小胞体からミトコンドリアへのストレス伝達と神経細胞死についての研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2018-05-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 堀, 修, Hori, Osamu メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00050707

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

研究成果報告書

研究課題名

小胞体からミトコンドリアへのストレス伝達と神経細胞死についての研究

課題番号14580739

平成14年度～平成16年度科学研究費補助金　(基盤研究(C)(2))　研究成果報告書

平成17年 4月

研究代表者　　堀　　修
(金沢大学大学院医学系研究科助教授)

はしがき

研 究 組 織

研究代表者：　堀　修　(金沢大学大学院医学系研究科・助教授)
研究分担者：　小川　智　(金沢大学大学院医学系研究科・教授)
研究分担者：　北尾　康子　(金沢大学大学院医学系研究科・助手)

交付決定額

	直接経費(円)	間接経費(円)	合　計(円)
平成14年度	1,200,000	0	1,200,000
平成15年度	1,200,000	0	1,200,000
平成16年度	600,000	0	600,000
総　計	3,000,000	0	3,000,000

研究発表

1. Yamaguchi A, Taniguchi M, Hori O, Ogawa S, Tojo N, Matsuoka N, Miyake Si S, Kasai K, Sugimoto H, Tamatani M, Yamashita T, Tohyama M. Peg3/Pw1 Is Involved in p53-mediated Cell Death Pathway in Brain Ischemia/Hypoxia. ***J. Biol. Chem.*** 2002; 277, 623-629

2. Hori O, Ichinoda F, Tamatani T, Yamaguchi A, Sato N, Ozawa K, Kitao Y, Miyazaki M, Harding HP, Ron D, Tohyama M, Stern DM, and Ogawa S. Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: expression of Lon protease. ***J. Cell Biol.*** 2002, 157: 1151-1160

3. Miyazaki M, Ozawa K, Hori O, Kitao Y, Matsushita K, Ogawa S, and Matsuyama T. Expression of ORP150 (150 kDa oxygen regulated protein) in the hippocampus suppresses delayed neuronal cell death. ***J. Cereb. Blood Flow Metab.*** 2002; 22, 979-987

4. Miyagi T, Hori O, Koshida K, Egawa M, Kato H, Kitagawa Y, Ozawa K, Ogawa S, and Namiki M. Antitumor effect of reduction of 150-kDa oxygen-regulated protein expression on human prostate cancer cells. ***Int J Urol.*** 2002; 9: 577-585

5. Asahi H, Koshida K, Hori O, Ogawa S, and Namiki M. Immunohistochemical detection of the 150-kDa oxygen-regulated protein in bladder cancer. ***BJU Int.*** 2002; 90: 462-466

6. Miyagi T, Koshida K, Hori O, Konaka H, Katoh H, Kitagawa Y, Mizokami A, Egawa M, Ogawa S, Hamada H, Namiki M. Gene therapy for prostate cancer using the cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide system. ***J Gene Med.*** 2003; 5: 30-37

7. Kitao Y, Hashimoto K, Matsuyama T, Iso H, Tamatani T, Hori O, Stern DM, Kano M, Ozawa K, and Ogawa S. ORP150/HSP12A regulates Purkinje cell survival: a role for endoplasmic reticulum stress in cerebellar development. ***J Neurosci.*** 2004; 24: 1486-96

8. Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, Taniguchi M, Koyama Y, Tohyama M, Stern D, Ozawa K,

Kitao Y, Ogawa S. Role of Herp in the endoplasmic reticulum (ER) stress response. ***Genes Cells.*** 2004 :457-469

9. Bando Y, Tsukamoto Y, Katayama T, Ozawa K, Kitao Y, Hori O, Stern DM, Yamauchi A, Ogawa S. ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. ***FASEB J.*** 2004; 18: 1401-3.

10. Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y, Matsuhisa M. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. ***J Biol Chem.*** 2005; 280(1): 847-851

11. Ozawa K, Miyazaki T, Hori O, Kitao Y, Tamatani T, and Ogawa S. The ER chaperone 150 kDa Oxygen Regulated Protein (ORP150) improves insulin resistance in Type 2 Diabetes Mellitus. ***Diabetes.*** 2005; 54(3): 657-63

小胞体からミトコンドリアへのストレス伝達と神経細胞死についての研究

主任研究者　堀　修
分担研究者　小川　智
同　北尾　康子

研究要旨
ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Yに対し、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンやタプシガルジンで処理した所、Hela細胞の場合同様、cytochrome C oxydase (COX)等のミトコンドリア蛋白の発現にアンバランスが生じた。さらに、パーキンソン病のモデル薬剤であるMPP+で細胞を処理した場合も、細胞に小胞体ストレスが引き起こされると共に、COXの発現に同様のアンバランスが生じることを確認した。この事は、ミトコンドリアに加わったストレスが小胞体に伝播し、さらにミトコンドリアに戻ってくると言った、ストレスの悪循環が存在する可能性を示唆している。一方、SH-SY5Y細胞に於けるLonプロテアーゼやGRP75/mtHSP70等ミトコンドリアのATPプロテアーゼや分子シャペロンの発現を検討してみると、HeLa細胞の場合に比し、小胞体ストレスによる誘導が弱いことが判明した。この事は、特に神経系細胞において、上記ストレスの悪循環に対する防御機構が弱くなっていることを示唆している。
また、作製したLonノックアウトマウスについての機能解析をおこなった所、Lonホモ(-/-)胎児は、E9.5以降では、全く生存せず、E7.5では、著しい成長障害を認めた。これらのことから、LonがE7.5と言った、比較的発生初期の段階で重要な働きをしていることが示唆された。

1．序論

以前より、MPP+やrotenone等、ミトコンドリアの電子伝達系に障害をもたらす薬剤が、Parkinson病によく似た病態を引き起こす事が言われている。また、最近になって、少なくとも一部のParkinson病においては、小胞体の機能異常が重要な役割を果たす事(Imai et al., 2001, Cell)、さらに上記薬剤が、神経細胞内でミトコンドリアのみならず、小胞体に対してもストレスを引き起こすことが明らかになってきている(Ryu et al., 2002, J Neurosci.)。一方、我々は、小胞体のストレスはタンパク合成の低下を介してミトコンドリアに伝播するが、同時にミトコンドリアに於けるATP依存性プロテアーゼであるLonやYme1、さらに分子シャペロンであるGRP75/mtHSP70等が誘導され、ミトコンドリア機能を維持していることを報告した(Hori et al., 2002, J Cell Biol)。本研究においては、神経芽細胞腫SH-SY5Y等をParkinson病関連薬剤MPP+や小胞体ストレス誘導剤で処理した際の、ミトコンドリア及び小胞体でのストレス及びストレス応答の程度を評価する。また、現在作製中のLonノックアウトマウスの機能解析も行う。

2．解析方法

1）　培養細胞系での解析

ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Yを、小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンやタプシガルジン、さらにMPP+等Parkinson病関連薬剤で処理し、その後の小胞体からミトコンドリアへのストレス伝播の状態を、ミトコンドリア内膜上の複合体cytochrome C oxidase (COX)の発現を指標により検討する。次にその条件下での細胞のストレス応答を、小胞体ストレス関連遺伝子GRP78, GRP94, Lon　GRP75/mtHSP70等の発現を指標にして検討する。

2）　Lonノックアウトマウスの解析

現在作製中のLonノックアウトマウスを用いて、上記ストレス下に於ける、Lonの機能的重要性について検討する。具体的には、Lon(-/-)マウスが誕生する場合は、E18の脳から神経細胞を単離し、

上記薬剤での処理を試みる。また、Lon(-/-)マウスが胎生致死を示す場合は、その時期及び胎生期に於けるLonの発現との関係について検討する。

3．解析結果

1）培養細胞系での解析

SH-SY5Yに対し、小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンやタプシガルジンで処理した所、Hela細胞の場合同様、cytochrome C oxydase (COX)等のミトコンドリア蛋白の発現にアンバランスが生じた(Fig.1)。さらに、パーキンソン病のモデル薬剤であるMPP+で細胞を処理した場合も、細胞のviability (Fig2A)、及びミトコンドリア膜電位(Fig.2B)は時間とともに低下したが、この時、小胞体ストレスも誘起され、COXの発現に同様のアンバランスが生じた(Fig.1)。この事は、ミトコンドリアに加わったストレスが小胞体に伝播し、さらにミトコンドリアに戻ってくると言った、ストレスの悪循環が存在する可能性を示唆している。一方、この時、小胞体ストレスのマーカーであるGRP78やGRP94、さらに小胞体ストレスで誘導されるミトコンドリアのATPプロテアーゼや分子シャペロンLonプロテアーゼやGRP75/mtHSP70の発現を検討してみると、GRP78やGRP94は小胞体ストレス誘導剤及びMPP+のいずれの処理でもその発現が誘導されるのに対し、LonプロテアーゼやGRP75/mtHSP70は小胞体ストレスによる誘導が弱く、MPP+処理では、むしろ発現が低下することが判明した(Fig.1)。この事は、特に神経系細胞において、上記ストレスの悪循環が起こった場合、それに対する防御機構が弱くなっていることを示唆している。

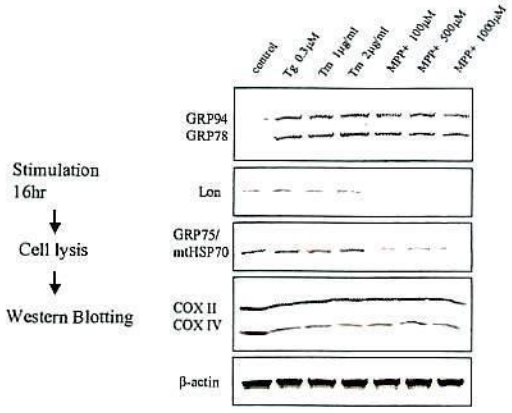


Fig.1 Expressions of the ER and mitochondrial proteins after treatment with ER stressors or MPP+

Fig.2A

Fig.2B

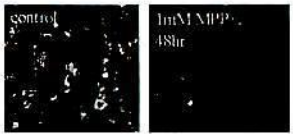


Fig.2A,B Effects of MPP+ on cell viability (A) and mitochondrial membrane potential (B) in SH-SY5Y cells.

2）Lonノックアウトマウスの作製及び解析

我々は、相同組み替え法を用いて、Lonプロテアーゼのノックアウトマウスを作製した。これまで、約50組以上のLonヘテロ(+/-)マウス同士の交配を行ったが、Lonホモ(-/-)マウスは誕生していない。Northern Blottingにより胎児期に於けるLonの発現を調べた所、E7と言った比較的発生初期の段階からLon型階レベルで発現していることが判明した。PCR法を用いて胎児の遺伝子型を調べた所、Lonホモ(-/-)胎児は、E3.5ではほぼ予想される割合で生存しているのに対し、E9.5以降では、全く生存していなかった。さらに、E7.5では、Lonホモ(-/-)マウス胎児に著しい成長障害を認めた。これらのことから、LonがE7.5と言った、比較的発生初期の段階で重要な働きをしていることが示唆された。

4．総括

1）　神経系細胞をパーキンソン病のモデル薬剤であるMPP+で細胞を処理した場合、ミトコンドリアに加わったストレスが小胞体に伝播し、さらにミトコンドリアに戻ってくると言った、ストレスの悪循環を引き起こす可能性が示唆された。

2）　LonプロテアーゼがE7.5と言った、比較的発生初期の段階で重要な働きをしていることが示唆された。

参考文献

1) Imai et al., 2001. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. Cell. 105: 891-902.

2) Ryu et al., 2002. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. 22(24):10690-8.

3) Hori et al., 2002 Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: enhanced expression of Lon protease. J. Cell Biol. 157: 1151-1160.

５. 研究発表

1). 論文発表

1 Yamaguchi A, Taniguchi M, Hori O, Ogawa S, Tojo N, Matsuoka N, Miyake Si S, Kasai K, Sugimoto H, Tamatani M, Yamashita T, Tohyama M. Peg3/Pw1 Is Involved in p53-mediated Cell Death Pathway in Brain Ischemia/Hypoxia. J. Biol. Chem. 2002; 277, 623-629

2 Hori O, Ichinoda F, Tamatani T, Yamaguchi A, Sato N, Ozawa K, Kitao Y, Miyazaki M, Harding HP, Ron D, Tohyama M, Stern DM, and Ogawa S. Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: expression of Lon protease. J. Cell Biol. 2002, 157: 1151-1160

3 Miyagi T, Koshida K, Hori O, Konaka H, Katoh H, Kitagawa Y, Mizokami A, Egawa M, Ogawa S, Hamada H, Namiki M. Gene therapy for prostate cancer using the cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide system. J Gene Med. 2003; 5: 30-37

4 Kitao Y, Hashimoto K, Matsuyama T, Iso H, Tamatani T, Hori O, Stern DM, Kano M, Ozawa K, and Ogawa S. ORP150/HSP12A regulates Purkinje cell survival: a role for endoplasmic reticulum stress in cerebellar development. J Neurosci. 2004; 24: 1486-96

5 Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, Taniguchi M, Koyama Y, Tohyama M, Stern D, Ozawa K, Kitao Y, Ogawa S. Role of Herp in the endoplasmic reticulum (ER) stress response. Genes to Cells, 2004, 9(5), 457-469.

6 Bando Y, Tsukamoto Y, Katayana T, Ozawa K, Kitao Y, Hori O, Stern D, Yamauchi A, and Ogawa S. ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. FASEB J., 2004, in press.

2.) 学会発表

Kitao Y, Tamatani T, Hori O, Ozawa K, and Ogawa S. ORP150は発生段階における小脳プルキンエ細胞死を抑制する。神経科学学会、2003　名古屋

Kitao Y, Ozawa K, Hori O, and Ogawa S. 脳虚血における小胞体ストレスの役割。神経科学学会、2003　名古屋

Hori O, Ichinoda F, Kitao Y, Ozawa K, and Ogawa S. Role of SERP1 in the rapid hormone biosynthesis and development。日本分子生物学会、2003　神戸。

Hori O, Ichinoda F, Kitao Y, Ozawa K, and Ogawa S. Role of SERP1 in the rapid hormone biosynthesis and development Gordon Research Conference、2003　オックスフォード

Hori O, Ichinoda F, Kitao Y, Ozawa K, and Ogawa S. Role of SERP1 in the rapid hormone biosynthesis and development米国細胞生物学会、2003　サンフランシスコ

Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, Taniguchi M, Koyama Y, Tohyama M, Stern D, Ozawa K, Kitao Y, Ogawa S. Role of a ubiquitin-like protein in the endoplasmic reticulum (ER) stress response. 米国細胞生物学会、2004　サンフランシスコ

小胞体環境改善薬スクリーニング系の開発

主任研究者　　堀　修
分担研究者　　小川　智
同　　北尾　康子

小胞体ストレス感受性でアルツハイマー病との関連が示唆されているHerp遺伝子を欠損させたマウスF9細胞を用いたスクリーニング系を開発した。この細胞は、安定且つ取扱いが容易であり、虚血、アルツハイマー病やパーキンソン病治療薬等の小胞体ストレスによる細胞死を抑制する薬剤のスクリーニング系に利用できる。

A. 研究目的

近年、小胞体ストレス由来細胞死は、虚血性神経疾患やアルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患に深く関わっていることが明らかにされてきた。従って、小胞体ストレス由来細胞死を克服することは、上記疾患に対し、新たな治療法を提供することになると考えられる。我々が作製した、Herp遺伝子欠損F9細胞は、小胞体ストレスに極めて脆弱になる。我々は、この細胞株を用いる事により、小胞体ストレス由来細胞死を抑制する薬剤のスクリーニング系の開発を試みた。

B. 研究方法

ここでは、Herp遺伝子欠損F9細胞の作製、及び同細胞の小胞体ストレス下に於ける脆弱性については省略し(Genes to Cells, 2004, in press参照)、同細胞を用いた、化合物スクリーニング系に関する方法のみ記述する。

1 96穴、或いは24穴カルチャープレートをゼラチンコートした後、Herp欠損F9細胞、及びコントロールとして野生型F9細胞を播種する。
2 ２日間、或いは細胞が培養面積の50-60%を占めるまで培養を行う。
3 上記細胞に、小胞体ストレス付加条件下（例えばツニカマイシン1mg/mlで細胞処理）で、被験物質を加えて24-48時間培養する。
4 細胞生存、及び細胞死をMTT assay及びLIVE/DEAD assayにより測定し、さらにはcaspaseの活性を検討することにより、被験物質の小胞体ストレス由来細胞死抑制効果を判定する。
5 にて効果を認めた化合物については、それがどの様なメカニズムで働いているか検討する（Herp機能に直接関わるのか、小胞体ストレス全体に関わるのか等）。
6 また、④にて効果を認めた化合物については、⑤の結果をふまえた上で、より疾患に関連するモデル（神経細胞初代培養系やin vivoモデル）での効果を検討する。

（倫理面への配慮）

動物、又は、動物から単離した培養細胞を用いる実験にあたっては、金沢大学宝町地区動物実験指針を遵守し、行う。

C. 研究結果

グラフ１は、実際の測定例(MTT assay)を示す。小胞体からのCaイオン流出を阻害するDantroleneにより、Herp(SUP)欠損F9細胞における小胞体ストレス由来細胞死が抑制されていることが分かる。このほか、cycloheximide（図１），caspase inhibitors、JNK inhibitor等にもHerp遺伝子欠損F9細胞における小胞体ストレス由来細胞死を抑制する効果を認めている。

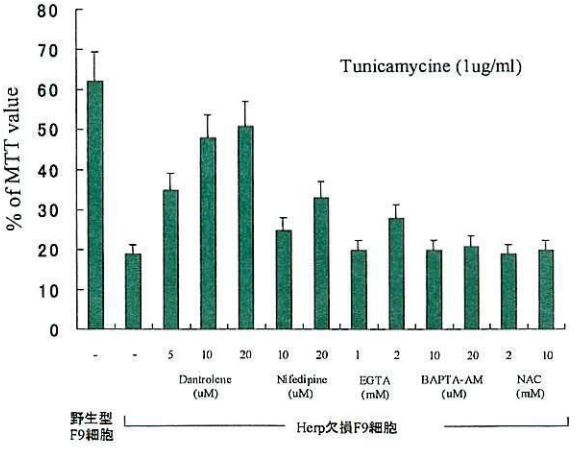
D. 考察

小胞体ストレス由来細胞死を抑制するような

薬剤の開発については、スクリーニングに用いる細胞に技術的な問題点が多く（神経細胞初代培養や変異蛋白を過剰発現させた細胞株を用いた場合、増殖能が低く、長期間の維持が困難である）、一度に多くの化合物をスクリーニングすることが難しかった。　一方、我々は、低酸素暴露したアストログリアより、小胞体ストレス関連遺伝子Herp (J.Biol.Chem. 2000, 275; 32846-53)をクローニングし、さらに、マウス胎児性癌細胞であるF9細胞を用いて、相同組み替え法によりHerp遺伝子欠損細胞を作製した。　Herpは若年性アルツハイマー病の責任遺伝子の一つであるプレセニリンと結合し、アミロイドの産生を増加させるとも報告されている(J.Biol.Chem. 2002, 277; 12915-20)。　これまでの検討から、Herp欠損F9細胞は、ツニカマイシン等による小胞体ストレスに対し、再現性よくアポトーシスを引き起こすことが認められた。また、この細胞株は、神経系の細胞や変異タンパク質を過剰発現させた様な細胞株とは異なり、安定的に長期維持され、増殖効率も高く、取り扱いも簡便であることが確認された。今回、我々はこのHerp欠損F9細胞を用いた、小胞体ストレス由来細胞死抑制物質のスクリーニング系を開発した。

これまで、既存の薬剤約10種類を用いて検討した所、N-アセチルシステイン(NAC)等の抗酸化剤にはあまり細胞死抑制効果を認めず、小胞体からのCaイオン流出を阻害するDantroleneに細胞死抑制効果を認めた。さらに、このDantroleneの効果は、小胞体ストレス負荷後、中期（8-20時間）に起こる細胞内変化に関連していることが明らかになっている。

今後、この評価系を用いて、実際に未知の化合物のスクリーニングに着手したいと考えている。



グラフ1　MTT assay

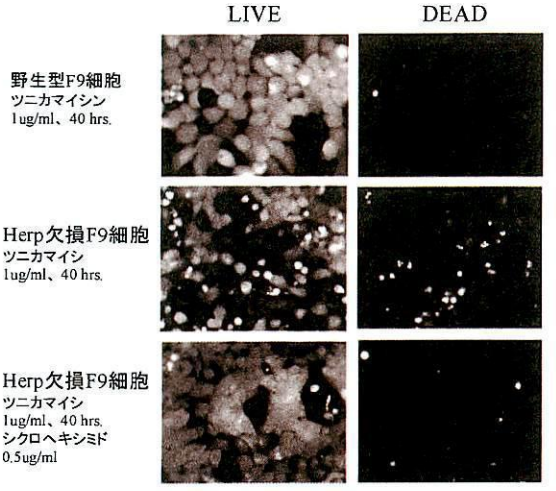


図1 LIVE / DEAD assay

E. 結論

Herp遺伝子を欠損させたマウスF9細胞を用いた小胞体ストレス由来細胞死抑制物質のスクリーニング系を開発した。

F. 研究発表

論文発表

Osamu Hori, Fusae Ichinoda, Atsushi Yamaguchi, Takashi Tamatani, Manabu Taniguchi, Yoshihisa Koyama, Taiichi Katayama, Masaya Tohyama, David M Stern, Kentaro Ozawa, Yasuko Kitao, and Satoshi Ogawa.　Role of Herp in the endoplasmic reticulum (ER) stress response　2004 Genes to Cells.　9(5): 457-469

Ozawa K, Miyazaki T, Hori O, Kitao Y, Tamatani T, and Ogawa S.　The ER chaperone 150 kDa Oxygen Regulated Protein (ORP150) improves insulin resistance in Type 2 Diabetes Mellitus. Diabetes. 2005; 54(3): 657-63