

新規オートファジー促進薬物による FTLD-TDP 療法の開発

田中良法

岡山理科大学

【研究の背景】

プログランニューリン(PGRN)遺伝子のハプロ不全によって生じる PGRN 産生低下は、前頭葉と側頭葉の萎縮を特徴とする前頭側頭葉変性症(FTLD-GRN)の原因となる。病変部では、核タンパク質 TDP-43 の核局在が減少し、病的にリン酸化された TDP-43 が細胞質に蓄積することが病理学的特徴である。近年、PGRN 補充療法が治療候補として検討されているものの、過剰な PGRN が神経変性を促進する可能性も指摘されており、PGRN 量を単純に増やすのではなく、その機能を補完する治療戦略が求められている。(マクロ)オートファジーは、オメガソームを起点として形成されるオートファゴソームがリソソームと融合してオートリソソームを形成し、TDP-43 凝集体などの不要な細胞内成分を分解する機構である。我々はこれまで、老齢 PGRN 欠損マウスの視床 VPM/VPL 領域において、オートファジーアダプターp62 の顕著な凝集・蓄積が生じることを示し、PGRN が老化によって生じるオートファジー破綻を抑制している可能性を報告してきた。また、同領域では TDP-43 の細胞質内蓄積や活性化ミクログリアの集積も認められ、これらの病理がオートファジー異常と密接に関連していると考えられる¹⁾。一方で、我々は血液脳関門を通過する乳がん治療薬アベマシクリブ(Abe)が、オメガソーム形成およびオートリソソーム形成を促進することで病的 TDP-43 の形成を抑制することを培養細胞を用いて示してきた²⁾。以上の背景から、Abe が PGRN 欠損に伴うオートファジー破綻を回復し、病理の改善に寄与する可能性が示唆されていた。

【目 的】

本研究では、Abe が PGRN 産生低下によって生じるオートファジー異常を回復させ、TDP-43 蓄積やミクログリア活性化といった病理形成を抑制し得るかを検討することを目的とした。

【方 法】

まず、siRNA により内在性 PGRN 発現を抑制したマウス Neuro-2a 細胞にヒト PGRN を再発現させ、レスキュー効果を検討した。オメガソーム形成を評価するために、GFP-ATG13 発現細胞における ATG13 の集積を解析した。オートファゴソームとオートリソソームの蓄積を評価するために、LAMP1-GFP および mCherry-LC3 の共発現細胞を用い、mCherry 単陽性領域をオートファゴソーム、mCherry と GFP の共陽性領域をオートリソソームとして定量した。さらに、オートリソソーム形成を評価するために、オートリソソームマーカーDALGreenを用いた解析を行った。また、易凝集性 TDP-43(GFP-TDP-43 aa162-414)を発現させ、易凝集性 TDP-43 および病的なリン酸化 TDP-43 の発現量を解析した。続いて、siRNA により PGRN 発現を抑制した Neuro-2a 細胞に Abe を添加し、PGRN 発現低下によって惹起されるオートファジー破綻や病的 TDP-43 形成が Abe により抑制されるかを検討した。加えて、老齢野生型マウスおよび PGRN フレームシフト変異(FS)マウスに Abe を投与し、LC3 免疫染色によるオートファゴソーム蓄積、LC3 と LAMP1 の二重免疫染色によるオートリソソーム形成、TDP-43 免疫染色による病理評価を行った。さらに、Iba1 免疫染色像をFracLacで解析し、ミクログリアの形態的複雑性および空隙性を評価した。

【結 果】

レスキュー実験から、PGRN 濃度依存的に GFP-ATG13 の集積が増加し、オートファゴソーム領域が減少するとともに DALGreen シグナルが増加することが確認された。これらの結果は、PGRN がオメガソーム形成を促進し、オートファゴソームの蓄積を抑制し、オートリソソーム形成を促進することを示唆している。さらに、PGRN 発現抑制によって生じた病的リン酸化 TDP-43 の形成が、ヒト PGRN の再発現によって抑制されたことから、病的 TDP-43 の形成が PGRN 濃度に依存して生じることも示唆された。Abe 添加実験では、PGRN 低下により障害されていたオメガソーム形成およびオートリソソーム形成が Abe によって回復し、易凝集性 TDP-43 の分解が促進されることで、病的リン酸化 TDP-43 の形成が抑制されることが示唆された。さらに、老齢 FS マウスにおいて Abe 投与は LC3 蓄積を抑制し、オートリソソーム形成を促進した結果、TDP-43 の細胞質内蓄積が軽減された。また、Abe は活性化に伴って形態が単純化したミクログリアにおいて、形態的複雑性や空隙性を改善する効果も示した。

【考 察】

Abe は PGRN 産生低下によって阻害されたオートファジーを回復し、TDP-43 蓄積およびミクログリア形態変化を抑制する可能性が示された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

Abe が PGRN 産生低下により生じる FTLD-TDP の進行を抑制する可能性が示され、本薬剤が有望なドラッグリポジショニング候補であることが示唆された。

【参考・引用文献】

1. **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
2. **Tanaka Y**, Kozuma L, Hino H, Takeya K, Eto M. Abemaciclib and Vacuolin-1 Decrease Aggregate-prone TDP-43 Accumulation by Accelerating Autophagic Flux *Biochemistry and Biophysics Reports*, 38, 101705, 2024