

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19500319  
 研究課題名（和文） 小胞体内レドックス異常により誘導される神経細胞死とその制御  
 研究課題名（英文） Prevention of neuronal cell death associated with altered redox in the endoplasmic reticulum (ER)  
 研究代表者  
 堀 修 (HORI OSAMU)  
 金沢大学・医学系・准教授  
 研究者番号：60303947

研究成果の概要：神経系細胞株 PC12 を BSO で処理すると、①細胞内グルタチオンの枯渇、②小胞体内での酸化ストレス発生、そして③細胞死が誘導された。この時、細胞を小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンで処理すると細胞死は増加し、逆に小胞体ストレス制御物質で処理すると減少した。マウスパーキンソン病(PD)モデルにおいても、①細胞内グルタチオンの低下、②小胞体ストレスの増加、③神経細胞死が認められたことから、グルタチオン枯渇により誘導される小胞体ストレス由来神経細胞死の重要性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学／神経薬理学

キーワード：神経科学、脳神経疾患、ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

近年の研究から、脳梗塞などの虚血性神経疾患、さらにはアルツハイマー病・パーキンソン病等の神経変性疾患の病態形成に、細胞内ストレスの増加が深く関与している事が明らかになって来た。ATP 産生のあるミトコンドリアの機能障害は、酸化ストレスの発生を伴い神経細胞死を引き起こすが、分泌系蛋白の生合成のある小胞体の障害も、

いわゆる小胞体ストレス (unfold な蛋白の小胞体内蓄積) の他、小胞体内のレドックス (酸化還元) 異常や酸化ストレスの増加を引き起こし、最終的に細胞死を誘導する。実際、脳虚血や糖尿病を含む複数の病態で、小胞体内のレドックス異常が指摘されている。

小胞体内の環境は、分泌系蛋白にジスルフィド結合 (-SS-) を付加するため、細胞内では例外的に酸化状態となっている。小胞体内の還元型グルタチオン (GSH) は、小胞体で発

生ずる reactive oxygen species:ROS を消去することにより細胞を保護していると考えられるが、その作用メカニズムについては未だ不明な点が多い。また GSH の生合成は、小胞体ストレスに対する防御システムである unfolded protein response (UPR)により促進されるが、GSH 量の変化が小胞体ストレスに与える影響についても明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究においては、GSH, UPR 標的遺伝子、そして上記小胞体ストレス制御化合物を解析ツールとして用い、「神経細胞における小胞体内レドックス制御の重要性」を明らかにすると共に、小胞体環境の改善という新たな切り口で、神経保護薬の開発を目指した。具体的には、特に以下の3つの課題について明らかにした。

a)小胞体におけるレドックス異常と細胞内ストレスの増大

b)マウスパーキンソン病モデルにおける小胞体内レドックス異常と神経細胞死

c)小胞体ストレス制御物質による小胞体内レドックスの制御と神経細胞保護

## 3. 研究の方法

a)小胞体におけるレドックス異常と細胞内ストレスの増大

神経系細胞株 PC12 及び SH-SY5Y を BSO(DL-butioinine-SR sulfoximine)で処理することにより、細胞内 GSH を枯渇させた(細胞内 GSH 量を測定し、GSH の枯渇を確認した)。酸化ストレス及び小胞体ストレスの増加は、それぞれ、蛍光トレーサー H2DCFDA (dichlorodihydrofluorescence diacetate)を用いた顕微鏡下での観察、及びノーザンブロットやウエスタンブロットを用いた UPR 標的遺伝子(GRP78 や CHOP)の発現量の変化で行った。GSH 枯渇が種々のストレス由来神経細胞死に与える影響について、MTT アッセイを用いて検討した。小胞体ストレス誘導剤としてツニカマイシン(小胞体において糖鎖の結合を阻害する化合物)を、酸化ストレス誘導剤としては過酸化水素やパーキンソン病モデル薬剤 6-OHDA(6-hydroxydopamine)を用いた。

b)マウスパーキンソン病モデルにおける小胞

体内レドックス異常と神経細胞死

我々は、すでに MPTP を用いたマウスパーキンソン病モデルにおいて、酸化ストレスのみならず小胞体ストレスが誘導されることを報告していた。本研究においては、同モデルにおいて、脳内 GSH の低下、小胞体内レドックスの変化、神経細胞死の関連性について主に形態学的に検討した。

c)小胞体ストレス制御物質による小胞体内レドックスの制御と神経細胞保護

我々が同定した小胞体ストレス制御物質メトキシフラボンとジベンゾイルメタン(DBM)、カルバゾール誘導体による神経保護作用と小胞体内レドックス制御の関連性について、培養細胞及びマウスを用いて検討した。

## 4. 研究成果

a)小胞体レドックス異常と細胞内ストレスの増大

PC12 細胞を BSO(DL-butioinine-SR sulfoximine)で処理して細胞内 GSH を枯渇させた所、約6時間で細胞内 GSH は対照群の1%程度まで低下し、その後、細胞内酸化ストレスが上昇した(H2DCFDA (dichlorodihydrofluorescence diacetate)の蛍光強度変化を用いて測定)。その際、特に、小胞体内蛋白の酸化的修飾(カルボニル化)を顕著に認め、小胞体内分子シャペロン GRP78 の発現も経度上昇していた。更に、BSO 投与後24時間以降に細胞死が起こり始め、48時間の段階で viability が60%程度まで低下した。このBSO由来の細胞死は、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン(Tm)により増強し、逆に小胞体ストレス制御物質メトキシフラボンやジベンゾイルメタン(DBM)、カルバゾール誘導体16-14により顕著に軽減した。DBMは小胞体に於ける酸化ストレスを軽減させる作用があることから、GSH 枯渇により引き起こされる細胞死に小胞体に於けるレドックス異常が深く関与している可能性が示唆された。また、16-14は小胞体に於けるCa恒常性の維持に貢献している事から、小胞体におけるCa恒常性の破綻も関与している可能性が示唆された。

b)マウスパーキンソン病モデルにおける小胞体内レドックス異常と神経細胞死

パーキンソン病関連神経毒 MPTP をマウスに投与すると、投与直後に GSH の低下及び酸

化ストレスの上昇を認め、その後、小胞体ストレス関連蛋白の発現上昇を認め、最終的に神経細胞死が誘導された。このことから、上記培養細胞において認められた小胞体内レドックス異常が、マウスパーキンソン病においても認められる可能性が示唆された。

c)小胞体ストレス制御物質による小胞体内レドックスの制御と神経細胞保護

我々が同定した小胞体ストレス制御物質メトキシフラボンとジベンゾイルメタン(DBM)は、共にMPTP及び6-OHDAを用いたマウスパーキンソン病モデルにおいて神経保護効果を認めた。更に、メトキシフラボンは、よりヒトのパーキンソン病の病態に近いと考えられるMPTP慢性投与モデルにおいても神経保護効果を認めた。

今後、パーキンソン病以外の神経変性疾患モデルにおいても小胞体内レドックス異常が重要な役割を果たしているか否か検討していきたい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

①Miura H, Takano K, Kitao Y, Hibino S, Choshi T, Murakami R, Suzuki H, Yamada M, Ogawa S, Hori O. A Carbazole derivative protects cells against endoplasmic reticulum (ER) stress and glutathione depletion J Pharma Sci. 2008 108, 164-71 査読有

②Stanyer L, Jorgensen W, Hori O, Clark JB, Heales SJ. Inactivation of brain mitochondrial Lon protease by peroxynitrite precedes electron transport chain dysfunction. Neurochem Int. 2008 53(3-4):95-101. Epub 2008 Jun 12. 査読有

③Takano K, Kitao Y, Tabata Y, Miura H, Sato K, Takuma K, Yamada K, Hibino S, Choshi T, Iinuma M, Suzuki H, Murakami R, Yamada M, Ogawa S, Hori O. A DIBENZOYLMETHANE (DBM) DERIVATIVE PROTECTS DOPAMINERGIC NEURONS AGAINST BOTH OXIDATIVE STRESS AND ENDOPLAMIC RETICULUM (ER) STRESS. Am J Physiol cell Physiol. 2007 293(6):C1884-94. 査読有

④Miyata T, Takizawa S, Izuhara Y, Kitao Y, Hori O, Ogawa S, Morita Y, Takagi S, Strihou CY. A novel inhibitor of advanced glycation and endoplasmic reticulum stress reduces infarct volume in rat focal cerebral ischemia. Brain Res. 2007 1183:124-37 査読有

⑤Tabata Y, Takano K, Ito T, Iinuma M, Yoshimoto T, Miura H, Kitao Y, Ogawa S, Hori O. Vaticanol B, a resveratrol tetramer, regulates endoplasmic reticulum (ER) stress and inflammation. Am J Physiol Cell Physiol. 2007 293(1):C411-8, Epub 2007 May 2. 査読有

⑥Ogawa S, Kitao Y, Hori O. Ischemia-induced neuronal cell death and stress response. Antioxid Redox Signal. 2007 9(5):573-87. 査読有

⑦Imuta N, Hori O, Kitao Y, Tabata Y, Yoshimoto T, Matsuyama T, Ogawa S. Hypoxia-mediated induction of heme oxygenase type I and carbon monoxide release from astrocytes protects nearby cerebral neurons from hypoxia-mediated apoptosis. Antioxid Redox Signal. 2007 9(5):543-52. 査読有

⑧Kitao Y, Matsuyama T, Takano K, Tabata Y, Yoshimoto T, Momoi T, Yamatodani A, Ogawa S, Hori O. Does ORP150/HSP12A protect dopaminergic neurons against MPTP/MPP(+)-induced neurotoxicity? Antioxid Redox Signal. 2007 9(5):589-95. 査読有

⑨Kitao Y, Imai Y, Ozawa K, Kataoka A, Ikeda T, Soda M, Nakimawa K, Kiyama H, Stern DM, Hori O, Wakamatsu K, Ito S, Itohara S, Takahashi R, Ogawa S. Pael receptor induces death of dopaminergic neurons in the substantia nigra via endoplasmic reticulum stress and dopamine toxicity, which is enhanced under condition of parkin inactivation. Hum Mol Genet. 2007 16(1):50-60. 査読有

⑩Takano K, Tabata Y, Kitao Y, Murakami R, Suzuki H, Yamada M, Iinuma M, Yoneda Y, Ogawa S, Hori O. Methoxyflavones protect cells against endoplasmic reticulum (ER) stress and neurotoxin. Am J. Physiol (Cell Physiol) 2007 Jan;292(1):C353-61. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

①Takeichi T, Kitao Y, Miura H, Kitamura O, Ogawa S, Hori O, NDRG2 regulates the motility of astroglial cells. 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会合同大会、神戸、12/9-12/12, 2008

②Awa Y, Miura H, Hashida K, Kitao Y, Hibino S, Choshi T, Murakami R, Suzuki H, Yamada M, Ogawa S and Hori O. A Carbazole derivative protects cells against endoplasmic reticulum (ER) stress and glutathione depletion. 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会合同大会神戸、12/9-12/12, 2008

③Hashida K, Miura H, Awa Y, Ogawa S, Kitao Y, and Hori O. Decreased expression of ERAD molecule Herp facilitates degradation of  $\alpha$ -synuclein and synphilin-1 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会合同大会 神戸、12/9-12/12, 2008.

④Hori O. ER stress response and neuronal cell death in the substantia nigra. 日本神経化学会 2008年9月13日、富山

⑤Miura H, Kitao Y, Ogawa S and Hori O, Decreased expression of ERAD molecule Herp facilitates degradation of  $\alpha$ -synuclein and synphilin-1, The 31st annual meeting of the Japan Neuroscience Society 東京, 7/9-7/11, 2008

⑥Hori O. A screening system for compounds to protect cells against endoplasmic reticulum (ER) stress. 6th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Science (Japanese Society for Alternatives and Animal Experiments), Tokyo, 8/25/2007

⑦Miura H, Kitao Y, Ogawa S, Hori O. Vaticanol B, a resveratrol tetramer, regulates endoplasmic reticulum (ER) stress and inflammation 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会合同大会、横浜 12/11/2007

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

①産業財産権の名称:「ピリミジン誘導剤を有効成分とする医薬組成物」  
発明者:堀 修 他  
出願者(権利者):金沢大学・明治乳業

産業財産権の種類:特許出願(国内)  
番号:特願 2007-306399  
出願年月日:平成19年11月27日

②産業財産権の名称:「小胞体ストレス制御化合物とそれを有効成分とする医薬組成物」  
発明者:堀 修 他  
出願者(権利者):金沢大学・明治乳業  
産業財産権の種類:特許出願(海外)  
番号:PCT/JP2007/60735  
出願年月日:平成19年5月25日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀 修 (HORI OSAMU)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号:60303947

### (2) 研究分担者

小川 智 (OGAWA SATOSHI)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号:90283746

北尾 康子 (KITAO YASUKO)  
金沢大学・医学系・助教  
研究者番号:00019613