

機関番号：23701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592082

研究課題名（和文） 網膜神経節細胞死における小胞体ストレスの分子メカニズムに関する研究

研究課題名（英文） A study of molecular mechanisms of endoplasmic reticulum stress in retinal ganglion cell death

研究代表者

嶋澤 雅光 (SHIMAZAWA MASAMITSU)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80381721

研究成果の概要（和文）：培養網膜神経細胞を用いたスクリーニングにより、小胞体ストレス細胞死を強力に抑制する SUN N8075 [(2S)-1-(4-amino-2,3,5-trimethylphenoxy)-3-(4-[4-(4-fluorobenzyl)phenyl]-1-piperazinyl)-2-propanol dimethanesulfonate]を見出した。その保護作用機序の解析により、SUN N8075 の小胞体ストレス細胞死抑制作用は神経分泌タンパク質である VGF nerve growth factor inducible (VGF) の発現を介していることを明らかにした。今後、網膜疾患における VGF の関与を明らかにすることにより、病態解明ならびに新たな治療薬の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We identified a small molecule, SUN N8075 [(2S)-1-(4-amino-2,3,5-trimethylphenoxy)-3-(4-[4-(4-fluorobenzyl)phenyl]-1-piperazinyl)-2-propanol dimethanesulfonate], which has a marked protective effect on ER stress-induced cell death, in an *in vitro* cell-based screening. Its protective mechanism was mediated by an induction of VGF nerve growth factor inducible (VGF). Elucidating the involvements of VGF in retinal diseases will be expected to provide a potential target for therapeutic intervention in retinal diseases in future.

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	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：小胞体ストレス、網膜神経節細胞、緑内障

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などに代表される神経変性疾患において、神経細胞内に異常なタンパク質が凝集体を形成していることが認められ、その神経変性と小胞体ストレスとの関連性が注目されている。一方、アルツハイマー病患者において高率に緑内障を発症して

いることが疫学調査で明らかにされた。即ち、緑内障の発症率は健常者で5%に対してアルツハイマー病患者での緑内障の発症率は26%であった。これらの知見から、緑内障とアルツハイマー病の間になんらかの因果関係があることが推測される。しかしながら、緑内障をはじめとした網膜疾患における小胞体ストレスの関与について検討した報告

は国内外問わずほとんどない。

これまで我々は、小胞体ストレスにより発現する X-box-binding protein 1 (XBP-1) 遺伝子の下流に蛍光蛋白質 VENUS 遺伝子を結合させたトランスジェニックマウス (Endoplasmic Reticulum stress Activated Indicator mouse; ERAI マウス) を用いて *N*-methyl-D- aspartate (NMDA) 及び一過性高眼圧負荷マウス網膜障害モデルにおいて小胞体ストレスが惹起されることを明らかにした。これらの検討により、(1) NMDA 硝子体内投与または高眼圧負荷によりマウス網膜において小胞体ストレス誘導剤である tunicamycin 硝子体内投与と同様に XBP-1 のスプライシングが起こること、(2) 小胞体分子シャペロンである glucose-regulated protein (GRP) 78/BiP が誘導されること、(3) その下流シグナルであり、プロアポトーシス転写因子である C/EBP-homologous protein (CHOP) が誘導されることを見出した。さらに、小胞体ストレスと神経細胞死の関係を網膜神経節細胞株 (RGC-5) 細胞を用いて検討し、ツニカマイシンによる小胞体ストレスの誘導により double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) のリン酸化が亢進すること、PKR 阻害剤または PKR mRNA 特異的 small interference RNA (siRNA) による PKR 蛋白質のノックダウンにより小胞体ストレス誘発細胞死が抑制されることを見出した。これらの知見から、緑内障をはじめとした網膜疾患における網膜神経節細胞死に小胞体ストレスを介した機構が関与していることが強く示唆される。小胞体ストレス細胞死を抑制する薬剤が新規網膜疾患治療薬として期待される。

2. 研究の目的

(1) 小胞体ストレス細胞死を抑制する化合物をスクリーニングにより見出し、(2) その化合物を用いて DNA マイクロアレイや RT-PCR 法を用いて作用機序を解明することにより細胞死に関与する遺伝子を見出し、(3) その遺伝子の機能を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養網膜神経節細胞における小胞体ストレス細胞死を抑制する化合物の *in vitro* スクリーニング

【方法】

ラット培養網膜神経節細胞株 (RGC-5) を 96 well plate 中に播種し、24 時間後に tunicamycin (終濃度 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した。細胞障害は tunicamycin 添加 24 時間後にレザズリンを培地中に添加し、その 3 時間後に細胞の代謝活性を測定することにより細胞生存率 (%) を算出した。被験化合物は

tunicamycin 添加 1 時間前に添加した。ここで保護作用が認められた化合物について、別途 Hoechst 33342 及び YO-PRO-1 (YO) による核蛍光染色により死細胞率 (YO 陽性細胞数 / Hoechst 陽性細胞数 $\times 100$) を測定することにより細胞保護作用を確認した。さらに、その保護作用が網膜以外の細胞においても認められるか否か確認するために、ヒト由来神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) を用いて同様の検討を実施した。

(2) 小胞体ストレス細胞死を抑制する化合物を用いて変動する遺伝子発現の差を DNA マイクロアレイによる解析

【方法】

SH-SY5Y を 100 mm dish に播種し、24 時間後に tunicamycin (終濃度 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した。SUN N8075 または溶媒は tunicamycin 添加 1 時間前に加える。Tunicamycin 添加後、経時的 (2, 6, 12, 24 時間) に total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイに供した。Tunicamycin 処置で変動し、かつ化合物添加により抑制または増強される遺伝子をスクリーニングした。見出した候補遺伝子の発現を real-time RT-PCR により検証した。

(3) 網膜細胞死に関与することが予想される遺伝子の機能を検証する。

【方法】

候補遺伝子の機能を遺伝子特異的 siRNA を用いた発現抑制または候補遺伝子を組み込んだ plasmid 遺伝子を導入することにより検証した。即ち、tunicamycin による刺激 24 または 48 時間前に候補となる遺伝子に特異的な siRNA をリポフェクタミン 2000 と共に添加することによりターゲット遺伝子の発現を抑制した。遺伝子導入は候補遺伝子 cDNA を組み込んだプラスミド DNA をトランスフェクトする。遺伝子または蛋白質発現は real-time RT-PCR 及び Western blotting 法によりそれぞれ確認する。Tunicamycin による細胞死の評価は上記 (2) の方法に準じた。

4. 研究成果

(1) 培養網膜神経節細胞における小胞体ストレス細胞死を抑制する化合物の *in vitro* スクリーニング

ラット培養網膜神経節細胞株 (RGC-5) を用いてツニカマイシン誘発小胞体ストレス細胞死に対するスクリーニングを実施した。スクリーニングには本学で所有している天然物由来の化合物、市販試薬および医薬品として開発中の候補化合物等を入手して検討した。そのスクリーニングから小胞体ストレス細胞死を抑制するいくつかの天然成分および化合物を見出した。そのなかで、抗酸化作用およびカルシウムチャネル遮断作用を有

する SUN N8075 [(2S)-1-(4-amino-2,3,5-trimethylphenoxy)-3-(4-[4-(4-fluorobenzyl)phenyl]-1-piperazinyl)-2-propanol dimethanesulfonate] が強力にその細胞死を抑制することが明らかになった(図 1)。一方、

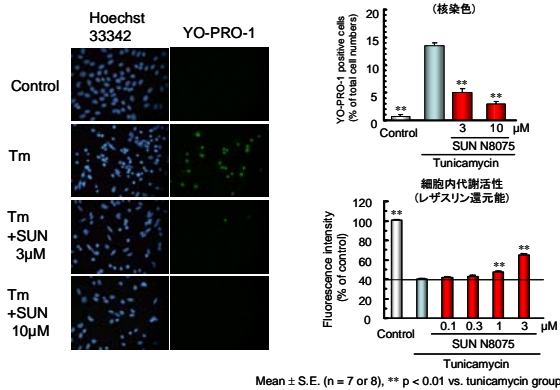


図 1. 小胞体ストレス細胞死に対する SUN N8075 の作用

Tm: tunicamycin, SUN: SUN N8075

他の抗酸化剤およびカルシウムチャネル遮断薬には明らかな保護作用は認められなかった。また、SUN N8075 はツニカマイシンにより誘導される GRP78/BiP および CHOP 蛋白質の発現に対して明らかな作用を示さなかったことから、本剤は小胞体ストレスの発現自体には作用していないと考えられる(図 2)。

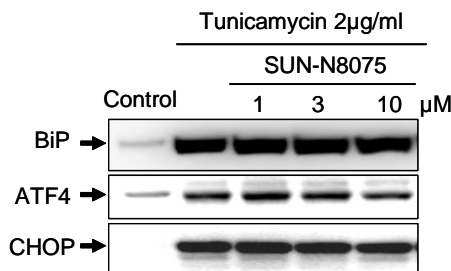


図 2. 小胞体ストレス誘発 BiP, ATF4 および CHOP 発現に対する SUN N8075 の作用

また、SUN N8075 は血清除去および酸化ストレスによる細胞死に対しても強い細胞保護作用を示した。さらに、SUN N8075 の保護作用が網膜以外の細胞においても認められるか否か確認するために、ヒト由来神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) を用いて同様の検討を実施した。その結果、SUN N8075 は SH-SY5Y 細胞においても同様にツニカマイシンによる細胞死および caspase-3 の活性化を抑制した。以上の結果から、SUN N8075 の小胞体ストレス細胞死抑制作用は新規な機序を介していることが示唆された。

(2) DNA マイクロアレイによる SUN N8075 の網羅的遺伝子発現解析

SUN N8075 の保護作用機序を DNA マイクロアレイにより解析した(図 3)。アレイ上の

41,000 遺伝子のうち 26,000 以上の遺伝子を検出することができた。SUN N8075 3 µM 処置により、2 倍以上増加した遺伝子が 563 個、2

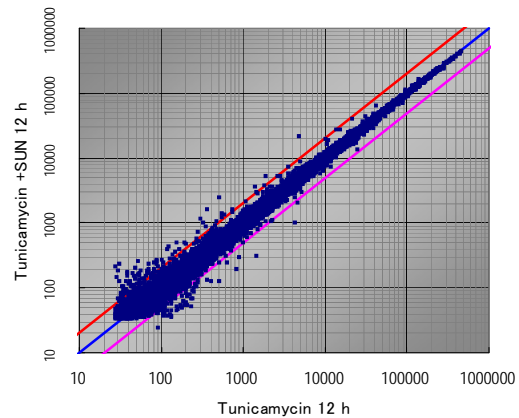


図 3. 小胞体ストレス負荷時の遺伝子発現変動に対する SUN N8075 の作用

倍以上低下した遺伝子が 590 個検出された。そのなかで候補遺伝子として神経分泌タンパク質である VGF nerve growth factor inducible (VGF) を見出した。さらに、その発現増加はリアルタイム RT-PCR 解析においても確認された(図 4)。VGF はエネルギーバランスの維持および海馬シナプスの可塑性への関与が報告されている神経分泌タンパク質で、神経栄養因子である Nerve growth factor (NGF) および Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) により誘導されることが知られている。一方、SUN N8075 は NGF および BDNF の発現には明らかな作用を示さなかった。

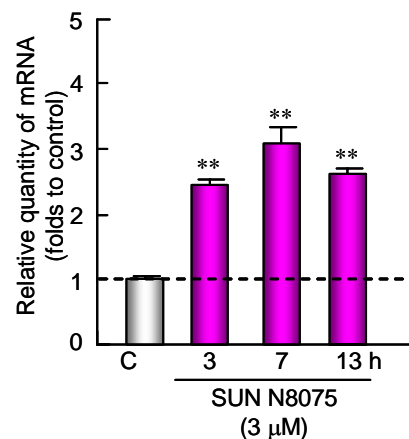


図 4. SUN N8075 による VGF 遺伝子発現変化
Each column represents the mean ± S.E.M. (n = 6).
**p < 0.01 vs. control.

(3) 網膜細胞死に関与することが予想される遺伝子の機能を検証する。

SUN N8075 の保護作用が VGF を介しているか否かを VGF siRNA により VGF の発現を抑制することに検討した。VGF siRNA を細胞に導入することにより、VGF mRNA の発現を約 40%

抑制した。この条件において tunicamycin による細胞死に対する SUN N8075 の保護作用は完全に消失した。さらに、VGF を細胞内に導入することにより小胞体ストレス細胞死を抑制できることを確認した。これらの結果から、SUN N8075 の小胞体ストレス細胞死抑制作用は VGF の発現を介していることが明らかになった。

今後、網膜疾患における VGF の関与を明らかにすることにより、病態解明ならびに新たな治療薬の開発に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- ① Uchibayashi R., Tsuruma K., Inokuchi Y., Shimazawa M. and Hara H. Involvement of Bid and caspase-2 in endoplasmic reticulum stress- and oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *J. Neurosci. Res.*, 査読有り, in press.
- ② Akane M., Shimazawa M., Inokuchi Y., Tsuruma K. and Hara H. SUN N8075, a novel radical scavenger, protects against retinal cell death in mice. *Neurosci. Lett.*, 査読有り, 488, 87-91, 2011.
- ③ Ito Y., Shimazawa M., Inokuchi Y., Yamanaka H., Tsuruma K., Imamura K., Onoe H., Watanabe Y., Aihara M., Araie M. and Hara H. Involvement of endoplasmic reticulum stress on neuronal cell death in the lateral geniculate nucleus in the monkey glaucoma model. *European Journal of Neuroscience*, 査読有り, 33, 843-855, 2011.
- ④ Shimazawa M., Tanaka H., Ito Y., Morimoto N., Tsuruma K., Kadokura M., Tamura S., Inoue Y., Yamada M., Takahashi H., Warita H., Aoki M. and Hara H. An inducer of VGF protects cells from ER stress-induced cell death and prolongs survival in the mutant SOD1 animal models of familial ALS. *PLoS ONE*, 査読有り, 5, e15307, 2010.
- ⑤ Shimazawa M., Suemori S., Inokuchi Y., Matsunaga N., Nakajima Y., Oka T., Yamamoto T. and Hara H. A novel calpain inhibitor, ((1S)-1-(((1S)-1-benzyl-3-cyclopropylamino-2,3-di-oxopropyl)amino)carbonyl)-3-methylbutyl)carbamic acid 5-methoxy-3-oxapentyl ester (SNJ-1945), reduces murine retinal cell death in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp.*

Ther., 査読有り, 332, 380-387, 2010.

〔学会発表〕(計7件)

- ① Shimazawa M., Uchibayashi R., Tsuruma K. and Hara H. The effect of SUN N8075 on endoplasmic reticulum stress-induced cell death in RGC-5 cells. ARVO 2010 Annual Meeting (Fort Lauderdale, Florida, 2010, 5, 2-6)
- ② Ito Y., Shimazawa M., Inokuchi Y., Miwa A., Yamanaka H., Tsuruma K., Onoe H., Araie M. and Hara H. Involvement of endoplasmic reticulum stress on neuronal degeneration in the lateral geniculate nucleus in the monkey glaucoma model. ARVO 2010 Annual Meeting (Fort Lauderdale, Florida, 2010, 5, 2-6)
- ③ 内林瑠美、井口勇太、嶋澤雅光、鶴間一寛、原英彰. 網膜神経節細胞死における Bid および Caspase 2 の関与. 第116回日本薬理学会近畿部会(大津、2009、11、13)
- ④ Shimazawa M. and Hara H. Protective effect of SUN N8075 on endoplasmic reticulum stress-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Neuroscience 2008* (Washington, DC, 2008, 11, 15-19)
- ⑤ 内林瑠美、嶋澤雅光、鶴間一寛、原英彰. 網膜神経節細胞死に対する SUN N8075 の保護作用. 第82回日本薬理学会年会(横浜、2009、3、16-18)
- ⑥ 嶋澤雅光、末森晋典、井口勇太、松永望、中島佳美、岡隆之、山本哲也、原英彰. In vitro および in vivo 網膜神経節細胞死に対する新規カルパイン阻害剤 SNJ-1945 の作用. 第82回日本薬理学会年会(横浜、2009、3、16-18)
- ⑦ 嶋澤雅光、内林瑠美、原英彰. 小胞体ストレス誘発網膜神経節細胞死に対する SUN N8075 の作用. 第28回日本眼薬理学会(岡山、2008、9、20-21)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋澤 雅光 (SHIMAZAWA MASAMITSU)
岐阜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：80381721

(2) 研究分担者

原 英彰 (HARA HIDEAKI)
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：20381717