

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号	32660
研究種目	若手研究(B)
研究期間	2011年4月1日～2013年3月31日
課題番号	23790201
研究課題名(和文)	新規 Parp1 制御メカニズムを利用した多作用点型虚血再灌流障害防御剤の開発
研究課題名(英文)	Development of therapeutic agents for ischemia/reperfusion injury utilizing a novel regulatory mechanism of Parp1
研究代表者	
	沖田 直之 (OKITA NAOYUKI)
	東京理科大学・薬学部・助教
	研究者番号 : 60453841

研究成果の概要 (和文) :

PARP1 は脳虚血や心虚血、臓器移植後の血流再開時に生じる虚血再灌流障害のような様々な病態生理学的な現象に関与する重要な酵素である。虚血再灌流による PARP1 の過活性化が活性酸素種の産生や NF- κ B の転写活性化に関与していることから、PARP1 は虚血再灌流障害の防御における重要な標的因子として考えられている。申請者は Mdm2 阻害剤である Nutlin-3a が培養細胞において PARP1 のタンパク質レベルを減少させることを見出したので、当該メカニズムを利用した虚血再灌流障害防御薬の開発を目指し、本研究を行った。その結果、(1) Nutlin-3a とそのアナログ Caylin-2 は p53 かつプロテアソーム依存的に PARP1 の分解を誘導すること (2) その分解は、一過性でありかつ炎症性反応を付随しないことが明らかとなった。以上の結果より、p53 の活性化を誘導できる cis-imidazoline 化合物が虚血再灌流障害の防御剤となりうることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) :

PARP1 is an important enzyme involved in various patho-physiological phenomena such as ischemia/reperfusion (I/R) injury, which occurs when blood flow is restored after cerebral infarction, myocardial infarction and transplantation of various organs. I/R-induced PARP1 over-activation is mediated by production of reactive oxygen species and is involved in NF- κ B transactivation. For these reasons, PARP1 is an attractive target for strategies to protect against I/R injury. Because we found that Nutlin-3a, an MDM2 inhibitor, treatment reduces the protein levels of PARP1 in culture cells, we investigated the novel regulatory mechanism of PARP1 for development of therapeutic agents for ischemia/reperfusion injury. Consequently we obtained the results that Nutlin-3a and its analogue Caylin-2 treatment induce proteasomal degradation of PARP1 in a p53-dependent manner, and the down-regulation of PARP1 is reversible and accompanied with an inflammatory response. For protection against I/R injury, our results support the usability of the p53 inducible cis-imidazoline compounds, Nutlin-3a and its analogs, as PARP1 inhibitors.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 薬学・医療系薬学

キーワード : PARP1、Nutlin3a、Caylin2、虚血再灌流障害、p53、プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

【虚血再灌流障害とは】

虚血再灌流障害とは、脳梗塞、心筋梗塞などの再灌流治療後や臓器移植後に、血流を再灌流する際におこる臓器障害である。障害を引き起こす機序としては活性酸素や一酸化窒素などのフリーラジカル産生による障害、炎症性サイトカインなど各種ケミカルメディエータ産生による障害などの機序が考えられており、虚血局所だけでなく遠隔臓器をも障害し、特に脳、肺、肝、腎などが標的臓器となり結果として多臓器不全をきたす。現代人の死因の上位を占める脳梗塞や心筋梗塞といった虚血性疾患、及び急速に発展している臓器移植医療に対する「効率的な治療薬」や「治療法の多様性確保」は高い需要と緊急性がある。

【PARP ファミリーとは】

PARP とは NAD⁺を基質としアクセプタータンパク質に対してポリ ADP リボースを付加合成する酵素群の総称であり、DNA 損傷応答、炎症、細胞死、テロメア制御などにおいて重要な役割を果たしている。現在までに、PARP ファミリー分子としては 18 種類が報告されているが、その中で PARP 活性を有するのは 7 種類 (PARP1、PARP2、PARP3、vPARP、tankyrase1、tankyrase2、TiPARP) である。PARP1 は、PARP ファミリーの中でも組織中のタンパク質量や活性が最も高い核内タンパク質であり、DNA 損傷応答や炎症制御などにおいて特に重要な役割を果たしている。さらに、PARP2 はこの PARP1 の補助的機能を有していることが報告されている。

【PARP1 の虚血再灌流障害ターゲットとしての有用性】

PARP1 は DNA 鎖切断端を認識することで基底レベルの 100 倍以上活性化し、DNA 損傷局所への DNA 修復因子の集積に寄与している。したがって、PARP1 は抗癌剤あるいは抗癌治療増感剤としての重要なターゲットであると考えられている。これに加え、PARP1 は炎症促進性の転写因子である NF- κ B の補因子として炎症関連遺伝子の発現を促進することが知られている。さらに、過剰な DNA 損傷等によって PARP1 が過剰に活性化してしまうと、多量の NAD⁺消費に伴う壊死を誘導し、それに伴う周辺組織への炎症の惹起の引き金自体にもなりうる。実際に PARP1 ノックアウトマウスにおいて虚血再灌流障害が軽減されるという報告も存在している。以上より、PARP 活性の阻害は虚血再灌流障害の治療薬としても有用であると考えられており、INO-1001 (イノテック社) が心筋梗塞後の再灌流障害患者の治療薬として、臨床試験が進

められている。

【p53 の虚血再灌流障害ターゲットとしての有用性】

Arf-Mdm2 による p53 の制御系は Ink4-CDK4/6 による pRB 制御系と並んで、細胞増殖や発癌において非常に重要な機構として考えられている。最近、p53 は炎症性サイトカインを負に制御する機能を有することが報告されており、炎症の制御においても重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。Mdm2 阻害剤は、p53 と Mdm2 ユビキチン E3 リガーゼとの複合体形成を阻害することで、p53 を安定化して細胞周期の停止やアポトーシスを誘導することができる。それゆえ、制癌治療に有効であり、ドラッグライクな Mdm2 阻害剤としては Nutlin-3a、MI-219、TDP665759 といった化合物が報告されている。

【申請者による Nutlin-3a 誘導性 PARP1 タンパク分解の発見】

ここ数年、申請者は、DNA 損傷非依存的な p53 の機能やポリ ADP リボシル化の分子機構に着目し研究をしてきたが、その中で Nutlin-3a を処理した細胞において PARP1 タンパクが消失するという現象を見出した。当該現象は、国内はもとより海外においても全く報告はなく、新規 PARP1 タンパク質制御機構が関与していることが考えられた。

2. 研究の目的

本申請課題は、p53 及びプロテアソーム依存的な PARP1 分解の分子メカニズムを解明し、その新規 PARP1 阻害メカニズムを利用した多作用点型虚血再灌流障害治療薬の開発を目標としている。

3. 研究の方法

i) PARP1 減少効果の分子メカニズムに関する検討

各種細胞株を用いて、Nutlin-3a 及びそのアナログ (cis-imidazoline 骨格化合物) やその他 Mdm2 阻害剤が PARP1 減少誘導効果を有するかを解析し、PARP1 減少誘導効果を有する化合物に関しては、さらにプロテアソームあるいは p53 に依存するかを確認した。また、PARP1 減少効果が可逆的であるか、炎症反応との関連についても検討を加えた。

ii) in vivo 応用に向けての基礎的検討

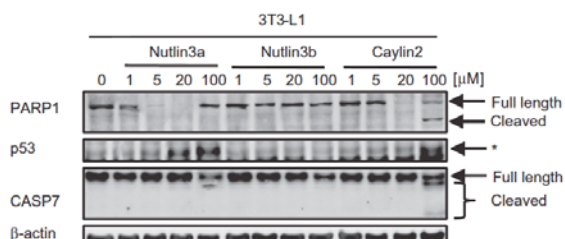
マウス腹腔に Nutlin-3a を投与し、どの臓

器において p53 あるいは PARP1 タンパク質レベルに変化が起きるかを解析した。

4. 研究成果

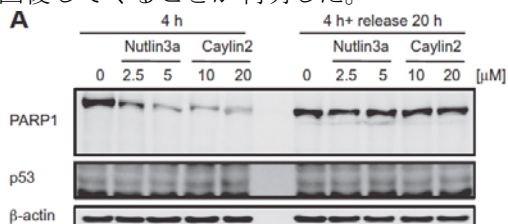
i) PARP1 減少効果の分子メカニズムに関する検討

我々が PARP1 タンパク質減少誘導効果を有する薬剤として見出した Nutlin-3a は、cis-imidazoline 骨格を有する Mdm2 阻害剤である。そこで、まずはじめに、PARP1 タンパク質減少効果が、Mdm2 阻害剤に共通する作用なのかを確認するために、現在研究用試薬として上市されている 2 種類の Mdm2 阻害剤 (NSC6681 及び trans-4-iodo, 4'-boranyl-chalcone) に関して、3T3-L1 細胞における PARP1 タンパク質減少誘導効果を有するかを検証した。その結果、PARP1 タンパク質の減少効果はおろか、p53 の誘導効果すら認められなかった (結果未掲載)。次に、cis-imidazoline 骨格に着目し、Nutlin-3a のエナンチオマーである Nutlin-3b 及び Nutlin-3a アナログである Caylin-2 に関して同様に 3T3-L1 細胞における PARP1 タンパク質減少誘導効果を有するかを検証した。その結果、Caylin-2 は Nutlin-3a と同様に PARP1 タンパク質減少効果を有していた一方で、Nutlin-3b は不応性であることが判明した。



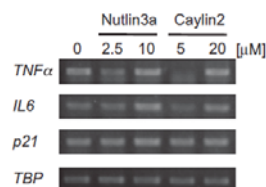
さらに、PARP1 タンパク質の減少効果か認められる条件下では、また、Caylin-2 による PARP1 タンパク質減少効果には、Nutlin-3a と同様に p53 依存性及びプロテアソーム依存性があることも明らかになった。

PARP1 は、様々な生理的シグナル応答を通して細胞恒常性の維持に寄与していることから、虚血再灌流障害時の PARP1 阻害様式は一過性であることが必要条件であると考えられた。そこで、リリース実験を行ったところ Nutlin-3a、Caylin-2 共に、培地から薬剤を除去した場合に PARP1 タンパク質レベルが回復してくることが判明した。



また、p53 の過剰な亢進は炎症シグナルを

亢進させることが知られていたため、Nutlin-3a 及び Caylin-2 が炎症シグナルを亢進してしまう可能性が考えられた。したがって、PARP1 タンパク質の減少効果が認められる条件下において炎症シグナルへの影響を評価した結果、少なくとも TNF- α や IL-6 の mRNA 発現に目立った影響は無いことが判明した。



ii) in vivo 応用に向けての基礎的検討

ターゲットとする虚血再灌流障害に関しては、脳梗塞による脳虚血や心筋梗塞による心虚血等があげられるが、実際に薬物動態等を考慮した上で標的臓器を絞り込む必要があると考えた。そこで、マウスを用いて Nutlin-3a 投与による PARP1 レベルの抑制がどの臓器で認められるかを確認することにした。投与方法は過去の文献を参考にし、5 mg/kg、20 mg/kg、100 mg/kg の投与量で腹腔内に投与した。腹腔内投与後 4、8、12 時間後にマウスを屠殺し、主要臓器 (脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脂肪) に関して、PARP1 タンパク質レベルに変動が見られるか確認した。本実験条件下では、唯一肺において p53 のタンパク質レベルの上昇が確認されたものの、効率よく PARP1 のタンパク質レベルの減少が認められる臓器はなかった (結果未掲載)。

iii) 総括

本研究により、Nutlin-3a 以外に PARP1 タンパク質の減少誘導効果を有する Caylin-2 を見出すことに成功した。この結果は、cis-imidazoline 骨格が PARP1 タンパク質減少誘導能において重要な役割を果たしていることを強く示唆している。この結果は今後、化合物の構造展開をするための重要な知見である。さらに、PARP1 タンパク質の減少は、薬剤の除去によって速やかに PARP1 タンパク質発現レベルを基底レベルに戻すことができ、危惧された炎症反応の惹起もしないことから、虚血再灌流障害防御剤としての有用性が高いことが予想された。これまでの研究結果より、PARP1 タンパク質減少効果にはある程度の細胞種選択性があると予想されていた。マウスを用いた基礎検討の結果からも、臓器解析の際にはバルクで PARP1 タンパク質の挙動を見ることは困難である可能性も示唆されており、今後免疫染色等を駆使し、特定の細胞種における PARP1 タンパク質の挙動を確認することで解決していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Chujo Y, Fujii N, Okita N (Co-1st author), Konishi T, Narita T, Yamada A, Haruyama Y, Tashiro K, Chiba T, Shimokawa I, Higami Y. Caloric restriction-associated remodeling of rat white adipose tissue: Effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis, sterol regulatory element binding protein-1 and macrophage infiltration. Age, 2012 Accepted.
2. Okita N (Corresponding author), Yoshimura M, Watanabe K, Minato S, Kudo Y, Higami Y, Tanuma S. CHK1 cleavage in programmed cell death is regulated by caspase and non-caspase family proteases. Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects 1830, 2204-2213, 2013.
3. Okita N (Corresponding author), Minato S, Ohmi E, Tanuma S, Higami Y. DNA damage-induced CHK1 autophosphorylation at Ser296 is regulated by intramolecular mechanism. FEBS Letters 586, 3974-3979, 2012.
4. Mikami K, Okita N, Tokunaga Y, Ichikawa T, Okazaki T, Takemoto K, Nagai W, Matsushima S, Higami Y. Autophagosomes accumulate in differentiated and hypertrophic adipocytes in a p53-independent manner. Biochemical and Biophysical Research Communications 427, 758-763, 2012.
5. Nagai W, Okita N (Co-1st author and corresponding author), Matsumoto H, Okado H, Oku M, Higami Y. Reversible induction of PARP1 degradation by p53 inducible cis-imidazoline compounds. Biochemical and Biophysical Research Communications 421, 21-25, 2012.
6. Okita N, Hayashida Y, Kojima Y, Fukushima M, Yuguchi K, Mikami K, Yamauchi A, Watanabe K, Noguchi M, Nakamura M, Toda T, Higami Y. Differential Responses of White Adipose Tissue and Brown Adipose Tissue to Caloric Restriction in Rats. Mechanisms of Ageing and Development 133, 255-266, 2012.
7. 藤井波木、沖田直之、樋上賀一
カロリー制限による白色脂肪組織を中心とした脂質代謝の活性化
基礎老化研究 36 巻 3 号 31-38 頁、2012 年
8. Matsushima S, Okita N (Co-1st author and corresponding author), Oku M, Nagai W, Kobayashi M, Higami Y. An Mdm2 antagonist, Nutlin-3a, induces p53-dependent and proteasome-mediated poly(ADP-ribose) polymerase1 degradation in mouse fibroblasts. Biochemical and Biophysical Research Communications 407, 557-61, 2011.
9. Okita N (Corresponding author), Ohta R, Ashizawa D, Yamada Y, Abe H, Abe T, Tanuma S. Bacterial production of recombinant human poly(ADP-ribose) glycohydrolase. Protein Expression and Purification 75, 230-235, 2011.

[学会発表] (計 3 件)

1. Okita N, Yoshimura M, Watanabe K, Minato S, Tanuma S, Higami Y.
Chk1 cleavage by both CASP and non-CASP family proteases during programmed cell death, The 1st International Postgraduate Conference 2012 at University of technology MARA, Puncak Alam, Malaysia, 2012
2. 沖田直之、松島慎吾、奥美紗子、永井恒、小林正樹、樋上賀一
PARP1 タンパク新規制御機構ー虚血再灌流障害治療法への応用に向けてー
第 10 回国際バイオ EXPO 東京 (2011 年)
3. 沖田直之
細胞周期制御因子 CHK1 キナーゼによる細胞運命の制御
日本薬学会関東支部大会 若手シンポジウム 習志野 (2011 年)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：METHOD OF TREATING ISCHEMIA/
REPERFUSION INJURY

発明者：樋上賀一、沖田直之、松島慎吾

権利者：東京理科大学

種類：特許

番号：PCT/JP2012/052565

出願年月日：2012 年 1 月 27 日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖田 直之 (OKITA NAOYUKI)

東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：60453841