

平成21年 5月 29日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19890238
 研究課題名（和文）HRD1による細胞死メカニズムの解明

研究課題名（英文）Regulation of cell death by HRD1

研究代表者 伊藤 友香 愛知学院大学・薬学部・助教 40454326

研究成果の概要：

RA患者由来滑膜細胞株 MH7A を糖鎖付加阻害剤のツニカマイシン（Tun）あるいは Ca^{2+} -ATPase 阻害剤のタブシガルギン（Tg）で刺激を行い、小胞体ストレスによる細胞死について検討した。両刺激とも濃度依存的に細胞死を誘導し、Caspase-9、Caspase-3の活性化を惹起した。HRD1高発現細胞株では、野生型と比較して Tun による細胞死は減少したが Tg による細胞死は増加した。HRD1高発現細胞株は Tg 誘導性 Bim 発現上昇に対して影響を与えなかったことから、Bim 発現制御以外の機構で細胞死を制御していると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,170,000	351,000	1,521,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,490,000	351,000	2,841,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：医歯薬学・生物系薬学

キーワード：細胞死、ストレス、カルシウムイオン、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

生物はその恒常性維持の一つとして、巧みに細胞の増殖とアポトーシスを制御している。この増殖とアポトーシスのバランスが壊れ、増殖が止まることなく繰り返されると癌に、アポトーシスが異常亢進すると神経変性疾患などが引き起こされることが知られている。自己免疫疾患である関節リウマチ(RA)や、全身性エリテマトーデス(SLE)、多発性硬化症(MS)などの疾患においてもアポト

シスの制御破たんがその発症、増悪に関与すると考えられている。

RA罹患関節にはサイトカインを始めとする様々な炎症性メディエーターが存在し、RAの病態形成に重要な役割を果たしている。これは腫瘍壊死因子 α (TNF α)やインターロイキン1(IL-1)を標的とした生物学的製剤が治療に有効であることから推察される。しかしながら、免疫抑制剤や抗サイトカイン療法によってもRAの進行を抑制できない症例

が約 25%存在することから、RA を炎症反応の異常のみでなく、滑膜細胞の細胞学的異常として捉える重要性が新たに注目されている。組織学的に RA 罹患関節では、滑膜細胞は異常増殖し、炎症性細胞（好中球、マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞など）の浸潤したパンススと呼ばれる肉芽組織が形成され、パンススが骨・軟骨を破壊している像が観察される。

これまでに RA 患者由来滑膜細胞を女性ホルモンの一つである β -エストラジオールで刺激することにより、関節滑膜の増殖への関与が示唆されているタンパク質 synoviolin のタンパク発現誘導、転写活性の促進が引き起こされることを明らかにしている。

synoviolin は小胞体ストレス時に誘導される HRD1 と同一の分子である。HRD1 は小胞体膜上に存在するタンパク質であり、小胞体ストレス時に異常構造を持つタンパク質を分解する経路（endoplasmic reticulum associated degradation: ERAD）に関与し、細胞の受けるストレスを軽減することが知られている。そして ERAD によってもストレス状態が改善されないとき細胞はアポトーシスを引き起こすと考えられており、小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおいて重要な役割を果たしていることが知られている。

これまでに HRD1 トランスジェニックマウスは関節炎を自然発症し、逆に HRD1 ヘテロノックアウトマウスはコラーゲン誘導関節炎（CIA）において滑膜細胞のアポトーシスが亢進し、関節炎に抵抗性を示すこと（Amano et al., *Genes Dev.* 2003）、HRD1 は神経細胞をアポトーシスから保護する働きを持つことが報告されている（Omura et al., *J Neurochem.* 2006）。また、神経変性疾患の原因である異常タンパク質の蓄積、ニューロン変性脱落には、小胞体におけるカルシウム恒常性の障害によって惹起される小胞体ストレスが関与しているとする可能性が示唆されている。しかし、HRD1 がアポトーシスを抑制するメカニズム、あるいは滑膜細胞における小胞体のカルシウム恒常性の破たんによる機能変化についてはほとんど明らかとされていない。

2. 研究の目的

(1) RA 罹患滑膜における小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおいて HRD1 がどのように作用するのか明らかとし、そのメカニズムを解明することを目的とした。

(2) 細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離を惹起する、生理活性を持つスフィンゴ脂質を用いて細胞内カルシウム濃度変化が滑膜細胞増殖に与える影響について検討し、RA 患者における脂質代謝異常と滑膜細胞病変との関連の一端を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 滑膜細胞における HRD1 による細胞死メカニズムの解明

MH7A 細胞 (RA 患者由来滑膜細胞株) は、10% 非働化 FBS を含む RPMI1640 に 100 units/ml ペニシリン G、100 mg/ml ストレプトマイシンを加えた培地で培養した。MH7A を用いて HRD1 高発現安定株を作製し、細胞の生存率についてクリスタルバイオレット染色により検討を行った。また、アポトーシス関連分子の発現をウェスタンブロットにより検討した。

(2) 生理活性を持つスフィンゴ脂質による関節リウマチ滑膜細胞死の制御

生理活性を持つスフィンゴ脂質であるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) あるいはスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) による滑膜細胞生存率の変化についてクリスタルバイオレット染色により検討を行った。S1P あるいは SPC による細胞内カルシウム濃度変化については、蛍光指示薬として fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2 AM) を使用し、細胞内色素を 340 nm 及び 380 nm の励起光で励起させ、放出された 510nm の各々の蛍光を高感度カメラで取得し、その蛍光強度比を算出した。

MH7A 細胞における S1P 受容体の発現は、RT-PCR 法あるいは各受容体の阻害剤を用いた検討により確認した。アポトーシスについては Hoechst33342 による核の染色、Caspase 阻害剤 ZVAD-FMK による細胞死の減少、Caspase の基質である PARP の分解を指標に検討した。

4. 研究成果

(1) 滑膜細胞における HRD1 による細胞死メカニズムの解明

RA 患者由来滑膜細胞株 MH7A を糖鎖付加阻害剤のツニカマイシン (Tun) あるいは Ca^{2+} -ATPase 阻害剤のタプシガルギン (Tg) で刺激を行い、小胞体ストレスによる細胞死について検討した。Tg 刺激では、1 nM から 1 μ M の範囲において濃度依存的な細胞死が誘導された。Tun 刺激 10 ng/ml から 1 μ g/ml の範囲で濃度依存的な細胞死が誘導された。Tun による小胞体ストレスの誘導について CHOP/GADD153 タンパク質の発現上昇により確認した。

各刺激による Caspase 活性について検討を行った。Tg 10 nM、100 nM 刺激により、Caspase-9 の Asp315 の切断が確認できた。Caspase-3 の切断についても Tg 10 nM、100 nM 刺激で確認できたが、100 nM 刺激でより強いシグナルが観察できた。一方、Tun 100 nM 刺激において、弱いながらも Caspase-9 の Asp315 切断、Caspase-3 の切断が確認できた。

また、TNF α 10 U/ml の刺激では Caspase-3 の切断は確認できたが、Caspase-9 の Asp315 切断は認められなかった。これは、Caspase-9 の Asp315 の切断は、ミトコンドリアからのシトクロム c 漏出を介して引き起こされる現象であり、TNF α などの受容体を介したアポトーシスとは経路が異なるためだと考えられる。

小胞体ストレスによる細胞死への HRD1 の影響について検討するため、HRD1 を高発現する安定株 (MH7A-HRD1) を作製した。MH7A-HRD1 細胞において 100 ng/ml Tun による細胞生存率は、野生型と比較して約 2 倍に上昇した。一方 1 μ M Tg 処理をした場合、MH7A-HRD1 細胞の細胞生存率は野生型より約 25% 減少した。

近年、小胞体ストレス誘導性アポトーシスには、アポトーシスを促進する BH3 因子 Bim タンパクの発現上昇が関与すると報告された (Puthalakath et al., *Cell* 2008)。そこで、HRD1 による Tg 誘導性細胞死の増強に Bim 発現が関与しているの検討した。Tg 10 nM を 24 時間刺激することにより、MH7A において Bim タンパク発現の上昇が認められた。HRD1 を過剰発現させた場合においても Tg 処理により、HRD1 を発現させない場合と同程度の Bim 発現上昇が確認できた。また、HRD1 過剰発現のみで Bim タンパク発現が上昇するような傾向がみられた。このことから、Bim は Tg 誘導性アポトーシスに関与している可能性が示唆されたが、HRD1 による Tg 誘導性細胞死には Bim 発現上昇は関与していないと考えられる。

以上の結果から、HRD1 は RA 罹患関節滑膜において、糖鎖付加阻害、小胞体カルシウムイオンの枯渇により誘導される細胞死に関与しており、異なる働きをしていることが示唆された。また、滑膜細胞に小胞体ストレスを誘導することにより、Caspase-9、Caspase-3 の切断、Bim 発現上昇が引き起こされることが明らかとなった。Caspase-9 の Asp315 切断はミトコンドリアからのシトクロム c 漏出によって引き起こされることから、今回の結果は小胞体ストレス誘導性アポトーシスがミトコンドリアの機能障害と関連していることを示唆している。HRD1 は ER ストレス誘導性 Bim 発現上昇に対しては影響を与えなかったことから、何か別の機構で細胞死を制御していると考えられ、今後さらなる検討が必要である。

(2) 生理活性を持つスフィンゴ脂質による関節リウマチ滑膜細胞死の制御

スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) は、生理活性を持つスフィンゴ脂質であり、生体内において、細胞増殖・分化、アポトーシス、遊走など多彩な作用を示すことが知ら

れている。SPC は、Niemann-Pick 病患者の脳、脾臓、肝臓あるいはアトピー性皮膚炎の炎症部位において蓄積が認められ、病態形成に関与していると推察される。

SPC は 3T3 線維芽細胞において強力な細胞分裂促進物質として発見された。その後内皮細胞やケラチノサイト、血管平滑筋細胞において細胞増殖を誘導することが明らかになった。しかし一方で、膵臓や卵巣癌、乳癌においては増殖を阻害することも知られている。炎症反応においては、SPC は腎メサンギウム細胞において TGF β のシグナル伝達分子である Smad2、Smad4 をリン酸化し炎症を抑制すること、またマウスミクログリア細胞においては IL-1 β 分泌を促進して炎症を増強させる可能性が報告されており、組織あるいは細胞状態によって異なる反応を示すと考えられる。

まず、MH7A 細胞が SPC に反応するか検討するため、Fura-2 AM を細胞に負荷し細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変化について蛍光強度の変化を指標に測定を行ったところ、MH7A を 0.1 から 3 μ M SPC で刺激すると濃度依存的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が観察され、その 50% 有効濃度は約 0.3 μ M であった。また、細胞外液 Ca^{2+} を除いても SPC による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が確認できたことから、SPC は細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離を引き起こすことが明らかとなった。一方、生理活性を持つスフィンゴ脂質である S1P においても同様に検討したところ、10 nM から 300 nM の S1P 刺激により濃度依存的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が観察されその 50% 有効濃度は約 40 nM であった。細胞外液 Ca^{2+} を除いても、SPC と同様に S1P による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が確認できた。RT-PCR 法あるいは阻害剤を用いた結果から、MH7A 細胞において S1P $_1$ 、S1P $_2$ 、S1P $_3$ 受容体が発現しており、S1P $_2$ 、S1P $_3$ 受容体が $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に関与していることが明らかになった。

次に、細胞生存率について検討したところ、血清非存在下 3 μ M SPC を 48 時間刺激することにより細胞生存率は約 50% 減少したが、S1P 刺激では細胞死は誘導されなかった。また、SPC による細胞死は Caspase 阻害薬 ZVAD-FMK の共存により一部抑制されたことから、SPC 誘導性細胞死の一部は Caspase の活性化を介していると考えられた。SPC 刺激により Caspase の基質であるポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) の分解と核の断片化が誘導された。以上の結果から、MH7A には Gq タンパク共役型 SPC 受容体が存在する可能性が高いこと、高濃度 SPC 刺激は Caspase を活性化し、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。この SPC 誘導性アポトーシスに対して、細胞外カルシウムイオンの関与はみられなかった。以前に報告されたヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) での SPC

誘導性アポトーシスの経路に関与する ROS についても、SPC による滑膜細胞死には関与する可能性は低いことが ROS 阻害剤を用いた検討から明らかとなり、これまでに報告のない新規の経路で SPC はアポトーシスを惹起する可能性が示唆された。

今回の結果から、RA 患者由来滑膜細胞株 MH7A において SPC により $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が誘導され、この SPC 誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇には細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離が関与していることが明らかとなった。また、この結果は Gq タンパク共役型 SPC 受容体の関与を示唆するものであり、SPC がその受容体を介して関節滑膜において何らかの機能を担っている可能性もあり、SPC 受容体作用薬、あるいは拮抗薬が RA 治療に有効となる可能性もある。

SPC は、S1P と同様血液中に豊富に存在しているが一部は high-density lipoproteins (HDL) により輸送されることが報告されている。RA 罹患患者において動脈硬化あるいは血栓症による心血管病変の合併が多いことが知られていることから、SPC を含む脂質代謝異常が RA の病態形成に対しても何らかの影響を与えているかもしれない。

SPC による炎症あるいは細胞死への関与については、現在までにいくつかの報告がされているが細胞種によりその反応は異なると考えられる。今後、受容体が同定されることによって受容体の発現組織やシグナル伝達機構のより詳細な解析が可能となり、治療薬としての応用も期待される。

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 5 件)

1 から 5 すべて査読論文

1. Itoh Y, Hatano N, and Muraki K.
Regulation of vascular tone by purinoceptor-activation in vascular smooth muscle and endothelial cells
The Aichi Gakuin Journal of Pharmaceutical Sciences **1** (2008) 31-37
2. Tanaka R, Muraki K, Ohya S, Yamamura H, Hatano N, Itoh Y, and Imaizumi Y.
TRPV4-Like Non-selective Cation Currents in Cultured Aortic Myocytes
Journal of Pharmacological Sciences **108** (2008) 179-189

3. Tanaka R, Muraki K, Ohya S, Itoh Y, Hatano N, and Imaizumi Y.
Cell-culture-dependent change of Ca^{2+} response of rat aortic myocytes to sphingosine-1-phosphate
Journal of Pharmacological Sciences **107** (2008) 434-442
4. Shizu M, Itoh Y, Sunahara R, Chujo S, Hayashi H, Ide Y, Takii T, Koshiko M, Chung SW, Hayakawa K, Miyazawa K, Hirose K, and Onozaki K.
Cigarette smoke condensate upregulates the gene and protein expression of proinflammatory cytokines in human fibroblast-like synoviocyte line
Journal of Interferon and Cytokine Reserch **28** (2008) 509-521
5. 伊藤友香
 H_2O_2 は cGMP 非依存的に PKG を活性化して平滑筋弛緩反応を惹起する
ファルマシア **44** (2008) 568-569

[学会発表] (計 1 件)

伊藤友香

スフィンゴシルホスホリルコリンによる関節リウマチ滑膜細胞死の制御
日本薬学会第 129 年会 2009 年 3 月 27 日(京都)

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 友香
愛知学院大学・薬学部・助教
40454326

(2)研究分担者

(3)連携研究者