

20030167

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

蛋白質のフォールディング異常に着目した、分子シャペロンによる神経変性疾患の根本的治療法の開発

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 水島 徹

平成16（2004）年 3月

目次

I. 総括研究報告	
蛋白質のフォールディング異常に着目した、分子シャペロン による神経変性疾患の根本的治療法の開発	-----1
II. 研究成果に刊行に関する一覧表	-----6
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----7

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

蛋白質のフォールディング異常に着目した、分子シャペロンによる神経変
性疾患の根本的治療法の開発

主任研究者 水島 徹 岡山大学薬学部助教授

研究要旨

GGA（世界で唯一の毒性のない分子シャペロン誘導剤）が毒性を示さないのになぜ分子シャペロンを誘導するのか、即ちGGAによる分子シャペロン誘導機構を検討し、分子シャペロンの発現に必須な転写因子（HSF1）を不活性化している因子（HSP70, HSP90）とGGAが結合することを発見した。そこでGGAは、これらの不活性化因子を阻害しHSF1を活性化することにより、分子シャペロンを誘導していることが分かった。また、HSP70, 及びHSP90と結合する物質を天然物から発見し、これが毒性のない新たな分子シャペロン誘導剤であることを示した。また共同研究により、HSF1のノックアウトマウスの作成に成功した。このように当初の研究計画に従い、研究は順調に進んでいる。

A. 研究目的

細胞内には蛋白質が正しいフォールディング（高次構造・折り畳み構造）をとるのを積極的に助けている一群の蛋白質（分子シャペロン）が存在する。分子シャペロンは、合成されたばかりの蛋白質が正しいフォールディングをとることを助けるだけでなく、ストレスによってそのフォールディングが異常になってしまった蛋白質を正常に戻すことも出来る。さらに分子シャペロンは、どうしてもそのフォールディングを正常に戻せない蛋白質に関しては、細胞に悪影響を及ぼすのを防ぐために、それを分解することもできる。このように分子シャペロンは細胞内で蛋白質の品質管理を行っている興味深い分子群である。

多くの疾患の根本的な原因は蛋白質の異常である。疾患の原因となる蛋白質の異常の関してこれまでは、発現異常や活性異常ばかりが注目されてきたが、最近の研究により、細胞内の蛋白質のフォールディング異常が原因になっている多くの疾患が明らかになり、蛋白質フォールディング異常病と呼ばれるようになっていく。神経変性疾患は、代表的な蛋白質フォールディング異常病である。アルツハイマー病、ハンチントン舞踏症、パーキンソン病をはじめとする神経変性疾患の原因は、アルツハイマー病では β アミロイド、ハンチントン舞踏症ではハンチンチン、パーキンソン病ではパーキンと

一方本研究では、同じくストレス遺伝子を利用した全く新しい毒性試験の確立も目指す。細胞は毒物などのストレスに対し、適切な遺伝子（ストレス遺伝子）を発現することによって、自らの生存を保っている。そこで、ある物質に対しいう原因蛋白質のフォールディングが異常になり凝集し、その凝集体により神経細胞が死滅したり機能を失ったりすることによって発症する。この他にも、嚢胞性繊維症、肺気腫、白内障、家族性高コレステロール症、ある種の糖尿病など、多くの疾患においてその原因が蛋白質のフォールディング異常であることが分かっている。

蛋白質フォールディング異常病の共通点として、その根本的な治療法が確立されていないことがある。神経変性疾患などの蛋白質フォールディング異常病を根本的に治療するためには、異常なフォールディングの蛋白質を正常なフォールディングへ戻す、あるいは異常なフォールディングの蛋白質を速やかに分解することが必要であり、これらはいずれも分子シャペロンによって行うことができる。そこで我々は、分子シャペロンを利用して、蛋白質に正しいフォールディングをとらせる技術を開発し、神経変性疾患の根本的治療法を確立するための研究を提案する。

B. 研究方法

GGAによる分子シャペロン誘導機構の解明。

グラニルグラニルアセトン(GGA)が毒性を示さないのに分子シャペロンを誘導するという事は、未だ解明されていない分子シャペロン誘導経路のいずれかの段階にGGAが作用していることを示唆している。従ってGGAが分子シャペロンを誘導するメカニズムを検討した。具体的には、放射標識したGGAを用いて、まずGGA結合蛋白質の検索系を確立した。次に、ヒト細胞粗抽出液中に、GGA結合蛋白質を発見したので、複数のカラムクロマトグラフィーを用いて、その結合蛋白質を精製した。

毒性のない分子シャペロン誘導剤のスクリーニング

漢方医薬研究振興財団から生薬成分、漢方薬などを供与して頂き、毒性のないシャペロン誘導剤のスクリーニングを行った。具体的には、HSP70, HSP90と結合する物質を検索した。

一方、現在使用されている様々な医薬品の中から、分子シャペロンを誘導するものを検索した。

C. 研究結果

我々はヒト胃粘膜細胞の粗抽出液中にGGAと結合する因子を発見した。そこでこの因子を、イオン交換、及びゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いて精

製し、そのアミノ酸配列を決定したところ、HSP70、及びHSP90であった。HSP70、及びHSP90は、分子シャペロン誘導に主要な役割を果たしている転写因子HSF1に結合し、それを不活性化することが知られている。そこでGGAは、これら不活性化因子(HSP70、及びHSP90)に結合し阻害することにより、HSF1を活性化し、その結果分子シャペロンを誘導していると考えられる。

次に我々は、生薬成分、漢方薬などから、HSP70, HSP90と結合する物質を検索した。その結果、ウウルシから、HSP90と結合する物質を発見した(構造未決定)。さらにこの物質が毒性を示さない濃度で、分子シャペロン(HSP70)を誘導することを見出した。この物質は本研究の目的である、毒性のない分子シャペロンの候補物質である。

一方、現在使用されている様々な医薬品の中から、分子シャペロンを誘導するものを検索したところ、非ステロイド系抗炎症薬が小胞体ストレスシャペロン(GRP78など)を誘導することを見出した。小胞体ストレスシャペロンの誘導には、ATF6, IRE1, PARKという3種の小胞体膜上に存在する受容体が関与することが知られているが、我々はこれらの全てが非ステロイド系抗炎症薬によって活性化されていることを示し、非ステロイド系抗炎症薬による小胞体ストレスシャペロン誘導機構を明らかにした。非ステロ

イド系抗炎症薬は、抗炎症作用以外にも、抗アルツハイマー病作用が知られているが、そのメカニズムはよく分かっていない。一方GRP78などの小胞体ストレスシャペロンは、アルツハイマー病の原因であるβアミロイドの凝集を防ぐことが知られている。そこで我々は、非ステロイド系抗炎症薬による小胞体ストレスシャペロン誘導により、非ステロイド系抗炎症薬の抗アルツハイマー病作用が説明出来るのではないかと考えている。

D. 考察

GGAの分子シャペロン誘導機構(HSP70、及びHSP90への結合)が明らかになり、さらに同様の活性を持つ物質が、毒性のない分子シャペロン誘導剤になりうるということが分かったので、本研究の目的である、毒性のない分子シャペロン誘導剤の発見への道筋は明らかになった。また非ステロイド系抗炎症薬による小胞体ストレスシャペロン誘導は、非ステロイド系抗炎症薬の抗アルツハイマー病作用を考える上で、大変重要な発見である。

E. 結論

上述のように、研究は順調に進んでおり、1年後には、研究目的(毒性のない分子シャペロン誘導剤の発見)を達成できる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hoshino, T., Takano, T., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hwang, H-J., Koura, Y., Nishimoto, K., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2003) Effects of sucralfate on gastric irritant-induced necrosis and apoptosis in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 24-27.
2. Hoshino, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hwang, H-J., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2003) Prostaglandin E₂ protects gastric mucosal cells from apoptosis via EP₂ and EP₄ receptor activation. *J. Biol. Chem.* 278, 12752-12758.
3. Mizushima, T., Tsutsumi, S., Hoshino, T., and Tomisato, W. (2003) Protection of gastric mucosal cells from apoptosis and necrosis by induction of HSP and PGE₂. *Jpn. J. Hyperthermic Oncol.* 19, 67-78.
4. Tsutsumi, S., Mima, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2003) Molecular mechanism of adaptive cytoprotection induced by ethanol in human gastric cells. *Exp. Biol. Med.* 228, 1089-1095.
5. Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mio, M., Tsuchiya, T. and

Mizushima, T. (2003) Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions. *Biochem. Pharmacol.* in press.

6. Tanaka, K., Nishimoto, K., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. Adaptive cytoprotection induced by pre-treatment with ethanol protects against gastric cell damage by NSAIDs. *Dig. Dis. Sci.* in press.
7. Tsutsumi, S., Gotoh, T., Mima, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mori, M., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. NSAIDs induce apoptosis through endoplasmic reticulum stress response in gastric mucosal cells. *Cell Death Differ.* in press.

学会発表 (招待講演のみ)

1. 水島徹 胃粘膜傷害副作用のない非ステロイド系抗炎症薬開発の戦略 日本薬学会中国四国支部例会 (2003) (徳島)
2. 水島徹 NSAIDs 潰瘍克服への戦略 聖マリアンナ医科大学での招待講演 (2003) (川崎)
3. 水島徹 HSP 誘導による胃粘膜保護と、HSP 誘導薬の将来 日本消化器外科学会ランチョンセミナー (2003) (東京)
4. 水島徹 GGA-HSP と PG によ

る胃粘膜保護作用の比較
GGA・HSP 研究会 (2003)

5. 水島徹 直接細胞傷害作用に着目した新しい NSAIDs 開発への戦略 日本炎症・再生医学学会 シンポジウム (2003)

C. 知的財産権の出願・登録状況

“該当なし”

研究成果に刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hoshino, T., Takano, T., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hwang, H-J., Koura, Y., Nishimoto, K., Tsuchiya, T. <u>Mizushima, T.</u>	Effects of sucralfate on gastric irritant-induced necrosis and apoptosis in cultured guinea pig gastric mucosal cells.	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	26	24-27	2003
Hoshino, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hwang, H-J., Tsuchiya, T. <u>Mizushima, T.</u>	Prostaglandin E ₂ protects gastric mucosal cells from apoptosis via EP ₂ and EP ₄ receptor activation.	<i>J. Biol. Chem.</i>	278	12752-12758	2003
<u>Mizushima, T.</u> , Tsutsumi, S., Hoshino, T., Tomisato, W.	Protection of gastric mucosal cells from apoptosis and necrosis by induction of HSP and PGE ₂ .	<i>Jpn. J. Hyperthermic Onco.</i>	19	67-78	2003
Tsutsumi, S., Mima, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Tsuchiya, T. <u>Mizushima, T.</u>	Molecular mechanism of adaptive cytoprotection induced by ethanol in human gastric cells.	<i>Exp. Biol. Med.</i>	228	1089-1095.	2003
Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mio, M., Tsuchiya, T. <u>Mizushima, T.</u>	Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions.	<i>Biochem. Pharmacol.</i>	in press.		2004
Tanaka, K., Nishimoto, K., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Tsuchiya, T. <u>Mizushima, T.</u>	Adaptive cytoprotection induced by pre-treatment with ethanol protects against gastric cell damage by NSAIDs.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	in press.		2004
Tsutsumi, S., Gotoh, T., Mima, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mori, M., Tsuchiya, T. <u>Mizushima, T.</u>	NSAIDs induce apoptosis through endoplasmic reticulum stress response in gastric mucosal cells.	<i>Cell Death Differ.</i>	in press.		2004

20030167

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。