

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：25503

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22716

研究課題名（和文）既存の小胞体ストレス応答を介さない新規パーキンソン病制御機構・創薬標的の解明

研究課題名（英文）Elucidation of novel control mechanism and therapeutic target of PD instead of activating known ER-stress signaling

研究代表者

野田 泰裕 (noda, yasuhiro)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：90880336

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：小胞体ストレスセンサータンパク質の一つであるPERK阻害薬のGSK2606414はin vitro PDモデル細胞の細胞死を強く抑制したが、アポトーシス誘導薬、小胞体ストレス誘導薬誘発の細胞死に対して保護作用を示さず、PD病態特異的に保護作用を示す可能性が示唆された。また、ウェスタンブロット法で解析した結果、薬物誘発in vitro PDモデルにおいてはGSK2606414の標的となるPERKの活性化が見られず、GSK2606414はPERK経路非依存的にPD病態を改善することが示唆された。以上の結果より、GSK2606414はPD病態に対する新たな治療薬候補となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、PD病態において保護作用を有する化合物が新たに見いだされ、治療薬候補としての応用が期待される。また、今回見いだされたGSK2606414は小胞体ストレスセンサーPERKの阻害剤であるにもかかわらず、PERK非依存的な経路で保護作用を発揮することが示されており、PD病態において未知の因子を修飾し、保護作用を発揮することが示唆されている。今後の検討によって標的因子の同定を行い、PD病態の新たな治療戦略開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：An inhibitor of PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), GSK2606414 ameliorated SH-SY5Y cell death induced by MPP+ which causes PD-like neuronal cell death. On the other hands, GSK2606414 did not exert protective effects against Staurosporine (an apoptosis inducer) or tunicamycin (an ER-stress inducer) induced cell death. These results suggest that GSK2606414 has specific neuroprotective effect in PD. Furthermore, in in vitro PD model, PERK was not activated. Therefore, it is suggested that GSK2606414 can ameliorate PD pathology without activation of PERK pathway, and it can be a candidate of therapeutic agent of PD.

研究分野：薬理学

キーワード：パーキンソン病 小胞体ストレス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (Parkinson's disease: PD) は大脳黒質ドパミン作動性神経の変性・脱落を主徴とする進行性の神経変性疾患であり、本邦では指定難病に指定されている。安静時振戦、筋強剛、無動、姿勢保持反射障害を主徴とし、自律神経症状や精神症状といった非運動性症状も散見される。本邦における患者数は 108,800 人程度と推計されており (平成 24 年度医療受給者証保持者数より) その特徴的症状による quality of life の低下は著しい。現行の治療法として、病態進行により減少するドパミンの補充及びその補助等が存在するが、対症療法にとどまっております、効果的な治療法の開発が切望されている。

近年の研究成果より、パーキンソン病の進行には小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR) が関与することが明らかになっている。小胞体ストレスとは、新生タンパク質の合成及び折り畳みの場である小胞体内において、正しい高次構造をとっていない不良タンパク質が蓄積し、細胞の恒常性に対して悪影響が生じることである。小胞体内腔の状態は小胞体膜上に存在するストレスセンサーと呼ばれるタンパク質によってモニターされており、これらは古典的ストレスセンサーと称される普遍的に発現する 3 種類のセンサータンパク質 (IRE1, PERK, ATF6) 及び組織特異的に発現するセンサータンパク質に大別される。センサータンパク質によって不良タンパク質の蓄積が感知された際、タンパク質の転写・翻訳抑制や不良タンパク質の分解、タンパク質の折り畳みを補助するタンパク質である分子シャペロンの発現量増加などが起こり、ストレス回避機構が作動するが、過度のストレスが生じた場合は細胞のアポトーシスが生じる。

PD 病態における小胞体ストレスの発生源として α -シヌクレイン (α -Syn) などが報告されている。 α -Syn は PD 患者に特徴的な病理所見である神経細胞内封入体レビー小体中にリン酸化状態で存在するほか、その変異は家族性 PD の原因となることが報告されている (Science. 1997, 276 (5321), 2045-2047)。また近年、小胞体内にも α -Syn の蓄積が観察され、小胞体内の分子シャペロンを不活性化させていることが報告されている (J. Neurochem. 2011, 116, 588-605)。これらより、小胞体ストレスと PD 病態には強固な因果関係があり、これを解明することは PD 病態のより詳細な理解及び治療法開発に資するものと考えられる。

2. 研究の目的

これまでに PD への治療介入を目的として、PD 病態モデルにおける小胞体ストレスセンサータンパク質を標的とした小胞体ストレス制御を行った研究が報告されている (J. Neurosci. 2012, 32 (10) 3306-3320, Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2014, 111, 6804-6809, J. Biol. Chem. 2011, 286, 7947-7957)。UPR は生じた小胞体ストレスを除去するために備わっている機構であり、一般にその活性化は正常な細胞の生存に有利に働くことが知られている。しかし、興味深いことに、UPR 経路のうち、PERK 経路を阻害すると細胞死が増加するのではなく、むしろ抑制されるという報告 (J. Neurosci. 2012, 32 (10) 3306-3320) がされており、効果が一定ではない。このことは、PD 病態において、UPR の恒常性が失われた際に活性化または不活性化される未知の新しい小胞体ストレス制御因子が存在する可能性を示唆するものであり、本研究ではこの「未知の因子」の同定を目指した。

3. 研究の方法

本検討は 1) *in vitro* 評価系の構築、2) 小胞体ストレスセンサータンパク質阻害剤を用いたスクリーニング、3) 網羅的な遺伝子発現解析 (RNA sequence) による小胞体ストレス誘導病態修飾因子の探索の順に実施し、新規 PD 病態制御因子の同定を行った。

1) PD 病態 *in vitro* 評価系の構築

神経毒であり、細胞及び動物モデルで PD 様の障害を引き起こすことが知られる 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydro-pyridine (MPTP) をドパミン系神経細胞株 (SH-SY5Y) に対して低濃度・反復投与し、進行性の PD 病態に近いストレスを負荷する。また、家族性変異を有する α -Syn を神経細胞株に過剰発現させることで PD モデル細胞を作製し、比較検討として用いる。この際、毒性 (細胞死) が発揮

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

されず小胞体ストレスマーカの発現変動 (GRP78 及び CHOP の誘導を指標に PCR とウエスタン解析を実施) がみられる濃度から有意な細胞死が見られる薬物濃度・培養期間を明らかにし、薬剤スクリーニング時に適応する。

2) UPR 阻害薬を用いたスクリーニング

1) で作製した PD モデル細胞に対し、小胞体ストレスセンサータンパク質等の UPR 関連タンパク質阻害剤 (PERK 阻害剤: GSK2606414、IRE1 阻害剤: KIRA6 など) を低濃度から高濃度まで単独または複数種類 (PERK 阻害剤+IRE1 阻害剤) 組み合わせで処置し、Cell viability、酸化ストレスマーカー、アポトーシスをエンドポイントとして検討を行い、最も顕著な表現型 (細胞保護効果など) がみられる薬剤の組み合わせ・濃度を探索する。さらに、PD モデル細胞に同様の薬物処置した際の PD 細胞固有の機能の変化 (ドパミン産生、分泌機能 (チロシンヒドロキシラーゼ等を指標とする)) を解析する。

4 . 研究成果

小胞体ストレスセンサータンパク質の一つである PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase)阻害薬の GSK2606414 は *in vitro* PD モデル細胞の細胞死を強く抑制した。一方、アポトーシス誘導薬のスタウロスポリン、小胞体ストレス誘導薬のツニカマイシン、タプシガルギン誘発の細胞死に対して GSK2606414 は保護作用を示さず、PD 病態特異的に保護作用を示す可能性が示唆された。また、薬物誘発 *in vitro* PD モデルにおける PERK 活性化及びそれに対する GSK2606414 の作用をウエスタンプロット法で解析した。その結果、薬物誘発 *in vitro* PD モデルにおいては GSK2606414 の標的となる PERK の活性化が見られず、GSK2606414 は PERK 経路非依存的に PD 病態を改善することが示唆された。以上の結果より、GSK2606414 は PD 病態に対する新たな治療薬候補となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野田泰裕
2. 発表標題 PERK阻害剤GSK2606414のパーキンソン病モデル細胞に対する小胞体ストレス非依存的保護作用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------