

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659024

研究課題名(和文)新規シグマ-1受容体の機能解明と神経変性疾患治療への応用

研究課題名(英文)Novel function of sigma-1 receptor and therapeutics strategy for neurodegenerative disorders

研究代表者

福永 浩司 (FUKUNAGA, KOHJI)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90136721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動神経障害を伴う神経変性疾患である。私達はALSの原因遺伝子シグマ-1受容体のE102Q変異体が神経変性を誘導する機序を解析し、神経変性を抑制する候補化合物を探索した。シグマ-1受容体(E102Q)変異体を発現した神経細胞ではミトコンドリアATP産生が低下し、小胞体ストレスが加わるとミトコンドリア機能低下による神経細胞死が誘導された。ATP産生を促進するために、メチルピルビン酸を処置するとミトコンドリアATP産生が回復し、神経細胞死も抑制された。シグマ-1受容体(E102Q)変異体によるALSの障害はメチルピルビン酸により、治療できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disorder caused by motor neuron dysfunction. Recently, a E102Q mutation in the chaperone protein sigma-1 receptor (R) was discovered in familial ALS patients. Here, we address mechanisms underlying neurodegeneration caused by this mutation using overexpression analysis in neuro2A cells. Sigma-1R(E102Q) overexpression promoted its dissociation from the endoplasmic reticulum (ER) membrane and its cytoplasmic aggregation, and in turn impaired mitochondrial ATP production. Under ER stress condition, sigma-1R(E102Q) overexpression aggravated mitochondrial damage, thereby causing apoptosis. The enhancement of ATP production by methyl pyruvate treatment rescued mitochondrial damage induced by sigma-1R(E102Q) overexpression. Taken together, phenotypes observed in sigma-1R(E102Q)-overexpressing cells suggest that ATP supplementation by methyl pyruvate is potential the therapeutic strategy to treat ALS caused by sigma-1R mutations.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 シグマ-1受容体 ミトコンドリア障害 小胞体ストレス メチルピルビン酸 ALS治療薬

1. 研究開始当初の背景

Sigma-1 受容体 (Sigma-1R) はオピオイド受容体として分類されていたが、オピオイド類は結合せず、生理機能の不明なオーファン受容体である。幻覚作用のある dimethyltryptamine や neurosteroid である dehydroepiandrosterone (DHEA) が Sigma-1R の内因性リガンドとして同定された。さらに、fluvoxamine などの selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) 等の抗うつ薬が Sigma-1R に結合することから、Sigma-1R の神経保護作用、神経新生作用への関与が注目されている。実際に、Sigma-1R アゴニストである SA4503 は抗うつ薬として、臨床試験が進められている。私達は心肥大モデルのマウスとラットを用いて fluvoxamine が直接、心筋細胞の Sigma-1R に作用し、心筋肥大及び心筋障害を抑制することを証明した (Eur J Pharmacol, 2011)。

2. 研究の目的

私達は Sigma-1R に新しいサブライズバリアント、Sigma-1short 受容体 (Sigma-1SR) をクローニングし、脳で発現が高いことを見出した。さらに、Sigma-1SR は Sigma-1R の機能を阻害し、小胞体ストレス下では細胞死を誘導することを見出した。本研究では、Sigma-1SR の神経細胞での発現の機能的な役割を明らかにする。ヒトの Sigma-1R 遺伝子変異は前頭側頭葉変性症及び若年性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因となる。しかし、Sigma-1R の遺伝子変異が神経変性を起こすメカニズムは不明である。本研究ではヒトで見つかった Sigma-1R 遺伝子変異 (E102Q) による神経変性が神経細胞死を惹起するメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

Neuro2A 細胞に Sigma-1R と Sigma-1SR を過剰発現し、サポニン処理して細胞の膜透過性を高めて、IP₃ 刺激を行う。ミトコンドリアに集積するカルシウム指示薬、**retimetric-perican-mito** (理研、宮脇博士から供与) を発現させ、ミトコンドリアへの Ca²⁺ 流入を測定する。次に、Sigma-1R の IP₃ 受容体との結合に対する Sigma-1SR の結合阻害について解析する。Neuro2A 細胞に Sigma-1R (E102Q) を発現して、凝集体の形成機構と小胞体ストレス存在下での神経細胞死について検討する。

4. 研究成果

コントロールの neuro2A 細胞に比較して、Sigma-1R 発現細胞では IP₃ 受容体刺激依存性のミトコンドリア Ca²⁺ 流入が促進される。一方、Sigma-1SR 発現細胞では抑

制された。さらに、両方を発現させると Sigma-1R による Ca²⁺ 流入促進は Sigma-1SR 共発現により阻害された。Sigma-1R は IP₃ 受容体と複合体を形成するのに対して、Sigma-1SR は複合体を形成しなかった。さらに、Sigma-1SR は Sigma-1R と結合することから、両者のヘテロ複合体の形成は小胞体-ミトコンドリアカルシウム輸送を阻害すると考えられる。次に、Sigma-1R (E102Q) 変異体を neuro2A 細胞に過剰発現すると、IP₃ 受容体依存性のミトコンドリア流入が抑制された。同時に ATP 産生も低下した。この ATP 産生抑制は小胞体ストレス下に顕著であり、最終的にアポトーシスが誘導した。TCA 回路の基質であるメチルピルビン酸を前処置すると、ATP 産生低下は改善され、アポトーシスも有意に抑制された。以上の結果により、Sigma-1R は小胞体-ミトコンドリアカルシウム輸送と ATP 産生に重要であり、Sigma-1R (E102Q) 変異体ではこの機能が著しく障害されることが解った。さらに、メチルピルビン酸投与はこれらのミトコンドリア障害を改善することを明らかにした。

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 31 件) 全て査読有

1. Tagashira H, Bhuiyan MS, Shioda N, Fukunaga K. Fluvoxamine rescues mitochondrial Ca²⁺ transport and ATP production through σ(1)-receptor in hypertrophic cardiomyocytes. *Life Sci.* 2014;95(2):89-100. doi: 10.1016/j.lfs.2013.12.019.

2. Tao RR, Wang H, Hong LJ, Huang JY, Lu YM, Liao MH, Ye WF, Lu NN, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, Shoji I, Wilcox CS, Lai EY, Han F. Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. *Antioxid Redox Signal.* 2014 in press. doi:10.1089/ars.2013.5381.

3. Yabuki Y, Ohizumi Y, Yokosuka A, Mimaki Y, Fukunaga K. Nobiletin treatment improves motor and cognitive deficits seen in MPTP-induced Parkinson model mice. *Neuroscience.* 2014;259:126-41. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.11.051.

4. Tian Y, Yabuki Y, Moriguchi S, Fukunaga K, Mao PJ, Hong LJ, Lu YM, Wang R, Ahmed MM, Liao MH, Huang JY, Zhang RT, Zhou TY, Long S, Han F. Melatonin reverses the decreases in hippocampal protein serine/threonine kinases observed in an animal model of autism. *J Pineal Res.* 2014;56(1):1-11. doi: 10.1111/jpi.12081.

5. Moriguchi S, Tagashira H, Sasaki Y, Yeh JZ, Sakagami H, Narahashi T, Fukunaga K. CaMKII

- activity is essential for improvement of memory-related behaviors by chronic rivastigmine treatment. *J Neurochem.* 2014;128(6):927-37. doi: 10.1111/jnc.12510.
6. Lu YM, Huang JY, Wang H, Lou XF, Liao MH, Hong LJ, Tao RR, Ahmed MM, Shan CL, Wang XL, Fukunaga K, Du YZ, Han F. Targeted therapy of brain ischaemia using Fas ligand antibody conjugated PEG-lipid nanoparticles. *Biomaterials.* 2014;35(1):530-7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.093.
7. Tagashira H, Matsumoto T, Taguchi K, Zhang C, Han F, Ishida K, Nemoto S, Kobayashi T, Fukunaga K. Vascular endothelial σ 1-receptor stimulation with SA4503 rescues aortic relaxation via Akt/eNOS signaling in ovariectomized rats with aortic banding. *Circ J.* 2013;77(11):2831-40. doi: 10.1253/circj.CJ-13-0256.
8. Tagashira H, Bhuiyan MS, Fukunaga K. Diverse regulation of IP3 and ryanodine receptors by pentazocine through σ 1-receptor in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;305(8):H1201-12. doi: 10.1152/ajpheart.00300.2013.
9. Huang JY, Lu YM, Wang H, Liu J, Liao MH, Hong LJ, Tao RR, Ahmed MM, Liu P, Liu SS, Fukunaga K, Du YZ, Han F. The effect of lipid nanoparticle PEGylation on neuroinflammatory response in mouse brain. *Biomaterials.* 2013;34(32):7960-70. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.009.
10. Yabuki Y, Fukunaga K. Oral administration of glutathione improves memory deficits following transient brain ischemia by reducing brain oxidative stress. *Neuroscience.* 2013;250:394-407. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.07.017.
11. Katsushima Y, Sato T, Yamada C, Ito M, Suzuki Y, Ogawa E, Sukegawa I, Sukegawa J, Fukunaga K, Yanagisawa T. Interaction of PICK1 with C-terminus of growth hormone-releasing hormone receptor (GHRHR) modulates trafficking and signal transduction of human GHRHR. *J Pharmacol Sci.* 2013;122(3):193-204. doi: 10.1254/jphs.12287FP.
12. Moriguchi S, Tanaka T, Narahashi T, Fukunaga K. Novel nootropic drug sunifiram enhances hippocampal synaptic efficacy via glycine-binding site of N-methyl-D-aspartate receptor. *Hippocampus.* 2013;23(10):942-51. doi: 10.1002/hipo.22150.
13. Yabuki Y, Shioda N, Yamamoto Y, Shigano M, Kumagai K, Morita M, Fukunaga K. Oral L-citrulline administration improves memory deficits following transient brain ischemia through cerebrovascular protection. *Brain Res.* 2013;1520:157-67. doi: 10.1016/j.brainres.2013.05.011.
14. Yabuki Y, Nakagawasai O, Moriguchi S, Shioda N, Onogi H, Tan-No K, Tadano T, Fukunaga K. Decreased CaMKII and PKC activities in specific brain regions are associated with cognitive impairment in neonatal ventral hippocampus-lesioned rats. *Neuroscience.* 2013;234:103-15. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.048.
15. Moriguchi S, Shinoda Y, Yamamoto Y, Sasaki Y, Miyajima K, Tagashira H, Fukunaga K. Stimulation of the sigma-1 receptor by DHEA enhances synaptic efficacy and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of olfactory bulbectomized mice. *PLoS One.* 2013;8(4):E60863. doi: 10.1371/journal.pone.0060863.
16. Tagashira H, Zhang C, Lu YM, Hasegawa H, Kanai H, Han F, Fukunaga K. Stimulation of σ 1-receptor restores abnormal mitochondrial Ca(2+) mobilization and ATP production following cardiac hypertrophy. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(4):3082-94. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.12.029.
17. Bhuiyan MS, Tagashira H, Fukunaga K. Crucial interactions between selective serotonin uptake inhibitors and sigma-1 receptor in heart failure. *J Pharmacol Sci.* 2013;121:177-84. doi: 10.1254/jphs.12R13CP.
18. Yabuki Y, Nakagawasai O, Tadano T, Fukunaga K. [Imaging monitoring method of CaMKII activity by immunohistochemical analysis in schizophrenic model rats]. *Yakugaku Zasshi.* 2013;133:501-6. doi: 10.1248/yakushi.12-00278-3.
19. Aoki K, Yokosuka A, Mimaki Y, Fukunaga K, Yamakuni T. Nobiletin induces inhibitions of Ras activity and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling to suppress cell proliferation in C6 rat glioma cells. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(4):540-7. doi: 10.1002/hipo.22150.
20. Nguyen AT, Nishijo M, Hori E, Nguyen NM, Pham TT, Fukunaga K, Nakagawa H, Tran AH, Nishijo H. Influence of Maternal Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on Socioemotional Behaviors in Offspring Rats. *Environ Health Insights.* 2013;7:1-14. doi: 10.4137/EHI.S10346.
21. Liao MH, Xiang YC, Huang JY, Tao RR, Tian Y, Ye WF, Zhang GS, Lu YM, Ahmed MM, Liu ZR, Fukunaga K, Han F. The Disturbance of Hippocampal CaMKII/PKA/PKC Phosphorylation in Early Experimental Diabetes Mellitus. *CNS Neurosci Ther.* 2013;19(5):329-36. doi: 10.1111/cns.12084.
22. Yamamoto Y, Shioda N, Han F, Moriguchi S, Fukunaga K. The Novel Cognitive Enhancer ST101 Enhances Acetylcholine Release in Mouse Dorsal Hippocampus Through T-type Voltage-Gated Calcium Channel Stimulation. *J Pharmacol Sci.* 2013;121(3):212-26. doi:

10.1254/phs.12233FP.

23. Moriguchi S, Tanaka T, Tagashira H, Narahashi T, Fukunaga K. Novel nootropic drug sunifiram improves cognitive deficits via CaM kinase II and protein kinase C activation in olfactory bulbectomized mice. *Behav Brain Res*. 2013;242:150-7. doi: 10.1016/j.bbr.2012.12.054.

24. Zhang GS, Tian Y, Huang JY, Tao RR, Liao MH, Lu YM, Ye WF, Wang R, Fukunaga K, Lou YJ, Han F. The γ -secretase blocker DAPT reduces the permeability of the blood-brain barrier by decreasing the ubiquitination and degradation of occludin during permanent brain ischemia. *CNS Neurosci Ther*. 2013;19(1):53-60. doi: 10.1111/cns.12032.

25. Tao RR, Huang JY, Shao XJ, Ye WF, Tian Y, Liao MH, Fukunaga K, Lou YJ, Han F, Lu YM. Ischemic injury promotes Keap1 nitration and disturbance of antioxidative responses in endothelial cells: a potential vasoprotective effect of melatonin. *J Pineal Res*. 2013;54(3):271-81. doi: 10.1111/jpi.12009.

26. Bhuiyan MS, Tagashira H, Fukunaga K. Crucial interactions between selective serotonin uptake inhibitors and sigma-1 receptor in heart failure. *J Pharmacol Sci*. 2013;121(3):177-84. doi: 10.1254/jphs.12R13CP.

27. Yabuki Y, Nakagawasai O, Tadano T, Fukunaga K. Imaging monitoring method of CaMKII activity by immunohistochemical analysis in schizophrenic model rats. *Yakugaku Zasshi*. 2013;133(5):501-6. doi: 10.1248/yakushi.12-00278-3.

28. Shinoda Y, Fujita K, Saito S, Matsui H, Kanto Y, Nagaura Y, Fukunaga K, Tamura S, Kobayashi T. Acyl-CoA binding domain containing 3 (ACBD3) recruits the protein phosphatase PPM1L to ER-Golgi membrane contact sites. *FEBS Lett*. 2012;586(19):3024-9. doi: 10.1016/j.febslet.2012.

29. Lu YM, Tao RR, Huang JY, Li LT, Liao MH, Li XM, Fukunaga K, Hong ZH, Han F. P2X(7) signaling promotes microsphere embolism-triggered microglia activation by maintaining elevation of Fas ligand. *J Neuroinflammation*. 2012;9:172. doi: 10.1186/1742-2094-9-172.

30. Shioda N, Ishikawa K, Tagashira H, Ishizuka T, Yawo H, Fukunaga K. Expression of a truncated form of the endoplasmic reticulum chaperone protein, σ 1 receptor, promotes mitochondrial energy depletion and apoptosis. *J Biol Chem*. 2012;287(28):23318-31. doi: 10.1074/jbc.M112.349142.

31. Moriguchi S, Shioda N, Yamamoto Y, Tagashira H, Fukunaga K. The T-type voltage-gated calcium channel as a molecular target of the novel cognitive enhancer ST101: enhancement of long-term potentiation and

CaMKII autophosphorylation in rat cortical slices. *J Neurochem*. 2012;121(1):44-53. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07667.x.

〔学会発表〕(計 22 件)

1. Kohji Fukunaga: “The memory improvement by T-type Ca^{2+} channel stimulation” 第 87 回日本薬理学会年会 (平成 26 年 3 月 19 ~ 21 日、仙台)

2. Norifumi Shioda, Masahiro Sawai, Misaki Onozato, Kouya Yamaguchi and Kohji Fukunaga: “Molecular mechanisms of synapse pathology in ATR-X syndrome” 第 87 回日本薬理学会年会 (平成 26 年 3 月 19 ~ 21 日、仙台)

3. Kohji Fukunaga: “Synergic induction of cardiac hypertrophy by CaMKII and calcineurin activities” The 2nd Taiwan-Japan Bilateral Conference on Protein phosphatases (平成 25 年 11 月 27 ~ 30 日、台湾。竹南)

4. 福永浩司: “神経変性疾患におけるニコチン受容体を介する神経保護” 喫煙科学研究財団シンポジウム 2013「脳内ニコチン受容体と神経保護・再生」(平成 25 年 11 月 15 日、東京)

5. Kohji Fukunaga, Hideaki Tagashira and Norifumi Shioda: “Sigma-1 receptor mutation in Amyotrophic Lateral Sclerosis causes neuronal inclusion of TDP-43” 43th Society for Neuroscience; Annual Meeting (平成 25 年 11 月 9 ~ 13 日、アメリカ・サンディエゴ)

6. Norifumi Shioda, Yasushi Yabuki, Yuji Owada and Kohji Fukunaga: “FABP3 expression aggravates neuronal α -synuclein accumulation in Parkinson's model mice” 43th Society for Neuroscience; Annual Meeting (平成 25 年 11 月 9 ~ 13 日、アメリカ・サンディエゴ)

7. Kohji Fukunaga and Yasushi Yabuki: “Neurochemical methods for evaluating the cognition-enhancing drugs using schizophrenia model rats.” The 2nd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity (平成 25 年 10 月 28 ~ 29 日、横浜)

8. 福永浩司: “循環器疾患に対するフルボキサミンの有用性” 第 43 回日本神経精神薬理学会 (平成 25 年 10 月 24 ~ 26 日、沖縄)

9. 福永浩司: “CaM kinase II 研究から精神疾患を考える” 第 26 回鹿児島ブレインサイエンスカンファレンス (平成 25 年 10 月 22 日、鹿児島) (招待講演)

10. Kohji Fukunaga: “A mutation of sigma-1 receptor associated with ALS causes neuronal mitochondrial

dysfunction” The 11th Korea-Japan Joint Symposium of Brain Sciences and Cardiac and Smooth Muscle Sciences (平成 25 年 9 月 4 ~ 7 日、浜松)(招待講演)

11. 福永浩司: “筋萎縮性側索硬化症 ALS におけるミトコンドリア障害と創薬ターゲット” 生体機能と創薬シンポジウム 2013 (平成 25 年 8 月 29 ~ 30 日、福岡)

12. Kohji Fukunaga: “Impact of sigma-1 receptor in cardiovascular and neurodegenerative diseases” The 12th Meeting of the Asia Pacific Federation of Pharmacologists (MAPFP) (平成 25 年 7 月 9 ~ 13 日、中国・上海)(招待講演)

13. Kohji Fukunaga, Hideaki Tagashira and Akikazu Kakei: “Development of potent T-VGCC activator SAK3 as Alzheimer therapeutics” The 11th International Conference on Alzheimer’s and Parkinson’s diseases (平成 25 年 5 月 6-10 日、イタリア・フローレンス)

14. 福永浩司、矢吹梯、大泉康: “Nobiletin improves cognitive impairment in Parkinson model mice” 第 86 回日本薬理学会年会 (平成 25 年 3 月 21 ~ 23 日、福岡)

15. 福永浩司: “Clinical implication of sigma-1 receptor ligands in neurodegenerative disease therapy” 第 86 回日本薬理学会年会 (平成 25 年 3 月 21 ~ 23 日、福岡)

16. Norifumi Shioda, Masahiro Sawai and Kohji Fukunaga: “Protein phosphatase-1 regulates nuclear translocation of CaMKII 3” 10th International Conference on Protein Phosphatase (平成 25 年 2 月 7 ~ 9 日、東京)

17. Kohji Fukunaga: “Novel therapeutic targets in Alzheimer disease” The 1th International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity (平成 24 年 10 月 31 日 ~ 11 月 1 日、京都)(招待講演)

18. 福永浩司、山本由似: “新規アルツハイマー治療候補薬 ST101 による認知機能改善のメカニズム” 第 42 回日本神経精神薬理学会(平成 24 年 10 月 18 ~ 20 日、福岡)

19. 塩田倫史、福永浩司: “神経細胞死における新規シグマ-1 受容体スプライスバリエーションの機能的役割” 第 39 回日本脳科学会(平成 24 年 10 月 6 ~ 7 日、福岡)

20. 福永浩司、田頭秀章、塩田倫史: “Sigma-1 受容体の構造と心臓機能” 生体機能と創薬シンポジウム 2012(平成 24 年 8 月 30 ~ 31 日、神戸)

21. Kohji Fukunaga and Hideaki Tagashira: “The mitochondrial Ca²⁺ transport and ATP production through sigma-1 receptor in heart” Basic Cardiovascular Sciences 2012 Scientific

Sessions(平成 24 年 7 月 23 ~ 27 日、アメリカ・ニューオーリンズ)

22. Kohji Fukunaga, Yui Yamamoto and Shigeki Moriguchi: “Novel Alzheimer’s therapeutics, ST101 enhances acetylcholine release through T-type voltage-gated calcium channel” Alzheimer’s Association of International Conference (平成 24 年 7 月 14 ~ 19 日、カナダ・バンクーバー)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等:
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~yakuri/yakuri-j.shtml>:

6. 研究組織

(1) 研究代表者
福永 浩司 (FUKUNAGA KOHJI)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 90136721

(2) 研究分担者
塩田 倫史 (SHIODA NORIFUMI)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 00374950

(3) 連携研究者 ()
研究者番号: