

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860112

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼの発現量を指標とした脳機能評価法の確立と薬物治療への応用

研究課題名(英文) Establishment of a method for the assessment of brain function measuring the expression level of ubiquitin ligase and its application for pharmacotherapeutics

研究代表者

大村 友博(Omura, Tomohiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00439035

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)：脳機能障害において、マーカー分子の発現量測定から機能障害の程度を評価できれば、臨床において有用なツールとなり得る。そこでパーキンソン病モデルを用いて脳機能障害に関与すると考えられるユビキチンリガーゼHRD1及び安定化分子SEL1Lについて機能解析を行った。パーキンソン病モデルにおいてHRD1及びSEL1Lの発現量を検討したところ、mRNAおよび蛋白質レベルの発現上昇を見出し、これらの分子がパーキンソン病の疾患マーカーの一つとなり得る可能性が示唆された。また、HRD1及びSEL1Lが協調的に神経細胞死抑制に関与することが示唆され、パーキンソン病の新たな治療ターゲットとなり得る可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：It is very useful if we can objectively assess brain function through the measurement of marker proteins. I therefore analyze the function of ubiquitin ligase HRD1 and SEL1L, a HRD1 stabilizer, related to neurodegenerative diseases using Parkinson's disease (PD) model cells. We confirmed that the mRNA and protein levels of HRD1 or SEL1L are upregulated in the PD model, indicating that it is possible that these molecules might be disease markers in PD. Moreover, HRD1 and SEL1L coordinated to suppress neuronal cell death in PD model, suggesting that the HRD1-SEL1L complex may potentially be one of the novel therapeutic targets in PD.

研究分野：神経化学

キーワード：神経変性疾患 HRD1 SEL1L ユビキチンリガーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の到来とともに、認知機能や運動機能が低下している高齢者が増加傾向にあり、その中には老人性痴呆や運動障害などの神経疾患を罹患している場合がある。これら神経疾患の診断・評価法として、画像診断や問診・日常生活動作による評価法があるが、認知機能や運動機能を客観的に評価することは難しい。

これらの神経疾患の発症には、酸化ストレス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誘発による神経細胞死が提唱されている。小胞体機能を低下させるストレスが細胞に負荷されると、正常な蛋白質合成が行われず、代わりに変性蛋白質が細胞内に蓄積してしまう。この状態を小胞体ストレスと呼び、この状態が長時間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、その一つが小胞体膜内外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(小胞体関連分解、ERAD)である。

申請者はこれまでユビキチンリガーゼ HRD1 と神経疾患、特に認知障害と運動障害との関連性について研究を行ってきた。申請者は HRD1 が脳内で認知や運動に関与する部位の神経細胞に発現していること、そして HRD1 が家族性パーキンソン病原因蛋白質の一つを分解し、その蓄積によって起こる細胞死を抑制することを報告している。一方、認知症患者の大脳皮質で HRD1 の発現量が低下していることも報告されており、運動障害を呈する患者においても HRD1 の発現量が低下していると考えられる。すなわち、HRD1 などのユビキチンリガーゼがこれら神経疾患発症に関与している可能性は極めて高い。

これらの知見から、HRD1 をはじめとするユビキチンリガーゼ群やその関連分子の発現量が変化することによって変性蛋白質が蓄積して小胞体ストレスを惹起し、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た。そこでこれまでの成果を発展させ、ユビキチンリガーゼやその関連分子の発現量を測定・解析することで、認知機能や運動機能を評価する指標の一つとなり得るのではないかと考えた。さらにこれらを応用することで新たな薬物治療を提案できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

以下の研究を通して、HRD1 をはじめとするユビキチンリガーゼ及びその関連分子が、パーキンソン病モデルにおいてどのように関与しているか検討し、運動機能を評価する指

標となり得るか検討した。

また、小胞体ストレスをターゲットとした薬物(治療薬)候補を探索し、これら分子との関連性を検討した

- (1) パーキンソン病モデル細胞を作出し、小胞体ストレスが起きているかどうか検討する。また、HRD1 および HRD1 の安定化分子と考えられる SEL1L が誘導されるか否か検討する。
- (2) HRD1 および SEL1L がパーキンソン病モデル細胞においてどのような役割を果たしているか検討する。
- (3) 我々は、オキシカム系 NSAIDs がパーキンソン病モデルにおいて神経細胞死抑制効果を示すことを既に報告しているが、小胞体ストレスとの関連性は不明である。そこで、これらの化合物による神経細胞保護作用と小胞体ストレスとの関連性について検討する。

## 3. 研究の方法

- (1) ドパミン神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞に 6-hydroxydopamine (6-OHDA) や 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) を添加することでパーキンソン病モデル細胞を作出した。その後 GRP78、94、eIF2 $\alpha$ 、CHOP などの小胞体ストレス関連分子の誘導について、qRT-PCR 法やウエスタンブロット法などを用いて検討した。合わせて HRD1 および SEL1L の発現量についても検討した。
- (2) HRD1 および SEL1L を過剰発現もしくは発現抑制した際に、パーキンソン病モデル細胞における神経細胞死に影響を与えるか否か、MTT assay 法などを用いて検討した。
- (3) パーキンソン病モデルにおいて、オキシカム系 NSAIDs が小胞体ストレス応答分子に影響を与えるか否か、qRT-PCR 法やウエスタンブロット法を用いて検討した。また、オキシカム系 NSAIDs が小胞体ストレスに対して細胞保護作用を示すか、および小胞体ストレス応答分子に影響を与えるか否か、MTT assay 法や qRT-PCR 法、ウエスタンブロット法などを用いて検討した。

## 4. 研究成果

- (1) パーキンソン病モデル細胞における HRD1 および SEL1L の関与  
6-OHDA および MPP<sup>+</sup> を添加した SH-SY5Y 細胞において、MTT assay 法により細胞死が起きていることを確認したうえで、パーキンソン病モデル細胞における小胞体ストレス関連分子について検討した。

その結果、6-OHDA および MPP<sup>+</sup>を添加した SH-SY5Y 細胞においては、eIF2 $\alpha$  や CHOP などの小胞体ストレス関連分子がそれぞれ誘導されるのを確認した。一方、GRP78、94 に関しては 6-OHDA を添加した細胞では誘導されたのに対し、MPP<sup>+</sup>を添加した細胞では誘導は認められなかった。

次に HRD1 および SEL1L が誘導されるか否か検討したところ、6-OHDA を添加した細胞においては HRD1 および SEL1L は mRNA および蛋白質レベルで誘導されたのに対し、MPP<sup>+</sup>を添加した細胞ではこれらの分子の発現誘導は確認されなかった。

6-OHDA は小胞体ストレスによって起こる Unfolded Protein Response (UPR) のシグナル分子である ATF6 経路、PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4-CHOP 経路、IRE1-XBP1 経路が全て誘導されるのに対し、MPP<sup>+</sup>は PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4-CHOP 経路のみ誘導されることが報告されている。そして GRP78、94 および SEL1L は ATF6 経路により誘導され、HRD1 は IRE1-XBP1 経路および ATF6 経路により誘導される。すなわち、6-OHDA と MPP<sup>+</sup>の UPR 応答に違いが生じたため、MPP<sup>+</sup>では HRD1 および SEL1L が誘導されなかったのではないかと推察される。以降、本検討では 6-OHDA を添加した細胞を使用した。

次に、HRD1 が 6-OHDA 誘発神経細胞死に対して細胞保護効果を示すかを検討するため、HRD1 を過剰発現した細胞を用いて検討したところ、HRD1 過剰発現細胞では 6-OHDA 誘発細胞死に対して細胞保護効果を示した。また、RNA 干渉により HRD1 の発現量を抑制したところ、6-OHDA 誘発細胞死が増強したことから、HRD1 は 6-OHDA 誘発細胞死に対して保護的に働く可能性が示唆された。

さらに、HRD1 安定化分子とされる SEL1L が 6-OHDA 誘発細胞死に対してどのように影響するか検討した。SEL1L を RNA 干渉により発現抑制したところ、HRD1 の発現量は低下した。さらにこの時、6-OHDA 誘発細胞死は増強し、その影響は HRD1 を発現抑制したときよりも大きいことが示唆された。

SEL1L は、変性蛋白質をリクルートする ERAD 関連分子 OS-9 等と複合体を形成し、HRD1 への変性蛋白質の橋渡しを行うことが報告されている。すなわち、SEL1L の発現抑制により HRD1 の発現量低下だけでなく、変性蛋白質をリクルートする機構も破綻することで ERAD 機能がさらに低下し、HRD1 の発現抑制時よりも強く 6-OHDA 誘発細胞死が惹起された可能性が示唆された。OS-9 や HRD1-SEL1L 複合体との関連性については、今後更なる検証が必要であると考えられた。

以上のことから、6-OHDA を添加したパーキンソン病モデル細胞において、HRD1 および SEL1L はパーキンソン病の疾患マーカーの候補となり得る可能性が示唆された。また、6-OHDA 誘発神経細胞死に対して、HRD1-SEL1L 複合体は協調して細胞保護効果を示すことが示唆された。

MPP<sup>+</sup>と 6-OHDA では前述のとおり神経毒としての作用メカニズムが異なるため、MPP<sup>+</sup>曝露では HRD1、SEL1L に対する影響は認められなかったと考えられる。しかし孤発性パーキンソン病の場合、家族性と異なり様々な要因が複合的に絡み合っており、HRD1 も孤発性パーキンソン病の発症メカニズムに関与している可能性が考えられる。

また、パーキンソン病患者の約 30%は認知障害を伴うことが知られるが、アルツハイマー病患者の死後脳では大脳皮質の神経細胞の HRD1 発現量が低下していることも報告されており、認知症との関連も示唆されている。そのため、認知を伴うパーキンソン病においては特に黒質緻密層ドパミン神経細胞における HRD1 の発現量に変化が生じている可能性も考えられ、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

## (2) パーキンソン病モデルにおけるオキシカム系 NSAIDs の神経細胞死抑制効果と小胞体ストレスの関与

我々はオキシカム系 NSAIDs であるメロキシカムが、パーキンソン病モデルにおいて神経細胞死抑制効果を示すことを報告している。そこで、6-OHDA および MPP<sup>+</sup>を添加した SH-SY5Y 細胞における細胞死抑制効果について検討した。その結果、メロキシカムは MPP<sup>+</sup>誘発細胞死に対して細胞死抑制効果を示し、Caspase-3 の活性化も抑制したが、6-OHDA 誘発細胞死に対しては影響を与えないことが明らかとなった。

一方、小胞体ストレス試薬である Tunicamycin を添加した SH-SY5Y 細胞におけるメロキシカムの細胞死抑制効果について検討した。その結果、メロキシカムは Tunicamycin 誘発神経細胞死を抑制し、Caspase-3 の活性化も抑制した。メロキシカムが 6-OHDA によって起こる神経細胞死を抑制しない原因として、6-OHDA による酸化ストレスの影響が考えられる。すなわち、6-OHDA は小胞体ストレスだけではなく強い酸化ストレスを引き起こして細胞死を惹起するが、メロキシカムは 6-OHDA によって起こる酸化ストレスに対して細胞死抑制効果を示さない可能性が考えられた。

次に、MPP<sup>+</sup>誘発神経細胞死に対する細胞

死抑制効果に小胞体ストレス関連分子が関与するか否かを検討した。その結果、SH-SY5Y 細胞における MPP+ 投与により、小胞体ストレス関連分子である eIF2alpha およびその下流分子である ATF4 と CHOP が誘導され、これらの分子はメロキシカムを共処置することでその誘導が抑制された。

一方、SH-SY5Y 細胞に Tunicamycin を投与した場合、eIF2alpha、ATF4 および CHOP だけでなく、GRP78、GRP94 も誘導されたが、メロキシカムを共処置した場合、eIF2alpha、ATF および CHOP の発現は抑制されたが、GRP78、94 に関しては抑制されなかった。

Tunicamycin は、前述した 3 つの経路 (ATF6 経路、IRE1-XBP1 経路、PERK-eIF2alpha-ATF4-CHOP 経路) が全て活性化されるが、メロキシカムは GRP78、94 の発現量に影響を与えないことから、ATF6 経路および Ire1-XBP1 経路には影響を与えないことが考えられ、オキシカム系 NSAIDs は PERK-eIF2alpha-ATF4 経路を介して CHOP の発現誘導を抑制し、最終的に Caspase-3 の活性化を抑制した可能性が示唆された。

以上のことから、メロキシカムの MPP+ 誘発神経細胞死抑制メカニズムの一つに、UPR 応答機構の一つである eIF2alpha-ATF4-CHOP 経路の抑制が関与する可能性が示唆された。

## 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 2 件)

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

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, 粟屋敏雄, 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)

[学会発表](計 3 件)

松田裕貴, 大村友博, 今井哲司, 中川俊作, 米澤淳, 中川貴之, 松原和夫: 「6-OHDA 誘発細胞死に対するユビキチンリガーゼ

HRD1 の役割」第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪大谷大学, 大阪 (2015 年 10 月 17 日)

笹岡美和, 大村友博, 田崎嘉一, 松田裕貴, 小山智志, 中川俊作, 今井哲司, 米澤淳, 中川貴之, 松原和夫: 「オキシカム系 NSAIDs は ER ストレス抑制を介して MPP+ 毒性を軽減する」第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会合同年会, 奈良県文化会館・奈良県新公会堂, 奈良 (2014 年 9 月 30 日)

Tasaki Y, Ono T, Yamamoto J, Ohkubo T, Noda T, Omura T, Suno M, Matsubara K.: "Mammalian target of rapamycin (mTOR) mediates neuroprotection by oxycam non-steroidal anti-inflammatory drugs against MPP+-induced SH-SY5Y cell death", *Neuroscience* 2013, San Diego, USA (2013 年 11 月 11 日)

[図書](計 1 件)

大村友博, 松原和夫: 「1. 精神・神経系の病気と薬 B. 中枢系疾患 パーキンソン病」, 病気とくすり 2016 基礎と実践 Expert's Guide, p141-p151 (2016) [南山堂]

## 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・助教

研究者番号: 00439035