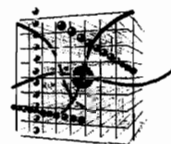


疾患と ER ストレス

Kazunori Imaizumi © 今泉和則

宮崎大学医学部解剖学講座分子細胞生物学分野



Summary

膜結合型タンパク質あるいは分泌型タンパク質は小胞体内に一旦運び込まれ、様々な修飾を受けて機能を持ったタンパク質に成熟していく。この過程で細胞内外からの様々な刺激によりタンパク質の成熟が阻害され、小胞体 (endoplasmic reticulum ; ER) 内に不良タンパク質 (unfolded protein) が過剰に蓄積し、細胞にダメージを与える (ER ストレス)。細胞にとって ER 機能異常は極めて重篤な事態で、直ちにストレスから回避するための防御システムを活性化させる。この応答系を ER ストレス応答あるいは unfolded protein response (UPR) と呼び、酵母から哺乳細胞に至るまで真核細胞に広く保存されている。ER 内タンパク品質管理の障害が脳神経疾患や糖尿病、骨軟骨疾患などの数多くの疾患に密接に関わることがわかってきた。本稿では ER ストレスがどのような機序で各疾患を発症させているのか、これまで明らかにされてきた分子機構について紹介する。

Key words

- 小胞体 (ER) ストレス
- 骨軟骨疾患
- 脳神経疾患
- 疾患治療
- 糖尿病

はじめに

細胞内外からの様々な刺激により小胞体 (endoplasmic reticulum ; ER) 内腔に折り畳み不全のタンパク質 (unfolded proteins) がたまる状態を、ER ストレスという。ER ストレスが加わると、細胞は直ちにストレスから回避するための防御システムを活性化させる。これがいわゆる ER ストレス応答あるいは unfolded protein response (UPR) である¹⁾²⁾ (オーバービュー 2 参照)。このストレス応答系は、酵母から哺乳細胞に至るまで真核細胞に広く保存されており、タンパク質の成熟を支える重要なシステムであるとともに、非常時に細胞死から身を守るのにも不可欠な役割を演じている。

2000 年前後までに ER ストレスに応答する 3 つの ER ストレスセンサーが同定され、それらから発信されるシグナル経路が、ER に蓄積した異常タンパク質の排除に必須であることが明らかにされた。その後、ER ストレス応答はタンパク品質管理における単なるマシナリーとして機能しているだけでなく、特定の細胞の分化・成熟にも重要な役割を演じていることがわかってきた³⁾⁴⁾。更に、ER 機能障害が様々な疾患の発

症に直結することがヒトの遺伝子解析やマウスモデルを用いた研究から明らかにされ、ER ストレスは疾患研究の1つの大きな領域を占めるに至っている。

本稿では、ER ストレスあるいはそのストレス応答が関与する疾患の発症機序と疾患治療へのアプローチについて、最近の知見を紹介する。

神経変性疾患

神経変性疾患では、神経細胞内に構造異常のタンパク質が過剰に蓄積するという共通の特徴がある。タンパク質の立体構造が変化し、細胞内に蓄積して細胞傷害を引き起こす疾患を総称してコンフォメーション病と呼ぶ。異常タンパク質の蓄積は神経細胞死につながり、神経機能脱落から種々の神経症状が現れる。ここではアルツハイマー病(AD)、パーキンソン病、およびポリグルタミン病とER ストレスとの関連性について述べる。

1. アルツハイマー病(AD)

ADは認知機能の低下を伴う進行性の神経変性疾患である。AD患者脳では、老人斑の構成成分であるアミロイドβタンパク質(Aβ)が細胞内外に過剰に蓄積する。

Aβを神経系細胞に添加すると、アポトーシスを起こす。このアポトーシスには、ノックアウトマウスの解析によりカスパーゼ12が関与することが報告されている。カスパーゼ12はER ストレス依存的に活性化することより、Aβによる細胞内Ca代謝異常が原因でER ストレスを起こし、アポトーシスを誘導している可能性がある⁵⁾⁶⁾。AD患者脳においてはマウスのカスパーゼ12と同様の働きをするとされるカスパーゼ4が増加している⁷⁾。

家族性ADの主要な原因遺伝子としてプレセニリン(presenilin; PS) 1, 2が知られている。変異PSはAβの産生に影響を及ぼすだけでなく、それ自身が細胞に様々な障害を与えることが報告されている⁸⁾。

細胞に変異PS1を発現させると、Caホメオスタシスの異常やER ストレスに脆弱性を示すようになる。変異PS1はinositol requiring enzyme 1 (IRE1)に結合し、IRE1の活性化を阻害する。その結果、IRE1からのシグナルが減弱し、ER分子シャペロンであるBiP/GRP78の転写が低下する。つまり変異PS1は、ER ストレスから回避するストレス応答を障害するのである⁹⁾¹⁰⁾。AD患者脳においてBiP/GRP78やPKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)の活性化レベルが上昇していることも報告されている¹¹⁾。この応答が死に至る細胞の二次的応答なのか、直接ER ストレスが神経細胞死を引き起こしているのか、更なる検討が必要である。

最近の研究では、チオール-ジスルフィド交換反応を触媒し、ジスルフィド結合の形成と転位反応を促進するタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)のS-ニトロシル化がADやパーキンソン病などを引き起こす一因になる可能性が示されている¹²⁾。S-ニトロシル化は、タンパク質機能に重要なシステインのチオール基に一酸化窒素(NO)を転移させる反応である。S-ニトロシル化されたPDIは酵素活性を失い、ジスルフィド結合ができなくなったタンパク質がER内に蓄積し、ER ストレスを引き起こす。AD患者脳ではPDIのS-ニトロシル化が検出されている。

2. パーキンソン病

パーキンソン病は黒質緻密部のドーパミンニューロンが選択的に変性脱落し、運動障害を生じる神経変性疾患である。パーキンソン病では変性神経細胞内にα-synucleinを主成分とするLewy小体と呼ばれる封入体が認められる。遺伝性パーキンソン病原因遺伝子としてはα-synuclein, Parkin, Uch-L1などが知られている。

家族性パーキンソン病の一種である常染色体劣性家族性パーキンソンニズム(AR-JP)は、ユビキチンリガーゼであるParkinが欠損するために発症する。Parkinの遺伝子欠損によってE3リガーゼとしての機能

が低下あるいは消失し、分解されるべき基質タンパク質が蓄積して、細胞機能低下や細胞死に至ることが考えられる^{13,14)}。Parkinの基質とされるタンパク質としては、Pael受容体、Synphilin-1、CDCrelなどが挙げられる。その中でもPael受容体はunfoldedになりやすく、この状態のPael受容体は本来Parkinによってユビキチン化され、ER associated degradation (ERAD)系にて分解される。Parkinを欠損する患者脳ではPael受容体の分解阻害が起き、unfoldedのPael受容体がERに過剰に蓄積することでERストレスを起こす。Pael受容体を過剰発現させた培養細胞ではERストレスに対して脆弱であり、この脆弱性は野生型Parkinの過剰発現により抑制されるが、変異Parkinの過剰発現では抑制されない¹⁵⁾。

3. ポリグルタミン病

ハンチントン病、球脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳変性症などの神経変性疾患では、それぞれの原因遺伝子内でCAG配列が異常に伸張し、グルタミン鎖をコードするようになる。その結果、ポリグルタミンを含む部分が細胞質あるいは核内に蓄積して封入体を形成し、

神経機能障害や神経細胞死を引き起こす。CAG配列の異常伸張により生じる疾患を総称してポリグルタミン病と呼ぶ。

ポリグルタミンを含む封入体は核内あるいは細胞質で形成され、転写調節機構及びタンパク質処理機構に影響を及ぼすと考えられている。ポリグルタミンを培養細胞に過剰発現させると、大量のポリグルタミンの処理によりプロテアソーム活性は徐々に減弱する。プロテアソーム活性の低下により異常タンパク質の分解が遅滞し、神経細胞を傷害する。プロテアソーム活性の低下はER関連分解ERAD系の活性低下につながり、ERストレスを引き起こす。apoptosis signaling kinase 1 (ASK1)欠損細胞ではポリグルタミンによる細胞死が抑制されることから、ポリグルタミンの過剰発現による神経細胞死には、ERストレスからのIRE1-ASK1-JNK経路が関与する¹⁶⁾。

4. その他

表1に、ERストレスが関わる脳神経疾患をまとめた。表1に示すように、多種多様な脳神経疾患にERストレスが関連する。神経細胞はポストマイトオーティ

疾患	関連分子	論文
アルツハイマー病	プレセニリン	Katayama T, et al : Nat Cell Biol 1 : 479-485, 1999 Guo Q, et al : Nat Med 5 : 101-106, 1999
	Aβ	Nakagawa T, et al : Nature 403 : 98-103, 2000
	PDI	Uehara T, et al : Nature 441 : 513-517, 2006
パーキンソン病	Parkin-Pael受容体	Imai Y, et al : Cell 105 : 891-902, 2001
	6-ヒドロキンドーバミン	Holtz WA, et al : J Biol Chem 278 : 19367-19377, 2003
ポリグルタミン病 (CAGリピート病)	ポリグルタミン	Nishitoh H, et al : Genes Dev 16 : 1345-1355, 2002 Thomas M, et al : J Biol Chem 280 : 21264-21271, 2005
プリオン病	プリオン	Hetz C, et al : EMBO J 22 : 5435-5445, 2003
筋萎縮性側索硬化症	SOD	Kikuchi, H, et al : Proc Natl Acad Sci USA 103 : 6025-6030, 2006
脳虚血	ORP150	Tamatani M, et al : Nat Med 7 : 317-323, 2001
Wolfram症候群	WFS1	Fonseca SG, et al : J Biol Chem 280 : 39609-39615, 2005
Pelizaeus-Merzbacher病	PLP1	Southwood CM, et al : Neuron 36 : 585-596, 2002
躁うつ病	XBP1	Kakiuchi C, et al : Nat Genet 35 : 171-175, 2003

表1. ERストレスと脳神経疾患

ックな細胞であることから、ほかの細胞と異なり一度蓄積した unfolded タンパク質は細胞が死ぬまで細胞内に留まるため、ER ストレスやプロテアゾーム系の障害に陥りやすいと考えられる。

糖尿病

膵臓ランゲルハンス島に存在するβ細胞は、インスリンを分泌し血糖値を維持する重要な働きをしている。糖尿病は膵β細胞のインスリン分泌の低下、あるいは肝臓や骨格筋などでのインスリン抵抗性により発症する。膵β細胞には、ER ストレスセンサーである IRE1 や PERK が豊富に発現しており、インスリン分泌のために厳密に ER タンパク質品質管理を行っている。PERK 遺伝子は、Wolcott-Rallison 症候群と呼ばれる新生児糖尿病の原因遺伝子であることも知られている¹⁷⁾。また PERK のノックアウトマウスでは生後にランゲルハンス島β細胞がアポトーシスにより徐々に

死滅し、インスリンの分泌が著しく低下する¹⁸⁾¹⁹⁾。PERK によりリン酸化され活性化される、eukaryotic initiation factor 2α (eIF2α)のリン酸化部位に変異を与えたノックインマウスにおいても、膵臓の低形成やインスリンの合成低下が観察されている²⁰⁾。このように PERK-eIF2α 経路は膵β細胞の機能発現には必須であり、その経路に異常が生じるとインスリンの合成・分泌障害を伴うアポトーシスに陥る。膵β細胞はインスリンを大量に合成・分泌しているため、常に弱い ER ストレスが負荷された状態にあるが、通常時は ER ストレス応答によって細胞死から守られている。一方、ER ストレス応答に必須の因子が欠如したり機能低下が起こると、C/EBP homologous protein (CHOP)、c-Jun-N-terminal kinase (JNK) 及びカスパーゼ 12 (ヒトではカスパーゼ 4 に相当)が活性化してアポトーシスを誘導する(図 1)。

自然発症糖尿病マウスである秋田マウスは、インスリン遺伝子の変異により、インスリントンパク質の

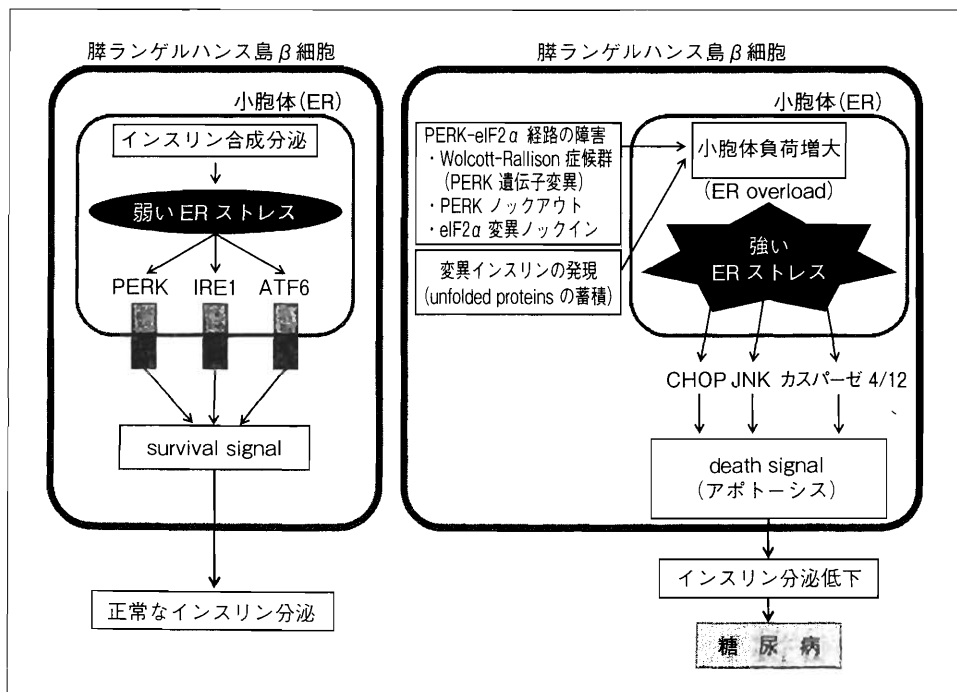


図 1. 膵臓ランゲルハンス島β細胞とERストレス

foldingが障害される。その結果、ER分子シャペロンBiPや転写因子CHOPの誘導を伴う強いERストレスが生じる²¹⁾。このERストレスによって隣β細胞がアポトーシスを起こし、糖尿病が発症する。

骨軟骨疾患

前出のWolcott-Rallison症候群は、糖尿病に加え骨格形成の異常も起こる²²⁾。PERKノックアウトマウスはβ細胞障害と骨芽細胞における極度のER拡張を伴った骨形成異常が観察されている¹⁹⁾。従ってPERKのシグナル応答系は骨の発生・分化・成長に必須で、PERKが欠損すると正常な骨形成が阻害されてしまうのである。PERKの下流で翻訳が亢進する転写因子activating transcription factor 4(ATF4)のノックアウトマウスも、骨形成が抑制されている。筆者らが最近同定した、ATF6に構造的に類似した新しいタイプのERストレスセンサーold astrocyte specifically induced substance(OASIS)のノックアウトマウスは、PERKノックアウトマウスと同じようにERの拡張を伴う骨形成不全を起こしていた(論文投稿中)。骨芽細胞はコラーゲンなどの骨基質を大量に産生・分泌する細胞であるため、常にERには負荷がかかった状態にある。そのような細胞では、ERストレスセンサーからのシグナルが障害されると、ERでのoverloadが更に増大して、最終的にERの機能低下から骨形成不全を起こすと予想される。

家族性偽性軟骨無形成症(Pseudoachondroplasia; PSACH)の原因遺伝子として知られているcartilage oligomeric matrix protein(COMP)は、関節軟骨で発現している細胞外マトリックスタンパク質である。COMPの遺伝子変異は、ERストレスにつながり、軟骨細胞のアポトーシスを誘導することが最近わかってきている²³⁾。

ERストレスから回避する薬剤の開発

前述のように、ERストレスが様々な疾患の発症に関わることがわかってきた。ERストレスから回避する薬の開発は、疾患治療に直結する。最近、YuanらのグループからPERK-eIF2 α 経路を活性化するSalubrinal(eIF2 α 脱リン酸化阻害剤)²⁴⁾が、そして筆者らのグループからER分子シャペロン誘導剤BiP inducer X(BIX)²⁵⁾が開発され、臨床応用が期待されている。ここでは筆者らが開発したBIXの紹介をする。

ER分子シャペロンBiPを細胞内に強制発現させておくと、ERストレスから保護される。筆者らは、約20,000種類のケミカルライブラリーからBiPプロモーター活性を上昇させる化合物を、レポーターアッセイによりスクリーニングした。その結果、5つの候補化合物を見出すことに成功し、そのうちレポーター活性を最も上昇させる機能をもつBIX(図2A)について薬効を詳細に検討した。化合物BIXが培養細胞の内蔵性BiP mRNAを誘導できるか否かを調べるために、細胞の培養上清にBIXを添加した。するとERストレスで誘導されるレベルには及ばなかったものの、BIXの濃度依存的にBiP mRNAは有意に発現上昇した(図2B)。BiP以外には、遺伝子上流にER stress response element(ERSE)を有する遺伝子、すなわちGRP94やCHOP遺伝子が軽度で発現誘導するだけで、ほかのERストレス関連遺伝子については全く発現変動がみられなかった。このことから、BIXはERストレスを誘発することなく、ER分子シャペロンBiPを優勢的に発現誘導する化合物であることがわかった。

それでは実際に、この化合物が疾患の治療に応用できるのであろうか?筆者らはERストレスが神経細胞死を誘導するモデルとして良く知られている中大脳動脈永久閉塞モデルを作成し、マウスにBIXを投与することで脳梗塞が軽減できるか否かについて調べた。BIXを投与しなかったマウスと比べ、BIX投与群では明らかに脳梗塞巣の領域が減少し、脳損傷を軽減さ

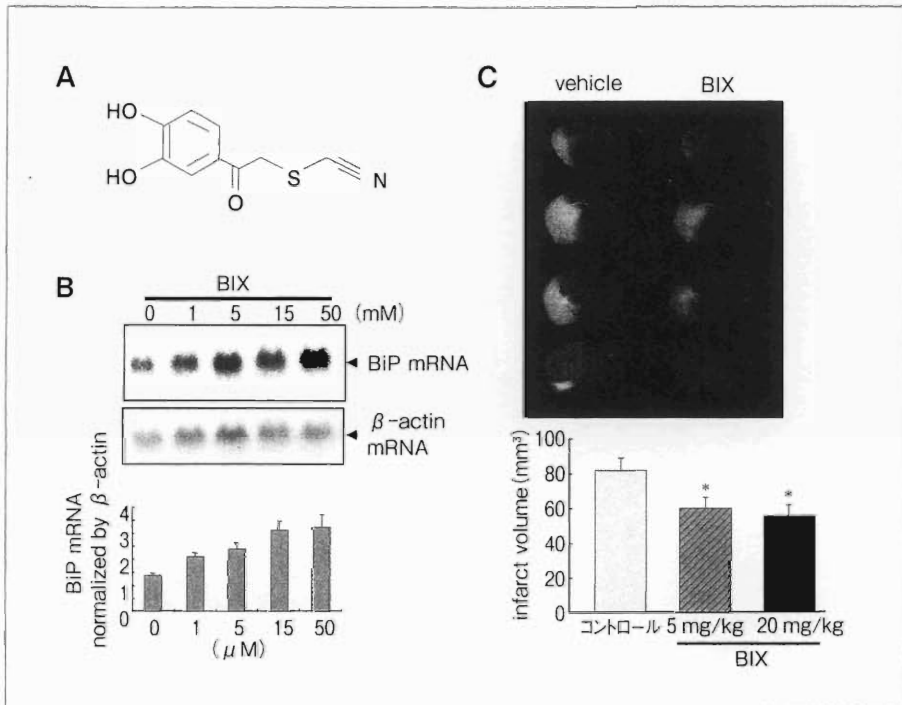


図2. 化合物 BIX の構造と機能

A: BIX の化学式. B: BIX による BiP mRNA の誘導. SK-N-SH 神経芽細胞に 0-50 μM の濃度で BIX を投与し, 6 時間後にトータル RNA を抽出後, BiP mRNA の発現レベルをノーザンブロットングにより解析した. C: BIX の脳虚血に対する効果. BIX あるいは溶媒を脳室内に投与し, 30 分後に中大脳動脈を永久結さした. 24 時間後に脳を取り出し 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色(上)を施し, 梗塞領域の体積(下)を測定した. 数値は平均値±標準偏差. *: $p < 0.05$, T-test, $n = 11$ or 12 .

せた(図2C). 特にERストレス誘導性神経細胞死が起こると考えられているベヌンプラ領域の神経細胞の脱落が顕著に軽減されていた. TUNEL染色でアポトーシスを起こした細胞数をカウントしても, やはり有意に抑制していることが確認された. 分子シャペロン誘導剤 BIX が *in vivo* で起こる ER ストレス誘導性神経細胞死から保護することが証明されたことで, ER ストレスが関与する様々な疾患への応用に展望が開けてきた.

おわりに

過度の ER ストレスは細胞に重篤な傷害を与え, 細胞の傷害は更に疾患発症にも波及する. それとは裏腹に, 形質細胞, 筋芽細胞, 骨芽細胞などでは軽微な

ER ストレスが各細胞の分化・成熟に重要な役割を演じていることもわかってきている. ER ストレス及びその応答系の生体内での役割が十分に解明されて, 初めてそれを制御する化合物が有効な疾患治療につながる. いまだ ER ストレスの応答機構についてはわかっていないことが多く, 薬の開発には様々な問題が山積されている. 分子のみに焦点を当てた従来の研究手法に加え, 動物個体レベルの研究や疾患の病態解析を更に積み上げていくことで, 多様化した ER ストレス応答の全容が明らかにされることを期待したい.

◎文献

- 1) Rutkowski DT, Kaufman RJ: A trip to the ER: coping with stress. *Trends in Cell Biol* 14: 20-28, 2004

- 2) Ron D : Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* **110** : 1383-1388, 2002
- 3) Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, et al : XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* **21** : 81-93, 2004
- 4) Nakanishi K, Sudo T, Morishima N : Endoplasmic reticulum stress signaling transmitted by ATF6 mediates apoptosis during muscle development. *J Cell Biol* **169** : 555-560, 2005
- 5) Nakagawa T, Yuan J : Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* **150** : 887-894, 2000
- 6) Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al : Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature* **403** : 98-103, 2000
- 7) Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, et al : Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A β -induced cell death. *J Cell Biol* **165** : 347-356, 2004
- 8) Guo Q, Sopher BL, Furukawa K, et al : Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid β -peptide : involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci* **17** : 4212-4222, 1997
- 9) Katayama T, Imaizumi K, Sato N, et al : Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **1** : 479-485, 1999
- 10) Imaizumi K, Katayama T, Tohyama M : Presenilin and the UPR. *Nat Cell Biol* **3** : E104, 2001
- 11) Hoozemans JJ, Veerhuis R, Van Haastert ES, et al : The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **110** : 165-172, 2005
- 12) Uehara T, Nakamura T, Yao D, et al : S-Nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* **441** : 513-517, 2006
- 13) Shimura H, Hattori N, Kubo S, et al : Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* **25** : 302-305, 2000
- 14) Imai Y, Soda M, Takahashi R : Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem* **275** : 35661-35664, 2000
- 15) Imai Y, Soda M, Inoue H, et al : An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* **105** : 891-902, 2001
- 16) Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, et al : ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* **16** : 1345-1355, 2002
- 17) Delépine M, Nicolino M, Barrett T, et al : EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2- α kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet* **25** : 406-409, 2000
- 18) Harding HP, Zeng H, Zhang Y, et al : Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk $^{-/-}$ mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell* **7** : 1153-1163, 2001
- 19) Zhang P, McGrath B, Li S, et al : The PERK eukaryotic initiation factor 2 α kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas. *Mol Cell Biol* **22** : 3864-3874, 2002
- 20) Scheuner D, Song B, McEwen E, et al : Translational control is required for the unfolded protein response and *in vivo* glucose homeostasis. *Mol Cell* **7** : 1165-1176, 2001
- 21) Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, et al : Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic β cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** : 10845-10850, 2001
- 22) Stöss H, Pesch HJ, Pontz B, et al : Wolcott-Rallison syndrome : diabetes mellitus and spondyloepiphyseal dysplasia. *Eur J Pediatr* **138** : 120-129, 1982
- 23) Hashimoto Y, Tomiyama T, Yamano Y, Mori H : Mutation (D472Y) in the type 3 repeat domain of cartilage oligomeric matrix protein affects its early vesicle trafficking in endoplasmic reticulum and induces apoptosis. *Am J Pathol* **163** : 101-110, 2003
- 24) Boyce M, Bryant KF, Jousse C, et al : A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* **307** : 935-939, 2005
- 25) Kudo T, Kanemoto S, Hara H, et al : A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. *Cell Death Differ* **15** : 364-375, 2008