

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670270

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答シグナル制御による封入体筋炎治療法の開発

研究課題名(英文)Therapeutic development for Inclusion Body Myositis targeting endoplasmic reticulum stress response

研究代表者

親泊 政一(OYADOMARI, Seiichi)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・教授

研究者番号：90502534

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、約4000化合物の探索をハイスループットスクリーニング法で実施し、小胞体ストレス応答の一つであるPEKR経路を活性化できる化合物を同定した。同定した化合物は、細胞レベルでATF4誘導効果などを確認できたが、in vivoでの効果では細胞で認めたような効果は認められなかった。原因として、同定した化合物の溶解度が極めて低いために、個体レベルでのドラッグデリバリーに問題があることが考えられる。今後は同定した化合物の分子構造修飾による溶解度による吸収改善が必要であるが、同定した化合物は既知のPERK経路の制御剤とは異なる母核を持つことから、今後の開発に向けて特許申請を準備している。

研究成果の概要(英文): Inclusion Body Myositis is suggested to associate with endoplasmic reticulum stress. In this study, approximately 4000 compounds have been searched through the cell-based high-throughput assay we developed. We identified the compound which could activate the PERK signaling pathway. The identified compound was able to induce ATF4, which is biomarker of PERK signaling activation, in cultured cells but not in mice. This incompatibility could be due to poor drug delivery in vivo, as the compound had extremely poor solubility. Although it is necessary to improve the compound solubility through structural, the identified compound has a unique core structure compared with other known PERK signaling modifiers

研究分野：疾患ゲノム機能学

キーワード：小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

封入体筋炎の発症メカニズムは明らかになっていないが、封入体にアミロイド前駆タンパク質が存在することから、小胞体ストレスが発症に関連するアルツハイマー病との相同性が指摘されている。研究代表者は、これまで小胞体ストレス応答が生体機能調節に必須で、その破綻は疾患発症において先導的な研究を展開してきた。また、小胞体ストレス応答を標的とした化合物スクリーニング法を開発して特許出願済：特願 2011-023697、PCT/JP2012/052650)、パイロットスクリーニングで 3000 化合物から eIF2 リン酸化させる化合物を複数見出している。本研究において、より活性の高い化合物を探索すること、また eIF2 リン酸化シグナルの活性化は骨格筋の機能回復させる新たな治療法となるという仮説の実証を目指す。

2. 研究の目的

封入体筋炎は、治療抵抗性で高齢化と共に増加している重要な疾患である。その原因は不明であるが、封入体でのアミロイド前駆タンパク質の存在から、小胞体ストレスが発症に関連するアルツハイマー病との相同性が指摘されている。研究代表者は、骨格筋で小胞体ストレス応答シグナルである eIF2 のリン酸化が、アミノ酸代謝を活性化し、遅筋繊維を増加させることを見出した。本研究では、骨格筋での eIF2 リン酸化シグナルの制御による封入対筋炎の新たな治療法の基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1)eIF2 リン酸化シグナル活性化による封入体筋炎治療法が可能か否かを、eIF2 リン酸化を制御できる遺伝子改変マウス(未発表)を用いた封入体筋炎モデルでの筋機能の改善効果で検証する。
(2)遺伝子改変のみならず、実際の治療に応用できる創薬リードとなる化合物の探索を申請者が開発したハイスループットスクリーニング法(特許出願済：特願2011-023697、PCT/JP2012/052650)で行い、その効果を封入体筋炎モデルで実証する。

4. 研究成果

本研究は、研究代表者が発見した eIF2 リン酸化シグナルによる骨格筋の機能変化を基に、治療抵抗性で高齢化と共に増加している封入体筋炎の低分子化合物による新たな治療法開発を目的とした。封入体筋炎の原因は不明な点が多いが、封入体に折りたたみ障害が受けるアミロイド前駆タンパク質が存在することから、小胞体ストレスとの関連が示唆された。小胞体ストレスに対して細胞は小胞体ストレス応答により適応を図ることから、小胞体ストレス応答を活

性化できる低分子化合物の探索を行った。前年度までに確立しているハイスループットスクリーニング法により、約 4000 化合物からなる化合物ライブラリーからの探索を実施した。そして小胞体ストレス応答の一つである PEKR 経路を活性化できる化合物を同定することができた。同定した化合物は、細胞レベルで筋芽細胞である C2C12 細胞でも ATF4 誘導効果などをウェスタンブロットなどで確認することができた。マウスを用いて in vivo での効果についても検討を行ったが、細胞で認めたような効果は残念ながら認められなかった。その原因として、同定した化合物の溶解度が極めて低いために、個体レベルでのドラッグデリバリーに問題があることが考えられた。そのため今後、同定した化合物の分子構造修飾による溶解度による吸収改善が必要である。しかしながら、同定した化合物は既知の PERK 経路の制御剤とは異なる母核を持つことから、今後の開発に向けて現在特許申請を準備している。

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 9 件)

1. Lu W, Hagiwara D, Morishita Y, Tochiya M, Azuma Y, Suga H, Goto M, Banno R, Sugimura Y, Oyadomari S, Mori K, Arima H Unfolded protein response in hypothalamic cultures of wild-type and ATF6 -knockout mice. *Neurotic Lett.* 査読有, 612, 2016, 199-203 DOI:10.1016/j.neulet.2015.12.031
2. Miyake M, Nomura A, Ogura A, Takehana K, Kitahara Y, Takahara K, Tsugawa K, Miyamoto C, Miura N, Sato R, Kurahashi K, Harding HP, Oyadomari M, Ron D, Oyadomari S Skeletal muscle-specific eukaryotic translation initiation factor 2 phosphorylation controls amino acid metabolism and fibroblast growth factor 21-mediated non-cell-autonomous energy metabolism *FASEB J.* 査読有, 30, 2016, 798-812, DOI : 10.1096/fj.15-275990
3. Kozuka C, Sunagawa S, Ueda R, Higa M, Tanaka H, Shimizu-Okabe C, Ishiuchi S, Takayama C, Matsushita M, Tsutsui M, Miyazaki JI, Oyadomari S, Shimabukuro M, Masuzaki H Gamma-oryzanol protects pancreatic -cells against endoplasmic reticulum stress in male mice.

- Endocrinology , 査読有, 156, 2015
1242-1250, DOI : 10.1210/en.2014-1748
4. Kozuka C, Sunagawa S, Ueda R, Higa M, Ohshiro Y, Tanaka H, Shimizu-Okabe C, Takayama C, Matsushita M, Tsutsui M, Ishiuchi S, Nakata M, Yada T, Miyazaki JI, Oyadomari S, Shimabukuro M, Masuzaki H
A novel insulinotropic mechanism of whole grain-derived -oryzanol via the suppression of local dopamine D2 receptor signalling in mouse islet
Br J Pharmacol. 査読有, 172, 4519-4534, 2015 DOI : 10.1111/bph.13236
 5. Shikama Y, Aki N, Hata A, Nishimura M, Oyadomari S, Funaki M
Palmitate-stimulated monocytes induce adhesion molecule expression in endothelial cells via IL-1 signaling pathway
J Cell Physiol 査読有, 230, 2015, 732-742
Doi: 10.1002/jcp.24797
 6. Azuma Y, Hagiwara D, Lu W, Suga H, Goto M, Banno R, Sugimura Y, Oyadomari S, Mori K, Shiota A, Asai N, Takahashi M, Oiso Y, Arima H
Activating Transcription Factor 6 Is Required for the Vasopressin Neuron System to Maintain Water Balance under Dehydration in Male Mice.
Endocrinology 査読有, 155, 2014, 4905-4914 Doi: 10.1210/en.2014-1522. Epub 2014 Sep 9.
 7. Handa K, Inukai K, Onuma H, Kudo A, Nakagawa F, Tsugawa K, Kitahara A, Moriya R, Takahashi K, Sumitani Y, Hosaka T, Kawakami H, Oyadomari S, Ishida H
Long-term low carbohydrate diet leads to deleterious metabolic manifestations in diabetic mice.
PLoS One 9, 査読有, 2014 29;9(8):e104948.
Doi: 10.1371/journal.pone.0104948.
 8. Yasue A, Mitsui SN, Watanabe T, Sakuma T, Oyadomari S, Yamamoto T, Noji S, Mito T, Tanaka E
Highly efficient targeted mutagenesis in one-cell mouse embryos mediated by the TALEN and CRISPR/Cas systems.
Sci Rep 査読有, 2014 4, 5705
Doi: 10.1038/srep05705
 9. Uehara Y, Hirose J, Yamabe S, Okamoto N, Okada T, Oyadomari S, Mizuta H
Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis contributes to articular cartilage degeneration via C/EBP homologous protein.
Osteoarthritis Cartilage 査読有, 2014 22, 1007-1017 Doi: 10.1016/j.joca.2014.04.025
- [学会発表](計 27 件)
1. 三宅雅人, 倉橋清衛, 森 智子, 宮本千伸, 津川和江, 三浦恭子, 北原吉朗, 親泊政一
小胞体ストレスを減弱させ膜 細胞でのインスリン合成を促進する新規化合物の同定
第 27 回分子糖尿病学シンポジウム
2015/12/5 丸ビルホール&コンファレンススクエア(東京都・千代田区)
 2. 谷内秀輔, 三宅雅人, 津川和江, 親泊美帆, 親泊政一
CRISPR/Cas9 システムを用いた統合的ストレス応答を制御する eIF2 キナーゼの検証
BMB2015(第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会年会合同大会) 2015/12/3
神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)
 3. 山川哲生, 小倉 淳, 三宅雅人, 宮本千伸, 津川和江, 親泊美帆, 親泊政一
PERK 経路の下流因子によって制御される癌細胞増殖機構について
BMB2015(第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会年会合同大会) 2015/12/2
神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)
 4. 張 君, 三宅雅人, 倉橋清衛, 津川和江, 宮本千伸, 親泊美帆, 親泊政一
CRISPR/Cas9 を用いた小胞体ストレス応答伝達タンパク質の検証
BMB2015(第 38 回分子生物学会年会第 88 回生化学会年会合同大会) 2015/12/2
神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)
 5. 三宅雅人, 張 君, 志内哲也, 倉橋清衛, 宮本千伸, 津川和江, 親泊美帆, 親泊政一
小胞体ストレスなどで活性化される eIF2 リン酸化シグナルによる摂食調節を介した肥満抑制作用
BMB2015(第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会年会合同大会) 2015/12/2 神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)
 6. 谷内秀輔, 三宅雅人, 津川和江, 親泊美帆, 親泊政一
CRISPR/Cas9 を用いた統合的ストレス応答に關与する eIF2 キナーゼの解析
第 10 回小胞体ストレス研究会 2015/11/29
淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市)

7. 森本雅俊, 久永 哲, 張 君, 谷内秀輔, 山川哲生, 三宅雅人, 西良浩一, 親泊政一
ATF6 の骨形成における役割
第 10 回小胞体ストレス研究会 2015/11/29
淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県・淡路市)
8. 三宅雅人, 高原一菜, 森本 雅俊, 倉橋清衛, 親泊政一
ATF6 の肥満・糖尿病における役割
第 10 回小胞体ストレス研究会 2015/11/29
淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県・淡路市)
9. 三宅雅人, 倉橋清衛, 森智子, 宮本千伸, 津川和江, 三浦恭子, 北原吉朗, 親泊美帆, 親泊政一
小胞体ストレスを標的とした膵 細胞でのインスリン合成を促進する新規化合物の同定
第 10 回臨床ストレス応答学会大会
2015/11/6 東京農工大学(東京都・小金井市)
10. KIYOE KURAHASHI, TOMOKO MORI, CHINOBU MIYAMOTO, KAZUE TSUGAWA, MIHO OYADOMARI, KAZUNA TAKAHARA, CHIZUKO KIMURA, MASATO MIYAKE, TOSHIO MATSUMOTO, SEIICHI OYADOMARI
Saturated Fatty Acids Predominantly Activate PERK Pathway via Altered Composition of the Endoplasmic Reticulum Membrane, and Reduce Insulin Secretion in Pancreatic Cell by Translation Attenuation
75th ADA Scientific Sessions
2015/6/7 Boston(USA)
11. 三宅雅人, 張 君, 倉橋清衛, 宮本千伸, 津川和江, 親泊美帆, 親泊政一
小胞体ストレスなどで活性化される eIF2 リン酸化シグナルによる摂食調節を介した肥満抑制作用
第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会
2015/5/21 海峡メッセ下関 (山口県・下関市)
12. 倉橋清衛, 森智子, 宮本千伸, 津川和江, 三浦直子, 親泊美帆, 野村明利, 高原一菜, 佐藤亮祐, 山下裕紀子, 木村千寿子, 三宅雅人, 松本俊夫, 親泊政一
膵 細胞での脂肪毒性における小胞体ストレス応答の役割の解明
第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 2015/5/21
海峡メッセ下関 (山口県・下関市)
13. 倉橋清衛, 森智子, 宮本千伸, 津川和江, 親泊美帆, 高原一菜, 佐藤亮祐, 木村千寿子, 三宅雅人, 松本俊夫, 親泊政一
飽和脂肪酸は膵 細胞の小胞体膜の組成を変化させ、PERK 経路の活性化による翻訳抑制を介してインスリン分泌を低下させる
第 26 回分子糖尿病学シンポジウム 2014/12/06
高知市文化プラザかるぼーと(高知県・高知市)
14. 三宅雅人, 倉橋清衛, 張 君, 津川和江, 宮本千伸, 親泊美帆, 親泊政一
肥満に伴う脂肪組織での慢性炎症の増悪プロセスへの小胞体ストレス応答経路の関与
第 37 回日本分子生物学会年会 2014/11/26
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
15. 倉橋清衛, 森智子, 宮本千伸, 津川和江, 親泊美帆, 高原一菜, 佐藤亮祐, 木村千寿子, 三宅雅人, 松本俊夫, 親泊政一
飽和脂肪酸は膵 細胞の小胞体膜の組成を変化させ、PERK 経路の活性化による翻訳抑制を介してインスリン分泌を低下させる
第 9 回臨床ストレス応答学会大会
2014/11/01 岡山大学 (岡山県・岡山市)
16. 張 君, 三宅雅人, 津川和江, 親泊政一
CRISPR/Cas9 を用いた小胞体ストレス応答伝達タンパク質の検証
第 9 回臨床ストレス応答学会大会
2014/11/01 岡山大学 (岡山県・岡山市)
17. 谷内秀輔, 三宅雅人, 津川和江, 親泊政一
Integrated Stress Response を担う第 5 の eIF2 キナーゼが存在する可能性の CRISPR/Cas9 のシステムを用いた検証
第 9 回臨床ストレス応答学会大会
2014/11/01 岡山大学 (岡山県・岡山市)
18. 親泊政一
小胞体ストレス応答ネットワーク : 細胞シグナルクロストークの新展開
第 87 回 日本生化学会大会 2014/10/17
国立京都国際会館 (京都府・京都市)
19. 張 君, 三宅雅人, 親泊政一
ゲノム編集技術を用いた小胞体ストレス応答の解析
第 9 回小胞体ストレス研究会
2014/7/4 徳島大学 (徳島県・徳島市)
20. 谷内秀輔, 三宅雅人, 親泊政一
ゲノム編集技術を用いた Integrated Stress Response (ISR) の解析
第 9 回小胞体ストレス研究会
2014/7/4 徳島大学 (徳島県・徳島市)
21. 倉橋清衛, 森智子, 宮本千伸, 津川和江, 親泊美帆, 高原一菜, 佐藤亮祐, 木村千寿子, 三宅雅人, 松本俊夫, 親泊政一

飽和脂肪酸による膵細胞の小胞体膜の組成変化は、PERK 経路活性化を遷延させ翻訳抑制を介してインスリン分泌を低下させる第 9 回小胞体ストレス研究会
2014/7/4 徳島大学(徳島県・徳島市)

22. 佐藤亮祐, 三宅雅人, 松尾 顕, 張 君, 谷内秀輔, 倉橋清衛, 久永 哲, 西良 浩一, 親泊政一
軟骨分化における ATF6 の役割
第 9 回小胞体ストレス研究会
2014/7/4 徳島大学(徳島県・徳島市)

23. 三宅雅人, 倉橋清衛, 森智子, 宮本千伸, 津川和江, 三浦恭子, 北原吉朗, 親泊美帆, 親泊政一
小胞体ストレス応答を制御する新規化合物によるインスリン生合成の促進
第 9 回小胞体ストレス研究会
2014/7/4 徳島大学(徳島県・徳島市)

24. 親泊政一
小胞体ストレス応答による生体機能調節
日本睡眠学会第 39 回定期学術集会
2014/7/3
ホテルクレメント徳島(徳島県・徳島市)

25. Masato Miyake, Kiyoe Kurahashi, Seiichi Oyadomari
Identification and Characterization of a Small -molecule Inducer of ATF4 for Promoting Insulin Synthesis in Pancreatic cells
74th ADA Scientific Sessions
2014/6/15 San Francisco(USA)

26. 親泊美帆, 三宅雅人, 森智子, 倉橋清衛, 宮本千伸, 津川和江, 三浦恭子, 北原吉朗, 親泊政一
小胞体ストレス応答を標的としたインスリン生合成を改善する新規化合物の同定
第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会
2014/5/23 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

27. 倉橋清衛, 森智子, 宮本千伸, 津川和江, 三浦直子, 親泊美帆, 野村明利, 高原一葉, 佐藤亮祐, 山下裕紀子, 木村千寿子, 三宅雅人, 松本俊夫, 親泊政一
飽和脂肪酸は膵細胞の小胞体膜の組成を変化させ、PERK 経路の活性化による翻訳抑制を介してインスリン分泌を低下させる
第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会
2014/5/22 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

[図書](計 1 件)

親泊政一, 三宅雅人 日本臨牀社

日本臨牀 増刊号 74 巻 増刊号 1 2016 年
671 (179-183)

6. 研究組織

(1)研究代表者

親泊 政一 (OYADOMRI, Seiichi)
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター
・教授
研究者番号: 90502534

(3)連携研究者

梶 龍兒 (KAJI, Ryuji)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 00214304

坂下 直実 (SAKASHITA, Naomi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 90284752