

いことが報告された。一方、沖縄県ではこの正常眼圧緑内障の有病率は多治見スタデーに比べ若干少ないものの、ほぼ同程度であり、諸外国に比べその有病率は非常に高いことが確認された。多治見スタデーでは閉塞隅角緑内障有病率は0.6%であったが、今回の久米島スタデーでは3%強であり、正常眼圧緑内障に若干及ばないものこのこれまでの多治見スタデーを含めた諸外国の報告に較べきわめて高いことが証明された。

### E. 結論

緑内障の2大病型として開放隅角緑内障と閉塞隅角緑内障が知られている。沖縄県では閉塞隅角緑内障の有病率が本邦および諸外国に比べ非常に高いことを証明できた。閉塞隅角緑内障はレーザー治療、早期の白内障手術で治癒させることが可能であり、適切なスクリーニング方法の開発と臨床応用が求められる。

### G. 研究発表 論文発表

なし

#### 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. シンポジウム「閉塞隅角緑内障のあたらしい動き」澤口昭一：久米島検診で見えてきた閉塞隅角緑内障、第17回日本緑内障学会 16巻 73ページ 2006年：発表内容は閉塞隅角緑内障の発症予備軍（危険群）の頻度である。もっとも単純な細隙灯顕微鏡検査による閉塞隅角緑内障予備軍の頻度は多治見スタデーでは5.3%であったが久米島スタデーでは約28%であり6倍の頻度であった。性差と加齢による変化についても報告した。

2. 「翼状片有病率と閉塞隅角緑内障危険因子」澤

口昭一、第18回日本緑内障学会 17巻 90ページ 2007年：発表内容は久米島疫学調査の進捗状況報告である。久米島町の40歳以上の人口での翼状片有病率は31.0%であること、3. 「久米島スタディの実施概要と検診参加率」平安山市子、仲村優子、酒井寛、澤口昭一、岩瀬愛子、富所敦男、新家 眞、第18回日本緑内障学会 17巻 164ページ 2007年：久米島検診の受診率を性別、年代別に検討した。検診受診率は81.2%であり、男性76.8%、女性86.0%と女性の方が高かった。また、90歳以上を除き高齢者の方が高かった。

図：年代・性別の検診受診率

4. 「久米島スタディにおける翼状片のリスクファクター」城間弘喜、澤口昭一、比嘉明子、岩瀬愛子、富所敦男、新家 眞、第61回日本臨床眼科学会、学会抄録 83ページ 2007年：久米島町における翼状片の有病率は過去の疫学研究に比べ高かった。高齢者、男性、屋外従事者（野外活動歴）が翼状片のリスクファクターであり、この結果は過去の報告と同傾向であった。また、帽子着用者の有病率は予想に反し非着用者より高かった。

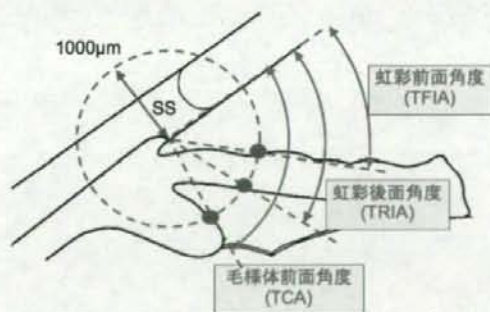
5. 「久米島スタディ参加者の屈折異常」比嘉明子、仲村佳巳、澤口昭一、岩瀬愛子、富所敦男、新家 眞、第61回日本臨床眼科学会、学会抄録 40ページ 2007年：久米島における屈折異常の頻度・分布を検討した。屈折異常（等価球度数）は日本本土での結果（多治見スタディ）と比較して遠視側に偏っていた。近視の頻度は多治見スタディより低く、遠視の頻度は高かった。

	N (人)	% (95%CI)
正視 SE $\leq$ $\pm$ 0.5D	1081	34.7 (33.0-36.4)
近視 <-0.5D	900	28.9 (27.3-30.5)
<-1.0D	605	19.4 (18.1-20.8)
<-6.0D	47	1.50 (1.10-2.00)
遠視 >+0.5D	1136	36.4 (34.8-38.2)

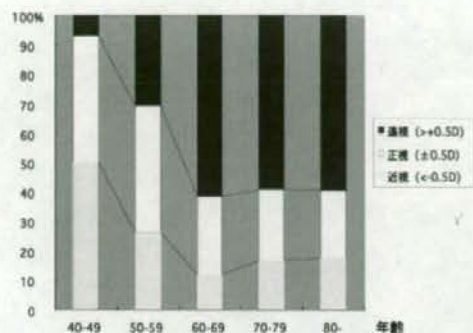
第 61 回日本臨床眼科学会、学会抄録 79 ページ  
 2007 年：久米島検診受診者の前房隅角構造を  
 高周波超音波画像診断装置である超音波生体顕微  
 鏡検査を用いて撮影した。得られた画像を新規に  
 開発した解析ソフトウェアで定量的に解析した。  
 この新規ソフトウェアは強膜岬を中心とした円と  
 角膜内皮面、虹彩前面・後面、毛様体前面との交  
 点を基準とした新しいパラメータにより隅角形態  
 を数値化するものである。また、その測定方法に  
 ついて信頼性を確かめるために検者内再現性を検  
 討した。結果として、新しく開発した UBM の定  
 量的パラメータの

検者内再現性は従来のパラメータに比べ、ほぼ同  
 等かやや良好であった。特に、緑内障の罹患危険  
 群と考えられる狭隅角眼においても広隅角眼とほ  
 ぼ同等の再現性が得られた点はこのソフトとウエ  
 アの有用性を示している。

図：新しく開発した超音波生体顕微鏡画像解析の  
 パラメータ

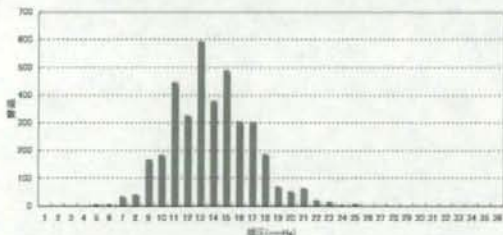


乱視	> 0.5D	1929	61.9 ( 60.2-63.6 )
	> 1.0D	1075	34.5 ( 32.8-36.2 )



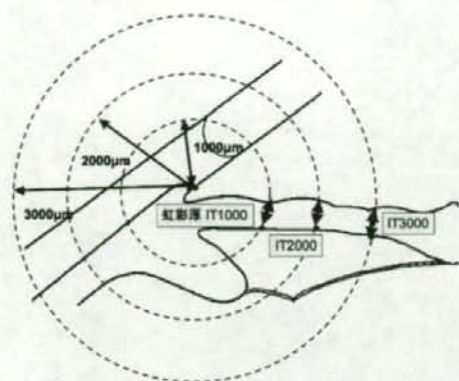
6. 「久米島スタディ参加者の眼圧の分布と関連因  
 子」友寄絵厘子、酒井寛、澤口昭一、石川修作、  
 岩瀬愛子、富所敦男、新家眞、第 61 回日本臨床  
 眼科学会、学会抄録 78 ページ 2007 年：  
 久米島における眼圧の分布と関連因子について眼  
 圧の分布と関連因子について検討し本土(多治見ス  
 タディ)のそれと比較し報告した。久米島スタディ  
 参加者の平均眼圧久米島スタディ参加者の平均眼  
 圧(右眼)は 14.9mmHg であり、高齢者ほど眼圧が  
 低かった。ボディーマスインデックス (BMI)、  
 収縮期血圧、中心角膜厚は、年齢補正後にも眼圧  
 と正の相関があった。眼圧と関連する因子は多治  
 見スタディでの眼圧と相関結果とほぼ類似してい  
 た。

図：久米島検診受診者の眼圧の分布 (右眼)



7. 「超音波生体顕微鏡による前眼部構造測定結果  
 の新しい定量的表現法」平安山市子、酒井寛、仲  
 村優子、澤口昭一、富所敦男、新家眞、高田英夫、





む)  
 特許取得  
 超音波生体顕微鏡の定量的解析法について特許取得済み

実用新案登録  
 なし。

その他  
 なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

網膜神経細胞死における小胞体ストレスの関与

分担研究者 原 英彰 岐阜薬科大学教授

研究要旨

近年、アルツハイマー病などの神経変性疾患において、小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) ストレスと神経細胞死との関連性が指摘され、神経変性疾患における小胞体ストレスの関与が注目されている。一方、緑内障をはじめとする網膜神経細胞死における小胞体ストレスの関与についてはほとんど明らかにされていない。これまで我々は、マウス硝子体内に *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) を投与すると網膜障害に先行して小胞体ストレスが誘導され、さらに tunicamycin (小胞体ストレス誘導剤) の硝子体投与により小胞体ストレスが誘導され網膜神経細胞死が認められることを明らかにした。このことから、網膜神経細胞死に小胞体ストレスが関与していることが示唆された。さらに我々は、ラット由来網膜神経節細胞株 (RGC-5) を用いてリン酸化 double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) (参照補足説明) の活性化が小胞体ストレスによる網膜神経節細胞に関与しているか否かを RGC-5 及びマウス NMDA 網膜障害モデルを用いて検討した。その結果、PKR の活性化が小胞体ストレス網膜細胞死に関与していること、PKR の活性化の抑制が小胞体ストレスを介した網膜細胞障害に対して有効であることが示唆された。さらに小胞体の分子シャペロンである BiP のプロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイ系スクリーニングより BiP 選択的誘導剤 (BiP inducer X: BIX) を見出し、BIX が小胞体ストレス誘発の神経細胞障害に有効であることを見出した。

以上、小胞体ストレスを制御する PKR 阻害薬及び BiP 選択的な誘導剤は緑内障などの網膜障害における新規治療薬となる可能性が示唆された。

補足説明: double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)

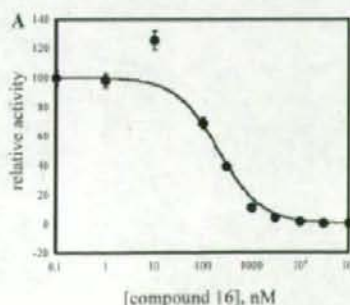
- ・ インターフェロンにより誘導されるセリン/スレオニンリン酸化タンパク質でウイルス感染に対する防御機構の重要な因子。
- ・ リン酸化された活性型 PKR がアルツハイマー病患者脳で確認された上に、リボザイムライブラリーを用いてツニカマイシン処理をした神経芽細胞種において細胞死促進的に働くことが見出された (Onuki et al., EMBO J, 2004)。

A. 研究目的

アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病、プリオン病、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) などに代表される神経変性疾患において、神経細胞内に異常なタンパク質が凝集体を形成していることが認められ、その神経変性との関連性が示唆されてきた。しかしながら、凝集体と神経細胞死とを結ぶ分子機構についてその詳細は不明であった。近年、それら神経変性疾患において、小胞体ストレスと神経細胞死との関連性が指摘され、神経変性疾患における小胞体ストレスの役割が注目されている<sup>1)</sup>

(図1)。一方、緑内障をはじめとする網膜神経細胞死における小胞体ストレス細胞死の関与についてはほとんど明らかにされていない。そこで、筆者らは下記の目的で検討を行った。

- 1) 小胞体ストレスと神経細胞死の関係をラ





ット由来網膜神経節細胞株(RGC-5)及び*in vivo* マウス網膜障害モデルを用いて検討した。その結果、網膜神経細胞死の機序の一部に小胞体ストレスの関与が明らかになった。(平成18年、19年度)

そこで、その治療薬の探索、更にはリード化合物を見出すべく、下記の実験を行った。

- 2) BiPのプロモーター配列を利用したBiPレポーターシステムを利用してBiPのメッセージを誘導する化合物の探索を行った。(平成20年度)
- 3) 上記2)で見出された化合物について緑内障様動物モデルを用いて効果を検証し、緑内障に基づく網膜神経細胞保護薬のリード化合物を見出した。(平成20年度)

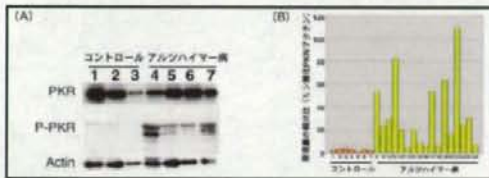


図1 アルツハイマー病患者におけるリン酸化型PKRの発現

(A) はそれぞれのタンパクに対する抗体を用いたウエスタンブロッティング  
(B) はバンドの強度を測定し、アクチン量でリン酸化型PKR量を補正

## B. 研究方法

実験に用いたピロリジノベンゾチアゾール誘導体PKR阻害薬を図2及びその作用プロフィールを示した成績を図3に示す。実験はラット由来網膜神経節細胞株(RGC-5)(図4)及び*in vivo* マウス網膜障害モデル(図5)を用いて検討した。詳細は下記研究発表論文1及び2に記載している。

図2 PKR阻害薬の化学構造式

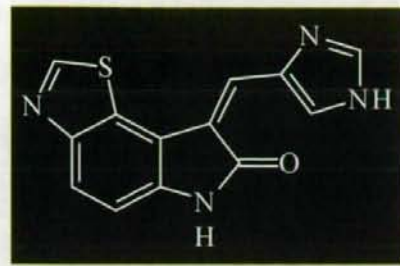


図3 A potent, ATP-binding site directed inhibitor of RNA-dependent protein kinase (PKR).

Shown to effectively inhibit RNA-induced PKR autophosphorylation ( $IC_{50} = 210 \text{ nM}$ ) and rescue PKR-dependent translation block ( $IC_{50} = 100 \text{ nM}$ ). Jammi et al., Biochem Biophys Res Commun, 308, 50-57, 2003.

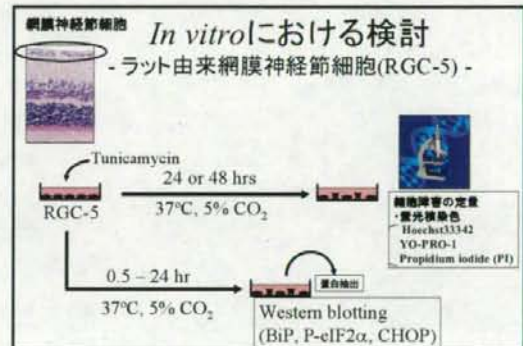


図4 ラット由来網膜神経節細胞株(RGC-5)を用いた*in vitro*実験方法

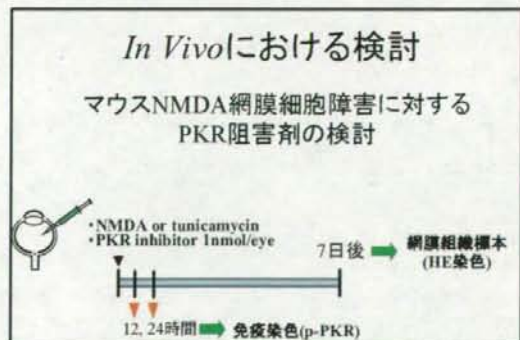


図5 マウス網膜障害モデルを用いた*in vivo* 実験方法



図6 マウス網膜障害モデルを用いた *in vivo* 実験方法と BIX の効果の検討

## C. 研究結果

### C-1 小胞体ストレスと神経細胞死の関係

小胞体ストレス誘導剤である tunicamycin を RGC-5 に添加することにより時間依存的に細胞死が誘導された (図7)。また、その細胞死に先行して小胞体分子シャペロンである glucose-regulated protein (GRP) 78/BiP、転写因子である activating transcription factor 4 (ATF-4) 及び c-Jun N-terminal kinase (JNK) 1/2 (c-Jun) 誘発蛋白質 (CHOP) が誘導された (図7)。また、マウスの硝子体内に *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) または tunicamycin を投与することにより、その7日後に網膜障害が観察され (図8)、それに先行して BiP 及び CHOP が網膜神経節細胞において発現していた (図9, 10)。これらのことから、網膜細胞死に小胞体ストレスが関与していることが示唆された<sup>2)</sup>。

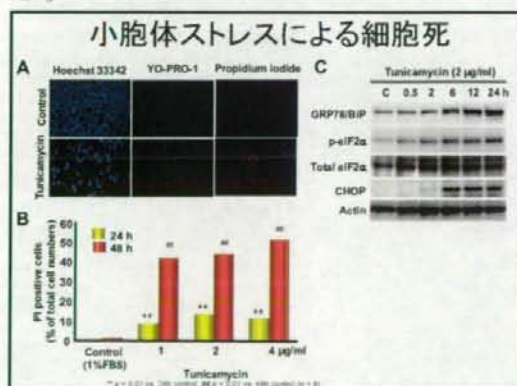


図7.

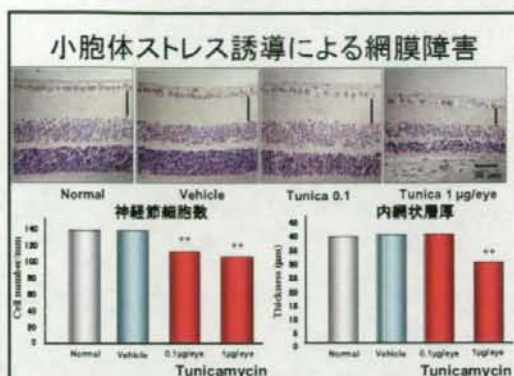


図8.

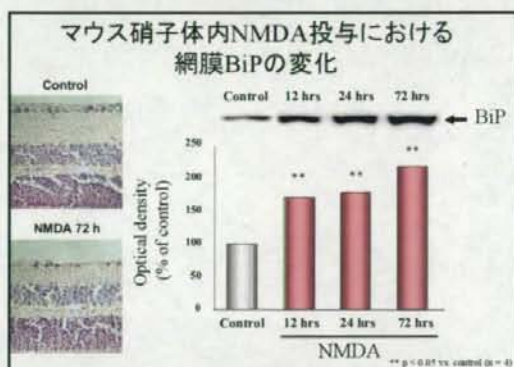


図9.

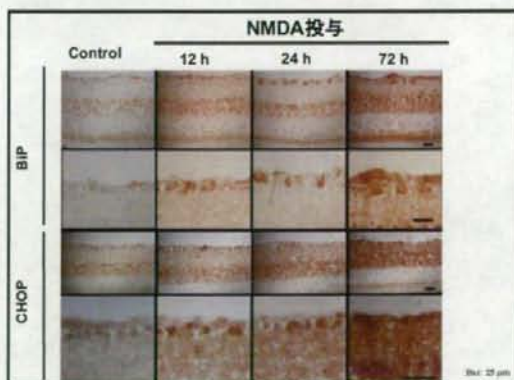


図10.

最近、活性化型のリン酸化 double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) がアルツハイマー病患者、パーキンソン病及びALS患者脳において増加していることが報告されている<sup>3,4)</sup> (図1)。PKRはインターフェロンにより誘導されるセリン/スレオニンリン酸化タンパク質で、ウイルス感染



に対する防御機構の重要な因子であることが知られている<sup>5)</sup>。そこで我々は、PKRの活性化がERストレスによる網膜神経節細胞に関与しているか否かをRGC-5及びマウスNMDA網膜障害モデルを用いて検討した。RGC-5細胞にtunicamycinを添加することにより細胞死に先行してリン酸化PKRの増加が観察された(図11A)。それに対してPKR阻害剤及びPKR siRNAにより、その細胞死を有意に抑制した(図11B-D、図12、図13)。

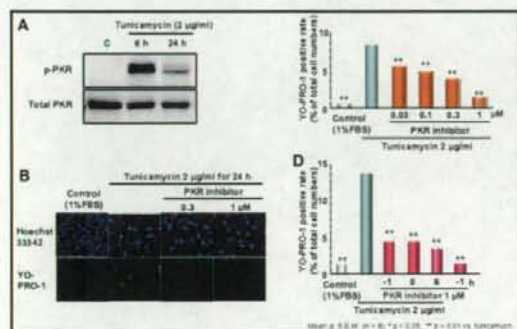


図11 小胞体ストレス細胞死に対するPKRの関与

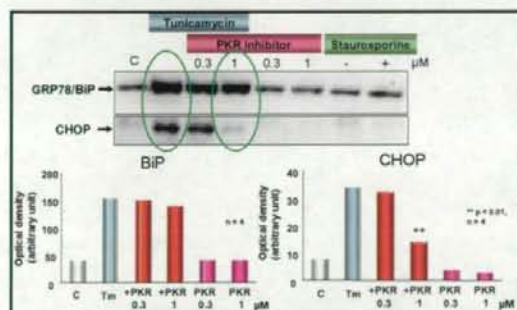


図12 BiPおよびCHOP発現に対するPKR阻害剤の効果

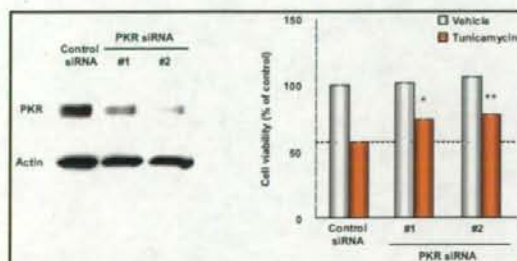


図13 小胞体ストレス細胞死に対するPKR siRNAの作用

さらに、NMDAまたはツニカマイシンをマウス硝子体内に投与することにより網膜内にリン酸化PKRの増加が認められ(図11A)、PKR阻害剤の投与によりNMDA誘発網膜神経節細胞死を有意に抑制した<sup>6)</sup>(図14、15)。

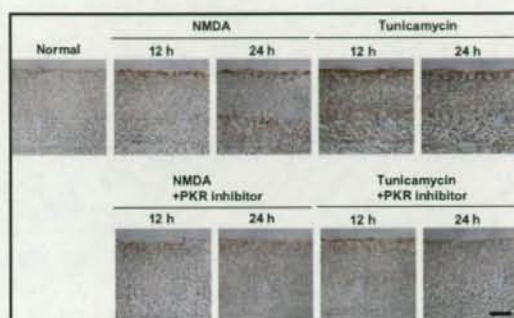


図14 マウス網膜障害モデルにおけるリン酸化PKRの変化

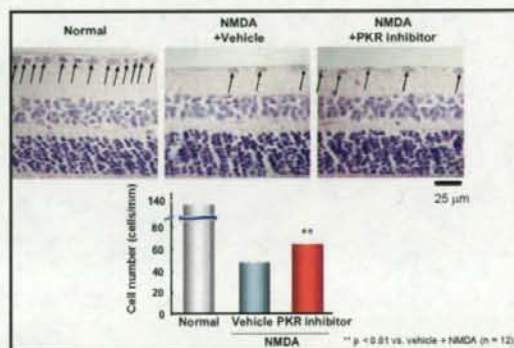


図15 マウスNMDA網膜障害モデルにおけるPKR阻害剤の作用

### C-2 & 3. 各種網膜障害に対するBiP選択的誘導剤の作用

【目的】アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病及び筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などに代表される神経変性疾患において、多くの場合、神経細胞内に異常なタンパク質が凝集体を形成していることが認められ、その神経変性との関連が示唆されてきた。近年、それら神経変性疾患において、小胞体ストレスと神経細胞死との関連性が指摘され、神経変性疾患における小胞体ストレスの役割が注目されている。小胞体に特異的に発現する分子シャペロンBiP/GRP 78が小胞体スト

レスにより誘導され、また *in vitro* において BiP の発現上昇が小胞体ストレスによる障害を軽減することが報告されている。BiP のプロモーター配列を利用した BiP レポーターシステムを利用して BiP のメッセージを誘導する化合物の探索を行った。さらに、そこで見出した化合物 BiP 選択的誘導剤 BiP inducer X (BIX) (図16, 17) を用いて、BiP の特異的発現上昇が小胞体ストレスによる網膜障害を軽減するか否かを検討した。

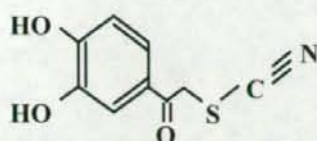
〔方法〕 *In vitro*: ラット由来網膜神経節細胞株 (RGC-5) を用いて BIX の濃度及び時間依存的な BiP の誘導をリアルタイム PCR により検討した。さらに、tunicamycin 処置12時間前に BIX (0.2~5  $\mu$ M) を添加し、tunicamycin 処理24または48時間後の細胞生存率を測定した。*In vivo*: *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 40 nmol のマウス硝子体内投与により網膜障害を惹起させた。BIX 5 nmol は NMDA と同時に硝子体内投与した。NMDA 投与7日後に眼球を摘出し、網膜薄切標本による組織評価を行った。

〔結果〕 *In vitro*: BIX は RGC-5 において BiP を濃度及び時間依存的に誘導した (図18)。また BIX は tunicamycin による細胞死に対して濃度依存的な保護効果を示した (図19)。ツニカマイシン誘発 CHO Pタンパク発現に対して BIX は抑制作用を示した

(図20)。しかし、スタウロsporin 誘発細胞死に対しては BIX は明らかな作用を示さなかった (図21)。マウス硝子体内に BIX を投与すると BiP の発現が経時的に認められた (図22)。*In vivo*: NMDA 投与マウス網膜障害モデルにおいても BIX は有意な細胞保護作用を示した (ツニカマイシンモデル; 図23、NMDAモデル; 図25)。ERAI-マウスを用いた検討で、ツニカマイシンは網膜で XBP-1-Venus の発現を誘導したが、BIX はその誘導を抑制した (図24)。ツニカマイシンまたは NMDA 誘発による CHOP の誘導を BIX は抑制した (図26)。

〔考察〕 BiP を選択的に誘導する薬剤は、小胞体ストレスと関連する網膜障害に対して有効である可能性が示唆された。

## BiP inducer X (BIX)



1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-thiocyanato-ethanone

図16 BIXの化学構造式

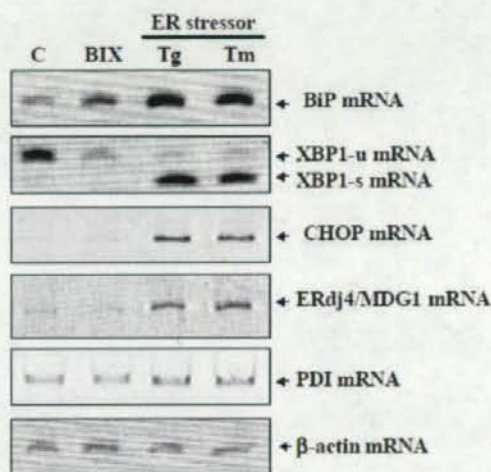


図17 BIXのBiP誘導効果とその他のERストレス  
BIXはBiPのみを誘導し、thapsigargin (Tg)や tunicamycin (Tm)などのERストレスラーが誘導するようなその他のERストレス誘導分子は誘導しない。

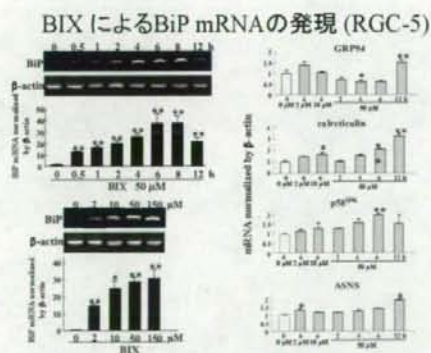


図18 ラット網膜神経節細胞 (RGC-5) における BiP mRNA発現に及ぼすBIXの影響



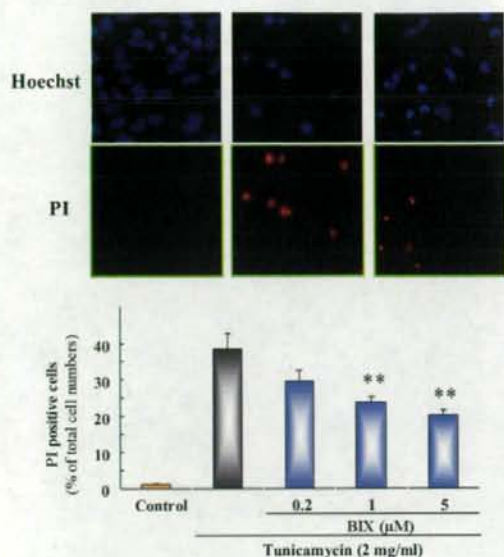


図 19 RGC-5におけるツニカマイシン誘発細胞死に対するBIXの作用

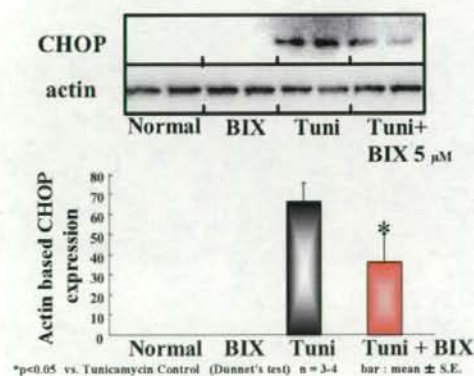


図 20 RGC-5におけるツニカマイシン誘発CHOPタンパク発現に対するBIXの作用

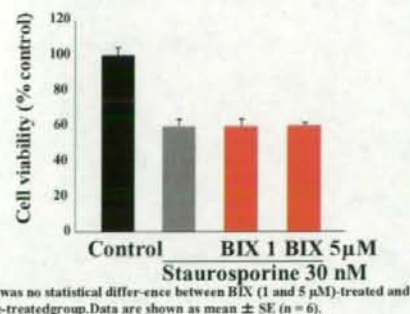


図 21 RGC-5 におけるスタウロスポリン誘発細胞死に対するBIXの作用

細胞死に対する BIX の作用

BIX はスタウロスポリン細胞死に対して作用を示さなかった。

### マウス網膜におけるBIXのBiP誘導効果

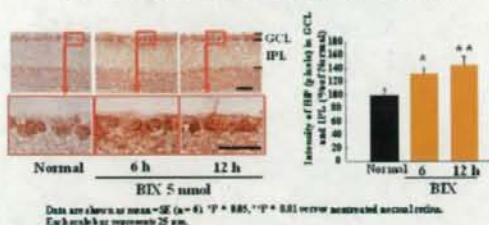


図 22 マウス網膜における BIX の BiP 誘導効果 BIX (5 nmol) はマウス硝子体内に投与され、6 または 12 時間後に眼を摘出された。

### ツニカマイシン誘発マウス網膜細胞死におけるBIXの細胞保護効果

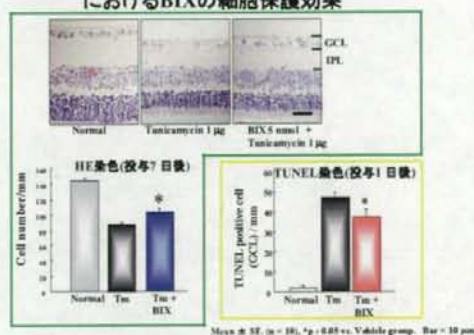


図 23 ツニカマイシン誘発マウス網膜細胞死に対する BIX の細胞保護効果

BIX (5 nmol) の硝子体内投与はツニカマイシン誘発網膜神経節細胞死に対して 1 日後のアポトーシスおよび 7 日後の細胞死を抑制した。

### ERAI TG マウスにおけるツニカマイシン誘発 XBP-1-venus (蛍光蛋白質)発現に対するBIXの作用 (投与24時間後)

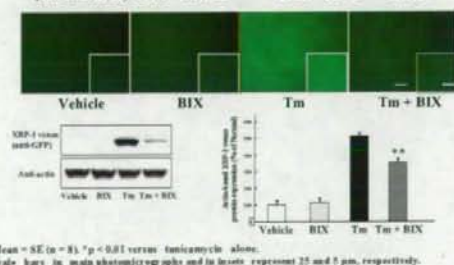


図 24 ERAI マウスにおけるツニカマイシン誘発 XBP-1 ビーナズ発現に対する BIX の作用

小胞体ストレス条件下においてスプライシングを受ける X-box binding protein-1 (XBP-1) 遺伝子

の下流に蛍光蛋白質 VENUS 遺伝子を結合させた遺伝子を組み込んだ遺伝子改変マウス (ERAI マウス) を用いた。ツニカマイシン投与 24 時間後に XBP-1-venus の発現による蛍光が網膜において観察され、とくに網膜神経節細胞層及び内網状層において強い蛍光が認められた。BIX はその発現を抑制した。

#### NMDA 誘発マウス網膜細胞死における BIX の細胞保護効果

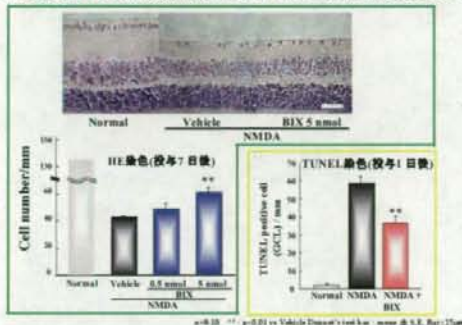


図 25 NMDA 誘発マウス網膜神経細胞死に対する BIX の細胞保護効果

BIX (5 nmol) の硝子体内投与は、NMDA 誘発網膜神経節細胞死に対して 1 日後のアポトーシスおよび 7 日後の細胞死を抑制した。

#### ツニカマイシンまたは NMDA 誘発 CHOP 発現に対する BIX の効果 (投与 3 日後)

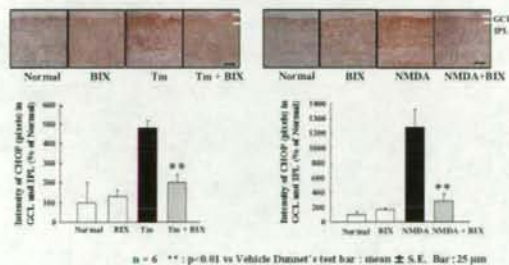


図 26 ツニカマイシンまたは NMDA 誘発 CHOP 発現に対する BIX の効果

#### D. 考察

マウス網膜障害モデルにおいて小胞体ストレスが惹起された。

PKR 阻害剤及び PKR siRNA が小胞体ストレスによる網膜細胞死を抑制した。

PKR 阻害剤はマウス NMDA 網膜障害モデルにおいて

保護作用を示した。

分子シャペロン BiP のプロモーターを用いた解析から、BiP 選択的誘導剤 (BIX) を見出した。

BIX は各種網膜障害モデルにおいて保護作用を示した。

以上、上記 1~3 の検討から、PKR の活性化が ER ストレス網膜細胞死に関与していること、PKR の活性化の抑制が ER ストレスを介した網膜細胞障害に対して有効であることが示唆された。また上記 4 及び 5 の検討から、BiP の誘導は網膜細胞障害に対して有効であることが示唆された。

#### E. 結論

以上のことから、小胞体ストレスを制御しうる薬物は、網膜疾患治療薬の新規な創薬ターゲットになる可能性が示唆された。

#### 引用文献

Aridor M, Balch WE: Integration of endoplasmic reticulum signaling in health and disease. *Nat Med* 5: 745-751, 1999

Shimazawa M, Inokuchi Y, Ito Y, Murata H, Aihara M, Miura M, Araie M and Hara H: Involvement of ER stress in retinal cell death. *Mol Vis* 13: 578-587, 2007

Onuki R, Bando Y, Suyama E, et al. An RNA-dependent protein kinase is involved in tunicamycin-induced apoptosis and Alzheimer's disease. *Embo J* 23: 959-968, 2004

Bando Y, Onuki R, Katayama T, et al. Double-strand RNA dependent protein kinase (PKR) is involved in the extrastriatal degeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease. *Neurochem Int* 46:11-18, 2005

Gale M, Jr, Katze MG: Molecular mechanisms of interferon resistance mediated by viral-directed inhibition of PKR, the interferon-induced protein kinase. *Pharmacol Ther* 78: 29-46, 1998

Shimazawa M, Ito Y, Inokuchi Y and Hara H: Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase in ER stress-induced retinal neuron damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 3729-3736, 2007



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shimazawa M. and Hara H. Inhibitor of double stranded RNA-dependent protein kinase protects against cell damage induced by ER stress. *Neurosci. Lett.*, 409, 192-195, 2006.
- 2) Shimazawa M, Inokuchi Y, Ito Y, Murata H, Aihara M, Miura M, Araie M and Hara H: Involvement of ER stress in retinal cell death. *Mol Vis* 13: 578-587, 2007
- 3) Shimazawa M, Ito Y, Inokuchi Y, and Hara H: Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase in ER stress-induced retinal neuron damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 3729-3736, 2007
- 4) 工藤喬、今泉和則、原英彰、分子シャペロン誘導剤の神経変性疾患治療への応用、*Jpn. J. Neuropsychopharmacol.* 27, 63-67, 2007.
- 5) 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, 364-375, 2008.
- 6) Inokuchi Y., Nakajima Y., Shimazawa M., Kurita T., Kubo M., Saito A., Saji 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.

### 2. 学会発表

- 1) 井口勇太、嶋澤雅光、中島佳美、工藤喬、今泉和則、原英彰、網膜細胞死における小胞体誘導シャペロンの関与、第80回日本薬理学会年会（名古屋、2007、3）
- 2) Suemori S, Shimazawa M, Yamamoto T and Hara H, Involvement of endoplasmic reticulum stress in retinal cell death. The ARVO Annual Meeting (Fort Lauderdale, Florida, 2007, 5, 8)
- 3) 井口勇太、中島佳美、栗田貴教、嶋

- 澤雅光、佐治木弘尚、工藤喬、今泉和則、原英彰  
網膜細胞死における小胞体誘導シャペロンの関与、第27回日本眼薬理学会（岐阜、2007、9、16-17）
- 4) 嶋澤雅光、原英彰、小胞体ストレスと網膜神経細胞死、第2回小胞体ストレス研究会（吹田、2007、10、22）
  - 5) 千原一泰、金本聡自、原英彰、工藤喬、今泉和則、分子シャペロン誘導剤BIXによる神経細胞死抑制効果、A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. 第31回日本神経科学大会（東京、2008、7、9-11）
  - 6) 井口勇太、嶋澤雅光、中島佳美、佐治木弘尚、工藤喬、今泉和則、原英彰  
小胞体ストレスによる網膜障害におけるBiP誘導剤（BIX）の保護効果  
第82回日本薬理学会年会（横浜、2009、3、16-18）

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金(感覚器障害研究事業)分担研究報告書

緑内障性網膜神経障害に対する新規治療薬の開発

分担研究者 金本尚志 広島大学講師

研究要旨

緑内障性網膜神経障害の基礎データを構築すること。

A. 研究目的

緑内障性網膜神経障害における、分子生物学的製剤を用いた新規治療法を開発すること。

B. 研究方法

1. 緑内障性網膜神経障害の関連タンパクの可能性のあるGABA受容体を主として解析した。*In vitro*では、継代培養系の網膜神経細胞であるR28細胞やRGC5細胞を用いて、GABA受容体アンタゴニストであるピククリンやアゴニストであるムシモールを用いて、GABA受容体による網膜神経細胞死への関与をMTSアッセイ等を行って検討した。*In vivo*では、マウス眼球を用いて、網膜神経節細胞死を誘導し、緑内障性網膜障害の誘導因子と考えられるグルタミン酸毒性や酸化ストレスに対するGABA受容体の関与について、組織免疫液染色法を用いて検討した。

2. 緑内障性網膜神経障害の関連タンパクの可能性のあるPDGFR $\alpha$ を主として解析した。まずは、*In vivo*の実験として、網膜内におけるPDGFR $\alpha$ の発現部位を同定するために、マウス網膜サンプルを用いて、免疫染色を行った。次に、*In vitro*の実験として、PDGFR $\alpha$ を介した網膜神経保護効果を検討するために、その特異的リガンドであるPDGF-AAを用いて、継代培養系の網膜神経細胞であるRGC5細胞に対して酸化ストレスなどによる神経細胞死を誘導し、その生存率をMTSアッセイ等を用いて検討した。さらに、siRNA法を導入し、継代培養系の網膜神経細胞であるRGC5細胞に

対してPDGFR $\alpha$ -siRNAを行った後、RGC5細胞に対して神経細胞死を誘導し、その生存率を検討した。

3. 緑内障性網膜神経障害の関連タンパクの可能性のあるT細胞受容体(T cell receptor: TCR)を解析した。まずは、*In vivo*の実験として、網膜内におけるTCRの発現部位を同定するために、マウス網膜サンプルを用いて、TCRのサブタイプであるTCR- $\alpha$ 、TCR- $\beta$ 、TCR- $\gamma$ 、TCR- $\delta$ の免疫染色を行った。また、緑内障モデルマウスであるDBA2Jの網膜内での生後7ヶ月から11ヶ月における経時的なTCRの発現変化を、ウェスタン・ブロット法にて分析した。次に、*In vitro*の実験として、TCRの網膜神経保護効果を検討するために、継代培養系の網膜神経細胞であるRGC5細胞に対して、TCRのsiRNAを行った後、酸化ストレスなどによる神経細胞死を誘導し、その生存率をMTSアッセイ等を用いて検討した。

4. 上記と同じく免疫系に関与するインテグリン・ファミリーのうち、緑内障性網膜神経障害の関連タンパクの可能性のあるインテグリン・ $\beta$ 7(Integrin-beta7: Intb7)を主として解析した。免疫染色を行って、マウス網膜内におけるIntb7の発現部位を同定した。次に、*In vitro*の実験として、Intb7を介した網膜神経保護効果を検討するために、ウィルスベクターを用いたsiRNA法を導入し、RGC5細胞に対してIntb7のsiRNAを行った後、グルタミン酸神経毒性による神経細胞死を誘導し、その生存率を検討した。

(倫理面への配慮)

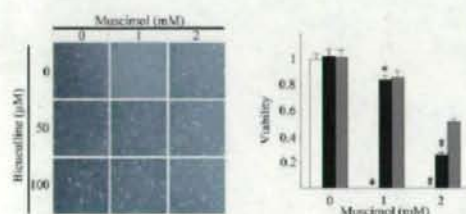
文部科学省告示の「研究機関等における動物実



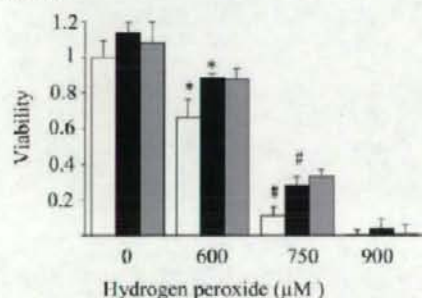
験等の実施に関する基本指針」および、広島大学動物実験指針、広島大学動物実験実施規則に則った。

### C. 研究結果

1. *In vitro* では、GABA受容体アゴニストのムシモールが網膜神経節細胞死を誘導し、ピククリンが特異的にその細胞死を抑制することが判明した。



2. 緑内障性網膜障害の誘導因子とされる酸化ストレスによる網膜神経節細胞死をピククリンが抑制した。

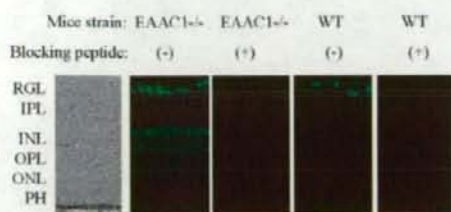


3. 網膜神経節細胞死を誘導する酸化ストレスのシグナル・タンパクの活性化においても、ピククリンによる活性化阻害が確認された。

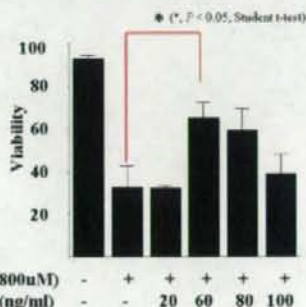


Hydrogen peroxide	(-)	(+)	(+)
Bicuculline	(-)	(-)	(+)

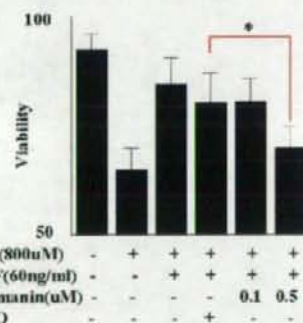
4. PDGFRα は網膜神経節細胞層に豊富に存在することが明らかになった。



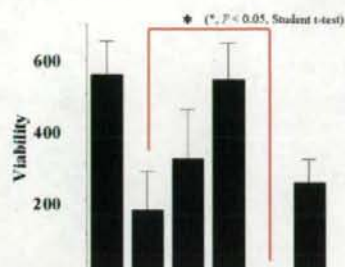
5. PDGF-AAによるPDGFRαの活性化により、酸化ストレスによって誘導される網膜神経節細胞死は抑制された。



6. PI3キナーゼの阻害剤の前投与により、PDGF-AAによる酸化ストレス誘導性網膜神経節細胞死は抑制された。(下図)



7. PDGFRα-siRNAにより、グルタミン酸誘導性の網膜神経節細胞死は変化なかったが、酸化ストレス誘導性網膜神経節細胞死は促進された。

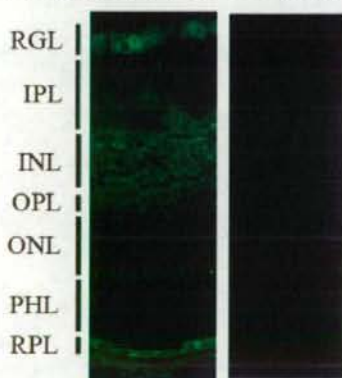


PDGFRα-siRNA - - - + + +  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (600μM) - + - - + -  
 Glutamate(15mM) - - + - - +

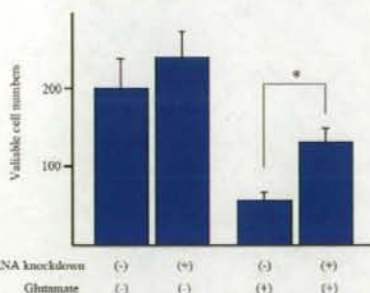
8. 1. TCR の網膜神経節細胞層の局在性と、網膜神経節細胞死への関与が明らかになった(下図)

	TCR α	TCR β	TCR γ	TCR δ
マウスRGCにおける発現	(+)	(+)	(+)	(+)
マウスRGC減少に伴う発現変化	増加	大きく減少	やや増加	増加
siRNAによるグルタミン酸誘導性細胞死 (=グルタミン酸誘導性細胞死への作用)	抑制 (=促進)	強く促進 (=抑制)	抑制 (=促進)	変化なし
siRNAによる酸化ストレス誘導性細胞死 (=酸化ストレス誘導性細胞死への作用)	抑制 (=促進)	抑制 (=促進)	強く抑制 (=促進)	変化なし

9. 免疫染色の結果から、Intb7は網膜神経節細胞層に豊富に存在することが明らかになった。



10. Intb7のsiRNAによって、グルタミン酸神経毒性で誘導される網膜神経節細胞死は抑制された(下図)。



D. 考察

今回の結果を基盤として、今後は動物モデルを用いた神経保護効果について、検討していく必要があると考えられた。

E. 結論

- GABA受容体が網膜神経節細胞死に関連している可能性が考えられたため、その詳細について検討した結果、GABA受容体アンタゴニストであるピククリンが、網膜神経節細胞死を抑制することが判明した。
- 網膜神経節細胞層に存在するPDGFRαの発現は、酸化ストレスに反応して上昇した。
- PDGF-AAの酸化ストレス誘導性網膜神経節細胞死に対する抑制効果はPI3Kを介するものであった。
- PDGFRαのRNAノックダウンによって、酸化ストレス誘導性網膜神経節細胞死は促進された。
- TCRの網膜神経節細胞層の局在性と、網膜神経節細胞死への関与が明らかになった。
- 網膜神経節細胞に局在するIntb7は、その細胞死を促進している可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tamura H, Kawakami H, Kanamoto T, Kato T, Yokoyama T, Sasaki K, Izumi Y, Matsumoto M, Mishima HK. High frequency of open-angle glaucoma in Japanese patients with Alzheimer's disease. J Neuro Sci. 246: 79-83. 2006.

Okumichi H, Kanamoto T, Souchelmytskyi N, Tanimoto S, Tanaka K, Kiuchi Y. Proteomic



analyses of retina of excitatory amino acid carrier 1 deficient mice.

Proteome Sci. 5(1):13. 2007

Okumichi H, Mizukami M, Kiuchi Y, Kanamoto T. : GABA(A) receptors are associated with retinal ganglion cell death induced by oxidative stress. Exp Eye Res. 86: 727-733. 2008.

Mizukami M, Kanamoto T, Souchelnytskyi N, Kiuchi Y.: Proteome profiling of embryo chick retina. Proteome Sci. 6(1):3. 2008

Sasaki T, Watanabe W, Muranishi Y, Kanamoto T, Aihara M, Miyazaki k, Tamura H, Saeki T, Souchelnytskyi N, Souchelnytskyi S, Aoyama H, Honda ZI, Furukawa T, Mishima HK, Honda H. Overexpression of ocular development-associated gene (ODAG) in the eye induced elevated intraocular pressure, optic nerve atrophy, and impaired retinal development. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 Jan; 50(1): 242-8.

## 2. 学会発表

Kanamoto T, et al. Proteomics analysis of the retina of EAAC1-knock out mice: Neuro-protective effect of PDGF against glutamate-induced excitotoxicity in retinal ganglion cells. 2006. ARVO (Florida. USA)

金本 尚志、水上 皆、谷本 誠治、木内 良明：PDGFR・受容体の神経保護効果：第27回日本眼薬理学会、岐阜、2007年9月

Kanamoto T : Neuroprotective effect of platelet-derived growth factor-alpha against oxidative stress Glaucoma summer camp, Awaji, Japan, July, 2008.

金本 尚志：緑内障関連タンパク、岡山緑内障研究会、岡山、2008年7月

金本尚志、奥道 秀明、水上 皆、木内良明：T細胞受容体の網膜神経節細胞における機能解析 第112回日本眼科学会総会、横浜、2008年4月

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

## 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
Shimazawa M. and Hara H.,	Inhibitor of double stranded RNA-dependent protein kinase protects against cell damage induced by ER stress	Neurosci. Lett.	409	192-195	2006
Shimazawa M, Inokuchi Y, Ito Y, Murata H, Aihara M, Miura M, Araie M, Hara H	Involvement of ER stress in retinal cell death	Mol Vis	13	578-587	2007
Shimazawa M, Ito Y, Inokuchi Y, and Hara H	Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase in ER stress-induced retinal neuron damage	Invest Ophthalmol Vis Sci	48	3729-3736	2007
工藤喬、今泉和則、原英彰	分子シャペロン誘導剤の神経変性疾患治療への応用	Jpn. J. Neuropsychopharmacol.	27	63-67	2007
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	364-375	2008
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.	エリ	334-344	2009
Tamura H, Kawakami H, Kanamoto T, Kato T, Yokoyama T, Sasaki K, Izumi Y, Matsumoto M, Mishima HK	High frequency of open-angle glaucoma in Japanese patients with Alzheimer's disease	J Neurol Sci	246	79-83	2006



Yu ZK, Chen YN, Aihara M, Mao W, Uchida S, Araie M	Effects of beta-adrenergic receptor antagonists on oxidative stress in purified rat retinal ganglion cells	Mol Vis	11	833-839	2007
Yi-Ning Chen, Hideyuki Yamada, Wei Mao, Shigemi Matsuyama, Makoto Aihara, Makoto Araie.	Hypoxia-Induced Retinal Ganglion Cell Death and the Neuroprotective Effects of Beta-adrenergic Antagonists	Brain Research	7	28-37	2007
Okumichi H, Mizukami M, Kiuchi Y, Kanamoto T.	GABA(A) receptors are associated with retinal ganglion cell death induced by oxidative stress	Exp Eye Res	3	In press	2008
Mizukami M, Kanamoto T, Souchelnytskyi N, Kiuchi Y	Proteome profiling of embryo chick retina	Proteome Sci	22	3-6	2008
Okumichi H, Kanamoto T, Souchelnytskyi N, Tanimoto S, Tanaka K, Kiuchi Y	Proteomic analyses of retina of excitatory amino acid carrier 1 deficient mice	Proteome Sci	21	13-16	2007
Saeki T, Ohashi M, Aihara M, Araie M.	The efficacy of Tonolab in detecting physiological and pharmacological changes of mouse intraocular pressure - comparison with TonoPen and Microneedle manometry	Curr Eye Res	33	247-52	2008
Murata H, Aihara M, Chen YN, Ota T, Numaga J, Araie M.	Imaging Mouse Retinal Ganglion Cells and Their Loss in vivo by a Fundus Camera in the Normal and Ischemia-Reperfusion Model	Invest Ophthalmol Vis Sci	49	5546-5552	2008
Abe H, Shirakashi M, Tsutsumi T, Araie M, Tomidokoro A, Iwase A, Tomita G, Yamamoto T	Laser scanning tomography of optic discs of the normal Japanese population in a population-based setting.	Ophthalmology	116	223-230	2009
Saito H, Tomidokoro A, Tomita G, Araie M, Wakakura M.	Optic disc and peripapillary morphology in unilateral nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy and age- and refraction-matched normals.	Ophthalmology	115	1585-1590	2008
Saito H, Tomidokoro A, Yanagisawa M, Aihara M, Tomita G, Araie M.	Scanning laser polarimetry with enhanced corneal compensation in patients with open-angle glaucoma	J Glaucoma	17	24-29	2008



## Inhibitor of double stranded RNA-dependent protein kinase protects against cell damage induced by ER stress

Masamitsu Shimazawa, Hideaki Hara\*

Department of Biofunctional Molecules, Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1 Mitahara-higashi, Gifu 502-8585, Japan

Received 22 August 2006; received in revised form 15 September 2006; accepted 21 September 2006

### Abstract

Endoplasmic reticulum (ER)-stress is known to induce neuronal cell death and to play roles in neurodegenerative diseases. Phosphorylation of double stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) has been demonstrated in brain tissues in patients with Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases. Here, we examined the effect of a PKR inhibitor (an imidazolo-oxindole derivative that acts as an ATP-binding site-directed inhibitor of PKR) on the neuronal cell death induced by ER-stress in cultured human neuroblastoma cells (SH-SY5Y). Cell damage was induced by tunicamycin (an ER-stress inducer), and cell viability was measured by Hoechst 33342 and YO-PRO-1 double staining and by the resazurin-reduction test (to evaluate metabolic activity). Treatment with tunicamycin at 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 24 h induced apoptotic cell death accompanied by nuclear condensation and/or fragmentation, and these cells were positive for YO-PRO-1 (early-phase apoptosis and necrosis indicator). Treatment with the PKR inhibitor at 0.1 or 0.3  $\mu\text{M}$  led to a decrease in the number of apoptotic cells induced by tunicamycin. In the resazurin-reduction test, the PKR inhibitor (at 0.1 and 0.3  $\mu\text{M}$ ) concentration-dependently inhibited the tunicamycin-induced decrease in metabolic activity. On the other hand, treatment with the PKR inhibitor alone (at 0.3  $\mu\text{M}$ ) had no effect on cell morphology or viability (versus in normal control cells). These results indicate that inhibition of PKR activation may be neuroprotective against ER stress-induced cell damage.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Endoplasmic reticulum (ER) stress; Double stranded RNA-dependent protein kinase (PKR); Tunicamycin; Neuroblastoma; SH-SY5Y cells

In chronic neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), abnormally unfolded proteins are known to aggregate and accumulate in neurons, and they are thought to be closely related to the initiation and development of these neurodegenerative diseases [1,5,8]. Recently, endoplasmic reticulum (ER)-stress has been reported to induce neuronal cell death, and moreover to play roles in neurodegenerative diseases [5]. Furthermore, it has been reported that one of the proapoptotic proteins involved in ER-stress-mediated apoptosis (tunicamycin-induced apoptosis) is a double stranded RNA-dependent protein kinase (PKR), as identified using a randomized ribozyme library [12]. PKR, an interferon-induced protein kinase that was initially identified in a study of responses to viral infection, is activated by the extensive secondary structure of viral RNA [3]. Upon binding to double-stranded RNA, PKR is autophosphorylated, and it then increases the cellular

sensitivity to apoptotic stimuli through a number of putative pathways, including the phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) [14,17]. Interestingly, phosphorylation of PKR has been demonstrated in brain tissues in patients with Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, and ALS [2,6,12,13]. Consequently, it has been suggested that PKR may be involved not only in the apoptosis induced by viral infection, but also in that induced by ER-stress. Recently, Jammi et al. discovered a potent, small-molecule PKR inhibitor, an imidazolo-oxindole derivative, by screening a library of 26 different ATP-binding site-directed inhibitors with a variety of structure [7]. However, there has been no report of any effect of a PKR inhibitor on ER-stress-induced cell death. Hence, our purpose in the present study was to examine whether the above PKR inhibitor might reduce the neuronal death induced by ER-stress (tunicamycin).

Cultures of human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagles's medium (D-MEM, St. Louis, MO) containing 10% FBS (Valeant, Costa Mesa, CA), 100 U/ml penicillin (Meiji Seika Kaisha Ltd., Tokyo, Japan), and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin (Meiji Seika Kaisha Ltd.)

\* Corresponding author. Tel.: +81 58 237 8596; fax: +81 58 237 8596.

E-mail address: [hidehara@gifu-pu.ac.jp](mailto:hidehara@gifu-pu.ac.jp) (H. Hara).



in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. The cells were passaged by trypsinization every 5–7 days, as described in a previous report [9]. To examine the effect of the above PKR inhibitor, {8-(imidazol-4-ylmethylene)-6H-azolidino[5,4-g]benzothiazol-7-one} (Calbiochem, San Diego, CA), on tunicamycin-induced cell death, cells were seeded at a density of  $1 \times 10^4$  cells per well into 96-well plates, and then incubated in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C for 2 days. Tunicamycin (Wako, Osaka, Japan) was added to the cells at a final concentration of 2 µg/ml. The PKR inhibitor was added 1 h before the tunicamycin treatment, at which time the cell-culture medium was replaced with D-MEM containing 1% FBS to reduce the cell growth as long as possible. Assessment of cell viability was performed using two methods, each at 24 h after the addition of tunicamycin. The first method was a single-cell digital imaging-based method employing fluorescent staining of nuclei. Cell death was assessed on the basis of combination staining with fluorescent dyes (namely, Hoechst 33342 and YO-PRO-1 (Molecular Probes, Eugene, OR)), observations being made using an OLYMPUS IX70 inverted epifluorescence microscope (OLYMPUS, Tokyo, Japan). Hoechst 33342 ( $\lambda_{ex}$  360 nm,  $\lambda_{em}$  > 490 nm) freely enters living cells and, therefore, stains the nuclei of viable cells, as well as those that have suffered apoptosis or necrosis. Apoptotic cells can be distinguished from viable and necrotic cells on the basis of nuclear condensation and fragmentation. YO-PRO-1 ( $\lambda_{ex}$  491 nm,  $\lambda_{em}$  > 509 nm) is a membrane-impermeant dye that is generally excluded from viable cells, whereas early-stage apoptotic and necrotic cells are YO-PRO-1-positive. At the end of the culture period, Hoechst 33342 and YO-PRO-1 dyes were added to the culture medium (at 8 and 0.1 µM, respectively) for 30 min. Images were collected using a digital camera (COOLPIX 4500, Nikon, Tokyo, Japan). In a blind manner, a total of at least 400 cells per condition were counted using image-processing software (Image-J ver. 1.33f; National Institutes of Health, USA). As the second method for measuring cell viability, cell metabolic activity was quantitatively assessed by the fluorescence-intensity changes induced by the cellular reduction of resazurin to resorufin. All experiments were performed in D-MEM medium at 37 °C. Cell viability was assessed by treatment with 10% resazurin solution for 2 h at 37 °C following by examination of fluorescence at 560/590 nm. Fluorescence was expressed as a percentage of that shown by control cells in D-MEM containing 1% FBS, after subtraction of background fluorescence.

Representative fluorescence stainings of nuclei (using Hoechst 33342 and YO-PRO-1 dyes) are shown in Fig. 1A. Non-treated control cells displayed normal nuclear morphology and little staining with YO-PRO-1 dye (which stains early-stage apoptotic and necrotic cells). Treatment with tunicamycin led to condensation and fragmentation of nuclei, and to positive staining with YO-PRO-1 dye. Treatment with the PKR inhibitor at 0.1 and 0.3 µM reduced both of the tunicamycin-induced effects (morphological changes in nuclei and the number of cells stained with YO-PRO-1). The number of cells exhibiting YO-PRO-1 fluorescence was counted, and positive cells were expressed as a percentage of YO-PRO-1- to Hoechst 33342-positive cells (Fig. 1B). After treatment with tunicamycin at 2 µg/ml for 24 h,

the percentage of YO-PRO-1-positive cells was  $44.1 \pm 1.9\%$  ( $n=8$ ), while in the non-treated control group (supplemented with 1% FBS) it was  $8.6 \pm 1.2\%$  ( $n=8$ ). Treatment with the PKR inhibitor at either 0.1 or 0.3 µM significantly reduced the tunicamycin-induced increase in YO-PRO-1-positive cells. In the resazurin-reduction test, tunicamycin decreased cell viability to approximately 70% of control (Fig. 1C). The PKR inhibitor (at 0.1 or 0.3 µM) reduced this decrease, the effect being significant at each concentration (Fig. 1C). On the other hand, treatment with the PKR inhibitor alone (at 0.3 µM) led to no change in cell morphology or viability (versus normal control cells) (Fig. 1B and C).

In the present study, we used the small-molecule inhibitor of PKR reported by Jammi et al. [7] to be an effective inhibitor of RNA-induced PKR autophosphorylation ( $IC_{50}=0.21$  µM) and to rescue PKR-dependent translation block ( $IC_{50}=0.1$  µM) in human PKR. The above potencies are close to the concentrations (0.1 and 0.3 µM) at which this inhibitor displayed a protective effect against ER-stress-induced cell death in the present study. There has been no previous report of any effects of a PKR inhibitor in living cells. Hence, this is the first report demonstrating a protective effect of a PKR inhibitor on ER-stress-induced neuronal cell death, although regarding specificity against PKR we must consider the possibility of effects on other targets as a limitation. Furthermore, our results were obtained in cultured neuroblastoma cells in the present study. Therefore, the protective effect *in vitro* may be difficult to extrapolate directly to animal models *in vivo*.

Activation of PKR by an ER-stress inducer (tunicamycin) has been well described by Onuki et al. [12]. The phosphorylated form of PKR translocates into nuclei and forms an aggregate, while overexpression of the dominant-negative form of the PKR phosphorylation site attenuates the apoptosis induced by tunicamycin in human neuroblastoma cells (SK-N-SH). Furthermore, aggregated  $\beta$ -amyloid peptide has been reported to activate PKR via its phosphorylation and/or cleavage through calcium release from the ER, with activation of caspase-8 and caspase-3 as upstream signals [15]. However, little is known about the downstream signals or about the precise mechanisms by which PKR induces cell death. The following possible mechanism may be proposed: eIF2 $\alpha$  phosphorylation induced by activated PKR results in an upregulation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-homologous protein/growth arrest and DNA damage-inducible protein 153 (CHOP/GADD153), a proapoptotic transcription factor. On the other hand, Takizawa et al. [16] reported that a dominant-negative mutant of PKR inhibited both the apoptosis and the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation induced by apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1), a member of the mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKKK) family, which is activated by a variety of apoptosis-inducers. Both ASK1 and PKR are known to bind proteins associated with death receptors, such as tumor necrosis factor (TNF)-receptor-associated protein 2 (TRAF2) [4,11]. During ER-stress, ASK1 is recruited to oligomerized inositol-requiring enzyme-1 (IRE1) complexes containing TRAF2, thereby activating this kinase and causing downstream activation of c-Jun N-terminal



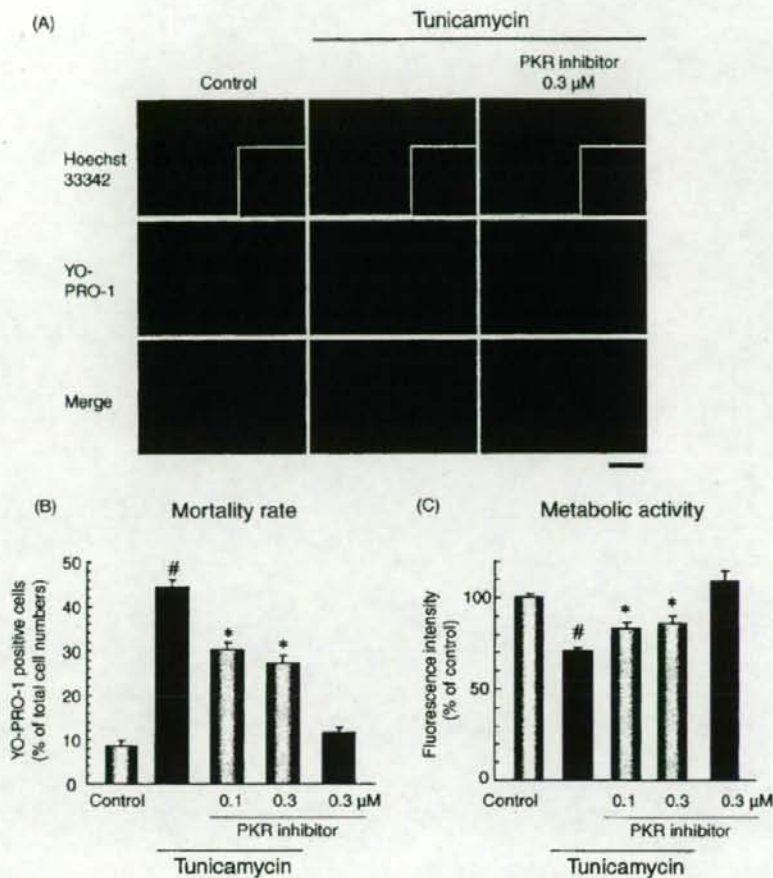


Fig. 1. Effects of the double stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) inhibitor on the SH-SY5Y cell death induced by tunicamycin. (A) Representative fluorescence microscopy showing nuclear staining for Hoechst 33342 (blue) and YO-PRO-1 (green) following 24 h tunicamycin (2  $\mu$ g/ml) treatment. Magnified images for Hoechst 33342 staining are shown in white frames. Control, 1% FBS; bar = 50  $\mu$ m. (B) Number of cells exhibiting YO-PRO-1 fluorescence was counted, and positive cells were expressed as the percentage of YO-PRO-1-positive to Hoechst 33342-positive cells. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 8$ ). <sup>#</sup>  $p < 0.01$  versus tunicamycin-treated group; <sup>\*</sup>  $p < 0.01$  versus control (1% FBS) group (Dunnett's test). (C) Cell metabolic activity was measured using a resazurin-reduction test. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 8$ ). <sup>#</sup>  $p < 0.01$  versus tunicamycin-treated group; <sup>\*</sup>  $p < 0.01$  versus control (1% FBS) group (Dunnett's test).

kinase (JNK) and p38 MAPK [10]. Thus, PKR may activate the ASK1-p38 MAPK/JNK signaling pathways that execute apoptosis. However, their activations alone would not be sufficient to explain the effects that occur following the translocation to nuclei and aggregation of PKR. Therefore, further studies will be needed to clarify the precise mechanisms.

In conclusion, our results indicate that PKR activation may play a pivotal role in the SH-SY5Y cell death induced by ER-stress.

#### Acknowledgement

The authors wish to express their gratitude to Dr. Hirokazu Hara, Department of Clinical Pharmaceuticals, Gifu Pharmaceutical University, Japan, for the kind gift of SH-SY5Y cells.

#### References

- [1] M. Aridor, W.E. Balch, Integration of endoplasmic reticulum signaling in health and disease, *Nat. Med.* 5 (1999) 745–751.
- [2] Y. Bando, R. Onuki, T. Katayama, T. Manabe, T. Kudo, K. Taira, M. Tohyama, Double-strand RNA dependent protein kinase (PKR) is involved in the extrastriatal degeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease, *Neurochem. Int.* 46 (2005) 11–18.
- [3] M. Gale Jr., M.G. Katze, Molecular mechanisms of interferon resistance mediated by viral-directed inhibition of PKR, the interferon-induced protein kinase, *Pharmacol. Ther.* 78 (1998) 29–46.
- [4] J. Gil, M.A. Garcia, P. Gomez-Puertas, S. Guerra, J. Rullas, H. Nakano, J. Alcami, M. Esteban, TRAF family proteins link PKR with NF- $\kappa$ B activation, *Mol. Cell Biol.* 24 (2004) 4502–4512.
- [5] H.P. Harding, M. Calton, F. Urano, I. Novoa, D. Ron, Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein response, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18 (2002) 575–599.