

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：14301
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23790722
研究課題名（和文） 脳機能障害におけるユビキチンリガーゼ HRD1 の発現量解析と 法医病態診断学への応用
研究課題名（英文） Expression analysis of ubiquitin ligase HRD1 in neurodegenerative disorders and application to forensic neuropathology
研究代表者 大村 友博（Omura Tomohiro） 京都大学・医学研究科・特定職員 研究者番号：00439035

研究成果の概要（和文）：HRD1 分子は蛋白質分解酵素であるが、神経変性疾患の発症に関与するといわれる。本研究では HRD1 が脳機能障害のマーカー分子となり得るか展望した。その結果、HRD1 とその安定化分子が脳機能障害モデルにおいて発現誘導されることが示唆された。さらに、抗てんかん薬ゾニサミドが HRD1 を活性化させることを見出し、脳機能障害モデルにおいて細胞死を抑制することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：HRD1 is reported to be involved in the pathogenesis of neurodegenerative disorders by its ubiquitin ligase activity. In the present study, we examine whether it is possible for HRD1 to be the marker of brain dysfunction. We found that HRD1 and related molecules are induced in the *in vitro* models of neurodegenerative disorders. Furthermore, we demonstrated that zonisamide, an antiepileptic agent, up-regulates HRD1 and suppresses neuronal cell death.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：法医学

キーワード：神経化学、小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

法医学実務において、認知・運動機能が低下していたと思われる剖検例に遭遇することは多い。脳機能低下の原因の一つとして服用薬物による影響が考えられ、剖検死体における対象薬物の血中濃度測定は、致死的不是にせよその因果関係を知る上で重要である。一方で、特に高齢者の中には老人性痴呆（認知症）や運動障害などの神経疾患を罹患している場合があるが、病理組織の観点だけでは剖検死体の生前の認知機能や運動機能を評価することは困難である。

これらの神経疾患の発症には、老化に伴う酸化ストレスの増加や遺伝的素因など多く

の要因が絡んでいるが、近年その発症原因の一つに小胞体ストレス（ER ストレス）誘発による神経細胞死が提唱されている。

ER ストレスとは、細胞に小胞体機能を障害するストレスが負荷されることで正常な蛋白質合成ができず、代わりに変性蛋白質が細胞内に蓄積してしまう状態を指し、この状態が続くと細胞はアポトーシスを起こして死に至る。このとき細胞は変性蛋白質の蓄積によって起こる細胞死に対抗するため、様々な防御機構を発動させるが、その一つが小胞体に存在するユビキチンリガーゼの活性化により変性蛋白質を分解・除去する機構である。

研究代表者はこれまでユビキチンリガー

ぜ、HRD1 分子と神経疾患、特に運動障害との関連性について研究を行ってきた。我々は HRD1 分子が認知機能に関与する部位である大脳皮質や海馬・歯状回に発現していること、運動機能に関与する部位である黒質や線条体、小脳プルキンエ細胞の神経細胞に発現していること、そして HRD1 分子が家族性パーキンソン病原因蛋白質の一つ、Pael 受容体を分解し、その蓄積によって起こる細胞死を保護することを見出している。また、認知症患者の大脳皮質における HRD1 分子の発現量が低下していることも報告されており、運動障害の患者においても同様のことが起こっている可能性が極めて高い。

これらの知見から、ユビキチンリガーゼ HRD1 分子の発現量が低下することによって小胞体に変性蛋白質が蓄積して ER ストレスを惹起し、神経細胞死を誘発して認知障害や運動障害を引き起こすのではないかと考えられる。そのため HRD1 分子は脳機能障害における病態の分子マーカーとなり得るのではないかと、さらには薬物治療の新たなターゲットとなり得るのではないかと考えられている。

2. 研究の目的

本研究では以下の研究を通して HRD1 分子が脳機能障害においてどのように関与しているかを検討し、運動機能や認知機能を評価する指標の一つとなりうるか否かを展望することを目的とした。さらに、HRD 分子が新たな薬物治療のターゲットとなり得るのではないかと仮定し、HRD1 分子を誘導する薬物を探索・検討することとした。

- (1) ユビキチンリガーゼ HRD1 が認知機能・運動機能障害モデルにおいて誘導されるか否か解析し、さらにこれらが神経細胞保護効果を有するか否かを検討する。
- (2) HRD 分子の発現を抑制した時、ER ストレスマーカーが誘導され、認知機能・運動機能障害モデルで起こる細胞死が増強するか否かを検討する。
- (3) ER ストレスとならずに HRD1 分子のみを活性化する薬物をスクリーニングし、これら脳機能障害モデルにおいて細胞保護効果を示すか否かを検討する。

3. 研究の方法

- (1) 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)、6-hydroxydopamine (6-OHDA) などのパーキンソン病発症試薬を投与したドパミン神経細胞 SH-SY5Y を用いて、CHOP や GRP78、94 などの ER ストレス応答分子が誘導されることを確認するとともに、これら脳機能障害モデル細胞におい

て HRD1 分子などのユビキチンリガーゼの発現量が変化するか否かについて、mRNA についてはリアルタイム PCR 法により、蛋白質レベルの発現量についてはウェスタンブロット法を用いて検討した。

- (2) HRD 分子を RNA 干渉によって発現抑制させることで、脳機能障害モデル細胞における神経細胞死が亢進するか否か、Caspase-3 の活性化や MTT assay 法を用いて検討した。
- (3) HRD 分子の発現を誘導する薬物をスクリーニングした。具体的には NSAIDs (特に COX-2 阻害薬) や抗てんかん薬など、疫学的に脳機能障害を改善することが報告されている薬物を SH-SY5Y 細胞に添加し、HRD1 分子の発現量が変化するか否かについて、リアルタイム PCR 法およびウェスタンブロット法を用いて検討した。その後 ER ストレス誘発細胞死を抑制するか否か、MTT assay 法を用いて検討した。

4. 研究成果

- (1) SH-SY5Y 細胞に 6-OHDA を用いてパーキンソン病モデル細胞を作製し、mRNA 量と蛋白質発現量をリアルタイム PCR 法およびウェスタンブロット法により検討したところ、ER ストレスの指標である CHOP、GRP78、94 の発現誘導を確認すると共に、ユビキチンリガーゼ HRD1 の発現が誘導されることが判明した。さらに HRD1 安定化分子である SEL1L についても発現が誘導されることが明らかとなった。そしてこれら分子の上流にある ATF6、XBP1 が変化するか否かについても検討したところ、ATF6、XBP1 が活性化することが判明した。これらの結果から、6-OHDA 刺激により ER ストレス反応が惹起され、ATF6、XBP1 経路を介して HRD1、SEL1L 分子を誘導することが明らかとなった。今後は *in vivo* のモデルにおいて HRD1 の発現量が変化するか否か検討し、脳機能障害の分子マーカーとなり得るか詳細に検討する必要があると考えられた。
- (2) HRD1 分子が 6-OHDA 誘発細胞死に影響を与えるか否かについて検証した。RNA 干渉により HRD1 を発現抑制した SH-SY5Y 細胞に 6-OHDA で刺激し、細胞死を評価したところ、6-OHDA 誘発細胞死が増加することが示唆された。本結果より、ユビキチンリガーゼ HRD1 は神経細胞保護効果を有することが示唆された。
- (3) SH-SY5Y 細胞を用いて HRD1 分子の発現を誘導する薬物をスクリーニングした結果、抗てんかん薬のひとつであるゾニ

サミドを見出した。ゾニサミドは HRD1 の蛋白質量は増加させるが、mRNA 量に影響を与えなかったため、その誘導機構を詳細に検討したところ、ゾニサミドは HRD1 の安定化分子である SEL1L の発現を誘導させることが判明した。さらに、RNA 干渉により SEL1L の発現を抑制すると、ゾニサミドによる HRD1 の蛋白質量増加も抑制されたことから、ゾニサミドは SEL1L を誘導することで、HRD1 分子を安定化させ、HRD1 蛋白質量を増加させることが示唆された。一方で、ゾニサミドは ER ストレス応答分子である GRP78、94、CHOP、また別の小胞体関連ユビキチンリガーゼである Parkin には影響を与えないことが示唆された。そして、ゾニサミドは 6-OHDA や ER ストレス刺激によって起こる細胞死を抑制することが示唆された。ゾニサミドは近年、パーキンソン病治療薬として本邦で使用されているが、ゾニサミドはパーキンソン病だけでなく、ER ストレスが病因の一つと考えられる他の神経変性疾患にも有用であることが示唆され、今後検討すべき課題であると考えられた。

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 6 件)

- ① Omura T, Kaneko M, Okuma Y, Matsubara K, Nomura Y.: "Endoplasmic reticulum stress and Parkinson's disease: The role of HRD1 in averting apoptosis in neurodegenerative disease", *Oxid Med Cell Longev*. Volume 2013, Article ID: 239854, 7 pages (2013), 査読有
DOI: 10.1155/2013/239854
- ② 田崎嘉一, 山本譲, 大村友博, 坂口智己, 木村周古, 大滝康一, 小野尚志, 須野学, 浅利優, 大久保知子, 野田敏宏, 栗屋敏雄, 清水恵子, 松原和夫: 「メロキシカムは、マウスパーキンソン病モデルにおいて、Akt シグナル維持により運動障害とドパミン神経変性を改善する」北海道医誌 88 (1), 45 (2013), 査読有
- ③ 大村友博, 浅利優, 山本譲, 神山直也, 岡久美子, 保科千里, 間瀬田千香暁, 栗屋敏雄, 田崎嘉一, 塩野寛, 清水恵子, 松原和夫: 「ゾニサミドによる HRD1 の増加が、神経細胞 SH-SY5Y における小胞体ストレス誘発細胞死とカスパーゼ-3 の活性化を抑制する」北海道医誌 87 (6), 251 (2012), 査読有
- ④ Tasaki Y, Yamamoto J, Omura T,

Sakaguchi T, Kimura N, Ohtaki K, Ono T, Suno M, Asari M, Ohkubo T, Noda T, Awaya T, Shimizu K, Matsubara K.: "Meloxicam ameliorates motor dysfunction and dopaminergic neurodegeneration by maintaining Akt-signaling in a mouse Parkinson's disease model", *Neurosci. Lett*. 521: 15-19 (2012), 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2012.05.045

- ⑤ Omura T, Asari M, Yamamoto J, Kamiyama N, Oka K, Hoshina C, Maseda C, Awaya T, Tasaki Y, Shiono H, Shimizu K, Matsubara K.: "HRD1 levels increased by zonisamide prevented cell death and caspase-3 activation caused by endoplasmic reticulum stress in SH-SY5Y cells", *J. Mol. Neurosci*. 46: 527-535 (2012), 査読有
DOI: 10.1007/s12031-011-9638-8
- ⑥ Tasaki Y, Yamamoto J, Omura T, Noda T, Kamiyama N, Yoshida K, Satomi M, Sakaguchi T, Asari M, Ohkubo T, Shimizu K, Matsubara K.: "Oxicam structure in non-steroidal anti-inflammatory drugs is essential to exhibit Akt-mediated neuroprotection against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced cytotoxicity", *Eur. J. Pharmacol*. 676: 57-63. (2012), 査読有
DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.11.046

[学会発表] (計 5 件)

- ① 田崎嘉一, 吉田光一, 小野尚志, 山本譲, 坂口智己, 飯田慎也, 大滝康一, 神山直也, 木村周古, 大久保知子, 野田敏宏, 大村友博, 栗屋敏雄, 松原和夫: 「Myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) は SH-SY5Y 細胞の MPP+誘発アポトーシスに対して保護作用を持つ」日本薬学会第 133 年会, 横浜 (2013 年 3 月)
- ② 田崎嘉一, 山本譲, 坂口智己, 野田敏宏, 大村友博, 神山直也, 吉田光一, 大久保知子, 松原和夫: 「オキシカム系 NSAIDs は、MPTP 反復投与パーキンソン病モデルにおいて黒質線条体神経を保護し、行動異常を改善する」日本薬学会第 132 年会, 札幌 (2012 年 3 月)
- ③ Tasaki Y, Yamamoto J, Ohkubo T, Noda T, Omura T, Ono T, Kimura N, Suno M, Sakaguchi T, Matsubara K.: "Oxicam non-steroidal anti-inflammatory drugs ameliorate motor dysfunction and dopaminergic degeneration by maintaining Akt-signaling in a mouse Parkinson's disease model", *Neuroscience 2012*, New Orleans, USA (October 2012)

- ④ Tasaki Y, Yamamoto J, Omura T, Noda T, Kamiyama N, Yoshida K, Satomi M, Sakaguchi T, Asari M, Ohkubo T, Shimizu K, Matsubara K.: "Structural specificity of Akt-mediated neuroprotection by oxycam non-steroidal anti-inflammatory drugs against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced cell death", WFN World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders 2011, Shanghai, China (December 2011)
- ⑤ Omura T, Asari M, Tasaki Y, Hoshina C, Yamamoto J, Kamiyama N, Oka K, Matsuda T, Kitamura A, Maseda C, Shimizu K, Matsubara K.: "Zonisamide increases human HRD1 protein resulting in the repression of caspase-3 activation and cell death caused by the ER stress in SH-SY5Y cells", Neuroscience 2011, Washington DC, USA (November 2011)

[図書] (計1件)

- ① 大村友博, 松原和夫: 「A) 精神・脳神経系疾患 3章. パーキンソン病」, 薬剤師のための疾患別薬物療法 II. 精神・脳神経疾患／消化器疾患, p36-p52 (2011) (編) 日本医療薬学会 [南江堂]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大村 友博 (Omura Tomohiro)
京都大学・医学研究科・特定職員
研究者番号: 00439035