

[特集：学会シンポジウム]

## 分子シャペロン誘導剤の神経変性疾患治療への応用\*

工藤 喬<sup>\*1</sup> 今泉 和則<sup>\*2</sup> 原 英彰<sup>\*3</sup><sup>\*1</sup> 大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室<sup>\*2</sup> 宮崎大学医学部解剖学講座<sup>\*3</sup> 岐阜薬科大学学生体機能分子学教室

**要約：**小胞体 (ER) ストレスは、折りたたみ不整な蛋白が細胞内に蓄積することによって生じ、アルツハイマー病などの神経変性疾患の病理過程に関与しているとされる。ER ストレスに対し、細胞は反応機構を元来備えており、ストレス状況からの離脱を図る。本研究は ER ストレス反応機構の1つである分子シャペロン誘導を人為的に行い、ストレスからの離脱を図ることで、アルツハイマー病 (AD) などの神経変性疾患の治療に応用しようとするものである。分子シャペロン BiP のプロモーターを用いた解析から、我々は BiP 誘導剤 (BIX: BiP inducer X) を得た。細胞実験から、BIX は BiP のみ誘導し、他の ER ストレス反応分子を誘導させないことが示された。また、BIX で処理した細胞は ER ストレスに耐性を示し、ER のアポトーシス誘導分子の発現を抑えることが示された。さらに、マウスの脳室に BIX を前投与し、脳虚血を負荷すると梗塞巣の面積の減少をもたらす、神経症状の軽減が認められた。この BIX の効果は、梗塞周辺領域で ER のアポトーシス誘導分子の発現を抑えることによることが示された。以上のように、BIX は ER ストレスから生じるアポトーシスを抑制し、AD をはじめとする神経変性疾患の治療薬になることが示唆された。

**キーワード：**小胞体 (ER) ストレス、分子シャペロン、アポトーシス、脳虚血、神経変性疾患

近年、アルツハイマー病 (AD) の治療薬開発は、アミロイド前駆体蛋白の  $\beta/\gamma$  セクレーターゼ阻害薬、非ステロイド消炎鎮痛剤、アミロイドワクチンなど様々な可能性が検討されているが、実用化に至ったものは未だない。したがって、現時点では多くの可能性を模索すべき時期であろうと思われる。また、パーキンソン病、レビー小体病、前頭側頭型認知症、ポリグルタミン病などの神経変性疾患は未だ病態過程が不明な点が多く、確立された根治療法がない。ただ、AD を含むこれらの疾患では、異常蛋白が神経細胞内に蓄積凝集するという点が共通であり、興味深い。

我々は、従来からアルツハイマー病の病態を小胞体 (ER) ストレスに対する反応、すなわち unfolded protein response (UPR) の見地から検討してきた。この UPR は異常蛋白蓄積に直接リンクしていると考えられ、神経変性疾患研究の1つのトレンドとして多くの検討が行われている。近年我々は、ER ストレスについて蓄積してきた知見を踏まえ、治療戦略への応用を検討し始めている。

### Unfolded Protein Response (UPR)

細胞小器官の1つである ER は、分泌蛋白や膜構成蛋白などの折りたたみや翻訳後修飾を行う蛋白の「組み立て工

場」のような役割を担う。「組み立て工場」であるが故に「不良品」すなわち折りたたみが不十分な、あるいは不正な蛋白 (unfolded protein) の出現は宿命のようなものである。様々なストレスは、ER ストレスとしてこの unfolded protein の ER 内への蓄積を生じ、カスパー 12 の活性化 (Nakagawa et al, 2000) (ヒトではカスパー 4 (Hitomi et al, 2004)), JNK 系路の活性化 (Nishitoh et al, 2002), CHOP の誘導 (Friedman, 1996) 等の ER 発動のアポトーシスにつながる。その防御機構として、細胞には3つの UPR が備わっている。

#### 1. 分子シャペロンの誘導

UPR の働きの1つは、小胞体から核へのシグナル伝達を活性化し、GRP78/BiP や GRP94 などの分子シャペロンを発現誘導することである。これら分子シャペロンは、unfolded protein に作用し、折りたたみの促進や是正を行う (Sidrauski et al, 1998)。

#### 2. 蛋白翻訳抑制

第2の戦略は、これ以上 unfolded protein を生じないように、蛋白の翻訳自体を抑制する方策であり、翻訳開始因子の eIF2 $\alpha$  がリン酸化されることで発動される (Harding et al, 1999)。

#### 3. ER-associated degradation (ERAD)

ER に蓄積した unfolded protein を処理しきれない場合、unfolded protein は ER から細胞質にはき出され、ユビキチン化を受け、26S プロテオソームで分解される (Bonifacino and Weissman, 1998)。

\* 本内容は第36回日本神経精神薬理学会 (2006年9月、名古屋) における、シンポジウム講演の記録である。

<sup>\*1</sup> 〒565-0871 吹田市山田丘 2-2 D3

E-mail: kudo@psy.med.osaka-u.ac.jp

(別刷請求先：工藤 喬)

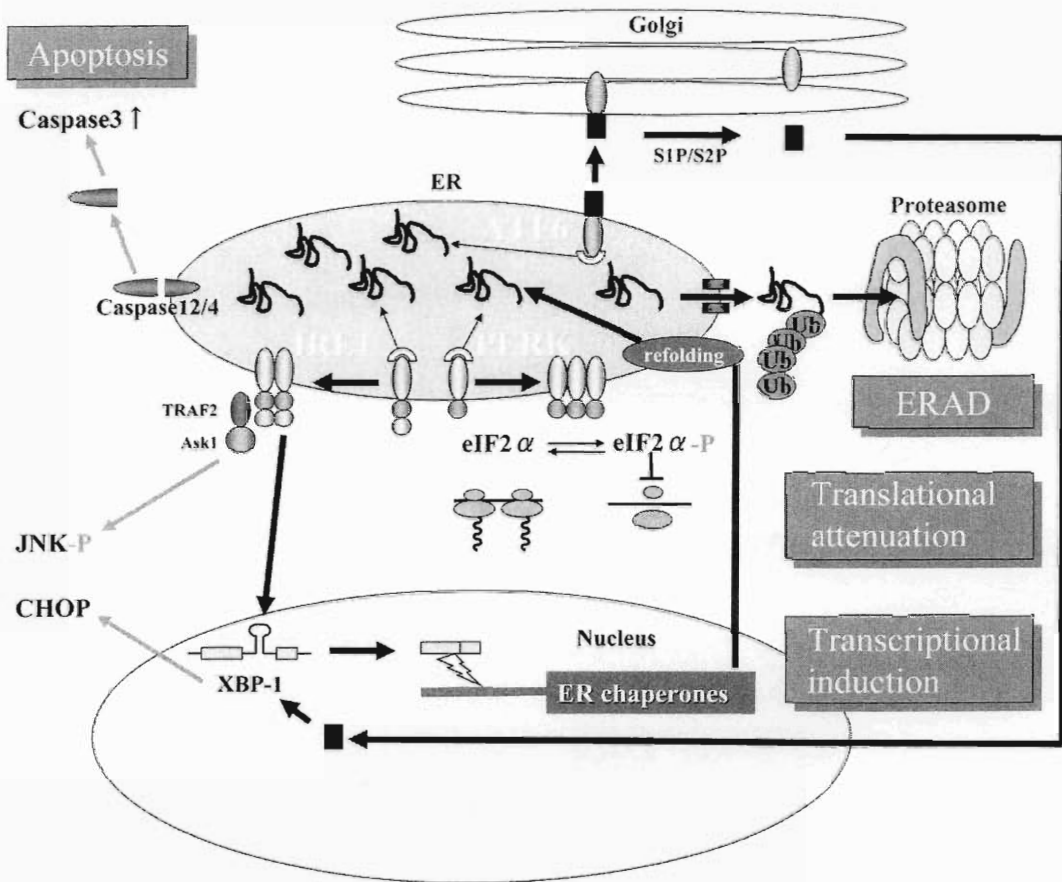


図1 小胞体 (ER) ストレス反応 (unfolded protein response: UPR) とアポトーシス。

#### ER ストレストランスデューサー (図1)

UPR は、ER 内の unfolded protein の蓄積を感知することから始動する。現在まで、unfolded protein のセンサーとして ER 膜上の IRE1, PERK, ATF6 が報告されている。IRE1 は、二量体形成と自己リン酸化を経て、XBP-1 の alternative splicing を起こし、成熟型の XBP-1 を生じさせる (Yoshida et al, 2001)。この成熟型 XBP-1 は、GRP78/BiP 等の分子シャペロンのプロモーターに働き、分子シャペロンを誘導する (Wang et al, 1998)。PERK は、多量体化と自己リン酸化を経て、eIF2 $\alpha$  をリン酸化する (Harding et al, 1999)。このリン酸化された eIF2 $\alpha$  は 43S initiation complex の形成を阻害し、翻訳開始を阻害する。ATF6 は、ゴルジに運ばれ、S1P および S2P によって細胞質側の膜貫通領域近傍で切断を受け、できた N 末端領域が XBP1 の転写を促進して分子シャペロンの誘導につながる (Haze et al, 1999)。これら 3 つのトランスデューサーは、非ストレス下では GRP78/BiP が結合しており、unfolded protein の ER 内での蓄積に際しその結合がはずれ、UPR が開始されるという共通の機序が想定されている。

#### ER ストレスと神経変性疾患

我々は、家族性アルツハイマー病の主要な原因遺伝子であるプレセニリン1が ER に局在することから、ER ストレスとプレセニリン1変異体の関係について検討した。プレセニリン1変異体発現神経細胞は、ER ストレスに脆弱であることが示され、ER ストレス下における分子シャペロン BiP の誘導が抑制されることが見いだされた。プレセニリン1変異体神経細胞の UPR を検討すると、IRE1, PERK, ATF6 全てのトランスデューサーの活性化が障害されており、UPR 抑制のために ER ストレス脆弱性をきたしていることが示唆された (Katayama et al, 1999, 2001; Yasuda et al, 2002)。また、プレセニリン1変異体神経細胞に UPR の1つである BiP をウイルスベクターにより発現させておくと、ER ストレス脆弱性をレスキューできることも示された (図2)。したがって、プレセニリン1変異による家族性アルツハイマー病の神経変性には、UPR 障害が関与すると考えられる。実際、家族性アルツハイマー病患者脳では BiP の発現が低いことが観察されており、おもしろいことに孤発性 AD 患者脳でも BiP 発現が低下していることが観察された。これは、AD の神経変性に共通して BiP 誘導障害、すなわち UPR 障害が関与することを

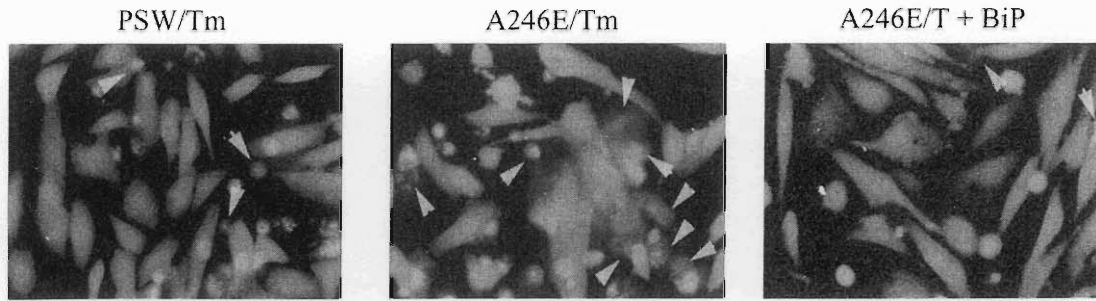


図2 プレセニリン1変異体発現細胞のERストレス脆弱性とBiP誘導によるレスキュー。プレセニリン1変異体(A246E)発現細胞は野生型(PSW)細胞に比し、ERストレス(tunicamycin: Tm)に脆弱性を示す(矢印は神経細胞死)が、あらかじめウイルスベクターを用いてBiPを発現させておくと、この脆弱性はレスキューできる。

示唆する事実である。

また、遺伝性若年性パーキンソン病の原因遺伝子であるParkinはユビキチンリガーゼであることが示され、Parkinの変異体は基質であるPeal受容体のERADを発動することができず、unfoldedなPeal受容体を溜め、ER発動のアポトーシスを招くとされる(Imai et al, 2001)。ハンチントン病などのポリグルタミン病は、CAGのリピートが異常に伸張したために神経変性を呈する疾患であるが、伸張したポリグルタミンはプロテオソームの機能低下をきたし、ERストレスを惹起し、ASK1を活性化してJNKを介するアポトーシスが発動することが示されている。以上のように、UPRの異常は神経変性疾患の共通した病理因子である可能性が示唆されている。

#### 分子シャペロン誘導剤開発

以上の知見から、UPRを人為的に活性化することは、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患の治療につながる可能性が考えられる。我々の過去の検討で、BiPを発現するウイルスベクターを神経細胞にあらかじめ感染させておくと、プレセニリン1変異体によるERストレス脆弱性が改善した結果を得ている(図2)。そこで我々は、UPRのうち分子シャペロン誘導に着目し、分子シャペロンBiP誘導剤の検索を行った。BiPのプロモーター配列を利用してBiPレポーターシステムを構築し、コンパウンドライブラリーをハイスループットスクリーニングにて検索し、最もBiPのメッセージを誘導するコンパウンドBiP inducer X (BIX)を得た。このBIXを神経芽細胞腫SK-N-SHに投与すると、BIXの濃度依存的にBiPを誘導することが示されたが、古典的なERストレス誘導剤であるthapsigargin等が誘導するようなBiPの高レベルよりは低く観察された。また、BIXによるBiP誘導は、投与4時間後から起こり、6時間後をピークに減衰していくことが観察された。以上の観察されたメッセージレベルのBiP誘導には、BiP蛋白発現を伴っていることが、ウェスタンブロット法にて確認された。

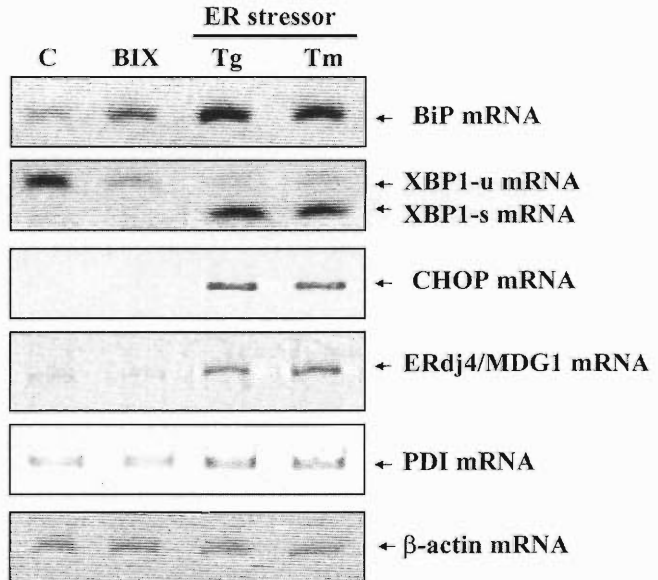


図3 BIXのBiP誘導効果とその他のERストレス。BIXはBiPのみを誘導し、thapsigargin (Tg) や tunicamycin (Tm) などのERストレスラーが誘導するようなその他のERストレス誘導分子は誘導しない。

このBIXが、もしBiP以外のERストレスによって発現される分子を活性化すれば、ERストレスによるアポトーシスにつながりかねず、治療法とはなり得ない。そこで、BiP以外のERストレス分子XBP1、CHOP、ERdj4/MDG1、PDIの活性化について、BIXの効果を検討した。BIXをSK-N-SH細胞に投与しても、BiPは誘導するが、XBP1のスプライシング(活性化)、CHOPの誘導、ERdj4/MDG1の誘導、PDIの誘導は起きないことが確認された(図3)。また、BiP誘導と相対する蛋白翻訳抑制を起こすeIF2 $\alpha$ のリン酸化についてもBIXの効果を検討したが、そのリン酸化は観察されなかった。以上の結果から、BIXはBiPのみを誘導し、他のERストレス反応分子を誘導しないことが示された。

#### BIXの神経細胞におけるERストレス保護作用

BIXのERストレス保護作用を検討する目的で、BIXをSK-N-SH細胞の培地に添加し、12時間後に tunicamycin

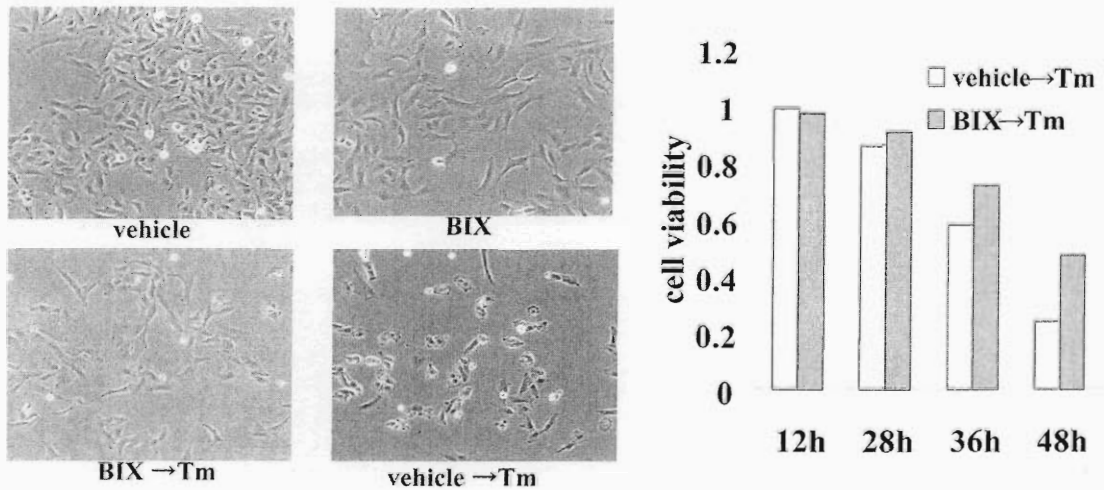


図4 BIXの抗ERストレス効果. BIXを12時間前に前投与しておく, vehicle投与神経細胞に比し, ERストレス(tunicamycin: Tm)による神経細胞死を抑制できる.

を投与してERストレスをかけた. BIXを投与していない細胞では, tunicamycin投与後36時間後より細胞死が観察されたが, BIX投与細胞では有意な細胞死の減少が観察された(図4). ERストレスから誘導されるアポトーシスで活性化されるカスプー4についてウェスタンブロット法で検討したところ, BIX投与細胞ではその活性化が抑制されていることが確認され, BIXはERストレスによるアポトーシスを抑制し, 神経細胞を保護することが示された.

#### BIXの脳虚血モデルにおける効果

脳虚血はERストレスを惹起するので, BIXの効果を検証する*in vivo*の実験系として, マウスの中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルを採用した. BIXのマウス脳室内投与は, 6時間後で脳実質内のBiPを誘導することが確認された. 今回は, 脳虚血30分前にBIXを脳室内投与し, MCAO24時間後に薬剤の効果を検討した. 通常MCAO後24時間では, 歩行不可, 反対側への旋回運動, 反対側前足の伸展障害, あるいは神経症状なしのいずれかの神経障害が認められ, 多くのマウスは旋回運動程度の神経障害を示すが, BIX投与マウスでは神経障害は軽度となり, 前足の伸展障害程度を示していた. MCAO24時間後の脳切片を作製し, TTC染色により脳梗塞部位の計測を行ったところ, BIX投与マウスでは脳梗塞部位面積の有意な減少が認められ, 特に梗塞周辺領域(penumbra)の減少が顕著であった. また, MCAO24時間後の脳浮腫についても検討したところ, BIX投与マウスでは有意に脳浮腫が軽減されていた. これらの結果は, BIXの脳室内前投与がMCAOによる脳梗塞の侵襲を軽減して神経症状発現を抑えることを示している.

BIXの効果は, penumbraの減少に顕著に認められたが, その部位でのERストレスによるアポトーシスについて検

討した. アポトーシス発現細胞を見るために脳切片をTUNEL染色したところ, BIX投与マウスのpenumbraにおけるTUNEL陽性細胞は有意に減少していることが観察された. さらに, ERストレスによるアポトーシス誘導分子であるCHOPの誘導について*in situ* hybridizationにて検討したところ, CHOPの誘導もBIX投与マウスのpenumbraにおいて有意に抑制されていることが観察された. これらのことから, BIX投与はpenumbraのERストレスを軽減し, それによるアポトーシスを抑制することで梗塞巣の増大を抑え, また*in vivo*においても, BIXはERストレスによるアポトーシスに効果があることを示している.

#### 文献

- Bonifacino, J. S. and Weissman, A. M. (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14: 19-57.
- Friedman, A. D. (1996) GADD153/CHOP, a DNA damage-inducible protein, reduced CAAT/Enhancer binding protein activities and increased apoptosis in 32D cl3 myeloid cells. *Cancer Res*, 56: 3250-3256.
- Harding, H. P., Zhang, Y. and Ron, D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397: 271-274.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T. and Mori, K. (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*, 10: 3787-3799.
- Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y. and Tohyama, M. (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A $\beta$ -induced cell death. *J Cell Biol*, 165: 347-356.
- Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y. and Takahashi, R. (2001) An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of parkin. *Cell*, 105: 891-902.
- Katayama, T., Imaizumi, K., Sato, N., Miyoshi, K., Kudo, T., Hitomi,

- J., Morihara, T., Yoneda, T., Gomi, F., Mori, Y., Nakano, Y., Takeda, J., Tsuda, T., Itoyama, Y., Murayama, O., Takashima, A., St George-Hyslop, P., Takeda, M. and Tohyama, M. (1999) Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biology*, 8: 479-485.
- Katayama, T., Imaizumi, K., Honda, A., Yoneda, T., Kudo, T., Takeda, M., Mori, K., Rozmahel, R., Fraser, P., St. George-Hyslop, P. and Tohyama, M. (2001) Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 mutations. *J Biol Chem*, 276: 43446-43454.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. and Yuan, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature*, 403: 98-103.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A. and Ichijo, H. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*, 16: 1345-1355.
- Sidrauski, C., Chapman, R. and Walteret, P. (1998) The unfolded protein response: An intracellular signalling pathway with many surprising features. *Trends Cell Biol*, 8: 245-249.
- Wang X.-Z., Harding, H. P., Zhang, Y., Jolicoeur, E. M., Kuroda, M. and Ron, D. (1998) Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J*, 17: 5708-5717.
- Yasuda, Y., Kudo, T., Katayama, T., Imaizumi, K., Yatera, M., Okochi, M., Yamamori, H., Matsumoto, N., Kida, T., Fukumori, A., Okumura, M., Tohyama, M. and Takeda, M. (2002) FAD-linked presenilin-1 mutants impede translation regulation under ER stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 296: 313-318.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. and Mori, K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107: 881-891.

**Abstract:** Takashi KUDO<sup>\*1</sup>, Kazunori IMAIZUMI<sup>\*2</sup> and Hideaki HARA<sup>\*3</sup> (<sup>\*1</sup>Department of Psychiatry, Osaka University Graduate School of Medicine, D3, 2-2 Yamadaoka, Suita, 565-0871 Japan; <sup>\*2</sup>Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Miyazaki; <sup>\*3</sup>Department of Biofunctional Molecules, Gifu Pharmaceutical University) *A molecular chaperone inducer as potential therapeutic agent for neurodegenerative diseases*. *Jpn. J. Neuropsychopharmacol.*, 27: 63-67 (2007).

Recent reports have shown that ER stress is involved in the pathology of some neurodegenerative diseases. In a screen for compounds that induce the ER-mediated chaperone BiP/GRP 78 (BiP), we identified BiP inducer X (BIX). BIX induced BiP only, in a dose-dependent manner, without induction of other molecules involved in the ER stress response. Pretreatment of neuroblastoma cells with BIX reduced cell death induced by ER stress. Intracerebroventricular pretreatment with BIX reduced the area of infarction due to focal cerebral ischemia in mice. In the penumbra of BIX-treated mice, ER stress-induced apoptosis was suppressed, leading to a reduction in the number of apoptotic cells. Taken together, BIX induces BiP to prevent neuronal death by ER stress, suggesting that it may be a potential therapeutic agent for cerebral diseases caused by ER stress.

**Key words:** ER stress, Molecular chaperone, Apoptosis, Cerebral ischemia, Neurodegenerative diseases

(Reprint requests should be sent to T. Kudo)