

科学的研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 2 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591403

研究課題名 (和文) 小胞体分子シャペロン誘導剤のアルツハイマー病治療への応用研究

研究課題名 (英文) Application of an ER chaperone inducer for Alzheimer disease

研究代表者

工藤 喬 (KUDO TAKASHI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10273632

研究成果の概要 (和文) : 小胞体 (ER) 分子シャペロン BiP のプロモーターを用いた解析から、BiP 誘導剤 (BIX: BiP inducer X) が得られた。マウスの脳室に BIX を前投与し、脳虚血を負荷すると梗塞巣の面積の減少をもたらし、神経症状の軽減が認められた。この BIX の効果は、梗塞周辺領域で ER のアポトーシス誘導分子の発現を抑えることによることが示された。以上のように、BIX は ER ストレスから生じるアポトーシスを抑制し、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患の治療薬になることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : The endoplasmic reticulum (ER) stress response is a defense system for dealing with the accumulation of unfolded proteins in the ER lumen. Recent reports have shown that ER stress is involved in the pathology of some neurodegenerative diseases and cerebral ischemia. In a screen for compounds that induce the ER-mediated chaperone BiP/GRP78 (BiP), we identified BiP inducer X (BIX). BIX preferentially induced BiP with slight inductions of GRP94, calreticulin, and CHOP. The induction of BiP mRNA by BIX was mediated by activation of ER stress response elements (ERSEs) upstream of the BiP gene, through the ATF6 pathway. Pretreatment of neuroblastoma cells with BIX reduced cell death induced by ER stress. Intracerebroventricular pretreatment with BIX reduced the area of infarction due to focal cerebral ischemia in mice. In the penumbra of BIX-treated mice, ER stress-induced apoptosis was suppressed, leading to a reduction in the number of apoptotic cells. Considering these results together, it appears that BIX induces BiP to prevent neuronal death by ER stress, suggesting that it may be a potential therapeutic agent for cerebral diseases caused by ER stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、精神神経科学

キーワード：小胞体ストレス、分子シャペロン、脳梗塞、アルツハイマー病、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

近年、アルツハイマー病 (AD) の治療薬開発は、アミロイド前駆体蛋白の β/γ セクレターゼ阻害薬、非ステロイド消炎鎮痛剤、アミロイドワクチンなど様々な可能性が検討されているが、実用化に至ったものは未だない。従って、現時点では多くの可能性を模索すべき時期であろうと思われる。また、パーキンソン病、レビー小体病、前頭側頭型認知症、ポリグルタミン病などの神経変性疾患は未だ病態過程が不明な点が多く、確立された根治療法がない。ただ、AD を含むこれらの疾患では、異常蛋白が神経細胞内に蓄積凝集するという点が共通であり、興味深い。

2. 研究の目的

認知症の半数以上を占めるとされる AD は、現在までのところ根治療法がなく、その治療法開発は社会的急務とされている。申請者らは、家族性 AD の原因遺伝子であるプレセニリン 1 (PS1) が小胞体 (ER) に局在する事実から、PS1 変異体と ER の機能についての検討を行ってきた。ER では様々なストレスにより unfolded protein が内腔に蓄積するが、その処理機構としての unfolded protein response (UPR) がある。申請者の検討より、AD の神経変性過程にこの UPR が強く関与している事を示めされている。そこで申請者らは、AD において障害されている UPR を活性化することが AD の治療法に繋がらないかを検討する発想に至った。申請者らは既に unfolded protein の折り畳みを是正する分子シャペロン BiP を誘導する化合物 BIX を得ている。本研究では、この BIX の BiP 誘導効果を詳細に検討し、アルツハイマー病治療への応用について動物モデルを用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) 分子シャペロン誘導剤の探索

BiP のプロモーター配列を利用して BiP レポーターシステムを構築し、コンパウンドライブラリーをハイスループットスクリーニングにて検索し、最も BiP のメッセージを誘導するコンパウンド BiP inducer X (BIX) を得た。

(2) BIX の BiP 誘導機序の解明

BIX を神経芽細胞腫に投与し、ER ストレス関連分子の発現について検討した。

(3) BIX の ER ストレス保護効果についての検討

神経芽細胞腫に BIX を投与し、ER ストレスをかけて、その保護効果を検討した。

また、マウスの脳室内に BIX を投与し、中大脳動脈閉塞によってもたらされる脳梗塞に対する効果も検討した。

4. 研究成果

(1) 分子シャペロン誘導剤の探索

BIX を神経芽細胞腫 SK-N-SH に投与すると BIX の濃度依存的に BiP を誘導することが示されたが、古典的な ER ストレス誘導剤である thapsigargin 等が誘導するような BiP の高レベルよりは低く観察された。また、BIX による BiP 誘導は、投与 4 時間後から起こり、6 時間後をピークに減衰していくことが観察された。以上の観察されたメッセージレベルの BiP 誘導は、BiP 蛋白発現を伴っていることは、Western 法にて確認された。

(2) BIX の BiP 誘導機序の解明

この BIX が、もし BiP 以外の ER ストレスによって発現される分子を活性化すれば、ER ストレスによるアポトーシスに繋がらねず、治療法とはなり得ない。そこで、BiP 以外の ER ストレス分子 XBP1、CHOP、ERdj4/MDG1、PDI の活性化について、BIX の効果を検討した。BIX を SK-N-SH 細胞に投与しても、BiP は誘導するが、XBP1 のスプライシング (活性化)、CHOP の誘導、ERdj4/MDG1 の誘導、PDI の誘導は起きないことが確認された。また、BiP 誘導と相対する蛋白翻訳抑制を起こす eIF2 α のリン酸化についても BIX の効果を検討したが、そのリン酸化は観察されなかった。以上の結果から、BIX は BiP のみを誘導し、他の ER ストレス反応分子を誘導しないことが示された。

(3) BIX の ER ストレス保護効果についての検討

BIX の ER ストレス保護作用を検討する目的で、BIX を SK-N-SH 細胞の培地に添加し、12 時間後に tunicamycin を投与して ER ストレスをかけた。BIX を投与していない細胞では tunicamycin 投与後 36 時間後より細胞死が観察されたが、BIX 投与細胞では有意な細胞死の減少が観察された。ER ストレスから誘導されるアポトーシスで活性化されるカスパー 4 についてウエスタン法で検討したところ、BIX 投与細胞ではその活性化が抑制されていることが確認され、BIX は ER ストレスによるアポトーシスを抑制し、神経細胞を保護することが示された。

脳虚血は ER ストレスを惹起するので、BIX の効果を検証する *in vivo* の実験系として、マウスの中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを採用した。BIX のマウス脳室内投与は、6 時間後で脳実質内の BiP を誘導することが確認された。今回は、脳虚血 30 分前に BIX を脳室内投与し、MCAO24 時間後に薬剤の効果を検討した。通常 MCAO 後 24 時間では、歩行不可、反対側への旋回運動、反対側前足の伸展障害、あるいは神経症状なしのいずれかの神経障害が認められ、多くのマウスは旋回運動程度の神経障害を示すが、BIX 投与マウスでは神経障害は軽度となり前足の伸展障害程度を示していた。MCAO24 時間後の脳切片を作成し、

TTC 染色により脳梗塞部位の計測を行ったところ、BIX 投与マウスでは脳梗塞部位面積の有意な減少が認められ、特に梗塞周辺領域 (penumbra) の減少が顕著であった。また、MCAO24 時間後の脳浮腫についても検討したところ、BIX 投与マウスでは有意に脳浮腫が軽減されていた。これらの結果は、BIX の脳室内前投与が MCAO による脳梗塞の侵襲を軽減して神経症状発現を抑えうることを示している。

BIX の効果は梗塞周辺領域 (penumbra) の減少に顕著に認められたが、その部位での ER ストレスによるアポトーシスについて検討した。アポトーシス発現細胞を見るために脳切片を TUNEL 染色で染めたところ、BIX 投与マウスの penumbra における TUNEL 陽性細胞は有意に減少していることが観察された。更に、ER ストレスによるアポトーシス誘導分子である CHOP の誘導について *in situ* hybridization にて検討したところ、CHOP の誘導も BIX 投与マウスの penumbra において有意に抑制されていることが観察された。これらのことから、BIX 投与は脳梗塞周辺領域 penumbra の ER ストレスを軽減し、それによるアポトーシスを抑制することで梗塞巣の増大を抑えることができることを示し、*in vivo* においても BIX は ER ストレスによるアポトーシスに効果があることを示している。

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 7 件)

1. Ishisaka M, Kudo T, Shimazawa M, Kakefuda K, Oyagi A, Hyakkoku K, Tsuruma, K Hara H., Restraint-Induced Expression of Endoplasmic Reticulum Stress-Related Genes in the Mouse Brain. *Pharmacology & Pharmacy* 2: 10-16 2011 査読有
2. Oida Y, Hamanaka J, Hyakkoku K, Shimazawa M, Kudo T, Imaizumi K, Yasuda T, Hara H., Post-treatment of a BiP inducer prevents cell death after middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosci Lett.* 484: 43-46 2010 査読有
3. Oida Y, Hamanaka J, Hyakkoku K, Shimazawa M, Kudo T, Imaizumi K, Yasuda T, Hara H., Post-treatment of a BiP inducer prevents cell death after middle cerebral artery

occlusion in mice. *Neurosci Lett.* 484: 43-46 2010 査読有

4. Inokuchi Y., Nakajima Y., Shimazawa M., Kurita T., Kubo M., Saito A., Sajiki H., Kudo T., Aihara M., Imaizumi K., Araie M., and Hara H., Effect of an Inducer of BiP, a Molecular Chaperone, on Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Induced Retinal Cell Death, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50: 334-344 2009 査読有
5. Prachasilchai W., Sonoda H., Yokota-Ikeda N., Oshikawa S., Aikawa C., Uchida K., Ito K., Kudo T., Imaizumi K., and Ikeda M., A protective role of unfolded protein response in mouse ischemic acute kidney injury, *Eur. J. Pharmacol.* 592: 138-145 2008 査読有
6. Oida Y., Izuta H., Oyagi A., Shimazawa M., Kudo T., Imaizumi K., and Hara H., Induction of BiP, ER-resident protein, prevents the neuronal death induced by transient forebrain ischemia in gerbil, *Brain Res.* 1208: 217-224 2008 査読有
7. Kudo T., Kanemoto S., Hara H., Morimoto N., Morihara M., Kimura R., Tabira T., Imaizumi K., and Takeda M., A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress, *Cell Death. Differ.* 15: 364-375 2008 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. 工藤 喬、アミロイド・カスケード仮説を基に認知症は治るか？—認知症治療法開発の新機軸、第 53 回日本神経化学学会大会、2010. 9. 3、神戸
2. Kudo T., A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress, 6th International Drug Discovery Science and Technology, 2009, Beijing
3. 工藤 喬、今泉和則、小胞体—プロテアソーム系に基づく神経変性疾患の新しい治療戦略、第 52 回日本神経化学学会大会、2009. 6. 4、伊香保
4. Kudo T., Imaizumi K., Hara H., Tabira T., and Takeda M., A novel therapeutic strategy for Alzheimer disease by a molecular chaperone inducer, The 11th International Conference on Alzheimer's disease and Related Disorders, 2008, Chicago

5. Kudo T., Imaizumi K., Hara H., Tabira T., and Takeda M., A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress, CINP Pacific Asia Regional Meeting, 2008, Kuala Lumpur
6. Kudo T., Imaizumi K., Hara H., Tabira T., and Takeda M., A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress, The 10th International Hong Kong/Springfield Pan-Asian Symposium on Advances in Alzheimer Therapy, 2008, Hong Kong,
7. 工藤 喬, A therapeutic strategy based on ER stress、第 51 回日本神経化学会大会、2008.7.19、富山

[図書] (計 2 件)

1. 工藤 喬、日本臨床、アルツハイマー病—基礎研究から予防・治療の新しいパラダイム—、107-112、2008
2. 工藤 喬、武田雅俊、科学評論社、神経内科 認知症診療マニュアル、167-171、2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 喬 (KUDO TAKASHI)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：10273632

(2) 研究分担者

森原 剛史 (MORIHARA TAKASHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：90403196
武田 雅俊 (TAKEDA MASATOSHI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：00179649

(3) 連携研究者

()

研究者番号：