  $\alpha$ -B クリスタリン (CryAB) 点変異体 (120 番目アルギニン→グリシン), 神経特異的 HSPB1 点変異体 (Ser135 番目セリン→フェニルアラニンあるいは 182 番目のプロリン→ロイシン) などを発現させたトランスジェニック (TG) マウスが作製されている。これらの変異 TG マウスは, 白内障, 心筋症, HMN, CMT 病で認められる疾患症状を示すが, 野生型の低分子 HSP を同じように発現させた TG マウスではこのような表現型は認められない。そのため, 変異により発生した変異低分子 HSP 自体が原因となり, 病態が発症している可能性が高いと考えられる。HSPB1 変異体を神経細胞で発現している TG マウスでは, 神経のヒストン脱アセチル化酵素 6 (HDAC6) 活性が増大し, 微小管の構成タンパク質である  $\alpha$ -チューブリンのアセチル化が低下していた。さらに, HDAC6 阻害薬を変異 TG マウスに処置することにより,  $\alpha$ -チューブリンのアセチル化低下は抑制され, 神経疾患は改善した。すなわち, HDAC6 の活性化によるアセチル化チューブリンの低下が神経変性につながっていると考えられる。しかしながら, 同じ低分子 HSP ファミリーである CryAB 関連 MFM では, 心筋 HDAC6 活性が低下すると報告されている。その上, 他の神経疾患では HDAC6 活性が低下するという報告もあり, いまだ不明な点が多い。HDAC6 の生理的な役割に関し, さらなる検討が必要である。

低分子ストレスタンパク質 (HSP) ファミリーは, 熱ショックにより誘導されるストレスタンパク質のうち, 分子量が比較的小さいタンパク質群 (15~30 kDa) が属し, 生物界に普遍的に存在している<sup>1)</sup>。低分子 HSP は分子内に相同性の高い約 80 アミノ酸残基からなる  $\alpha$ -クリスタリン

ドメインを有し, その多くがタンパク変性を防ぐシャペロン様活性を有することが知られている<sup>1)</sup>。その一方,  $\alpha$ -クリスタリンドメイン以外の領域では, それぞれの低分子 HSP 間でのアミノ酸配列の相同性は低く, N 末端及び C 末端領域のアミノ酸配列は多様である<sup>2)</sup>。幾つかの低分子 HSP において, そのアミノ酸変異, 特に  $\alpha$ -クリスタリンドメイン内の点変異は, 筋原線維性ミオパシー (myofibrillar myopathy: MFM) などの筋疾患, 白内障などの眼疾患, 遺伝性末梢性運動性ニューロパシー (distal hereditary motor neuropathy: HMN) およびシャルコー・マリー・トゥース病 (Charcot-Marie-Tooth disease: CMT 病) などの神経変性疾患の原因であることが知られている。MFM は, 心

岩手医科大学薬学部薬剤治療学講座 (〒028-3694 岩手県紫波郡矢巾町西徳田 2-1-1)

Small heat shock protein related diseases and acetylated tubulin

Atsushi Sanbe (Department of Pharmacotherapeutics, School of Pharmacy, Iwate Medical University, 2-1-1 Nishitokuda Yahaba-cho, Shiwa-gun, Iwate 028-3694, Japan)

筋細胞内および骨格筋内に筋原線維タンパク質を含む不溶性凝集体が蓄積する特徴を持つ症候群である。また、HMNやCMT病は、遺伝性運動感覚性ニューロパシーの一型であり、下肢の筋萎縮と感覚障害を特徴とする進行性、遺伝性の変性性末梢神経障害を特徴とする。これらの疾患では、疾患の原因遺伝子変異が見いだされてきている一方、現在でも有効な治療法は見つかっていない。これらの病態を詳細に解析する目的で、遺伝子改変マウスが作製され、病態解析および治療法の開発が試みられている。

### 1. HSPB1 (別名 HSP27, HSP25) 関連 CMT, HMN

HSPB1は別名HSP27(ヒト)あるいはHSP25(マウス)と呼ばれ、どの組織でも普遍的に遺伝子発現が認められる。HSPB1関連HMN, CMT病はHSPB1の135番目セリン→フェニルアラニン点変異(Ser135Phe)などにより発症する。点変異HSPB1の神経系への影響を観察するため、神経細胞特異的にHSPB1 Ser135PheおよびPro182Leuを発現させたトランスジェニック(TG)マウスが作製されている<sup>3)</sup>。これらの変異HSPB1 TGマウスは、HMN, CMT病で認められる神経症状を示すが、野生型のHSPB1を同じように神経細胞に発現させたTGマウスではこのような表現型は認められない。すなわち、変異により発生した変異HSPB1タンパク質自体が疾患原因となり、神経変性病態が発症している可能性が高いと考えられる。さらに興味深いことにHSPB1 Ser135Phe TGマウスでは知覚神経障害が認められるが、HSPB1 Pro182Leu TGマウスでは知覚神経障害は認められない<sup>3)</sup>。この違いが点変異の部位、あるいは変異アミノ酸によるのかは現時点では不明であるが、いずれの場合もミトコンドリア障害が認められる。このことから、HSPB1関連神経疾患ではミトコンドリア障害が病態形成と関わっていると考えられる。

低分子HSP変異関連疾患でミトコンドリア障害が起こる機序の一つとして、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)6の関与が示唆されている。HDAC6は、クラス2型のHDACファミリーに属し、主に細胞質に存在している<sup>4)</sup>。そのため、HDACでありながらヒストンを基質としているとは考えにくく、微小管タンパク質であるチューブリンの脱アセチル化を行っていることが知られている<sup>4)</sup>。 $\alpha$ -チューブリンのアセチル化は、一般に微小管を安定化させると言われているが、その生理的意義には不明な点が多い。HSPB1 Ser135PheおよびPro182Leuを発現しているマウスでは、微小管の構成タンパク質である $\alpha$ -チューブリンのアセチル化が低下していた<sup>3)</sup>。さらに、HDAC6阻害薬を変異TGマウスに処置することにより、 $\alpha$ -チューブリンのアセチル化が低下は抑制され、神経疾患は改善した。

すなわち、HDAC6の活性化によるアセチル化チューブリンの低下がミトコンドリア障害およびその後の神経変性

につながっていると考えられる<sup>3,5)</sup>。近年、アセチル化チューブリンはミトコンドリアの軸索への輸送および自己修復(マイトファジー)を調節している可能性も報告されており、アセチル化チューブリンの低下がミトコンドリア障害に関わっている可能性は高い<sup>3)</sup>。しかし、HDAC6活性低下が神経細胞の機能障害を引き起こすとも報告されており、神経細胞でのHDAC6機能にはいまだ不明な点が多い<sup>6)</sup>。近年、HDAC6欠損マウスがうつ病様症状を示すことが報告されている<sup>7)</sup>。そのため、ミトコンドリアの制御を含む神経細胞におけるHDAC6の役割は多岐に渡っていると考えられる。

### 2. $\alpha$ -Bクリスタリン(CryAB, 別名 HSPB5) 関連 MFM (別名 デスミン 関連 心筋症, $\alpha$ -B-Crystallinopathy) および 白内障

CryABは水晶体の構成成分として知られるが、心筋細胞にも非常に多く存在する。また骨格筋、神経等でもその遺伝子発現は認められる。そのため、比較的普遍的に生体内に存在し、ストレスタンパク質として機能していると考えられている。CryAB関連MFMはCryABの120番目アルギニン→グリシン点変異(Arg120Gly)などにより発症する<sup>8)</sup>。この疾患は、細胞内に筋細胞における中間径フィラメント構成成分であるデスミンおよびCryABを含む不溶性凝集体を形成する特徴を持ち、CryAB Arg120Glyタンパク質を心臓特異的に過剰発現しているTGマウスでその病態が再現されることを我々が報告している(図1)<sup>9)</sup>。一方、CryAB遺伝子欠損マウスでは、CryAB関連MFMの表現型はほとんど認められない。このことからCryAB関連MFMは、遺伝子変異により産生された変異CryABタンパク質が原因となり、病態が発症している可能性が高いと考えられる<sup>9)</sup>。変異CryABやデスミンを含む細胞内凝集体は、微小管依存的に輸送され、細胞核周辺に蓄積し、神経変性疾患等で認められるアグレゾーム(細胞核周辺に集積した凝集体)を形成する<sup>10,11)</sup>。さらに、我々はこのアグレゾームはアミロイド構造も示すことを見いだした。このことから、CryAB関連MFMはアルツハイマー病などの神経変性疾患と同じく、アグレゾーム関連疾患でありアミロイド関連疾患であると考えられる(図2)<sup>10,11)</sup>。

CryAB Arg120Gly TGマウス心筋では、アグレゾームの蓄積に伴ってミトコンドリア障害、ミトコンドリアのチトクロームCの細胞質への遊離、カスパーゼ3の活性化およびアポトーシスと思われるTUNEL陽性心筋細胞死が起こってくる<sup>10,11)</sup>。すなわち、CryAB関連MFM病態の進行にはミトコンドリア障害とアポトーシスが深く関わっていることが示唆される。しかし、アポトーシス抑制因子であるBcl-2を心筋に過剰発現させ、変異CryABによるアポトーシスを抑制しても、いったんは病態が軽減するもの

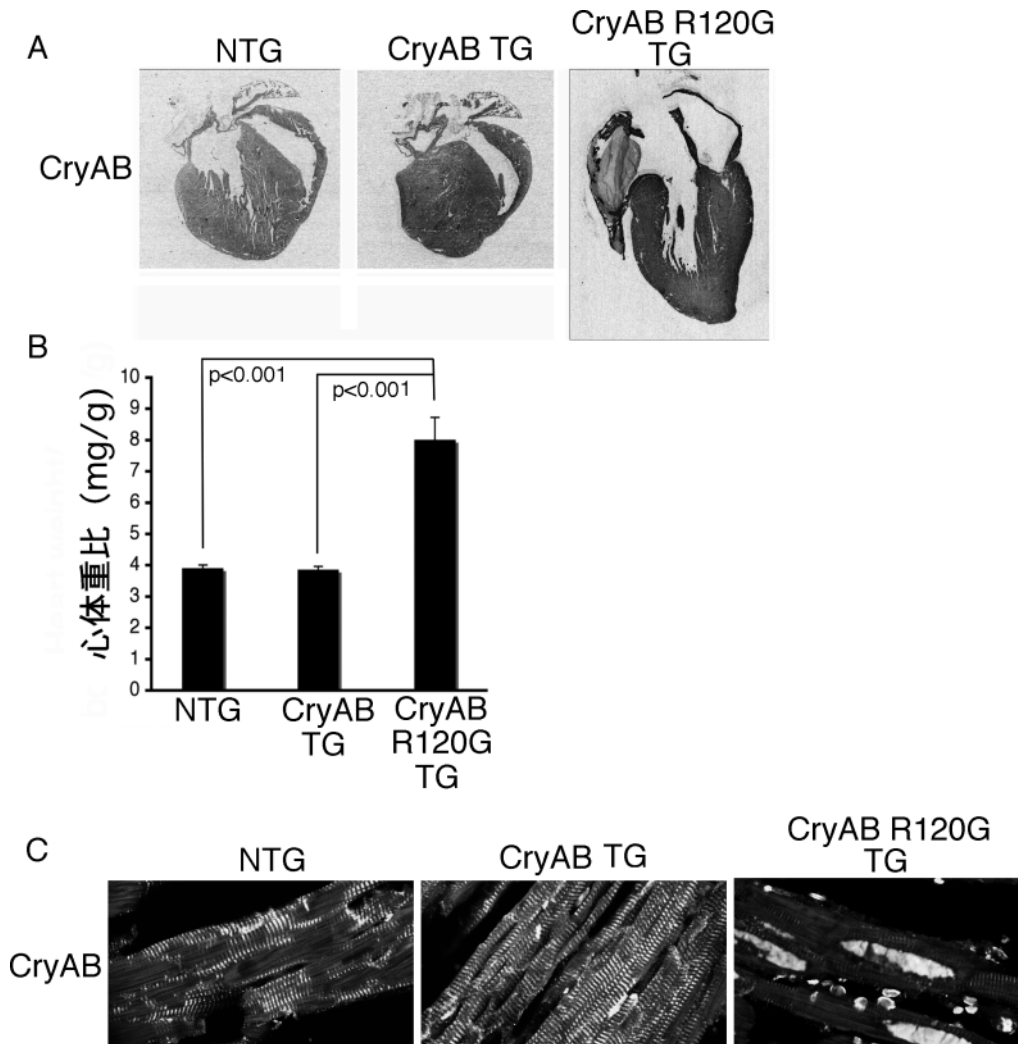


図1 心筋特異的  $\alpha$ -B クリスタリン (CryAB) 120 番目アルギニン→グリシン点変異体 (R120G) トランスジェニック (TG) マウスの表現型

(A) マウス  $\alpha$  ミオシン重鎖プロモーターで野生型 CryAB (CryAB TG), CryAB R120G (CryAB R120G TG) を強制発現させた TG マウスの典型例を示す. ノントランスジェニック (NTG) を対照群とした. 写真はいずれも 6 ヶ月齢マウス心臓を CyAB で免疫染色した典型例である. (B) 6 ヶ月齢での心体重比. CryAB R120G TG マウスの心体重比は, NTG および CryAB TG マウスに比して, 大きく, 心臓の肥大が認められた. (C) CryAB R120G TG マウスの心筋 CryAB 免疫染色像の典型例. CryAB R120G TG 心臓切片では, 心筋細胞内に CryAB を含む凝集体の蓄積が認められる. 文献 10 および 11 から改変した結果を示す.

の, 再び病態は進行する<sup>12)</sup>. この際, 心筋細胞のアポトーシスは抑制されるが, オートファジーを介するネクローシスが認められるようになる<sup>12)</sup>. つまり, CryAB 関連 MFM 病態にはアポトーシスだけでなく, オートファジーを介するネクローシスも関わっていると思われる.

以上のように CryAB 関連 MFM は, 心筋特異的 TG マウスを用いて解析されてきている<sup>9)</sup>. 一方, CryAB を原因とする白内障に関する動物モデルの報告は, 殆どなかった. 近年, CryAB Arg120Gly ノックインマウスが作製された<sup>13)</sup>. この変異 CryAB ノックインマウスでは野生型と比較し, 不溶性の CryAB タンパク質が増加し, 白内障発症

率が増加した<sup>13)</sup>. この変異 CryAB ノックインマウスの表現型は, 変異 CryAB TG マウスで認められるものと一致する点が多く認められることから, 白内障も CryAB MFM と同様, 変異低分子 HSP タンパク質自体が主な疾患原因である可能性が高いと考えられる.

低分子ストレスタンパク質の発現誘導を亢進させる化合物, ゲラニルゲラニルアセトン (GGA) は, 強力に HSPB8 および HSPB1 などの低分子 HSP の発現誘導を亢進し, その結果, CryAB 関連 MFM マウスの心筋症病態を抑制することが報告されている (図 3)<sup>14)</sup>. 低分子 HSP の発現誘導を亢進する薬物以外にも, ミトコンドリアの ATP 感受性

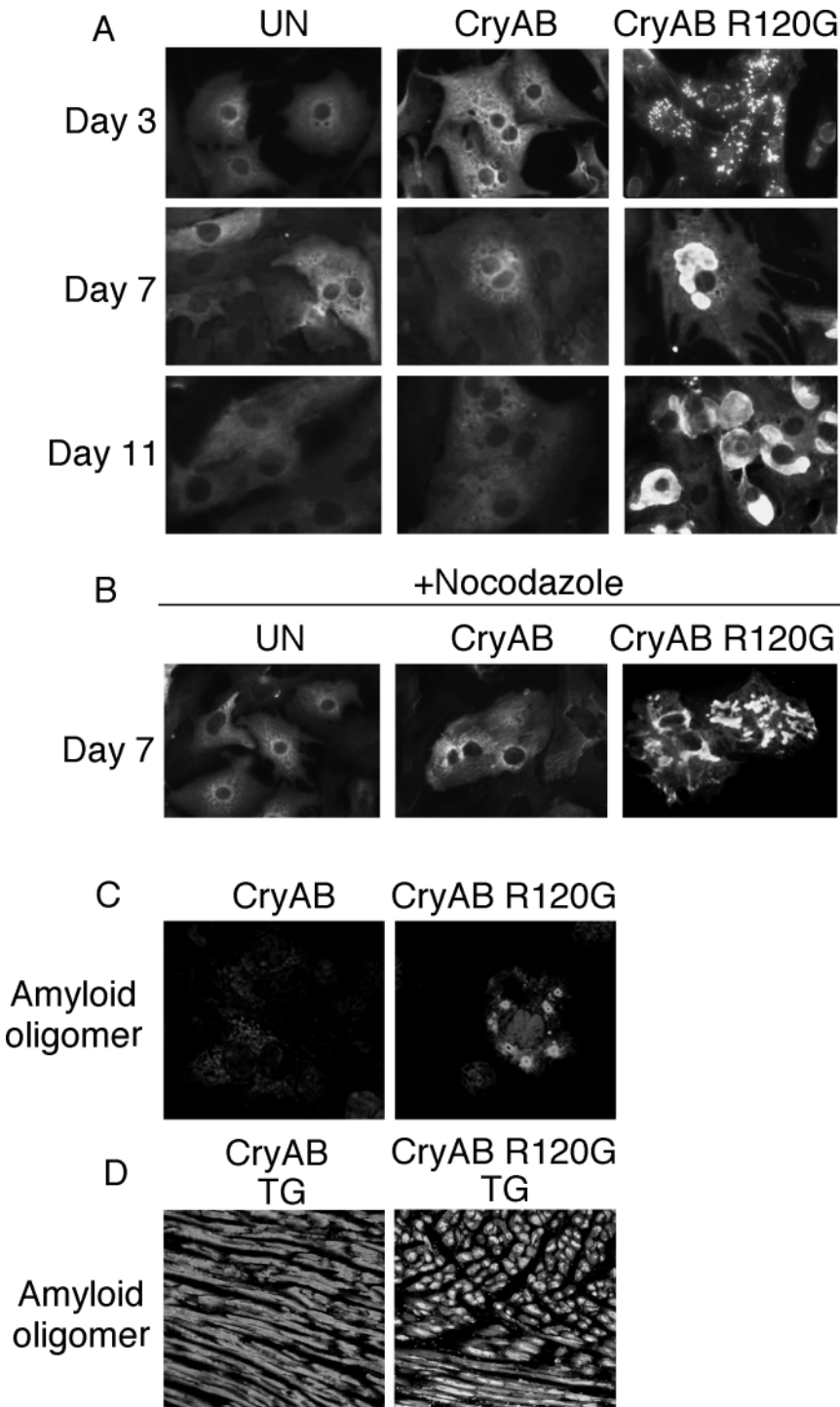


図2 アグレゾームおよび可溶性アミロイド (amyloid oligomer) 染色像

(A) 新生仔 Sprague-Dawley ラット心筋細胞を単離後、アデノウイルスベクターを用いて CryAB, CryAB R120G 遺伝子を導入した典型例を示す。遺伝子導入後3日目 (Day 3), 7日目 (Day 7) および11日目 (Day 11) に抗 CryAB 抗体を用いて免疫染色を行った。CryAB R120G を過剰発現させた心筋細胞では、細胞内に CryAB を含む凝集体が蓄積し、時間が経過することにより凝集体が細胞核周辺に集まっている。UN は未処置群, CryAB は野生型 CryAB を強制発現させた心筋細胞群。(B) 微小管重合阻害剤であるノコダゾール (10  $\mu$ M) を遺伝子導入後3日目から7日目まで処置した典型例。CryAB R120G を過剰発現させた心筋細胞にノコダゾールを処置することにより、細胞核周辺への凝集体蓄積が抑制されている。(C) 抗可溶性アミロイド抗体で免疫染色した新生仔ラット心筋細胞の典型例を示す。写真は CryAB あるいは CryAB R120G 遺伝子導入後7日目の免疫染色像。CryAB R120G 発現心筋細胞では、細胞核周辺の凝集体が抗可溶性アミロイド抗体にて染色される。(D) 抗可溶性アミロイド抗体で免疫染色した CryAB TG マウスあるいは CryAB R120G TG マウス心臓の典型例。心筋細胞内の凝集体が抗可溶性アミロイド抗体に反応している。文献10および11から改変した結果を示す。

カリウムチャンネル開口作用を持つニコランジルを CryAB Arg120Gly TG マウスに投与すると、ミトコンドリア保護効果を示し、その時の CryAB 関連 MFM 病態は軽減する<sup>15)</sup>。ニコランジルのこの心筋保護効果は、MFM 病態がすでに発症した後から薬物投与を開始しても認められるため、今後の臨床応用が期待できると考えられる (図4)<sup>15)</sup>。

前述のように HSPB1 関連神経疾患では HDAC6 活性が

その病態に関わっていることが報告されている。同じ低分子 HSP 関連疾患である変異 CryAB 関連 MEM 病態でも、HDAC6 活性の変化が報告されている<sup>16)</sup>。点変異 CryAB を発現している培養心筋細胞および TG マウス心筋では、HDAC6 活性は低下し、アセチル化チューブリンは増加していた<sup>16)</sup>。さらに、点変異 CryAB による心筋細胞毒性は、siRNA を用いて HDAC6 レベルを低下させると悪化し、逆に HDAC6 を過剰発現させると軽減した<sup>16)</sup>。この HDAC6

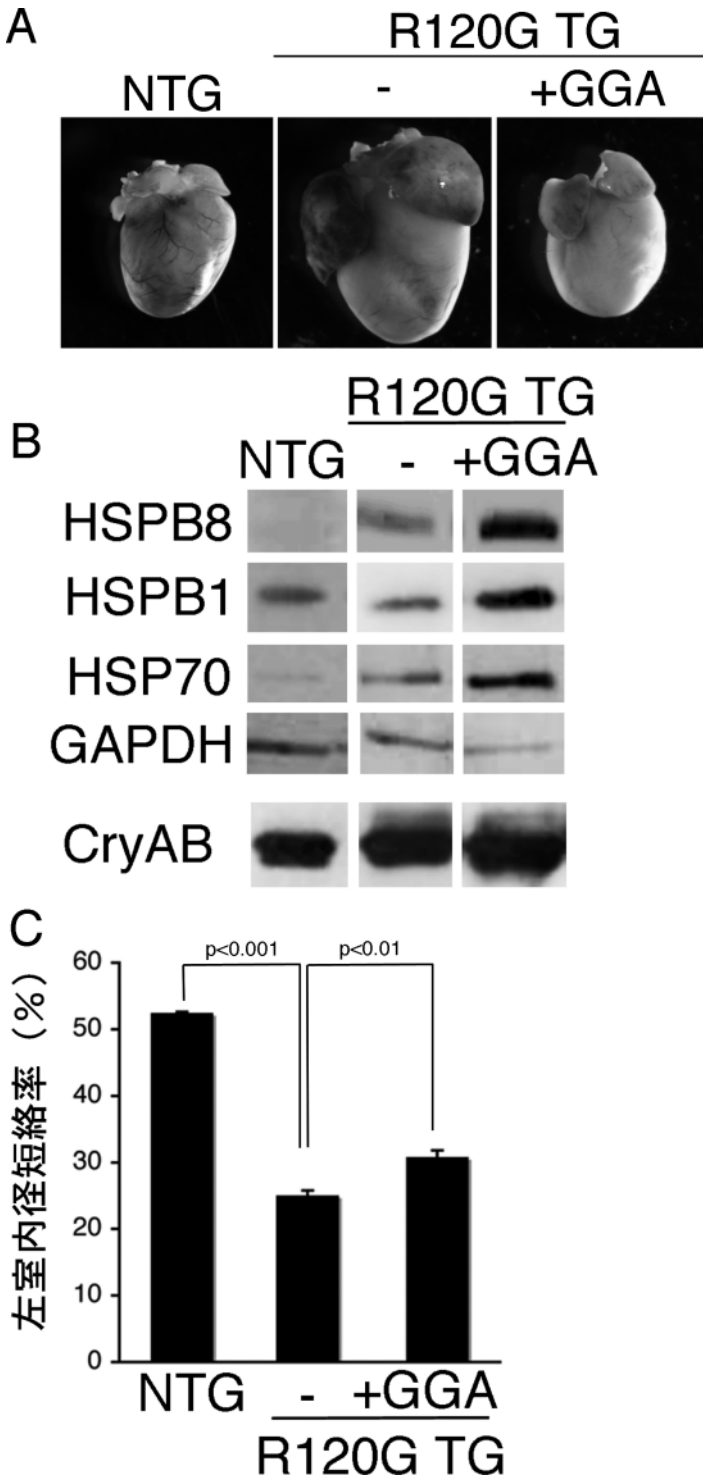


図3 CryAB R120G 心筋症に対するゲラニルゲラニルアセトン (GGA) の長期投与の効果

GGA は CryAB R120G TG マウスに生後1ヶ月から6ヶ月目まで混餌投与した。(A) 心臓の典型写真。GGA 処置により CryAB R120G TG マウス心臓の心臓肥大が抑制されている。(B) GGA 処置により発現誘導される熱ショックタンパク質 (HSP)。心筋の HSPB8, HSPB1, HSP70 は、GGA 処置により発現誘導が亢進しているが、CryAB は変わらない。(C) 心エコーにより測定された左室内径短絡率 (6ヶ月齢)。CryAB R120G TG マウスでは左室内径短絡率がノントランスジェニック (NTG) マウスに比して低下していた。GGA 処置は CryAB R120G TG マウスの左室内径短絡率低下を抑制した。文献 14 から改変した結果を示す。

の過剰発現による心筋細胞毒性軽減作用は、脱アセチル化酵素活性を有していない HDAC6 (HDAC6 His216Ala, His611Ala) では認められなかった (図 5)<sup>16)</sup>。これらの現象は TG マウス心臓でも再現され、HDAC6 の機能亢進あるいは機能消失により、心筋症病態は軽減あるいは悪化する。以上の結果、HDAC6 は心筋細胞において、不溶性凝集体の蓄積を制御し、その活性の低下は MFM 病態を悪化

させると考えられる<sup>16)</sup>。また、HDAC6 の不溶性凝集体の形成制御には脱アセチル化酵素活性が必須であると考えられる。これらの点変異 CryAB での実験結果は、HDAC6 活性が上がっている神経細胞特異的に点変異 HSPB1 を発現している TG マウスでの結果と矛盾する。この違いが同じ低分子 HSP ファミリー内での分子種の違いによるものか、あるいは細胞種の違いによるものかは今のところ不明であ

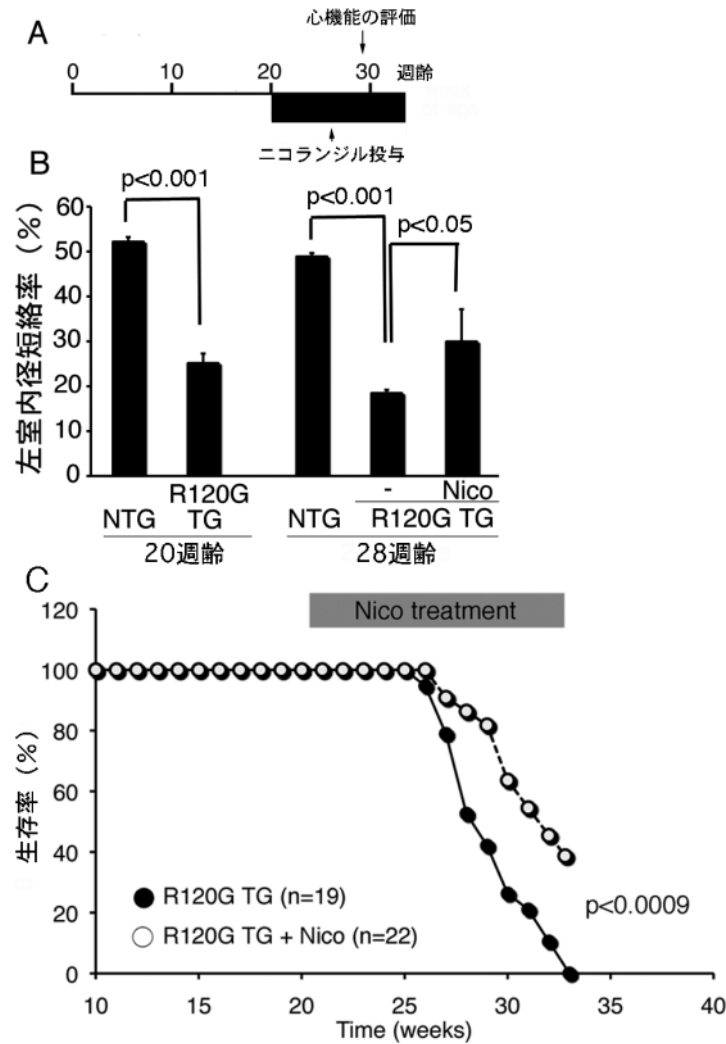


図4 CryAB R120G 心筋症に対するニコランジルの効果

(A) ニコランジル (Nico) は CryAB R120G TG マウスが生後 4.5 ヶ月齢 (20 週齢) の時から経口投与した (81 mg/1 飲水投与). (B) 心エコーにより測定された左室内径短絡率に対するニコランジルの効果. CryAB R120G TG マウス (R120G TG) 左室内径短絡率は, NTG マウスと比較し, 生後 20 週目で既に低下し, 28 週目ではさらに低下していた. 生後 20 週目からニコランジルを投与すると, 28 週目でのさらなる左室内径短絡率が抑制されていた. (C) 生存率. ニコランジルの投与により, CryAB R120G TG マウスの生存率低下が抑制された. 文献 15 から改変した結果を示す.

る.

### 3. ま と め

低分子 HSP 関連疾患では, いずれも変異 HSP 自身が主な疾患原因となっていると考えられる. すなわち, 低分子 HSP の変異により, 変異 HSP が不溶性凝集体として細胞核周辺に蓄積し, ミトコンドリア障害を伴いながら細胞死あるいは細胞機能障害が発生し, その結果, 神経症, 心筋症あるいは白内障などの病態が発症すると推測できる. しかし, ミトコンドリア障害あるいはその後の細胞死 (アポ

トーシスおよびネクローシス) の詳細な機序はいまだ不明な点が多い. CryAB 関連 MFM 治療に関しては, ニコランジルなどのミトコンドリア保護作用を有する薬物が有効であると考えられるが, その保護機構も不明である. さらに, HDAC6 抑制などの新たな機序による治療の試みも報告されてきているが, HSPB1 の結果と CryAB の結果では相違点が多い上, その詳細な機構も不明な点が多い. また, 他の低分子 HSP 関連疾患での HDAC6 の関与もわかっていない. HDAC6 の生理的な役割に関し, さらなる検討が必要である.

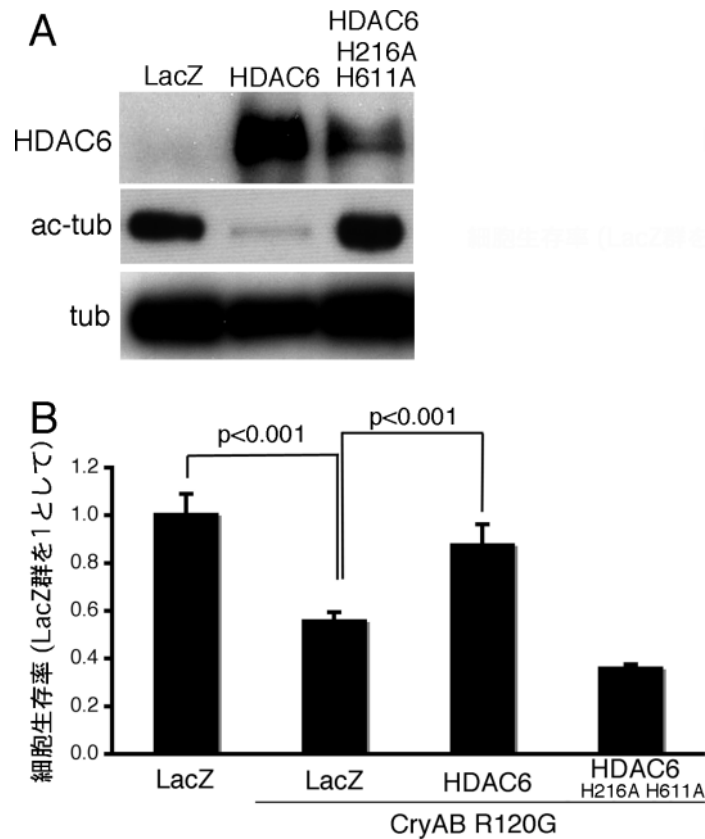


図5 ラット心筋細胞へのヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 6 過剰発現

(A) 新生仔 Sprague-Dawley ラット心筋細胞を単離後、アデノウイルスベクターを用いて野生型 HDAC6 (HDAC6), HDAC6 216 番目のヒスチジン→アラニン, 611 番目のヒスチジン→アラニン点変異 (H216A, H611A) 遺伝子を導入し, 遺伝子導入後 4 日目に細胞抽出液を採取し, 抗 HDAC6 抗体, 抗アセチル化チューブリン抗体 (ac-tub), 抗チューブリン (tub) を用いてウエスタンブロットを行った典型例を示す. HDAC6 の過剰発現により, 心筋細胞内のアセチル化チューブリン量が低下し, 脱アセチル化酵素失活体である HDAC6 H216A, H611A の過剰発現によりアセチル化チューブリンは増加した. (B) 細胞生存率. ラット心筋細胞を単離後, アデノウイルスベクターを用いて CryAB R120G と HDAC6 あるいは HDAC6 H216A, H611A 遺伝子を共発現させた. 対照群には LacZ 遺伝子を強制発現させた. 遺伝子導入 4 日目に MTT 法にて細胞生存率を測定した. CryAB R120G 遺伝子導入により, 心筋細胞の細胞生存率は低下し, HDAC6 の共発現はその低下を抑制した. 一方, HDAC6 の脱アセチル化酵素失活体 (HDAC6 H216A, H611A) 共発現では, CryAB R120G による細胞生存率低下に対する作用は認められなかった. 文献 16 から改変した結果を示す.

## 文 献

- 1) Taylor, R.P. & Benjamin, I.J. (2005) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 38, 433-444.
- 2) Bagnieris, C., Bateman, O.A., Naylor, C.E., Cronin, N., Boelens, W.C., Keep, N.H., & Slingsby, C. (2009) *J. Mol. Biol.*, 392, 1242-1252.
- 3) d'Ydewalle, C., Krishnan, J., Chiheb, D.M., Van Damme, P., Irobi, J., Kozikowski, A.P., Vanden Berghe, P., Timmerman, V., Robberecht, W., & Van Den Bosch, L. (2011) *Nat. Med.*, 17, 968-974.
- 4) Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A., & Yao, T.P. (2003) *Cell*, 115, 727-738.
- 5) Almeida-Souza, L., Asselbergh, B., d'Ydewalle, C., Moonens, K., Goethals, S., de Winter, V., Azmi, A., Irobi, J., Timmermans, J.P., Gevaert, K., Remaut, H., Van Den Bosch, L., Timmerman, V., & Janssens, S. (2011) *J. Neurosci.*, 31, 15320-15328.

- 6) Tapia, M., Wandosell, F., & Garrido, J.J. (2010) *PLoS One*, 5, e12908.
  - 7) Fukada, M., Hanai, A., Nakayama, A., Suzuki, T., Miyata, N., Rodriguiz, R.M., Wetsel, W.C., Yao, T.P., & Kawaguchi, Y. (2012) *PLoS One*, 7, e30924.
  - 8) Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z., Prevost, M.C., Faure, A., Chateau, D., Chapon, F., Tome, F., Dupret, J.M., Paulin, D., & Fardeau, M. (1998) *Nat. Genet.*, 20, 92-95.
  - 9) Sanbe, A. (2011) *Biol. Pharm. Bull.*, 34, 1653-1658.
  - 10) Sanbe, A., Osinska, H., Saffitz, J.E., Glabe, C.G., Kaye, R., Maloyan, A., & Robbins, J. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 10132-10136.
  - 11) Sanbe, A., Osinska, H., Villa, C., Gulick, J., Klevitsky, R., Glabe, C.G., Kaye, R., & Robbins, J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 13592-13597.
  - 12) Pattison, J.S., Sanbe, A., Maloyan, A., Osinska, H., Klevitsky, R., & Robbins, J. (2008) *Circulation*, 117, 2743-2751.
  - 13) Andley, U.P., Hamilton, P.D., Ravi, N., & Weihl, C.C. (2011) *PLoS One*, 6, e17671.
  - 14) Sanbe, A., Daicho, T., Mizutani, R., Endo, T., Miyauchi, N., Yamauchi, J., Tanonaka, K., Glabe, C., & Tanoue, A. (2009) *PLoS One*, 4, e5351.
  - 15) Sanbe, A., Marunouchi, T., Yamauchi, J., Tanonaka, K., Nishigori, H., & Tanoue, A. (2011) *PLoS One*, 6, e18922.
  - 16) Sanbe, A., Miyauchi, N., Nishigori, H., & Tanoue, A. (2010) *Circulation*, 122, A12922.
-