

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390023  
 研究課題名（和文） NSAIDs によるストレス蛋白質誘導と、NSAIDs の多彩な薬理作用における役割  
 研究課題名（英文） Induction of stress proteins by NSAIDs and its role in their pharmacological activity.  
 研究代表者  
 水島 徹（MIZUSHIMA TOHRU）  
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授  
 研究者番号：00264060

## 研究成果の概要：

細胞、動物レベルで、NSAIDs による抗アルツハイマー作用へのストレス蛋白質誘導の関与を検討した。その結果、GRP78 など種々の小胞体シャペロンの発現を抑制した時、NSAIDs による抗アルツハイマー作用効果が見られなくなることを見いだした。一方、動物レベルでは、APP の過剰発現マウスを用いて、ストレス蛋白質の過剰発現の効果を調べたところ、アルツハイマー病症状が緩和されることを見いだした。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

## 研究分野：創薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：NSAIDs、アルツハイマー、ストレス蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

アスピリンに代表される非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDs）は優れた抗炎症薬であり、世界中で最もよく処方されている医薬品の一つである。NSAIDs はシクロオキシゲナーゼ（COX）という酵素の阻害剤であり、この作用により抗炎症作用を発揮する（COX 依存に合成されるプロスタグランジン（PG）は炎症増悪因子である）。一方臨床現場では、その胃潰瘍副作用（NSAIDs 潰瘍）が大きな問題になっている。1996 年米国では 16,500

人が NSAIDs 潰瘍で亡くなっており、これは全米のエイズ死亡者を上回っている。近年胃潰瘍副作用の少ない NSAIDs として COX-2 選択的 NSAIDs（COX の二つのサブタイプ（COX-1/ COX-2）のうち、COX-2 だけを阻害する NSAIDs）が開発され、世界中（日本を除く）で大変よく使用されていた。しかし昨年、COX-2 選択的 NSAIDs の服用により心筋梗塞の発症リスクが高まることが発表され（COX-1 が血液凝固促進因子の、COX-2 が血液凝固阻害因子の産生にそれぞれ関与しているため）、多くの COX-2 選択的 NSAIDs

が販売(開発)中止となった。従って、NSAIDs 潰瘍の発症機構の解明、その予防法の確立、及び COX-2 選択的 NSAIDs に代わる胃潰瘍副作用の少ない NSAIDs の開発が急務となっている。

一方疫学調査から NSAIDs の長期使用により、癌、及びアルツハイマーの発症リスクが大きく低下することが明らかになっている。実際米国では、癌の再発予防薬として一部の NSAIDs の使用が認可されている。NSAIDs はこれまで臨床で長年使用されてきたので、その副作用などが充分理解されているという利点がある。また先進国では、予防医療重視の方針が確立されつつある。そこで NSAIDs は、癌、及びアルツハイマーの予防薬として世界的に注目されており、NSAIDs の抗癌、抗アルツハイマー作用機構を解明し、これらの効果のより強い NSAIDs を開発することは大変重要である。

PG が胃粘膜保護作用(粘液産生促進、血流増加作用などによる)を持つことから、NSAIDs 潰瘍の発症は COX 阻害による PG 低下作用のみにより説明できると考えられていた。しかし最近我々は、NSAIDs が胃潰瘍を導くためには COX を阻害し胃粘膜で PG を低下させるだけでは不十分で、NSAIDs がアポトーシスを誘導し直接胃粘膜細胞を傷害する必要があることを世界で初めて証明した。またこのアポトーシス誘導作用は、NSAIDs の抗炎症作用(COX 阻害作用)とは無関係であることを示した。そこで我々は、アポトーシス誘導作用のない、かつ COX-2 に対する選択性のない NSAIDs は、胃潰瘍、及び心筋梗塞副作用の少ないより安全な NSAIDs になると考え、そのような性質を持つ NSAIDs の合成、及びその医薬品としての開発に取り組んでいる。

PG が癌増悪作用(増殖促進作用、血管新生促進作用など)及びアルツハイマー増悪作用(アミロイド(アルツハイマーの原因蛋白質)産生促進作用など)を持つことから、NSAIDs の抗癌、抗アルツハイマー作用も COX 阻害による PG 低下作用のみにより説明できると考えられていた。しかし COX 阻害作用を持たない NSAIDs の誘導体が *in vivo*、及び *in vitro* で抗癌、抗アルツハイマー作用を示すことなどから、NSAIDs の抗癌、抗アルツハイマー作用には COX 非依存のメカニズムも関与していることが最近分かってきたが、その実体は不明だった。我々は、NSAIDs 潰瘍、及び NSAIDs の抗癌、抗アルツハイマー作用に関与する COX 非依存のメカニズムの解明を目指し、DNA チップ

を用いて、NSAIDs により COX 非依存的に誘導される遺伝子を網羅的に同定した。その結果、アポトーシス誘導能を持つ転写因子 CHOP、熱ショック蛋白質(HSP)、小胞体シャペロン(GRP78 など)、ヘムオキシゲナーゼ(HO-1)など、様々なストレス蛋白質が NSAIDs により誘導されることを見出した。ストレス蛋白質はストレスによって誘導される蛋白質の総称であり、ストレス依存の細胞傷害に関与する蛋白質(後述する CHOP など)と、ストレスから細胞を保護する蛋白質(HSP、小胞体シャペロン、HO-1 など)に大別される。我々は、NSAIDs による CHOP 誘導機構を解明し、これが NSAIDs 依存のアポトーシス誘導、及び胃潰瘍の発症に重要であることを、CHOP のノックアウトマウス(細胞)を用いて証明した。

## 2. 研究の目的

本研究で我々は、より大規模な DNA チップ解析を行い、NSAIDs により誘導される新規ストレス蛋白質を同定すると共に、NSAIDs によるストレス蛋白質(CHOP 以外の HSP、小胞体シャペロン、HO-1 など)の誘導機構を明らかにする。またノックアウトマウスなどを用いてその誘導が NSAIDs の多彩な薬理作用(抗炎症作用、抗癌作用、抗アルツハイマー作用、胃潰瘍副作用)においてどのような役割を果たしているのかを明らかにする。さらに、我々が所有する NSAIDs ライブラリー(既存の NSAIDs、自ら合成した NSAIDs、及び他大学や製薬企業から入手した NSAIDs (合計 1000 種以上)からなる)を用いて、これらストレス蛋白質誘導が強い(あるいは弱い)NSAIDs を選択する。さらに、共同研究している企業から得た漢方薬ライブラリー(約 600 種)の中から、NSAIDs によるこれらストレス蛋白質誘導を促進(あるいは抑制)するものを選択する。これらの研究により、抗炎症作用、抗癌作用、抗アルツハイマー作用の強い、あるいは胃潰瘍副作用の弱い NSAIDs、及び NSAIDs の抗炎症作用、抗癌作用、抗アルツハイマー作用を増強させる漢方薬、あるいは NSAIDs の胃潰瘍副作用を減弱させる漢方薬を発見し、新しい医薬品の開発に繋げるのが本研究の最終目標である。

## 3. 研究の方法

誘導機構に関しては我々が見出している NSAIDs による細胞内カルシウム濃度の上昇、 $\beta$ カテニンの分解、MAP キナーゼの活性化(何れも COX 非依存的作用)に加え、他の研究室で見出された COX 非依存的作用が関与するのを網羅的に検討する。

#### 4. 研究成果

我々は DNA チップを用いて NSAID により誘導される遺伝子を解析するなど NSAID の作用を、最新の研究手法を用いて分子レベルで網羅的に解析した。その結果、NSAID が抗炎症タンパク質である HO-1 を誘導することが NSAID の主作用(抗炎症作用)に、NSAID が細胞膜を傷害しアポトーシスを誘導することが NSAID の副作用(胃潰瘍)に、NSAIDs が TJ 関連遺伝子を誘導することが NSAID の抗癌作用に、NSAIDs が PG を低下させ EP2,4 受容体を不活性化することが、NSAID の抗アルツハイマー病作用にそれぞれ関与することを見いだした。この内、胃潰瘍副作用に関しては、膜傷害性のない NSAIDs の合成に世界で初めて成功し、それが十分な抗炎症作用を持つにも関わらず、**胃潰瘍をほとんど起こさないことを示した**(現在、前臨床試験中)。この研究成果から**既存薬に関する網羅的解析が、副作用の少ない新薬の開発につながることを知り、より作用の強い新薬やその既存薬の別の疾患治療薬としての開発にもつながると考えている。**

これら以外の成果は既に論文として発表している。

#### 5. 主な発表論文等(全て査読あり) (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 28 件)

1. Tanaka, K., Suemasu, S., Ishihara, T., Tasaka, Y., Arai, Y. and Mizushima, T. Inhibition of both COX-1 and COX-2 and resulting decrease in the level of prostaglandins E2 is responsible for NSAID-dependent exacerbation of colitis *Eur. J. Pharmacol.* in press. 査読有
2. Takehara, M., Nishimura, T., Mima, S., Hoshino, T. and Mizushima, T. Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* in press. 査読有
3. Makise, M., Takehara, M., Kuniyasu, A., Matsui, N., Nakayama, H. and Mizushima, T. Linkage between phosphorylation of the origin recognition complex and its ATP-binding activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* in press. 査読有
4. Namba, T., Houman, T., Nishimura, T., Mima, S., Hoshino, T. and Mizushima, T. Up-regulation of S100P expression by non-steroidal anti-inflammatory drugs and its role in their anti-tumorigenic effects. *J. Biol. Chem.* in press. 査読有
5. Namba, T., Tanaka, K., Ito, Y., Ishihara, T., Hoshino, T., Gotoh, T., Endo, M., Sato, K. and Mizushima, T. Positive role of CHOP, a transcription factor involved in the ER stress response in the development of colitis. *Am. J. Pathol.* in press. 査読有
6. Ishihara, T., Tanaka, K., Tasaka, Y., Namba, T., Suzuki, J., Ishihara, T., Okamoto, S., Hibi, T., Takenaga M., Igarashi, R., Sato, K., Mizushima, Y. and Mizushima, T. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) against colitis.

- J. Pharmacol. Exp. Ther.* 328, 152-164. (2009) 査読有
7. Makise, M., Matsui, N., Yamairi, F., Takahashi, M., Takehara, M., Asano, T. and Mizushima, T. Analysis of origin recognition complex in *Saccharomyces cerevisiae*, by use of degron mutants. *J. Biochem.* 43, 455-465. (2008) 査読有
  8. Mizushima, T. Development of new type of NSAIDs with lower gastric side effects. *Inflammation and Regeneration* 28, 100-104. (2008) 査読有
  9. Matsuo T, Chen, J., Minato, Y., Ogawa, W., Mizushima, T., Kuroda, T. and Tsuchiya T. SmdAB, a heterodimeric ABC type multidrug efflux pump, in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 190, 648-654. (2008) 査読有
  10. Takehara, M., Makise, M., Takenaka, H., Asano, T. and Mizushima, T. Analysis of mutant origin recognition complex with reduced ATPase activity *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. J.* 413, 535-543. (2008) 査読有
  11. Ishihara, T., Takahashi, M., Higaki, M., Takenaga, M., Mizushima, T. and Mizushima Y. Prolonging the *in vivo* residence time of prostaglandin E(1) with biodegradable nanoparticles. *Pharm. Res.* 25, 1686-1695. (2008) 査読有
  12. Mima, S., Takehara, M., Takada, H., Nishimura, T., Hoshino, T., and Mizushima, T. NSAIDs suppress the expression of claudin-2 to promote invasion activity of cancer cells. *Carcinogenesis* 10, 1994-2000. (2008) 査読有
  13. Ushijima, H., Hiasa, M., Namba, T., Hwang, H-J., Hoshino, T., Mima, S., Tsuchiya, T., Moriyama, Y. and Mizushima, T. Expression and function of TETRAN, a new type of membrane transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 325-330. (2008) 査読有
  14. Mizushima, T. Various stress proteins protect gastric mucosal cells against non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Inflammopharmacology* 15, 67-73. (2007) 査読有
  15. Makise, M., Takahashi, N., Matsuda, K., Yamairi, F., Suzuki, K., Tsuchiya, T., and Mizushima, T. Mechanism for the degradation of origin recognition complex containing Orc5p with a defective walker A motif and its suppression by over-production of Orc4p in yeast cells. *Biochem. J.* 402, 397-403. (2007) 査読有
  16. Hoshino, T., Nakaya, T., Araki, W., Suzuki, K., Suzuki, T. and Mizushima, T. Endoplasmic reticulum chaperones inhibit the production of amyloid- $\beta$  peptides. *Biochem. J.* 402, 81-89 (2007) 査読有
  17. Namba, T., Hoshino, T., Tanaka, K., Tsutsumi, S., Ishihara, T., Mima S., Suzuki, K., Ogawa, S. and Mizushima, T. Up-regulation of 150-kDa

- oxygen-regulated protein (ORP150) by celecoxib in human gastric carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* 71, 860-870. (2007) 査読有
18. Tanaka, K., Tsutsumi, S., Arai, Y., Hoshino, T., Suzuki, K., Takai, E., Itoh, T., Takeuchi, K., Nakai, A. and Mizushima, T. Genetic evidence for a protective role of heat shock factor 1 against irritant-induced gastric lesions. *Mol. Pharmacol.* 71, 985-993. (2007) 査読有
19. Namba, T., Ishihara, T., Tanaka, K., Hoshino, T. and Mizushima, T. Transcriptional activation of ATF6 by endoplasmic reticulum stressors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 543-548. (2007) 査読有
20. Mima, S., Ushijima, H., Hwang, H-J., Tsutsumi, S., Makise, M., Yamaguchi, Y., Tsuchiya, T., Mizushima, H. and Mizushima, T. Identification of the *TPO1* gene in yeast, and its human orthologue TETRAN, which cause resistance to NSAIDs. *FEBS Lett.* 581, 1457-1463. (2007) 査読有
21. Ishihara, T., Hoshino, T., Namba, T., Tanaka, K. and Mizushima, T. Involvement of up-regulation of PUMA in non-steroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 711-717. (2007) 査読有
22. Katsu, T., Imamura, T., Komagoe, K., Masuda, K. and Mizushima, T. Simultaneous measurements of K<sup>+</sup> and calcein release from liposomes and the determination of pore size formed in the membrane. *Anal. Sci.* 23, 517-522. (2007) 査読有
23. Shahcheraghi, F., Minato, Y., Chen, J., Mizushima, T., Ogawa, W., Kuroda, T. and Tsuchiya T. Molecular cloning and characterization of a multidrug efflux pump, SmfY, from *Serratia marcescens*. *Biol Pharm Bull.* 30, 798-800. (2007) 査読有
24. Tanaka, K. Namba, T., Arai, Y., Fujimoto, M., Adachi, H., Sobue, G., Takeuchi, K., Nakai, A. and Mizushima, T. Genetic evidence for a protective role for heat shock factor 1 and heat shock protein 70 against colitis. *J. Biol. Chem.* 282, 23240-23252. (2007) 査読有
25. Asano, T., Makise, M., Takehara, M. and Mizushima, T. Interaction between ORC and Cdt1p of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 8, 1256-1262. (2007) 査読有
26. Matsuda, K., Makise, M., Sueyasu, Y., Takehara, M., Asano, T. and Mizushima, T. Yeast two-hybrid analysis of the origin recognition complex of *Saccharomyces cerevisiae*: interaction between subunits and identification of binding proteins. *FEMS Yeast Res.* 8, 1263-1269. (2007) 査読有
27. Hoshino, T., Nakaya, T., Homan, T., Sugimoto, Y., Araki, W., Narita, M., Narumiya, S., Suzuki, T. and Mizushima, T. Involvement of

- prostaglandin E<sub>2</sub> in production of amyloid- $\beta$  peptides both *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 282, 32676-32688. (2007) 査読有
28. Matsuo, T., Hayashi, K., Morita, Y., Koterawasa, M., Ogawa, W., Mizushima, T., Tsuchiya, T. and Kuroda, T. VmeAB, an RND-type multidrug efflux transporter in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology* 153, 4129-4137. (2007) 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

- |  |  |
|--|--|
| <p>1 水島徹 医薬品開発の新しい流れ--既存薬の研究から新薬へ--第 2 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (2008.12.21) (京都)</p> <p>2 水島徹 温故知新創薬研究 第二回熊本創薬シンポジウム (2008.12.18) (熊本)</p> <p>3 水島徹 トランスクリプトソーム解析による医薬品の副作用機構の解明と、その副作用感受性診断、及び創薬への応用 創薬バイオマーカー探索研究事業研究発表会 (2008.11.6) (東京)</p> <p>4 水島徹 私が受け継ぐ医薬品開発研究--リポ剤の次に来るもの--日本 DDS 学会 (2008.10.6) (東京)</p> <p>5 水島徹 HSF1、及び HSPs の遺伝子改変マウスを用いた、胃潰瘍、及び炎症性腸疾患に対する生体防御機構研究 日本薬学会関東支部会 (2008.10.4) (千葉)</p> <p>6 水島徹 NSAIDs 潰瘍発症の分子機構 日本潰瘍学会 (2008.9.23) (札幌)</p> | <p>7 水島徹 副作用の少ない非ステロイド系抗炎症薬の開発 日本薬学会シンポジウム (2008.3.30) (東京)</p> <p>8 水島徹 HSF1 ノックアウトマウスの、胃潰瘍、炎症性腸疾患感受性 日本薬理学会シンポジウム (2008.3.4) (東京)</p> <p>9 水島徹 副作用の少ない NSAIDs の開発 物理化学、有機化学、生化学、薬理学など、薬学の総合力を活かした創薬 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 特別企画 (2007.11.10) (仙台)</p> <p>10 水島徹 非ステロイド系抗炎症薬による胃潰瘍発症機構と HSP 誘導薬による胃粘膜保護 九州山口薬学大会 (2007.11.2) (熊本)</p> <p>11 水島徹 胃潰瘍、炎症性腸疾患に対する HSP の保護効果 日本潰瘍学会 (2007.9.21) (鳥取)</p> <p>12 水島徹 副作用の少ない非ステロイド系抗炎症薬の開発 日本炎症・再生学会シンポジウム (2007.8.4) (東京)</p> <p>13 水島徹 胃潰瘍、炎症性腸疾患に対する HSP の保護効果 日本フリーラジカル学会 (2007.5.3) (名古屋)</p> <p>6. 研究組織<br/>         (1)研究代表者<br/>         水島 徹 (MIZUSHIMA TOHRU)<br/>         熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授、<br/>         研究者番号：00264060</p> <p>(2)研究分担者<br/>         なし</p> <p>(3)連携研究者<br/>         なし</p> |
|--|--|