

抗がん剤アベマシクリブを用いた FTLD-TDP 療法の開発

田中良法

岡山理科大学 獣医学部 獣医学科

【研究の背景】

前頭側頭葉変性症 (FTLD) は前頭葉及び側頭葉の萎縮が特徴的な神経変性疾患である。TDP-43 の蓄積が特徴的な FTLD-TDP は全 FTLD の半数近くを占め、その四分の一程度でプログリン(PGRN) 遺伝子変異を原因とする。TDP-43 は細胞核に局在するタンパク質であるが、病変部位では核から消失し、細胞質で凝集・蓄積する。この TDP-43 細胞質内蓄積病理は、疾患の進行に伴い初発部位から脳内を拡散するため、疾患の発症と密接に関係していると考えられている。細胞質に凝集・蓄積したアミロイド様の線維構造をもつ TDP-43 は、正常な TDP-43 を異常型に変換し、TDP-43 の蓄積を促進する。

我々は繊維構造を構成する C 末端側の TDP-43 領域に GFP を付加した不溶性タンパク質 162C がオートファジーで主に分解されること¹⁾、老齢マウスのミクログリアでは、PGRN 産生低下によってオートリソソーム形成が抑制されること²⁾を明らかにした背景から、オートリソソーム形成を促進すれば TDP-43 蓄積が抑制できるのではないかと考え、薬物の探索を開始した。我々は CDK4/6 阻害薬 abemaciclib (Abe) と PIKfyve 阻害薬 vacuolin-1 (Vac) が細胞内に巨大なオートリソソームを形成することを明らかにし、Abe と Vac がオートリソソーム形成促進薬物であることを示唆した³⁾。

【目 的】

Abe や Vac のオートリソソーム形成促進効果、及び不溶性 TDP-43 蓄積抑制効果を調べることを目的とした。

【方 法】

オートファゴソームとリソソームの融合によるオートリソソーム形成(オートファジーフラックス)を定量的に解析するために、GFP-LC3-RFP-LC3 ΔG プローブを用いた。オートファジーの影響を調べるために、オートファジー欠損 ATG16L1 (-/-) HeLa 細胞を用いた。細胞内のホスファチジルイノシトール3リン酸(PI(3)P)の発現を調べるために、GFP-2×FYVE プローブを用いた。FTLD-TDP のモデル動物として PGRN 欠損(-/-)マウスを用いた。PGRN 欠損の影響を調べるために、PGRN (+/+)マウスと PGRN (-/-)マウス由来の胎児線維芽細胞(MEF)を用いた。オートリソソーム形成を DALGreen (Dojindo, Kumamoto)で評価した。生体内における Abe の影響を調べるために、75~80 週齢の WT と KO マウスに 150 μg(乳がんの治療で一日に投与される用量をマウスの体重で換算した用量)の Abe を隔週で9回経口投与した。

【結 果】

Abe と Vac は濃度依存的にオートファジーフラックスを促進することが示唆された。Abe と Vac は ATG16L1 (+/+)細胞では 162C の蓄積を抑制したが、ATG16L1 (-/-)細胞では蓄積抑制効果が認められなかったことから、Abe と Vac はオートファジー依存的に 162C の蓄積を抑制することが示唆された。Abe と Vac は GFP-2×FYVE シグナルを増加したことから、PI(3)P 産生を増加することが示唆された。PI(3)P 産生阻害剤 Wortmannin を用いた解析から、Abe と Vac は PI(3)P を介してオートファジーフラックスを促進し、不溶性 TDP-43 蓄積を抑制することが示唆された。

Abe と Vac は PGRN(-/-)MEF で低下した DALGreen 染色性を PGRN(+/-)MEF と同程度まで回復したことから、Abe と Vac は PGRN 欠損によって生じるオートリソソーム形成不全を回復することが示唆された。さらに、Abe と Vac は PGRN(-/-)MEF で促進する 162C 凝集体形成を顕著に低下させたことから、Abe と Vac は PGRN 欠損によって促進する TDP-43 凝集体形成を抑制することが示唆された。老齢の PGRN(-/-)マウスのミクログリアでは、PGRN(+/-)マウスのミクログリアと比較してリソソームマーカーCD68 の発現増加が顕著であったが、Abe の経口投与は PGRN 欠損によって生じる CD68 の発現増加を有意に抑制したことから、Abe が生体内においてもオートリソソーム形成を促進することが示唆された。

【考 察】

Abe と Vac は PI(3)P の産生によってオートリソソーム形成を促進し、不溶性の TDP-43 分解を促進することが示唆された。また、Abe は PGRN 欠損によって生じるオートリソソーム形成不全を回復することが示唆されたため、FTLD-TDP の疾患修飾薬の候補薬物となる可能性が考えられた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

乳がんの治療薬として承認されている Abe がオートリソソーム形成を促進し、不溶性 TDP-43 の分解を促進することが示唆されたことで、Abe が ALS や FTLD-TDP の治療薬として有用である可能性が考えられた。Abe を間欠的に投与する乳がん治療と異なり、週1回程度の単回投与でオートリソソーム形成促進効果が期待できることも明るい材料と言える。

【参考・引用文献】

1. **Tanaka Y**, Kusumoto S, Honma Y, Takeya K, Eto M. “Overexpression of progranulin increases pathological protein accumulation by suppressing autophagic flux” *Biochem Biophys Res Commun.*, 611, pp78-84, 2022
2. **Tanaka Y**, Chambers JK, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M. Possible involvement of lysosomal dysfunction in pathological changes of the brain in aged progranulin-deficient mice. *Acta Neuropathol Commun.*, 15, 2, 78, 2014
3. **Tanaka Y**, Hino H, Takeya K, Eto M. “Abemaciclib and vacuolin-1 induce vacuoli-like autolysosome formation - a new tool to study autophagosome-lysosome fusion” *Biochem Biophys Res Commun.*, 614, pp191-197, 2022