

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 14 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010-2011

課題番号：22500282

研究課題名（和文）熱ショック蛋白質を誘導して脳を保護する創製分子の研究

研究課題名（英文）Neuroprotective Compounds through Induction of Heat Shock Proteins

研究代表者

佐藤 拓己(SATOH TAKUMI)

岩手大学・工学部・准教授

研究者番号：10300831

研究成果の概要（和文）：

パラヒドロキノン骨格を持つ新規創製分子 D1 (23 年度に PED1 を D1 と名称を変更) の脳保護作用を検討した。D1 は大脳皮質ニューロンにおいて酸化ストレス及び小胞体ストレスによる細胞死を顕著に抑制した。D1 は Keap1/Nrf2 経路及び HSP90/HSF-1 経路を活性化し、抗酸化酵素群及び熱ショック蛋白質を誘導することによってニューロンを保護することを明らかにした。

Keap1/Nrf2 経路を活性化する親電子性物質において、これらが同時に HSP90/HSF-1 経路を活性化することを初めて証明した。従って D1 は加齢黄斑変性などの、今まで有効な治療方法がなかった変性疾患において有効な保護分子となりうる。

研究成果の概要（英文）：

Activation of the Keap1/Nrf2 pathway and consequent induction of phase 2 antioxidant enzymes is known to afford neuroprotection. Here, we present a series of novel electrophilic compounds that protect neurons via this pathway. Natural products, such as carnosic acid (CA), are present in high amounts in the herbs rosemary and sage as *ortho*-dihydroquinones, and have attracted particular attention because they are converted by oxidative stress to their active form (*ortho*-quinone species) that stimulate the Keap1/Nrf2 transcriptional pathway. Once activated, this pathway leads to the production of a series of antioxidant phase 2 enzymes. Thus, such dihydroquinones function as redox-activated “pro-electrophiles.” Here, we explored the concept that related *para*-dihydroquinones represent even more effective bioactive pro-electrophiles for the induction of phase 2 enzymes without producing toxic side effects. We synthesized several novel *para*-hydroquinone-type pro-electrophilic compounds (designated D1 and D2) in order to analyze their protective mechanism. DNA microarray, PCR, and Western blot analyses showed

that compound D1 induced expression of heat-shock proteins (HSPs), including HSP70, HSP27 and DnaJ, in addition to phase 2 enzymes such as hemeoxygenase-1 (HO-1), NADP(H) quinine-oxidoreductase1, and the Na⁺-independent cystine/glutamate exchanger. Furthermore, NRF2 was translocated into nuclei by D1 but HSF-1 was already in nuclei in control cells, thus activating NRF2- and HSF-1—responsive transcriptional elements. In this manner, D1 protected neuronal cells from both oxidative and endoplasmic reticulum (ER)-related stress. Additionally, D1 suppressed induction of GRP78, an ER chaperone protein, and inhibited hyperoxidation of peroxiredoxin 2 (PRX2), a molecule that in its reduced state can protect from oxidative stress. These results suggest that D1 is a novel pro-electrophilic compound that activates both the NRF2 and HSF-1 pathways, and may thus offer protection from oxidative and ER stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,00,000	900,000	3,900,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：(1) 親電子性物質 (2)Nrf2 (3)HSF-1 (4)熱ショック蛋白質 (5)脳

1. 研究開始当初の背景

熱ショック蛋白質(HSP)は熱ショックで誘導されることが古くから知られていたが、ここ20年の研究で蛋白質の高次構造を維持することが主な役割であることが明らかになった。一方ハンチントン舞蹈病やアルツハイマー病などの中枢神経系の疾患において、蛋白質の高次構造が壊れた変性蛋白質の蓄積が最も基本的な病源であることがわかった。従って HSP (特に HSP70) の誘導によって脳を

保護するという仮説は多くの研究者から提唱された。しかし直接的な証明はまだない。

2. 研究の目的

上記の仮説を証明するためには、(1) ニューロンを保護する、及び(2) HSP を誘導する、以上二つの性質を持つ創製分子が必要である。最近申請者と Stuart A Lipton のグループはこの性質を満足する創製分子 PED1 を創製した。PED1 は転写因子 HSF-1 を活性化し

て、HSP を誘導し、ニューロンを保護する。
本研究の目的は PED1 を用いて、HSP を誘導し
て脳保護するという仮説を、PED1 を用いて証
明することである。

3. 研究の方法

(1) 中枢ニューロンにおいて、PED1 が NRF2
及び HSF-1 を活性化する“プロドラッグ”と
しての性質を持つ化合物であることを証明
する。

(2) マイクロアレー解析によって NRF2 の
下流にある phase2 蛋白質や HSF-1 の下流に
ある HSP が顕著に誘導されることを証明する。

(3) Keap1/Nrf2 経路及び HSP90/HSF-1 経路
の活性化作用を証明する

(4) 酸化ストレス及びポリグルタミンによ
るニューロン死の抑制

(5) PED1 の動物モデルでの保護作用を二つ
の系で証明する。

1. 蛋白質凝集によるニューロン死のモデル

2. 酸化ストレスによるニューロン死のモデ
ル

4. 研究成果

2010 年度

(1) **ヒドロキノン (プロドラッグ) からキ
ノン (ドラッグ) への変換機構:** 化学では、
ヒドロキノンからキノンへの変換は para
及び ortho 異性体でおこり、meta では起こら
ないとされる。この傾向は、HT22 細胞など
の細胞死の抑制作用、及び転写エレメント
ARE 活性化の強度と殆ど一致する。従って
PED1 のニューロン死の抑制はキノンへの変
換を介していることを示唆した。

(2) **マイクロアレー解析をもとに、PCR など
を用いた遺伝子発現解析:** ARPE-19 及び HT22 細
胞の両方を用いてマイクロアレー解析を行
い、PED1 は HSPs 及び Phase2 酵素群を誘導す
ることを証明した。PCR 及びウエスタンブ
ロットを用いて確認した。

(3) **Keap1/Nrf2 経路及び HSP90/HSF-1 経路の
活性化の証明:** PED1 が Phase2 酵素のマス
ター調節因子である Nrf2、及び HSPs のマス
ター調節因子である HSF-1 が核内に PED1 が促
進することを証明した。

(4) **酸化ストレス及びポリグルタミンによる
ニューロン死の抑制:** HT22 では PED1 は高濃
度グルタミン酸による細胞死を濃度依存的
に抑制した。また ARPE 細胞及び光受容体細
胞 661W では PED1 が過酸化水素による細胞死

を濃度依存的に抑制した。

2011年度

(1) PED1がプロドラッグ体であることの証明

PED1はパラ型であるが、オルソ型の化合物を合成し、これらと比較しながら、PED1がオルソ型よりもキノン型に変換することが容易であり、ARE活性化及び細胞死抑制の活性が高いことを証明した。

(2) 酸化ストレスによる細胞死を抑制するメ

カニズムの解明 ニューロンを酸化ストレス

から保護するメカニズムとしてパーオキシレ

ドキン2 (Prx-II)によるチオール基の還元作

用を注目されている。このとき酸化ストレス

による細胞死は、Prx-IIのスルホン酸化が起

こるためである。過酸化水素の添加によって

、Prx-IIのスルホン酸化が亢進し、PED1の添

加によって抑制されることを証明した。また

スルホン酸化されたPrx-IIをチオールに還元

するSrxn-1がPED1によって誘導されることを

証明した。

(3) 小胞体ストレスによる細胞死を抑制する

メカニズムの解明 ツニカマイシンは小胞体

ストレスを誘導してARPE-19細胞にアポトー

シスを誘導し、PED1が有意に抑制することを

見出したので、この抑制がHSP70の誘導を介す

ることを証明した。

(4) Full Paper の投稿 (Journal of Neurochemistry)

23年度にPED1のin vitroの実験結果は論文にまとめ、23年度にJournal of Neurochemistyに投稿し、8月に論文は受理された。

D1がポリグルタミンによる細胞死 (ハンチントン舞踏病の細胞レベルの実験モデル) を抑制しなかったため、動物レベルの実験は中止した。

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7件)

① Wang T, Takikawa Y, Tabuchi T, Satoh T, Kosaka K, Suzuki K. Carnosic acid (CA) prevents lipid accumulation in hepatocytes through the EGFR/MAPK pathway. J Gastroenterol 2012 Feb 18. [Epub ahead of print] . 査読有

② Yanagitai Y, Kitagawa T, Itoh S, Takenouchi T, Kitani H, Satoh T. Carnosic acid, a pro-electrophilic compound, inhibits LPS-induced activation of microglia. Biochem Biophys Res Commun 418:22-26 (2012) . 査読有

- ③ Yanagitai Y, Kitagawa T, Okawa K, Koyama H, Satoh T. Phenylenediamine Derivatives Induce GDF-15/MIC-1 and Inhibit Adipocyte Differentiation of Mouse 3T3-L1 Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 417:294-298 (2012) . 査読有
- ④ Satoh T, Raraie T, Seki M, Sunico CR, Tabuchi T, Kitagawa T, Yanagitai M, Senzaki M, Kosegawa C, Taira H, Mckercher SR, Hoffman JK, Roth GP, Lipton SA., Dual neuroprotective pathways of a pro-electrophilic compound via HSF-1-activated heat-shock proteins and Nrf2-activated phase 2 antioxidant response enzymes. *J Neurochem* 119:569-578 (2011) . 査読有
- ⑤ Wang T, Takikawa Y, Satoh T, Yoshioka Y, Kosaka K, Tatemichi Y, Suzuki K. Carnosic acid prevents obesity and hepatic steatosis in ob/ob mice. *Hep Res* 41:87-92 (2011) . 査読有
- ⑥ Sasaki S, Tozawa T, Van Wagoner RM, Ireland CM, Harper MK, Satoh T. Strongylophorine-8, a pro-electrophilic compound from the marine sponge *Petrosia*(Strongylophora) *corticata*, provides neuroprotection through Nrf2/ARE pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 415:1-6 (2011) . 査読有
- ⑦ Mimura J, Kosaka K, Maruyama A, Satoh T, Harada N, Yoshida H, Satoh K, Yamamoto M, Itoh K. Nrf2 regulates NGF mRNA induction by carnosic acid in T98G glioblastoma cells and normal human astrocytes. *J. Biochem.* 150:209-217 (2011) . 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 拓己 (SATOH TAKUMI)
岩手大学・工学部・准教授
研究者番号：10300831