

学位論文の内容の要旨

学位論文題目 グリコールアルデヒドによる小胞体ストレス誘導性
アポトーシスに関する研究

指導教員 丹保好子

学位申請者 佐藤恵亮 ㊦

2012年の世界における糖尿病人口は3億7,100万人とみられており、2030年には5億5,200万人に急増すると予測されている。2012年のわが国における糖尿病人口は710万人とみられ、2030年には1,000万人を超えると予想されている。糖尿病性神経症は合併症の中でも比較的早期かつ高頻度に認められるが、自覚症状に乏しく軽視されやすい。しかし、痛みや異常感覚などの症状が出現すると治療が難しくQOLを著しく損なう疾患であり、発症早期からの進展阻止は大きな課題となっている。

1980年代後半にタンパク質の糖化反応やグルコースの自動酸化に伴う活性酸素の産生が明らかにされて以来、糖尿病と酸化ストレスの関連性を示す多数の知見が報告されている。一方、近年になって小胞体ストレス応答経路の分子機構が次々と明らかになり、糖尿病の病態形成に小胞体ストレスによるアポトーシスが関与していることが報告されている。小胞体ストレスが生じると、糖化反応やSH基の酸化などを受けた異常立体構造タンパク質が小胞体内腔に蓄積する。これを感知した小胞体ストレスセンサー（PERK、IRE1、ATF6）は、オートファジーや転写因子であるCHOPを介したアポトーシスを誘導する一方で、ストレスを緩和するための応答機構を活性化する。応答機構として抗酸化酵素群や第II相解毒酵素群の発現誘導が起これ、これにはKeap1/Nrf2システムが関与していることが近年示されている。

α -ヒドロキシアルデヒドであるグリコールアルデヒド（GA）は、糖化反応により生成する advanced glycation end products（AGEs）の前駆

体である。AGEs は、生成経路により AGE-1～6 に分類される。AGEs の前駆体としてメチルグリオキサールなどのジカルボニル化合物が広く知られているが、GA 由来の AGE-3 はジカルボニル化合物由来の AGEs よりも生物作用が強いことが報告されている。また、GA の生体内濃度は 0.1～1 mM と報告されており、ジカルボニル化合物に比べ高濃度に存在する。さらに、炎症性組織ではアミノ酸の酸化促進によって GA の生成能が上昇することが知られている。しかし、GA が生体にどのような影響を及ぼしているのか明らかにされていない。

小胞体ストレス	ストレス応答機構
<ul style="list-style-type: none"> ○異常構造タンパク質の蓄積 ○小胞体ストレスセンサーの活性化 <ul style="list-style-type: none"> ・ PERK ・ IRE1 ・ ATF6 ○オートファジーによる異常構造タンパク質の分解 ○アポトーシス誘導因子の活性化 <ul style="list-style-type: none"> ・ CHOP 	<ul style="list-style-type: none"> ○抗酸化タンパク質や第Ⅱ相解毒酵素などの誘導 <ul style="list-style-type: none"> ・ heme oxygenase-1 (HO-1) ・ γ-glutamylcysteine synthetase (γ-GCS) ・ SOD ・ catalase ・ NAD(P)H quinone oxidoreductase ・ GSH S-transferase ・ multidrug resistance associated protein 1 (MRP1) ○Keap1/Nrf2 制御システムの活性化

Fig. 1 小胞体ストレス及び応答機構の特徴

当研究室では、血管内皮細胞においてジカルボニル化合物（メチルグリオキサール）がミトコンドリアの傷害とそれに続く酸化ストレスを介してアポトーシスを引き起こすことを報告してきた。本研究では、末梢神経構成細胞であるシュワン細胞を用い、GA の影響について検討した。細胞傷害性やアポトーシスとの関連性、小胞体ストレス及びそのストレス応答機構を中心として検討を行った。

1. GAによるアポトーシスの誘導

細胞生存率に対するGAの影響について、MTS還元能を指標に評価した。細胞生存率は、GAにより濃度および時間依存的に低下した（Fig. 2）。細胞傷害の指標であるLDHの漏出も同様に確認された。また、シユワン細胞においてGAはジカルボニル化合物よりも強い細胞傷害性を示した。以後の実験には、主に500 μ M GA、24時間処理の条件を用いた。

次に、GAがアポトーシスを誘導する可能性について検討した。アネキシン-V/ヨウ化プロピジウム二重染色を行った結果、GAによる細胞膜構造の変化が認められ、アポトーシスの特徴を示した（Fig. 3）。さらに、DNAの断片化、およびアポトーシス実行酵素であるカスパーゼ-3の活性化が認められた。これらの結果から、GAによる細胞傷害にはアポトーシスの関与が示唆される。

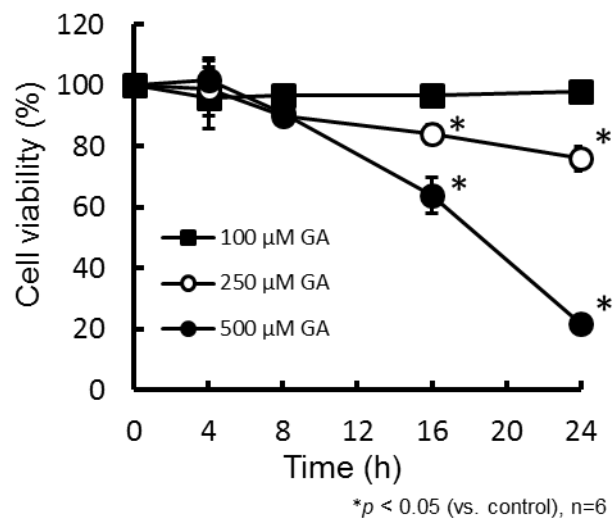


Fig. 2 細胞生存率に対するGAの影響

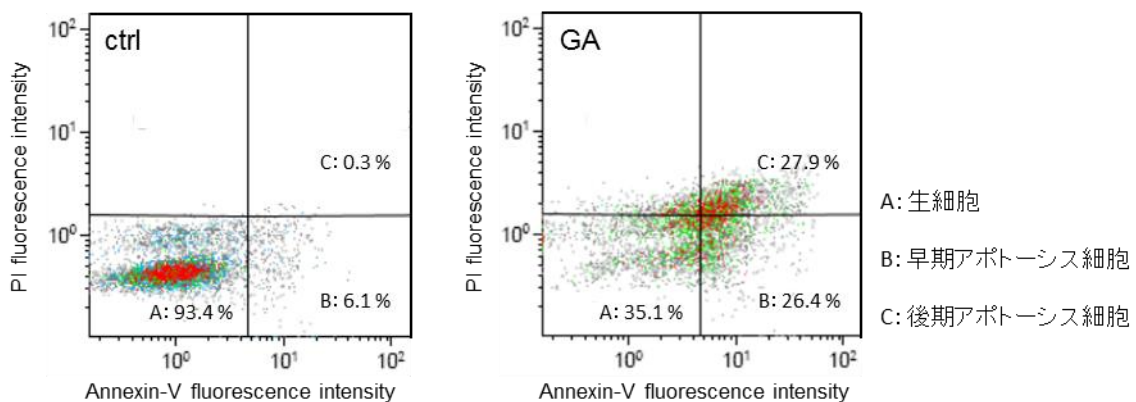


Fig. 3 GAによるアポトーシスの誘導

2. GAによる小胞体ストレス誘導

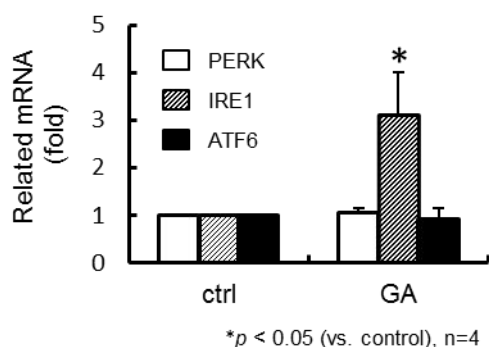
ジカルボニル化合物により誘導されるアポトーシスには、ミトコンドリアの傷害とそれに続く酸化ストレスが関与すると報告されている。しかし、GAによるミトコンドリアの傷害および活性酸素産生量の増大は認められなかった。このことから、GAによるアポトーシス誘導メカニズムはジカルボニル化合物と異なると考えられる。

次にGAが小胞体ストレスを惹起する可能性について、そのストレスセンサーに対する影響を検討した (Fig. 4)。PERK mRNA 発現量に対するGAの影響は認められなかったが、PERKの活性化を示すリン酸化が認められた。さらに、IRE1 mRNA 発現量の増大とIRE1のリン酸化が認められた。なお、ATF6 mRNA 発現量に対するGAの影響は認められなかった。これらの結果から、少なくとも2つの小胞体ストレスセンサーがGAにより活性化されていると考えられる。また、

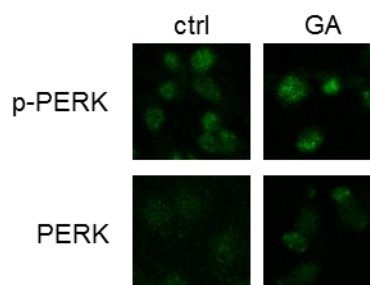
小胞体内腔の異常タンパク質の蓄積を示すオートファジーが観察された。以上より、GAは小胞体ストレスを惹起すると示唆される。

CHOPは、小胞体ストレスによるアポトーシスを決定づける転写因子である。そこで、CHOPに対するGAの影響について検討した (Fig. 5)。GAによりCHOPのmRNAおよびタンパク質発現量はいずれも増大し、

(A) 小胞体ストレスセンサーmRNA発現量



(B) PERKのリン酸化



(C) IRE1のリン酸化

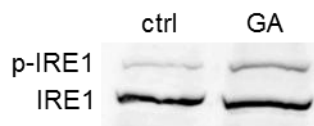


Fig. 4 小胞体ストレスセンサーに対するGAの影響

活性化を示す CHOP の核への移行も認められた。これらの結果から、GA は小胞体ストレス誘導性アポトーシスを引き起こすことが示唆される。一方で、GA による Fas 受容体 mRNA の増大、その下流に位置するカスパーゼ-8 の活性化が認められ、GA によるアポトーシスには膜受容体を介する経路も関与していることが考えられる。

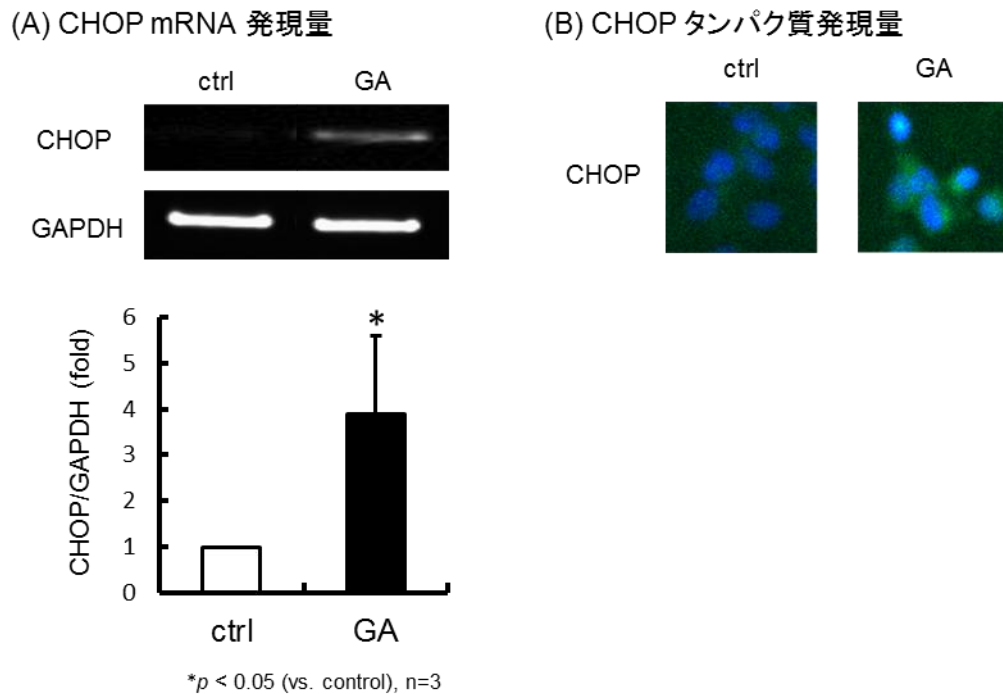


Fig. 5 CHOPに対するGAの影響

3. GA による小胞体ストレス応答機構の誘導

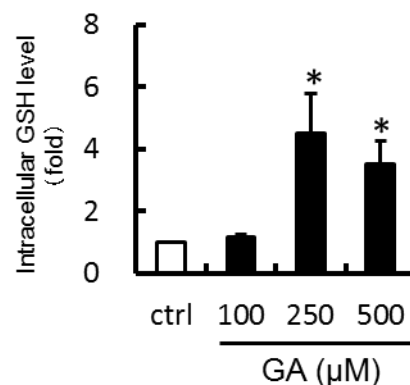
小胞体は細胞内外からのストレスを感知し、そのストレスを回避するために小胞体ストレス応答機構を活性化させる。GA が小胞体ストレスを誘導したことから、小胞体ストレス応答機構が働いている可能性が考えられる。最初に GSH に着目し、検討を行った。GSH は小胞体ストレスの際、小胞体内腔に蓄積した異常タンパク質の修復に関与していることが知られている。GA 誘導細胞傷害は、GSH の前駆体である NAC の添加により抑制された。NAC の抑制作用は小胞体ストレスを示す CHOP の誘導およびアポトーシスを示す細胞膜構造の変化に対しても認められた。これらの結果から、GSH は防御因子として作用してい

ることが示唆される。

GA 処理細胞において、細胞内 GSH 量は顕著に増加し、GSH 合成の律速酵素である γ -GCS の mRNA 発現量の上昇が認められた (Fig. 6)。また、GSH および GSH 抱合体の輸送に関わる MRP1 のタンパク質発現量の増大が観察された (Fig. 7)。さらに MRP1 ノックダウン細胞において、GA による細胞傷害の増強が認められ、MRP1 が防御作用を示していることが明らかになった。以上より、GSH は異常タンパク質の修復に関わると共に、MRP1 と連携して GA 誘導細胞傷害を防御していると考えられる。

Keap1/Nrf2 システムは、小胞体ストレス応答機構の中心的役割を担っている。 γ -GCS や MRP1 の発現誘導に関与するだけでなく、様々なストレス応答タンパク質の発現を制御していることが知られている。なかでも HO-1 は、Keap1/Nrf2 システムによって制御されている代表的タンパク質である。HO-1 に対する GA の影響について検討した結果、タンパク質発現量の増大が認められた。そこで次に、GA に対するストレス応答機構に Keap1-Nrf2 システムが関与している可能性について検討した。GA により Nrf2 mRNA 発現量が上昇し、Nrf2 の活性化を示す核内タンパク質発現量の増大も認められた (Fig. 8)。

(A) 細胞内GSH量



(B) γ -GCS mRNA発現量

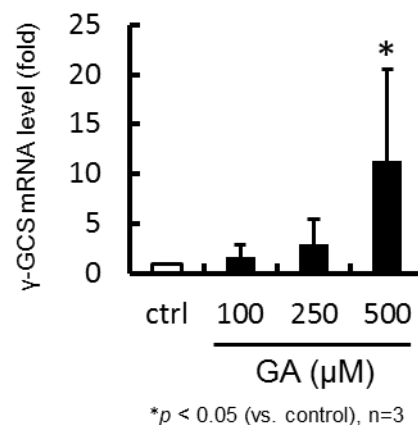


Fig. 6 GSHに対するGAの影響

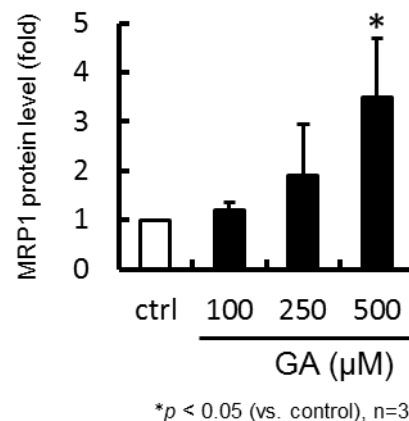


Fig. 7 MRP1に対するGAの影響

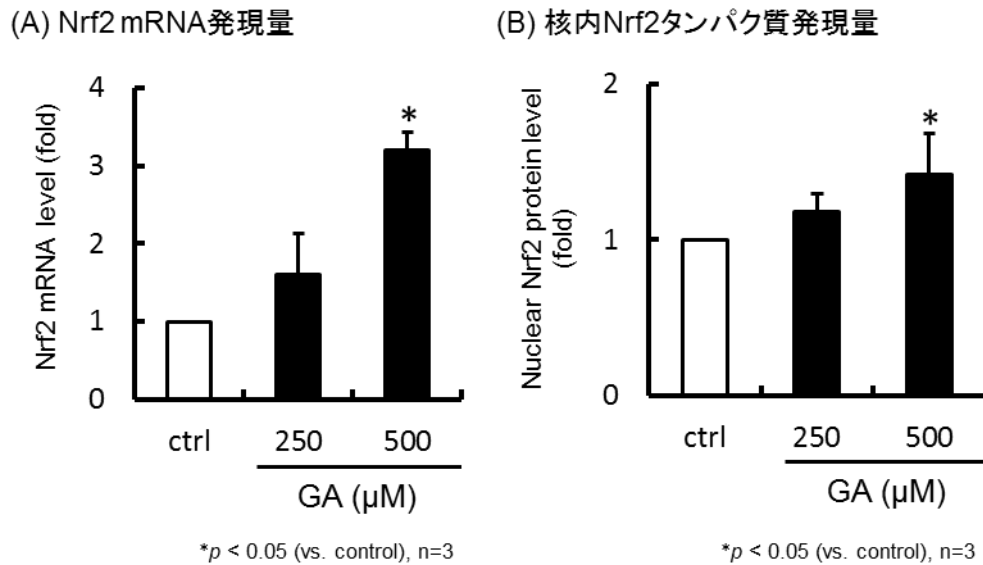


Fig. 8 Nrf2に対するGAの影響

一方、Nrf2 ノックダウン細胞において、GAにより誘導される細胞内GSH量の増大が抑制された。更にNrf2 ノックダウン細胞では、GAによる細胞傷害が亢進することが明らかとなった (Fig. 9)。これらの結果から、GAは小胞体ストレスおよびアポトーシスを誘導するが、この過程には小胞体ストレス応答機構であるKeap1/Nrf2システムの活性化が関与していることが示唆される。以上のことから、シュワン細胞はKeap1/Nrf2システムを活性化し、GAによるストレスの回避を図るが、そのストレスが過度なためにアポトーシスに至ると推察される。

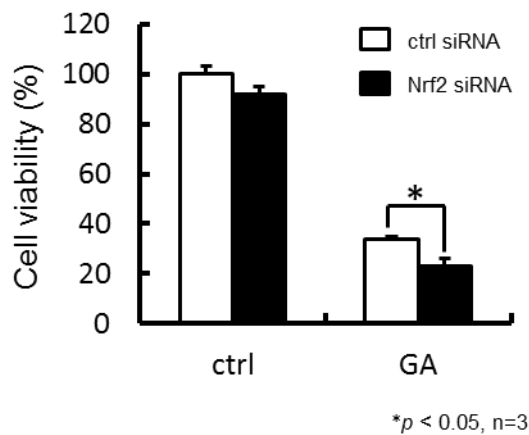


Fig. 9 Nrf2ノックダウン細胞に対するGAの影響

まとめ

本研究では、シュワン細胞における GA の影響について検討を行った。GA は、小胞体ストレス誘導性アポトーシスを惹起すること、小胞体ストレス応答機構を活性化することが明らかになった。以上をまとめ、Fig. 10 に示す。

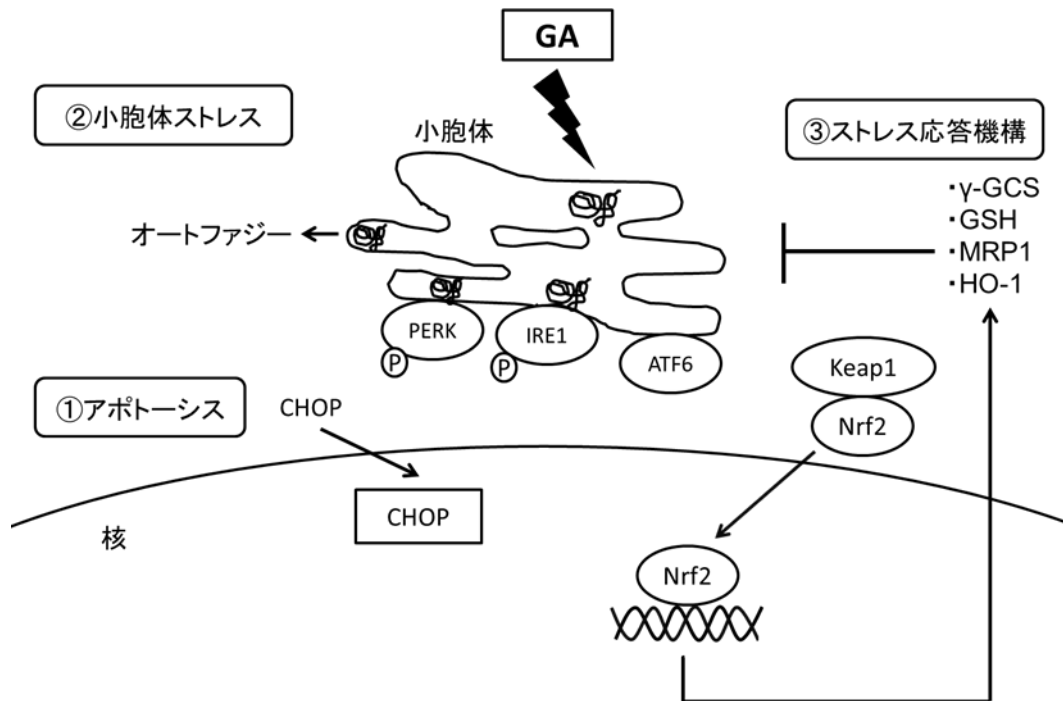


Fig. 10 GAによる小胞体ストレス誘導性アポトーシスの推定機構

シュワン細胞において、GA は①アポトーシスを引き起こす。この過程では②小胞体ストレスが起こり、小胞体ストレスを感知した PERK、IRE1 のセンサーが活性化され、小胞体内腔の異常構造タンパク質を除去するためのオートファジー機構が働く。一方で、③ストレス応答機構である Keap1/Nrf2 システムの活性化に伴い γ -GCS、MRP1、HO-1 が誘導され、GA によるストレスの回避を図る。しかし、GA によるストレスがストレス応答機構を上回るために CHOP の活性化が起こり、アポトーシスに至ると推察される。

当研究室では、糖尿病性神経症治療薬エパルレスタットのドラッグリプロファイリングに関する研究を行い、エパルレスタットが

Keap1/Nrf2 システムを活性化することを明らかにしている。GA により誘導される細胞傷害はエパルレスタットにより抑制された。このことは Keap1/Nrf2 システムの能力を高めると、GA によるストレスから回避されることに一致する。

糖尿病性神経症の発症メカニズムには、シュワン細胞のアポトーシスの関与が示唆されている。最近では、2 型糖尿病患者において膵 β 細胞の生細胞数が減少していることが明らかになってきている。この一因として、小胞体ストレスによるアポトーシスが注目されている。GA による小胞体ストレス誘導性アポトーシスに関する本研究の成果は、AGEs やその前駆体などの種々の糖化反応生成物が小胞体ストレスを介して糖尿病合併症の発症や進展に影響を及ぼしている可能性を示すものである。