

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06864

研究課題名(和文) CIDE-A - AMPK経路を標的とした小胞体ストレス関連疾患治療薬の探索

研究課題名(英文) A compound screening targeting CIDE-A - AMPK pathway in the endoplasmic reticulum stress-related diseases

研究代表者

森下 啓明 (Morishita, Yoshiaki)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：20621634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究により、慢性小胞体ストレスへの適応に關与する新規小胞体ストレス応答因子CIDE-Aは、ラット甲状腺濾胞細胞株PCCL3細胞において、1)Forkhead box protein O1 (Foxo1)により正に制御されること、2)過剰発現による細胞死が同じCIDEファミリー蛋白であるCIDE-C抑制によって増強されることが明らかとなった。また、ミトコンドリア機能改善作用を持つとされる糖尿病治療薬のIpegliminがPCCL3細胞の小胞体ストレス関連死を抑制すること、その背景としてBiP発現が増加しCIDE-A発現増加率が低下していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリン遺伝子異常による糖尿病や家族性中枢性尿崩症、遺伝性甲状腺機能低下症等の内分泌疾患や遺伝性神経変性疾患等を含む小胞体ストレス関連疾患は不可逆的であり、病態完成を抑制する治療法確立が求められている。今回の我々の研究成果は、これらの疾患の根本原因である細胞死に關与する新規小胞体ストレス応答因子であるCIDE-Aの制御機構解明に寄与するものである。また、今回明らかにしたイメグリミンによる甲状腺濾胞細胞の小胞体ストレス関連死抑制は、膵細胞においても同様の報告がされており、広く内分泌細胞保護に応用できる可能性があることから、小胞体ストレス関連疾患の治療法開発に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that 1) a newly discovered unfolded protein response gene "cell death-Inducing DNA fragmentation factor-like Effector-A (CIDE-A)", which is associated with the adaptation to the chronic endoplasmic reticulum (ER) stress, is regulated positively by forkhead box protein O1 (Foxo1) and 2) the cell death induced by the over-expression of CIDE-A is amplified by suppression of CIDE-C, another CIDE family protein. We also elucidated that imeglimin, a brand new orally drug for type 2 diabetes mellitus, which is thought to improve mitochondrial function reduced ER stress associated death of rat thyroid follicular cell line PCCL3 along with increased BiP expression and decreased CIDE-A elevation.

研究分野：医学

キーワード：小胞体ストレス 甲状腺濾胞細胞 細胞生存 CIDE-A イメグリミン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 小胞体 (ER) ストレス関連疾患において、細胞は ER ストレス適応期を経て死に至るが、その機序については不明点が多く、治療法も確立していない。申請者はサイログロブリン (Tgn) 遺伝子変異マウス及びラット甲状腺濾胞細胞株を用いた検討により、新たな ER ストレス応答因子として Cell death-Inducing DNA fragmentation factor-like Effector-A (CIDE-A) を見出し、1) ER ストレスが古典的 ER ストレス応答因子 (BiP、CHOP 等) と同様に、転写亢進により CIDE-A mRNA 発現を増加させること、2) CIDE-A mRNA 発現は ER ストレスセンサーの一つである ATF6 により負に制御され、そこにマイクロ RNA (未同定) が介在している可能性が高いこと、3) ER ストレスは CIDE-A 蛋白を安定化し、その細胞傷害性を増強すること、4) 慢性 ER ストレス (ER ストレス誘導薬 Tunicamycin 慢性投与) 適応 PCCL3 細胞は Tunicamycin とは別機序の ER ストレス誘導薬である Thapsigargin による追加 ER ストレスに対して、対照細胞と同等の BiP・CHOP 反応を示しながらも、低い CIDE-A 発現応答と細胞死減少を示すこと、5) 慢性 ER ストレス適応細胞では対照細胞より AMPK が活性化していることを明らかにし、CIDE-A の発現低下<sup>1)</sup> と AMP-activated protein kinase (AMPK) 活性化<sup>2)</sup> が慢性 ER ストレスへの適応 (細胞生存) に関与することをそれぞれ報告してきた。

(2) 一方で、ER ストレス下における CIDE-A 遺伝子発現制御の詳細と、AMPK 活性制御との関係はいずれも明らかにできていなかった。また、ER ストレス関連細胞死を低減する薬剤の発見と、その作用における CIDE-A の関与の解明は、ER ストレス関連疾患の病態解明の進展と、新たな治療法の開発に寄与すると考えられた。

### 2. 研究の目的

(1) ラット甲状腺濾胞細胞株である PCCL3 細胞を用いて、ER ストレス下における CIDE-A 発現制御機構および細胞死誘導機構の解明と、AMPK 活性制御との関係を明らかにすることを第一の目的とした。

(2) PCCL3 細胞の ER ストレス関連細胞死を低減する薬剤の発見と、その作用における CIDE-A の挙動を解明することを第二の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ER ストレス下における CIDE-A 発現制御機構を解明するために、文献調査において ER ストレス下ではない条件で CIDE-A との関連が示唆されていた Forkhead box protein O1 (Foxo1) について検討を行った。RNA 干渉により Foxo1 mRNA 発現を抑制した状況で ER ストレス誘導薬である Tunicamycin (100ng/mL) を投与し、CIDE-A mRNA 発現を定量的リアルタイム PCR 法で評価した。

(2) CIDE-A は元来脂肪滴形成蛋白として知られており、同じ CIDE ファミリー蛋白である CIDE-C と協働することが知られるが、ER ストレス関連細胞死における両者の関係は不明であったことから、Doxycyclin 誘導性にマウス CIDE-A を過剰発現する PCCL3 細胞において、RNA 干渉を用いて CIDE-C mRNA 発現を抑制した場合の細胞死について、CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay (Promega) を用いて評価した。

(3) 先述の Doxycyclin 誘導 CIDE-A 発現 PCCL3 細胞において、Doxycyclin 投与による AMPK のリン酸化状況をウエスタンブロット法で評価した。

(4) 当初予定していた薬理活性化化合物ライブラリー (Merck LOPAC®1280) によるスクリーニングは同製品の終売により実施できなくなったため、文献調査において見出した化合物を Tunicamycin とともに投与し、細胞死を CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay、CIDE-A を含めた ER ストレス応答因子の mRNA 発現を定量的リアルタイム PCR 法で評価した。

### 4. 研究成果

(1) RNA 干渉により Foxo1 mRNA 発現を抑制した状況で PCCL3 細胞に Tunicamycin を投与すると、Foxo1 mRNA 発現を抑制しない場合よりも CIDE-A mRNA 発現が低下した。このことから、ER ストレス下の甲状腺濾胞細胞においても Foxo1 が CIDE-A 発現を制御する可能性が示されたが、Foxo1 活性化時に見られるとされる核内移行は同条件下では確認できなかった。

(2) Doxycyclin 誘導 CIDE-A 発現 PCCL3 細胞において、Doxycyclin 投与により CIDE-A 発現と細胞死の誘導が見られたが、RNA 干渉を用いて CIDE-A mRNA 発現を抑制するとその細

胞死も抑制され、CIDE-C mRNA 発現を抑制すると細胞死は増強された(図1)。このことから、CIDE-Aによる細胞死を抑制する、あるいはCIDE-Cと協働しないCIDE-Aが細胞死を惹起する可能性が示された。

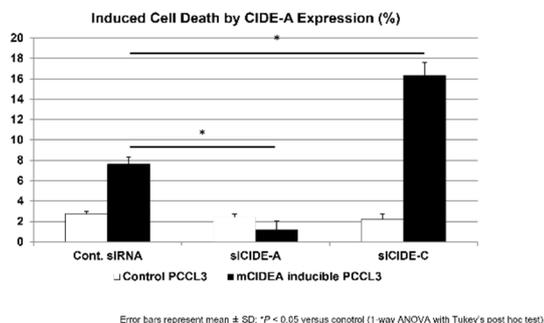
(3) ウェスタンブロット法によるリン酸化 AMPK (活性型 AMPK) の検出を試みたが、技術的な問題から再現性のある結果が得られておらず、CIDE-A 過剰発現によるリン酸化 AMPK の低下および CIDE-A 抑制によるリン酸化 AMPK の増加は確認できていない。

(4) 複数の化合物を調査した結果、小胞体シャペロン BiP の選択的誘導剤である BiP Inducer X (BIX) とミトコンドリア機能改善作用を持つとされる糖尿病治療薬のイメグリミン (Imeglimin) がいずれも Tunicamycin による CIDE-A 増加率を低下させること、更に Imeglimin は Tunicamycin による細胞死を抑制すること(図2)が明らかとなった。なお、Imeglimin は Tunicamycin による BiP 発現を増強した。

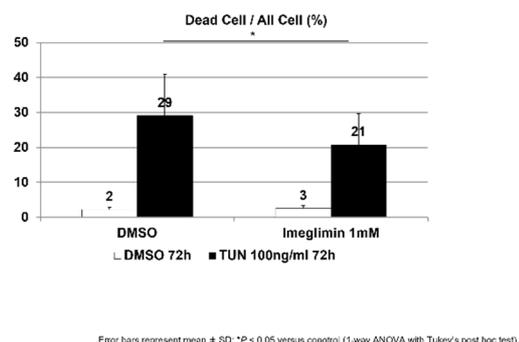
(5) ER ストレス関連疾患治療薬としての応

用を期待して、Imeglimin の甲状腺濾胞細胞における作用を調査したところ、同薬剤は PCCL3 細胞の主要な合成蛋白であるサイログロブリンの mRNA 発現量と蛋白合成・分泌量を共に増加させる一方で、同細胞を特徴づけるサイロペルオキシダーゼ (TPO) 及び PAX8 の mRNA 発現を抑制する(図3)ことが明らかとなった。すなわち、イメグリミンによる甲状腺濾胞細胞の保護作用は同細胞の蛋白合成・分泌機能改善と脱分化に関与しているものと推測された。

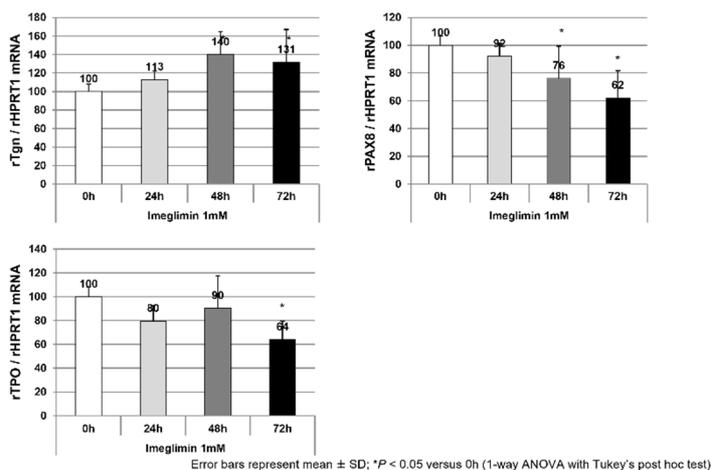
(図1) CIDE-A強制発現による細胞死に対するCIDE-C抑制の影響



(図2) イメグリミンによるERストレス関連細胞死の抑制



(図3) イメグリミンのTgn, TPO, PAX8 mRNA発現に対する影響



<引用文献>

1. Morishita Y, Kellogg AP, Larkin D, Chen W, Vadrevu S, Satin L, Liu M, Arvan P. " Cell death-associated lipid droplet protein CIDE-A is a noncanonical marker of endoplasmic reticulum stress" JCI Insight. 2021 Apr 8;6(7):e143980.
2. Morishita Y, Kabil O, Young KZ, Kellogg AP, Chang A, Arvan P. " Thyrocyte cell survival and adaptation to chronic endoplasmic reticulum stress due to misfolded thyroglobulin " J Biol Chem. 2020 May 15;295(20):6876-6887.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清瀬俊樹、森下啓明、速水智英、山田祐一郎、三浦絵美梨、姫野龍仁、近藤正樹、恒川 新、加藤義郎、中村二郎、神谷英紀
2. 発表標題 イメグリミンは甲状腺濾胞細胞のサイログロブリン分泌を促進し、小胞体ストレス関連細胞死を抑制す
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森下啓明
2. 発表標題 甲状腺濾胞細胞における新たな小胞体ストレス応答の解析
3. 学会等名 第66回日本甲状腺学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森下啓明、清瀬俊樹、速水智英、山田祐一郎、三浦絵美梨、姫野龍仁、近藤正樹、恒川 新、加藤義郎、中村二郎、神谷英紀
2. 発表標題 慢性小胞体ストレスにおける甲状腺細胞生存因子であるCIDE-Aの発現及び機能制御に関する検討
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下啓明、清瀬俊樹、速水智英、山田祐一郎、三浦絵美梨、姫野龍仁、近藤正樹、恒川 新、加藤義郎、中村二郎、神谷英紀
2. 発表標題 甲状腺濾胞細胞の小胞体ストレス関連細胞死におけるイメグリミンの効果
3. 学会等名 第65回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下啓明、Kabil, Omer、Kellogg, Aaron、神谷英紀、林良敬、中村二郎、Arvan, Peter
2. 発表標題 慢性小胞体ストレス下における甲状腺細胞生存機序の解析
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森下啓明、Larkin, Dennis、Kellogg, Aaron、山田祐一郎、三浦絵美梨、姫野龍仁、近藤正樹、恒川新、加藤義郎、中村二郎、Arvan, Peter、神谷英紀
2. 発表標題 慢性小胞体ストレス下の甲状腺細胞生存におけるCIDE-Aの関与
3. 学会等名 第64回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------