

20080802/A

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

分子シャペロン誘導剤の認知症治療への応用の研究

平成 20 年度総括研究報告書

主任研究者 田平 武

平成 21 年 (2009 年) 4 月

目 次

I. 総括研究報告書

- 分子シャペロン誘導剤の認知症治療への応用の研究・・・・・・・・・・ 1
田平 武

II. 分担研究報告書

1. 分子シャペロン誘導剤の抗小胞体ストレス効果（細胞実験）・・・・・・・・ 11
工藤 喬
2. 分子シャペロン誘導剤 BIX の作用機序の検討・・・・・・・・・・ 13
今泉 和則
3. 脳虚血と小胞体ストレス
—分子シャペロン誘導剤の抗小胞体ストレス効果（動物実験）—・・・・ 17
原 英彰

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・ 21

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・ 25

分子シャペロン誘導剤の認知症治療への応用の研究

研究代表者 田平 武 国立長寿医療センター

研究要旨：小胞体（ER）ストレスは、アルツハイマー病などの神経変性認知症の病態に関与している事が、近年報告されている。本研究は、ER ストレス反応の1つである分子シャペロン BiP を誘導するコンパウンド（BiP inducer X: BIX）を認知症治療に応用する事を目指した。BIX は、BiP の誘導と GRP94 及び calreticulin の若干の誘導をおこすが、その他の ER ストレス発現分子の誘導はおこさないことが示された。BIX の誘導には、ATF6 経路が必要とされ、ER ストレスエレメント（ERSE）を介することが示された。Tunicamycin を負荷した神経細胞に BIX を投与すると、ER ストレスによるアポトーシスを防止することができた。BIX 脳室内投与は、マウスの中大脳動脈閉塞モデル（MCAO）による神経症状の軽減、梗塞巣面積の減少、さらに脳浮腫の軽減をもたらした。BIX 投与は、penumbra 領域での ER ストレスによるアポトーシスの軽減を起こしており、BIX の抗 ER ストレス効果を *in vivo* で証明した。

工藤 喬・大阪大学大学院医学系研究科精神医学・准教授

今泉和則・宮崎大学医学部解剖学講座分子生物学・教授

原 英彰・岐阜薬科大学生体機能解析学講座薬効解析学・教授

ある。近年、アルツハイマー病やパーキンソン病など神経変性疾患では、ER ストレスが関与してアポトーシスを起こすとの報告が相次いでいる。もし、ER ストレス反応を人為的に起こすことができれば、ストレスに伴うアポトーシスを防ぐ新たな治療戦略を見出すことができるかもしれない。そこで、今回は分子シャペロン誘導に注目して、治療薬開発を目指した。

B. 研究方法

1. シャペロン誘導剤の検索

SK-N-SH 細胞に、BiP プロモーター領域にホタルルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポータープラスミドを遺伝子導入し、対照遺伝子として SV40 によって制御される Renilla ルシフェラーゼ（Promega 社）も

A. 研究目的

小胞体（ER）ストレス反応は、ER 内の unfolded protein の蓄積に対し、蛋白の翻訳を抑制して更なる unfolded protein の蓄積を減少させる、unfolded protein の折り畳みを是正する分子シャペロンを誘導する、あるいは unfolded protein をプロテアソームにて分解するなどの機構を介して、ストレスによるアポトーシスを抑止するもので

導入した。10,000 個のコンパウンドからなるライブラリーを HTS で検索し、10 個の lead コンパウンドを抽出し、最も BiP 誘導活性の高かったコンパウンドを、BiP inducer X (BIX) として以後の実験を進めた。

2. 神経芽細胞腫 SK-N-SH における BIX の ER ストレス分子発現の網羅的検討

SK-N-SH 細胞に、5 μ M BIX、対照として 1 μ M thapsigargin (Tg) 及び 1 μ g/ml tunicamycin (Tm) を 6 時間作用させた。リン酸バッファー (PBS) で洗浄の後、細胞を遠心で回収し、RNeasy kit (Qiagen 社) で、総 RNA を抽出した。cDNA を、Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen 社) と random primer (Takara 社) を用いて合成した。

PCR を、0.8 μ M 各 primer、0.2 mM dNTPs、3 U TaqDNA polymerase (Promega)、2.5 mM MgCl₂、1xPCR バッファーを含む 30 μ l で反応させた。PCR 条件は、5 分間の 95°C denaturation step、1 分間 95°C を 22 サイクル、1 分間 55°C、1 分間 72°C、最後の extension には 7 分間 72°C で反応させた。PCR 産物は、4.8% polyacrylamide ゲルで展開し、Scion Image Program を用いて、バンドのデンシトメトリーを行った。

ウエスタンブロットは、細胞を Nonidet P-40 含有ライシスバッファーでライシスし、遠心の後、上清 SDS-PAGE で展開する。PVDF 膜にトランスファーして、抗体を反応させ、ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare UK 社) を用いて発色、RT-PCR と同様に、デンシトメトリーを行った。

リアルタイム PCR には、High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystem 社) を用いて、総 RNA から cDNA を合成した。定量リアルタイム PCR は、ABI PRISM 700HT Sequence Detection System (Applied Biosystem 社) に TaqMan Universal PCR Master Mix を用いて行った。mRNA の発現量の計測には、Applied Biosystems Assays-on-Demand Gene Expression Applied Biosystems Assays-on-Demand Gene Expression Product を用いた。

3. レポーターアッセイ

SK-N-SH 細胞に、BiP プロモーター領域あるいは ER ストレスエレメント (ERSE) 配列を改変したプロモーター領域にホタルルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポータープラスミドを遺伝子導入し、対照遺伝子として SV40 によって制御される Renilla ルシフェラーゼ (Promega 社) も導入した。ルシフェラーゼ活性は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社) とルミノメーター (Berhold Technologies 社) を用いて計測し、Renilla ルシフェラーゼ活性に対するホタルルシフェラーゼ活性を算出した。

4. PERK、IRE1 α β ノックアウト線維芽細胞および ATF6 ノックダウン線維芽細胞

PERK ノックアウトマウス胎児線維芽細胞 (MEF) は、Ron 博士 (New York University) から、IRE1 α β ノックアウト MEF は浦野博士 (University of Massachusetts Medical School) から、ATF6 ノックダウン MEF は、Glimcher 博士 (Harvard School of Public Health) から供与を受けた。MEF を用いたウエスタン

プロットおよび RT-PCR は、前出どおり行
った。

5. BIX の抗 ER ストレス効果 (細胞実験)

SK-N-SH 細胞に 5 μ M BIX と vehicle を
12 時間作用させ、培地を交換して 5 μ g/ml
tunicamycin を投与し、12、24、36、48
時間後に 4%パラホルムアルデヒドで固定
し、Hoechst 33258 (Wako 社) で染色した。
500 個の細胞を蛍光顕微鏡で観察し、アポ
トーシス細胞をカウントした。また、一部
の細胞はライセートして、ウエスタンプロ
ットにてカスパー 4 の染色を、
caspase-Glo 3/7 Assay kit (Promega 社)
にてカスパー 3 および 7 の活性を計測し
た。

6. BIX の抗 ER ストレス効果 (中大脳動 脈閉塞モデル: MCAO モデル)

雄成獣 ddY マウスを 1% isoflurane で麻
酔し、体温を 37.0-37.5°C に保った。シリコ
ンレジンを先端をコートした 8-0 ナイロン
フィラメントを、左側総頸動脈から前大脳
動脈起始部まで挿入することで中大脳動脈
を閉塞した。24 時間閉塞の後、神経学的評
価を行い、断頭して組織学的評価を行った。

BIX の脳保護作用の検討は、MCAO 前
30 分に 1、5 μ g 及び 20 μ g/2 μ l を脳室内に
投与し検討した。

(倫理面への配慮) 特になし。

C. 研究結果

1. シャペロン BiP 誘導剤 (BiP inducer X: BIX) の検索

(1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-thiocyanate
ethanone) が BIX の分子式である。

SK-N-SH に 1-50 μ M の BIX を 6 時間反
応させ、RT-PCR およびリアルタイム PCR
で BiP 発現を検討したところ、BIX 濃度依

存性に BiP が発現することが示された。ま
た、5 μ M BIX を 0-12 時間作用させ、BiP
発現を RT-PCR およびリアルタイム PCR
で検討したところ、BiP 発現は 4 時間でピ
ークを迎え、6 時間後まで活性を保ち、以
後徐々に活性が下がることが示された。こ
の BiP の発現パターンは、抗 BiP 抗体によ
るウエスタンプロットにより、蛋白レベル
でも確認された。

2. BIX の BiP 誘導

SK-N-SH 細胞に 5 μ M BIX を 6 時間投
与して、半定量的 RT-PCR で検討した。BIX
は BiP を顕著に誘導され、GRP94、
calreticulin、CHOP も若干誘導されたが、
ERdj4/MDG1、EDEM、p58^{IPK}、ASNS な
どの ER ストレス関連因子の誘導は観察さ
れなかった。また、5 μ M および 50 μ M
BIX を SK-N-SH 細胞に投与し、リアルタ
イム PCR によって、ER ストレス関連因子
誘導の経時的変化も検討した。BIX による
BiP 誘導は投与後 2-6 時間で顕著になっ
た。BIX は GRP94、calreticulin、CHOP
も誘導するが、それらは一過性である事が
示された。さらに、EDEM、p58^{IPK}、ASNS
は殆ど誘導されなかった。

また、5 μ M BIX で処理した SK-N-SH
細胞ライセートにウエスタンプロットを行
い、GRP94 とリン酸化 eIF2 α について検
討したところ、GRP94 は若干の誘導を認め
たが、リン酸化 eIF2 α の増加は認められな
かった。

以上の結果から、BIX は ER ストレスを
おこすことなく、分子シャペロン BiP を選
択的に誘導することが示された。

3. BIX は BiP プロモーターの ERSE に作
用する。

BiP プロモーターをつなげたレポーターアッセイ系に、5 μ M BIX、300 nM thapsigargin、0.5 μ g/ml tunicamycin を投与し、蛍光を6、16 時間検討した。Thapsigargin や tunicamycin では、16 時間まで続く BiP の誘導が観察されたが、BIX による誘導は6 時間後には認められるが、16 時間後には認められず、一過性であることが示された。また、ERSE に変異を入れたレポーターに5 μ M BIX、300 nM thapsigargin、0.5 μ g/ml tunicamycin を投与したところ、BIX は thapsigargin や tunicamycin 同様 ERSE の変異には反応しないことが示され、BIX の作用点は BiP プロモーターの ERSE であることが示された。

4. BIX は ATF6 系を介して BiP を誘導する。

PERK ノックアウト MEF、IRE1 α β ノックアウト MEF、ATF6 α β ノックダウン MEF に、50 μ M BIX や 300 nM thapsigargin を投与し、BiP 誘導を RTPCR で検討した。PERK および IRE1 α β ノックアウト MEF では、BIX と thapsigargin 共に BiP 誘導が観察された。一方、ATF6 α β ノックダウン MEF では、thapsigargin は BiP を誘導するが、BIX は BiP を誘導できなかった。この事は BIX の BiP 誘導は ATF6 系を介していることを示している。

5. BIX の抗 ER ストレス効果 (細胞実験)

SK-N-SH 細胞に5 μ M BIX と対照として vehicle を12 時間作用させ、培地を0.5 μ g/ml tunicamycin に交換して、ER ストレスをかけた。Hoechst 染色にてアポトーシス細胞をカウントしたところ、36 時間以降で BIX 投与群が vehicle 群に対し、有意にアポトーシスを抑制していることが観察

された。また、カスパーズ4の活性型をウエスタンブロットで検討すると、BIX 投与群の活性型カスパーズ4出現は、対照より後れる傾向が示された。さらに、キットを使ってカスパーズ3/カスパーズ7活性比率を算出したところ、tunicamycin 投与36、48 時間何れにおいても、BIX によってカスパーズ3の活性は抑制された。これらのことにより、BIX は ER ストレスによるアポトーシスを抑止することが示された。

6. BIX の抗 ER ストレス効果 (MCAO モデル)

MCAO 後24 時間において、溶媒投与群と比較して BIX は用量依存的に脳保護作用を示し、梗塞面積では前脳先端から4 及び6 mm において BIX 5 及び20 μ g 投与により、8 mm において BIX 20 μ g 投与により有意に抑制した。梗塞体積では BIX 5 及び20 μ g 投与により、脳浮腫においては20 μ g 投与により、神経症状においては BIX 5 及び20 μ g 投与により有意に抑制した(図1)。さらに皮質、皮質下と梗塞部位を分け BIX の脳保護作用の詳細な検討を行った。皮質では、梗塞面積では前脳先端から4 mm 及び6 mm において BIX 1、5 及び20 μ g 投与により、8 mm において BIX 5 及び20 μ g 投与により、梗塞体積では BIX 5 及び20 μ g 投与により有意に抑制した。皮質下では、梗塞面積では前脳先端から4 mm において BIX 5 μ g 投与により、6 mm において BIX 5 及び20 μ g 投与により、梗塞体積では BIX 5 μ g 投与により有意に抑制した。

D. 考察

ER ストレスによるアポトーシスを抑止する治療戦略を模索する目的で、3 つ報告されている ER ストレス反応機構のうち、分子シャペロン誘導を選択肢、その誘導剤開発に着手した。最も代表的な ER ストレスにより誘導されるシャペロンである BiP のプロモーター領域を利用したルシフェラーゼレポーター系を用いて、コンパウンドライブラリーを検索したところ、BIX を得た。

もし、BIX が thapsigargin や tunicamycin と同様に ER ストレスをただおこすコンパウンドであれば、ER ストレスによるアポトーシスをおこす可能性があり、治療薬とは成り得ない。今回の検討から、BIX は、他のシャペロンである GRP94 と calreticulin を若干誘導するが、ほぼ選択的に BiP を誘導することが示され、シャペロン誘導剤としての開発が期待される。

BIX の抗 ER ストレス効果は、SK-N-SH 細胞に 12 時間投与することによって示された。また、ER ストレス特異的なカスパーズ 4 の活性化を抑制する事も示されたことにより、BIX の抗 ER ストレス効果を示した。

また、MCAO モデルでは、BIX の虚血前の脳室内投与は用量依存的に脳保護作用を示し、梗塞体積、脳浮腫及び神経症状を有意に抑制した。

E. 結論

BIX は BiP を誘導することで、ER ストレスによる疾患の治療薬となる可能性が示された。

G. 研究発表 論文発表

1. Takashi Kudo, Soshi Kanemoto, Hideaki Hara, Nobutaka Morimoto, Takashi Morihara, Ryo Kimura, Takeshi Tabira, Kazunori Imaizumi, Masatoshi Takeda A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress Cell Death Differ 15: 364-375, 2008
2. Shinji Tagami, Masayasu Okochi, Kanta Yanagida, Akiko Ikuta, Akio Fukumori, Naohiko Matsumoto, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Taisuke Nakayama, Naohiro Itoh, Jingwei Jiang, Kouhei Nishitomi, Kouzin Kamino, Takashi Morihara, Ryota Hashimoto, Toshihisa Tanaka, Takashi Kudo, Shigeru Chiba, and Masatoshi Takeda Regulation of Notch Signaling by Dynamic Changes in the Precision of S3 Cleavage of Notch-1 Mol. Cell. Biol. 28: 165-176, 2008.
3. Nuripa Jenishbekovna Aidaraliev, Kouzin Kamino, Ryo Kimura, Mitsu ko Yamamoto, Takeshi Morihara, Hiroaki Kazui, Ryota Hashimoto, Toshihisa Tanaka, Takashi Kudo, Tomoyuki Kida, Jun-Ichiro Okuda, Takeshi Uema, Hidehisa Yamagata, Tetsuro Miki, Hiroyasu Aka

- tsu, Kenji Kosaka
Masatoshi Takeda Dynamin 2
gene is a novel susceptibility gene
for late-onset Alzheimer disease in
non-APOE-epsilon4 carriers. *J Hum
Genet.* 53: 296-302, 2008
4. Masafumi Shimojo, Naruhiko
Sahara, Tatsuya Mizoroki, Satoru
Funamoto, Maho
Morishima-Kawashima, Takashi
Kudo, Masatoshi Takeda, Yasuo
Ihara, Hiroshi Ichinose, and
Akihiko Takashima Enzymatic
Characteristics of I213T Mutant
Presenilin-1/ γ -secretase in Cell
Models and Knock-in Mouse
Brains: FAD-linked Mutation
Impairs γ -site Cleavage of
APP-CTF β . *J. Biol. Chem.*,
283(24):16488-96, 2008
 5. Y.Oida, H.Izuta, A.Oyagi, M.Shimaza
wa, T.Kudo, K.Imaizumi, H.Hara.
Induction of BiP, ER-resident protein,
prevents the neuronal death induced
by transient forebrain ischemia in
gerbil *Brain Res* 1208: 217-224,
2008
 6. Kazutaka Ohi, Ryota Tagami,
Fuminobu Sugai, Yuka Yasuda,
Shinji Tagami, Takashi Morihara,
Masayasu Okochi, Toshihisa
Tanaka, Takashi Kudo, Saburo
Sakoda, Masatoshi Takeda
Difficulty identifying
spinocerebellar ataxia 17 from
preceding psychiatric symptoms
Psychiat Clin Neurosci
 7. Inokuchi Y, Nakajima Y,
Shimazawa M, Kurita T, Kubo M,
Saito A, Sajiki H, Kudo T, Aihara M,
Imaizumi K, Araie M, & Hara H.
Inducer of BiP, an endoplasmic
reticulum(ER)-resident protein,
limits retinal cell death.
*Investigative Ophthalmology &
Visual Science*, 50(1)334-344.
 8. Masamitsu Shimazawa, Yuta
Inokuchi, Takashi Okuno,
Yoshihiro Nakajima, Gaku
Sakaguchi, Akira Kato, Hidehiro
Oku, Tetsuya Sugiyama, Takashi
Kudo, Tsunehiko Ikeda, Masatoshi
Takeda, and Hideaki Hara. Reduced
retinal function in amyloid
precursor rotein-overexpressing
transgenic mice via attenuating
glutamate-N-methyl-d-aspartate
receptor signaling *Journal of
Neurochemistry* 107: 279-290, 2008
 9. Prachasilchai W, Sonoda H,
Yokota-Ikeda N, Oshikawa S,
Aikawa C, Uchida K, Ito K, Kudo T,
Imaizumi K, & Ikeda M.: A
protective role of unfolded protein
response in mouse ischemic acute

- kidney injury. *European Journal of Pharmacology* 592:138-145, 2008.
10. Oida Y., Shimazawa M., Imaizumi K. and Hara H.
Involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in the neuronal death induced by transient forebrain ischemia in gerbil. *Neuroscience*, 151, 111-119, 2008.
 11. Kotani Y., Nakajima Y., Hasegawa T., Satoh M., Nagase H., Shimazawa M., Yoshimura S., Iwama T. and Hara H. Propofol exerts greater neuroprotection with disodium edentate (EDTA) than without it. *J. Cereb. Blood Flow & Metabol.*, 28, 354-366, 2008.
 12. Oyagi A., Oida Y., Hara H., Izuta H., Shimazawa M., Matsunaga N., Adachi T. and Hara H. Protective effects of SUN N8075, a novel agent with antioxidant properties, in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *Brain Res.*, 1214, 169-176, 2008.
 13. Oida Y., Izuta H., Oyagi A., Shimazawa M., Kudo T., Imaizumi K. and Hara H.
Induction of BiP, an ER-resident protein, prevents the neuronal death induced by transient forebrain ischemia in gerbil. *Brain Res.*, 1208, 217-224, 2008.
 14. Ito Y., Nakamura S., Tanaka H., Shimazawa M., Araie M. and Hara H. Memantine protects against secondary neuronal degeneration in lateral geniculate nucleus and superior colliculus after retinal damage in mice. *CNS Neurosci. Ther.*, 14, 192-202, 2008.
 15. Nonaka Y., Shimazawa M., Yoshimura S., Iwama T. and Hara H. Combination effects of normobaric hyperoxia and edaravone on focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in mice. *Neurosci. Lett.*, 441, 224-228, 2008.
 16. Shimazawa M., Inokuchi Y., Okuno T., Nakajima Y., Sakaguchi G., Kato A., Oku H., Sugiyama T., Kudo T., Ikeda T., Takeda M. and Hara H. Reduced retinal function in amyloid precursor protein-overexpressing transgenic mice via attenuating glutamate-N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J. Neurochem.*, 107, 279-290, 2008.
 17. Koumura A., Nonaka Y., Hyakkoku K., Oka T., Shimazawa M., Hozumi I., Inuzuka T. and Hara H. A novel calpain inhibitor, SNJ-1945, protects neuronal cells from

- cerebral ischemia-induced damage in mice. *Neuroscience*, 157, 309-318, 2008.
18. Inokuchi Y., Nakajima Y., Shimazawa M., Kurita T., Kubo M., Saito A., Sajiki H., Kudo T., Aihara M., Imaizumi K., Araie M. and Hara H. Effect of an inducer of BiP, a molecular chaperone, on endoplasmic reticulum (ER) stress-induced retinal cell death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 50, 334-344.2009
 19. Hyakkoku K., Nakajima Y., Izuta H., Shimazawa M., Yamamoto T., Shibata N. and Hara H. Thalidomide protects against ischemic neuronal damage induced by focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience*, 159, 760-769, 2009.
 20. Nonaka Y., Tsuruma K., Shimazawa M., Yoshimura S., Iwama T. and Hara H. Cilostazol protects against hemorrhagic transformation in mice transient focal cerebral ischemia-induced brain damage. *Neurosci. Lett.*, 452, 156-161, 2009.
 21. Kudo T, Kanemoto S, Hara H, Morimoto N, Morihara T, Kimura R, Tabira T, Imaizumi K, and Takeda M. A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. *Cell Death and Differentiation* 15(2)364-375. 2008
 22. Prachasilchai W, Sonoda H, Yokota-Ikeda N, Oshikawa S, Aikawa C, Uchida K, Ito K, Kudo T, Imaizumi K, and Ikeda M. A protective role of unfolded protein response in mouse ischemic acute kidney injury. *European Journal of Pharmacology* 592(1-3)138-145, 2008
 23. Oida Y, Shimazawa M, Imaizumi K, and Hara H. Involvement of endoplasmic reticulum stress in the neuronal death induced by transient forebrain ischemia in gerbil. *Neuroscience* 151(1) 111-119 2008
 24. Oida Y, Izuta H, Oyagi A, Shimazawa M, Kudo T, Imaizumi K, and Hara H. Induction of BiP, an ER-resident protein, prevents the neuronal death induced by transient forebrain ischemia in gerbil. *Brain Research* 1208 217-224 2008
 25. Yoshinaga K, Kawai K, Tanii I, Imaizumi K, and Kodama K. Nerve fiber analysis on the so-called accessory subscapularis muscle and its morphological significance.

26. Inokuchi Y, Nakajima Y, Shimazawa M, Kurita T, Kubo M, Saito A, Sajiki H, Kudo T, Aihara M, Imaizumi K, Araie M, and Hara H. Inducer of BiP, an Endoplasmic Reticulum (ER)-resident Protein, Limits Retinal Cell Death. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50(1) 334-344 2009

27. Prachasilchai W, Sonoda H, Yokota-Ikeda N, Ito K, Kudo T, Imaizumi K, and Ikeda M. The protective effect of a newly developed molecular chaperone-inducer against mouse ischemic acute kidney injury. *Journal of Pharmacological Sciences* 109(2) 311-314 2009

分子シャペロン誘導剤の抗小胞体ストレス効果（細胞実験）

研究分担者 工藤 喬 大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室

研究要旨：BiP プロモーター領域を利用したレポーターアッセイ系を用いて、コンパウンドライブラリーを検索した結果、BiP inducer X (BIX) を得た。BIX は濃度依存的に BiP を誘導し、投与後 4-6 時間で誘導のピークを示す。Tunicamycin を負荷した神経細胞に BIX を投与すると、ER ストレスによるアポトーシスを防止することができた。BIX は BiP を誘導することで、ER ストレスによる疾患の治療薬となる可能性が示された。

A. 研究目的

小胞体 (ER) ストレス反応は、ER 内の unfolded protein の蓄積に対し、蛋白の翻訳を抑制して更なる unfolded protein の蓄積を減少させる、unfolded protein の折り畳みを是正する分子シャペロンを誘導する、あるいは unfolded protein をプロテアソームにて分解するなどの機構を介して、ストレスによるアポトーシスを抑止するものである。近年、アルツハイマー病やパーキンソン病など神経変性疾患では、ER ストレスが関与してアポトーシスを起こすとの報告が相次いでいる。もし、ER ストレス反応を人為的に起こすことができれば、ストレスに伴うアポトーシスを防ぐ新たな治療戦略を見出すことができるかもしれない。そこで、今回は分子シャペロン誘導に着目して、治療薬開発を目指した。

B. 研究方法

1. シャペロン誘導剤の検索

SK-N-SH 細胞に、BiP プロモーター領域にホタルルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポータープラスミドを遺伝子導入し、対

照遺伝子として SV40 によって制御される Renilla ルシフェラーゼ (Promega 社) も導入した。10,000 個のコンパウンドからなるライブラリーを HTS で検索し、10 個の lead コンパウンドを抽出し、最も BiP 誘導活性の高かったコンパウンドを、BiP inducer X (BIX) として以後の実験を進めた。

2. BIX の抗 ER ストレス効果 (細胞実験)

SK-N-SH 細胞に 5 μ M BIX と vehicle を 12 時間作用させ、培地を交換して 5 μ g/ml tunicamycin を投与し、12、24、36、48 時間後に 4%パラホルムアルデヒドで固定し、Hoechst 33258 (Wako 社) で染色した。500 個の細胞を蛍光顕微鏡で観察し、アポトーシス細胞をカウントした。また、一部の細胞はライセートして、ウェスタンブロットにてカスパー 4 の染色を、caspase-Glo 3/7 Assay kit (Promega 社) にてカスパー 3 および 7 の活性を計測した。

(倫理面への配慮) 特になし。

C. 研究結果

1. シャペロン BiP 誘導剤 (BiP inducer X: BIX) の検索

(1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-thiocyanate ethanone)が BIX の分子式である。

SK-N-SH に 1-50 μ M の BIX を 6 時間反応させ、RT-PCR およびリアルタイム PCR で BiP 発現を検討したところ、BIX 濃度依存性に BiP が発現することが示された。また、5 μ M BIX を 0-12 時間作用させ、BiP 発現を RT-PCR およびリアルタイム PCR で検討したところ、BiP 発現は 4 時間でピークを迎え、6 時間後まで活性を保ち、以後徐々に活性が下がることが示された。この BiP の発現パターンは、抗 BiP 抗体によるウエスタンブロットにより、蛋白レベルでも確認された。

2. BIX は抗 ER ストレス効果を持つ。

SK-N-SH 細胞に 5 μ M BIX と対照として vehicle を 12 時間作用させ、培地を 0.5 μ g/ml tunicamycin に交換して、ER ストレスをかけた。Hoechst 染色にてアポトーシス細胞をカウントしたところ、36 時間以降で BIX 投与群が vehicle 群に対し、有意にアポトーシスを抑制していることが観察された。また、カスパー 4 の活性型をウエスタンブロットで検討すると、BIX 投与群の活性型カスパー 4 出現は、対照より後れる傾向が示された。さらに、キットを使ってカスパー 3/カスパー 7 活性比率を算出したところ、tunicamycin 投与 36、48 時間何れにおいても、BIX によってカスパー 3 の活性は抑制された。これらのことにより、BIX は ER ストレスによるアポトーシスを抑止することが示された。

D. 考察

ER ストレスによるアポトーシスを抑止

する治療戦略を模索する目的で、3 つ報告されている ER ストレス反応機構のうち、分子シャペロン誘導を選択肢、その誘導剤開発に着手した。最も代表的な ER ストレスにより誘導されるシャペロンである BiP のプロモーター領域を利用したルシフェラーゼレポーター系を用いて、コンパウンドライブラリーを検索したところ、BIX を得た。

BIX は濃度依存的に BiP を誘導し、その誘導のピークは投与 4 時間後であり、6 時間まで活性が続いた後徐々に活性が低下を見せ、一過性の誘導パターンを示した。

BIX の抗 ER ストレス効果は、SK-N-SH 細胞に 12 時間投与することによって示された。また、ER ストレス特異的なカスパー 4 の活性化を抑制する事も示されたことにより、BIX の抗 ER ストレス効果を示した。

E. 結論

BIX は BiP を誘導することで、ER ストレスによる疾患の治療薬となる可能性が示された。

G. 研究発表

論文発表

1) Takashi Kudo, Soshi Kanemoto, Hideaki Hara, Nobutaka Morimoto, Takashi Morihara, Ryo Kimura, Takeshi Tabira, Kazunori Imaizumi, Masatoshi Takeda

A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress

Cell Death Differ 15: 364-375, 2008

2) Shinji Tagami, Masayasu Okochi, Kanta Yanagida, Akiko Ikuta, Akio Fukumori, Naohiko Matsumoto, Yoshiko

- Ishizuka-Katsura, Taisuke Nakayama, Naohiro Itoh, Jingwei Jiang, Kouhei Nishitomi, Kouzin Kamino, Takashi Morihara, Ryota Hashimoto, Toshihisa Tanaka, Takashi Kudo, Shigeru Chiba, and Masatoshi Takeda
Regulation of Notch Signaling by Dynamic Changes in the Precision of S3 Cleavage of Notch-1
Mol. Cell. Biol. 28: 165-176, 2008.
- 3) Nuripa Jenishbekovna Aidaralieva, Kouzin Kamino, Ryo Kimura, Mitsuko Yamamoto, Takeshi Morihara, Hiroaki Kazui, Ryota Hashimoto, Toshihisa Tanaka, Takashi Kudo, Tomoyuki Kida, Jun-Ichiro Okuda, Takeshi Uema, Hidehisa Yamagata, Tetsuro Miki, Hiroyasu Akatsu, Kenji Kosaka and Masatoshi Takeda
Dynamain 2 gene is a novel susceptibility gene for late-onset Alzheimer disease in non-APOE-epsilon4 carriers.
J Hum Genet. 53: 296-302, 2008
- 4) Masafumi Shimojo, Naruhiko Sahara, Tatsuya Mizoroki, Satoru Funamoto, Maho Morishima-Kawashima, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda, Yasuo Ihara, Hiroshi Ichinose, and Akihiko Takashima
Enzymatic Characteristics of I213T Mutant Presenilin-1/ γ -secretase in Cell Models and Knock-in Mouse Brains: FAD-linked Mutation Impairs-site Cleavage of APP-CTFB.
J. Biol. Chem., 283(24):16488-96, 2008
- 5) Y.Oida, H.Izuta, A.Oyagi, M.Shimazawa, T.Kudo, K.Imaizumi, H.Hara
Induction of BiP, ER-resident protein, prevents the neuronal death induced by transient forebrain ischemia in gerbil
Brain Res 1208: 217-224, 2008
- 6) Masamitsu Shimazawa, Yuta Inokuchi, Takashi Okuno, Yoshihiro Nakajima, Gaku Sakaguchi, Akira Kato, Hidehiro Oku, Tetsuya Sugiyama, Takashi Kudo, Tsunehiko Ikeda, Masatoshi Takeda, and Hideaki Hara
Reduced retinal function in amyloid precursor protein-overexpressing transgenic mice via attenuating glutamate-N-methyl-D-aspartate receptor signaling
Journal of Neurochemistry 107: 279-290, 2008
- 7) Prachasilchai W, Sonoda H, Yokota-Ikeda N, Oshikawa S, Aikawa C, Uchida K, Ito K, Kudo T, Imaizumi K, & Ikeda M.: A protective role of unfolded protein response in mouse ischemic acute kidney injury. *European Journal of Pharmacology* 592:138-145, 2008.

分子シャペロン誘導剤 BIX の作用機序の検討

研究分担者 今泉和則 宮崎大学医学部解剖学講座、分子生物学

研究要旨: 分子シャペロン BiP 誘導剤 (BiP inducer X: BIX) の作用機序を検討した。RT-PCR の検討では、BIX は、分子シャペロン BiP の誘導と GRP94 及び calreticulin の若干の誘導をおこなすが、その他の小胞体 (ER) ストレス発現分子の誘導はおこなわないことが示された。また、BiP のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイ系によれば、BIX は ER ストレスエレメント (ERSE) を介して BiP を発現することが示された。さらに、ER ストレス発現因子のノックアウト線維芽細胞を用いた実験では、BIX の BiP 発現には、ATF6 経路が必要とされることが示唆された。

A. 研究目的

分子シャペロン BiP 誘導剤 (BiP inducer X: BIX) は、BiP を選択的に誘導することを目的としてスクリーニングされたコンパウンドであるが、本研究ではその分子シャペロン誘導選択性とシャペロン誘導の作用機序を検討した。

B. 研究方法

1. 神経芽細胞腫 SK-N-SH における BIX の ER ストレス分子発現の網羅的検討

SK-N-SH 細胞に、5 μ M BIX、対照として 1 μ M thapsigargin (Tg) 及び 1 μ g/ml tunicamycin (Tm) を 6 時間作用させた。リン酸バッファー (PBS) で洗浄の後、細胞を遠心で回収し、RNeasy kit (Qiagen 社) で、総 RNA を抽出した。cDNA を、Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen 社) と random primer (Takara 社) を用いて合成した。

PCR を、0.8 μ M 各 primer、0.2 mM

dNTPs、3 U TaqDNA polymerase (Promega)、2.5 mM MgCl₂、1xPCR バッファーを含む 30 μ l で反応させた。PCR 条件は、5 分間の 95°C denaturation step、1 分間 95°C を 22 サイクル、1 分間 55°C、1 分間 72°C、最後の extension には 7 分間 72°C で反応させた。PCR 産物は、4.8% polyacrylamide ゲルで展開し、Scion Image Program を用いて、バンドのデンシトメトリーを行った。

ウエスタンブロットは、細胞を Nonidet P-40 含有ライシスバッファーでライシスし、遠心の後、上清 SDS-PAGE で展開する。PVDF 膜にトランスファーして、抗体を反応させ、ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare UK 社) を用いて発色、RT-PCR と同様に、デンシトメトリーを行った。

リアルタイム PCR には、High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystem 社)

を用いて、総RNAからcDNAを合成した。定量リアルタイムPCRは、ABI PRISM 700HT Sequence Detection System (Applied Biosystem社)にTaqMan Universal PCR Master Mixを用いて行った。mRNAの発現量の計測には、Applied Biosystems Assays-on-Demand Gene Expression Applied Biosystems Assays-on-Demand Gene Expression Productを用いた。

2. レポーターアッセイ

SK-N-SH細胞に、BiPプロモーター領域あるいはERストレスエレメント(ERSE)配列を改変したプロモーター領域にホタルルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポータープラスミドを遺伝子導入し、対照遺伝子としてSV40によって制御されるRenillaルシフェラーゼ(Promega社)も導入した。ルシフェラーゼ活性は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega社)とルミノメーター(Berhold Technologies社)を用いて計測し、Renillaルシフェラーゼ活性に対するホタルルシフェラーゼ活性を算出した。

3. PERK、IRE1 α β ノックアウト線維芽細胞およびATF6ノックダウン線維芽細胞

PERKノックアウトマウス胎児線維芽細胞(MEF)は、Ron博士(New York University)から、IRE1 α β ノックアウトMEFは浦野博士(University of Massachusetts Medical School)から、ATF6ノックダウンMEFは、Glimcher博士(Harvard School of Public Health)から供与を受けた。MEFを用いたウエスタンブロットおよびRT-PCRは、前出どおり行った。

(倫理面への配慮)特になし。

C. 研究結果

1. BIXは、BiPを特異的に誘導する。

SK-N-SH細胞に5 μ M BIXを6時間投与して、半定量的RT-PCRで検討した。BIXはBiPを顕著に誘導され、GRP94、calreticulin、CHOPも若干誘導されたが、ERdj4/MDG1、EDEM、p58^{IPK}、ASNSなどのERストレス関連因子の誘導は観察されなかった。また、5 μ Mおよび50 μ M BIXをSK-N-SH細胞に投与し、リアルタイムPCRによって、ERストレス関連因子誘導の経時的変化も検討した。BIXによるBiP誘導は投与後2-6時間で顕著になった。BIXはGRP94、calreticulin、CHOPも誘導するが、それらは一過性である事が示された。さらに、EDEM、p58^{IPK}、ASNSは殆ど誘導されなかった。

また、5 μ M BIXで処理したSK-N-SH細胞ライセートにウエスタンブロットを行い、GRP94とリン酸化eIF2 α について検討したところ、GRP94は若干の誘導を認めたが、リン酸化eIF2 α の増加は認められなかった。

以上の結果から、BIXはERストレスをおこすことなく、分子シャペロンBiPを選択的に誘導することが示された。

2. BIXはBiPプロモーターのERSEに作用する。

BiPプロモーターをつなげたレポーターアッセイ系に、5 μ M BIX、300 nM thapsigargin、0.5 μ g/ml tunicamycinを投与し、蛍光を6、16時間検討した。Thapsigarginやtunicamycinでは、16時間まで続くBiPの誘導が観察されたが、BIXによる誘導は6時間後には認められる

が、16時間後には認められず、一過性であることが示された。また、ERSEに変異を入れたレポーターに5 μ M BIX、300 nM thapsigargin、0.5 μ g/ml tunicamycinを投与したところ、BIXはthapsigarginやtunicamycin同様ERSEの変異には反応しないことが示され、BIXの作用点はBiPプロモーターのERSEであることが示された。

3. BIXはATF6系を介してBiPを誘導する。
PERKノックアウトMEF、IRE1 $\alpha\beta$ ノックアウトMEF、ATF6 $\alpha\beta$ ノックダウンMEFに、50 μ M BIXや300 nM thapsigarginを投与し、BiP誘導をRT-PCRで検討した。PERKおよびIRE1 $\alpha\beta$ ノックアウトMEFでは、BIXとthapsigargin共にBiP誘導が観察された。一方、ATF6 $\alpha\beta$ ノックダウンMEFでは、thapsigarginはBiPを誘導するが、BIXはBiPを誘導できなかった。この事はBIXのBiP誘導はATF6系を介していることを示している。

D. 考察

もし、BIXがthapsigarginやtunicamycinと同様にERストレスをただおこすコンパウンドであれば、ERストレスによるアポトーシスをおこす可能性があり、治療薬とは成り得ない。今回の検討から、BIXは、他のシャペロンであるGRP94とcalreticulinを若干誘導するが、ほぼ選択的にBiPを誘導することが示され、シャペロン誘導剤としての開発が期待される。

また、BIXのBiP誘導の作用点としては、BiPプロモーターのERSEであり、ERストレス反応経路としてATF6系を介する事が示されている。

E. 結論

BIXは、ERSEおよびATF6系を介して、BiPをほぼ選択的に誘導することが示された。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Inokuchi Y, Nakajima Y, Shimazawa M, Kurita T, Kubo M, Saito A, Sajiki H, Kudo T, Aihara M, Imaizumi K, Araie M, Hara H. : Inducer of BiP, an Endoplasmic Reticulum (ER)-resident Protein, Limits Retinal Cell Death. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50(1):334-344, 2009.
- 2) Prachasilchai W, Sonoda H, Yokota-Ikeda N, Ito K, Kudo T, Imaizumi K, and Ikeda M. : The protective effect of a newly developed molecular chaperone-inducer against mouse ischemic acute kidney injury. *Journal of Pharmacological Sciences* 109(2):311-314, 2009.
- 3) Kudo T, Kanemoto S, Hara H, Morimoto N, Morihara T, Kimura R, Tabira T, Imaizumi K, Takeda M. : A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. *Cell death and differentiation* 15(2):364-375, 2008.
- 4) Prachasilchai W, Sonoda H, Yokota-Ikeda N, Oshikawa S, Aikawa C, Uchida K, Ito K, Kudo T, Imaizumi K, Ikeda M. : A protective role of unfolded protein response in mouse ischemic acute kidney injury. *European Journal of Pharmacology* 592(1-3):138-145, 2008.
- 5) Oida Y, Shimazawa M, Imaizumi K,

and Hara H.: Involvement of endoplasmic reticulum stress in the neuronal death induced by transient forebrain ischemia in gerbil. *Neuroscience* 151(1):111-119, 2008.

6) Oida Y, Izuta H, Oyagi A, Shimazawa M, Kudo T, Imaizumi K, Hara H.: Induction of BiP, an ER-resident protein,

prevents the neuronal death induced by transient forebrain ischemia in gerbil. *Brain Research* 1208:217-224, 2008.

7) Hosoi T, Saito A, Kume A, Okuma Y, Nomura Y, Ozawa K.: Vanadate inhibits endoplasmic reticulum stress responses. *European journal of pharmacology* 594(1-3): 44-48, 2008.

脳虚血と小胞体ストレス

一分子シャペロン誘導剤の抗小胞体ストレス効果（動物実験）一

研究分担者 原 英彰 岐阜薬科大学薬効解析学研究室

研究要旨： マウス中大脳動脈閉塞（MCAO）モデルを用いて脳梗塞巣を作成し、小胞体（ER）ストレスとの関連を検討したところ、梗塞周辺領域 penumbra で ER ストレスが検知された。そこで、このモデルを用いて分子シャペロン誘導剤 BIX の効果について検討した。BIX 脳室内投与は、MCAO による神経症状の軽減、梗塞巣面積の減少、さらに脳浮腫の軽減をもたらした。BIX 投与は、penumbra 領域での ER ストレスによるアポトーシスの軽減を起こしており、BIX の抗 ER ストレス効果を *in vivo* で証明した。

A. 研究目的

従来、脳梗塞の進展には小胞体（ER）ストレスの関与が示唆されてきた（Tamatani et al., Nature Med. 7, 317, 2001）。本研究では、マウスの片側中大脳動脈を閉塞せしめたモデル（MCAO）を用いて、脳梗塞と ER ストレスの関係について検証する。さらに、このモデルを用いて分子シャペロン BiP 誘導剤である BiP inducer X (BIX) の抗 ER ストレス効果について *in vivo* にて検証し、分子シャペロン誘導剤の認知症治療への可能性を検討する。

B. 研究方法

1. 中大脳動脈閉塞モデル（MCAO モデル）

雄成獣 ddY マウスを 1% isoflurane で麻酔し、体温を 37.0-37.5℃ に保った。シリコンレジンで先端をコートした 8-0 ナイロンフィラメントを、左側総頸動脈から前大脳動脈起始部まで挿入することで中大脳動脈を閉塞した。24 時間閉塞の後、神経学的評

価を行い、断頭して組織学的評価を行った。

2. ER stress Activated Indicator (ERAI) マウス

脳梗塞による ER ストレスの関与を確認する目的で、ERAI マウス（小胞体ストレス条件下、XBP-1 mRNA のスプライシンにより緑色蛍光タンパク質を発現する）にも MCAO を同様に行った。ERAI マウスは、XBP1 遺伝子と蛍光タンパク質をコードする Venus 遺伝子とを連結した人工遺伝子（ERAI 遺伝子）を遺伝子導入したマウスで、この ERAI 遺伝子が本来の XBP1 遺伝子と同様に ER ストレスを感知した IRE1 にスプライシングされ、活性化して蛍光を発するよう設計されている。

3. BIX 脳室内投与

BIX の脳保護作用の検討は、MCAO 前 30 分に 1、5 μg 及び 20 μg/2 μl を脳室内に投与し検討した。

（倫理面への配慮）特になし。

C. 研究結果

1. ERAI マウスでの検討

ERAI マウスを用いた検討では、MCAO 後、梗塞領域下において ERAI 蛍光が発現した。ERAI 蛍光は線条体で MCAO 後 6 時間に、皮質において 12 時間後に発現し、両領域において 1 日後に最大の発現がみられた。ERAI 蛍光は細胞質および樹状突起に局在し、核には局在しなかった。また MCAO 後 1 日及び 3 日においてグリア細胞においても局在が認められた。

2. BIX の効果

MCAO 後 24 時間において、溶媒投与群と比較して BIX は用量依存的に脳保護作用を示し、梗塞面積では前脳先端から 4 及び 6 mm において BIX 5 及び 20 μ g 投与により、8 mm において BIX 20 μ g 投与により有意に抑制した。梗塞体積では BIX 5 及び 20 μ g 投与により、脳浮腫においては 20 μ g 投与により、神経症状においては BIX 5 及び 20 μ g 投与により有意に抑制した(図 1)。さらに皮質、皮質下と梗塞部位を分け BIX の脳保護作用の詳細な検討を行った。皮質では、梗塞面積では前脳先端から 4 mm 及び 6 mm において BIX 1、5 及び 20 μ g 投与により、8 mm において BIX 5 及び 20 μ g 投与により、梗塞体積では BIX 5 及び 20 μ g 投与により有意に抑制した。皮質下では、梗塞面積では前脳先端から 4 mm において BIX 5 μ g 投与により、6 mm において BIX 5 及び 20 μ g 投与により、梗塞体積では BIX 5 μ g 投与により有意に抑制した。BIX の脳保護作用は線条体よりも皮質において強く認められた(データ未提示)。

D. 考察

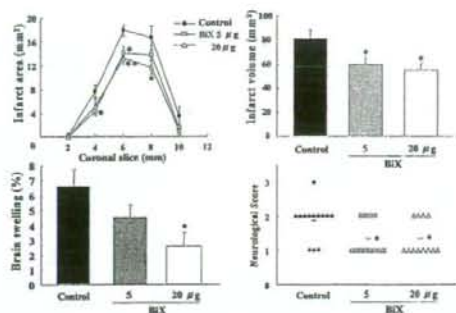


Fig. 2 Effects of BIX on infarct area, infarct volume, brain swelling, and neurological deficits at 24 h after permanent MCA occlusion in mice. $n=12$ or 13 , * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs Control

小胞体ストレス下において活性化 IRE1 は、XBP-1 mRNA のスプライシングを行うことが知られている。ERAI マウスはヒトの XBP-1 及び venus (変異蛍光タンパク質) 融合遺伝子を用いている。正常時では、融合遺伝子の mRNA はスプライシングされないが、小胞体ストレス時にはスプライシングされ、XBP-1 及び venus 融合遺伝子が誘導される。ERAI 蛍光は MCAO 後 6 時間から認められ、梗塞領域に強く現れた。Pachen らは、脳虚血再灌流後 6 時間に XBP-1 mRNA が誘導されたことを報告している。今回我々は、ERAI 蛍光が MCAO 後 1 日及び 3 日においてグリア細胞にも発現していることを明らかにした。このことは脳虚血後期においてグリア細胞においても UPR を発現しており、小胞体ストレスに対する保護作用の機序の一端を担っていることが示唆された。さらに、ERAI 蛍光は MCAO 後 12 時間の細胞質及び樹状突起に、MCAO 後 1 日及び 3 日のグリアにおいて認められたが、核には認められなかった。脳虚血早期からの虚血領域下での ERAI 蛍光の発現は我々の行った小胞体ストレスマーカー BIP 及び CHOP の結果 (未提示) と良く相関している。そのため ERAI マウスは小胞体ストレスの変化及び神経細胞死