

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08025

研究課題名(和文) アルデヒドデヒドロゲナーゼを標的とした新規小胞体ストレス関連疾患治療戦略

研究課題名(英文) Elucidation of novel therapeutics of endoplasmic reticulum stress-related disease targeting aldehyde dehydrogenase

研究代表者

小澤 孝一郎 (Ozawa, Koichiro)

広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・教授

研究者番号：10211822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：現在までに、非ステロイド性抗炎症薬として知られているフルルビプロフェンが小胞体ストレスを抑制できる可能性を示して来た。さらに、フルルビプロフェンの標的タンパク質はアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)である可能性を示してきた。今回、ALDH標品を用いた検討の結果、フルルビプロフェンはALDH活性を上昇させることが示された。また、小胞体ストレス誘起試薬を細胞に処置することにより、ALDHはミトコンドリアにおいて凝集し、その凝集はフルルビプロフェン処置により抑制される可能性が示された。従ってフルルビプロフェンはALDH活性上昇効果と小胞体ストレスによるALDH凝集抑制効果を有する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We previously found that flurbiprofen, one of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs, can ameliorate endoplasmic reticulum stress (ER stress). Furthermore, we previously found that flurbiprofen may interact with aldehyde dehydrogenase (ALDH). In the present study, by using recombinant ALDH protein, we found that flurbiprofen can induce activation of ALDH activity. Additionally, we found possibility that ALDH may form aggregate in the mitochondria by ER stress-inducing reagent and this aggregation was reduced by flurbiprofen. These results suggest that flurbiprofen may increase ALDH activity and attenuate ER stress-induced aggregation of ALDH.

研究分野：薬物治療学

キーワード：ALDH 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の多くは小胞体で合成され、正しい形に折り畳まれることで正常な機能を獲得する。しかしながら、細胞が低酸素、低グルコース、有害化学物質のようなストレスに暴露されると、小胞体の機能に問題が生じて、折り畳みが不完全なタンパク質が作られる。このような状態を「小胞体ストレス」と呼び、神経変性疾患、糖尿病、肥満などの疾患の発症要因となっている (*Nature Review Mol. Cell Biol.* 2007, 8: 519-29)。現在、「小胞体ストレス」がどのようなメカニズムで惹起され、どのように制御されているかについてはよく解かっておらず、小胞体ストレス応答を効果的に制御する有効な化合物も開発されていない。そのような背景のなかで、申請者は、非ステロイド性抗炎症薬である「フルルビプロフェン」が、肥満による小胞体ストレスを軽減することで「抗肥満効果」を発揮することを見出した。その発見に至った経緯を以下に示す。

ホルモン的一种である「レプチン」は、脳に作用し、摂食抑制、エネルギー代謝亢進作用により抗肥満効果を発揮することから、レプチンは有効な抗肥満薬になり得るものと期待されていた。ところが、肥満患者にレプチンを投与しても効果が認められなかったことから、肥満の原因は、レプチンが効かない“レプチン抵抗性”であろうと推定されている (*Science* 2003, 299:856-8)。従って、レプチン抵抗性を改善する薬物は、肥満治療に有効であると考えられ、その概念に沿った抗肥満薬の開発が世界中で進められている。

申請者は、(1) 小胞体ストレスがレプチン抵抗性の原因である可能性を見出した。さらに、(2) 小胞体ストレス軽減により、レプチン抵抗性を改善する薬物として、非ステロイド性抗炎症薬であるフルルビプロフェンが利用できる可能性を示唆した。また、(3) フルルビプロフェンはアルデヒドデヒ

ドロゲナーゼ (ALDH) に直接結合していることも見出した。このように、現在までフルルビプロフェンが小胞体機能制御に重要な役割を担っている可能性を示唆してきた。しかし、フルルビプロフェンによる ALDH 活性制御機構については不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

ALDH はアルデヒドを酸化してカルボン酸に代謝する酵素である。本研究ではこのような代謝酵素が小胞体ストレス制御に関わる可能性についてフルルビプロフェンによる ALDH 活性制御機構を調べることで明らかにする。

3. 研究の方法

ALDH の活性測定:

精製したアルデヒドデヒドロゲナーゼ標品を用いてフルルビプロフェンのアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性に及ぼす影響について ALDH 活性測定キットを用いて検討した。

Insoluble fraction の調整:

細胞をシャーレに播種し、それぞれの条件で試薬処理を行い、37 でインキュベートした。その後、Lysis buffer を加え、反応を停止させ、4、15000rpm で 20min 遠心し、上清を除いた。残ったペレットを PBS で洗浄し、modified RIPA buffer を加え、sonication と shaking により可溶化し、Laemmli buffer を加えてサンプルとした。

Western blotting:

SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜上にトランスファーした。その後、メンブレンを各 1 次抗体の条件に合わせてブロッキングを行い、1 次抗体と反応させて 4 で一晩インキュベートした。TBS-T で室温 5min で 3 回洗浄した後、2 次抗体で室温で 1h インキュベートした。

TBS-Tで室温5min 3回洗浄後、ECL™ detection kitで発光させ、X線フィルムに露光して検出した。

免疫染色：

ウェルにカバーガラスを敷き、そこに細胞を播種し、それぞれの条件で刺激を行った。その後、PBSで洗浄しMeOHで固定を行った。PBSでwash後、Blockingを37で1h行なった。PBS-Tでwash後、1次抗体で一晩インキュベートした。Wash後、2次抗体で、37で1h反応させた。その後washを行い、PBS-Tで1000倍希釈したHoechst溶液を1mL滴下して室温で5min静置することで核を染色した。PBS-Tでwash後、mounting mediumを滴下しておいたスライドガラスにカバーガラスを被せ、蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) ALDH活性に及ぼす影響

フルルビプロフェンのALDH活性に及ぼす影響について検討した。その結果、ALDH活性を上昇させることが知られているAlda-1処置時と同様にフルルビプロフェンはALDH活性を上昇させることが明らかになった。従って、フルルビプロフェンはALDH活性上昇効果を有すると考えられた。

(2) 小胞体ストレスのALDH凝集に及ぼす影響

次に、小胞体ストレスのALDH凝集に及ぼす影響を解析した。検討の結果、小胞体ストレス誘起試薬(DTT; Dithiothreitol)をヒト肝癌由来細胞であるHepG2細胞に24時間処置することにより、ALDHの凝集画分への増加が観察された。さらにフルルビプロフェンをHepG2細胞に処置したところ、小胞体ストレス誘起試薬によるALDHの凝集画分への増加は抑制されることが明らかになった。従って、

フルルビプロフェンはALDHタンパク質の凝集抑制効果を有する可能性が考えられた。

(3) 小胞体ストレスによるALDHタンパク質の局在に及ぼす影響

ALDHはミトコンドリアに存在するタンパク質である。そこで小胞体ストレス誘起試薬のALDH局在変化に及ぼす影響を検討した。その結果、小胞体ストレス誘起試薬の有無にかかわらずALDHはミトコンドリアに存在することが示唆された。従って、(2)の結果と合わせると、小胞体ストレス誘起試薬によりALDHはミトコンドリアにおいて凝集し、その活性に影響を及ぼしていると考えられた。

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4件)

Thon M., Hosoi T., Chanbora C., and Ozawa K. (2017) Loss of stearyl-CoA desaturase-1 activity induced leptin resistance in neuronal cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 40: 1161-1164. doi: 10.1248/bpb.b17-00311. (査読有)

Hosoi T. and Ozawa K. (2016) Possible pharmacological approach targeting endoplasmic reticulum stress to ameliorate leptin resistance in obesity. *Frontiers in Endocrinology* 7:59. doi: 10.3389/fendo.2016.00059. (査読有)

Nakatsu K., Hosoi T., Toyoda K. and Ozawa K. (2015) Synthesis of a peptide that can translocate to the endoplasmic reticulum. *Biochemical and Biophysical Research*

Communications 460: 628-632. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.080. (査読有)

Hosoi T., Matsuzaki S., Miyahara T., Shimizu K., Hasegawa Y. and Ozawa K. (2015) Possible involvement of 15-deoxy-^{12,14}-prostaglandin J₂ in the development of leptin resistance. *Journal of Neurochemistry* 133: 343-351. doi: 10.1111/jnc.13057. (査読有)

[学会発表](計8件)

城田真輝, 細井 徹, 森 光平, 小澤孝一郎 (2018) Flurbiprofen の ALDH2 タンパク質活性に対する影響の検討, 第 133 回日本薬理学会近畿部会 広島市, 2018 年 6 月 1 日

細井 徹, 森 光平, 城田真輝, 小澤孝一郎 (2018) フルルビプロフェンによる ALDH2 活性制御機構の解明, 第 71 回日本酸化ストレス学会・第 18 回日本 N0 学会合同学術集会 京都市 2018 年 5 月 17-18 日

Hosoi T., Mori K., Kitagawa K., Ozawa K. (2016) Behavioral analysis of ALDH2 deficient mice. The 18th international symposium of society for Aldh2 knockout research-Joint symposium with 5th prenatal programming and toxicity (PPTox V)-, November 16, 2016, kitakyusyuu

森 光平, 細井 徹, 北川恭子, 小澤孝一郎 (2016) マウスにおけるアルデヒドデヒドロゲナーゼ 2 欠損による行動異常の発現, 第 55 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 2016 年 11 月 5-6 日, 岡山市

細井 徹, 小澤孝一郎 (2016) 小胞体ストレスを標的とした治療薬開発の可能性 第 89 回日本薬理学会年会 (2016 年 3 月 9-11 日), 横浜市

細井 徹, 小澤孝一郎 (2016) 中枢神経系におけるレプチン抵抗性の形成機構解明と創薬ターゲット開発戦略 第 89 回日本薬理学会年会 (2016 年 3 月 9-11 日), 横浜市

長谷川由紀, 細井 徹, 小澤孝一郎 (2015) 神経細胞レプチンシグナルへのグリア細胞の役割, 第 54 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2015 年 10 月 31-11 月 1 日, 高知市

細井 徹, 小澤孝一郎 (2015) 小胞体ストレスによるレプチン抵抗性形成機構の解明 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学大会 合同大会, (2015 年 12 月 1-4 日), 神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 孝一郎 (OZAWA, Koichiro)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・教授
研究者番号: 10211822

(2) 研究分担者

杉山 政則 (SUGIYAMA, Masanori)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・共同研究講座教授
研究者番号: 30106801

細井 徹 (HOSOI, Toru)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・准教授

研究者番号：40379889