

学 位 論 文 題 名

Endoplasmic Reticulum Dysfunction as A Possible
Therapeutic Target for Cerebral Ischemia

(脳虚血に対する治療標的としての小胞体機能障害)

学位論文内容の要旨

Disruption of endoplasmic reticulum (ER) homeostasis interferes with protein folding and leads to the accumulation of unfolded and misfolded proteins in the ER lumen. Evidence obtained in recent years has demonstrated that the ER plays an important role in the pathogenesis of stroke. Therefore, targeting the ER may provide a therapeutic approach for blocking the pathological process induced by cerebral ischemia. In this research, I focused on ER dysfunction as a possible therapeutic target for cerebral ischemia and investigated the protection of agents on ER dysfunction induced by ischemic injury and new therapeutic target for ER dysfunction.

Sodium 4-phenylbutyrate (4-PBA) is a low-molecular weight fatty acid that has been used for treatment of urea cycle disorders in children, sickle cell disease and thalassemia. It has recently been demonstrated that 4-PBA can act as a chemical chaperone by reducing the load of mutant or mislocated proteins retained in the endoplasmic reticulum (ER) under conditions associated with cystic fibrosis and liver injury. In the present study, we demonstrated for the first time the neuroprotective effect of 4-PBA on cerebral ischemic injury. Pre- or post-treatment with 4-PBA at therapeutic doses attenuated infarction volume, hemispheric swelling and apoptosis, and improved neurological status in a mouse model of hypoxia-ischemia. Moreover, 4-PBA suppressed ER-mediated apoptosis by inhibiting eIF-2 α phosphorylation, CHOP induction and caspase-12 activation. In neuroblastoma neuro2a cells, 4-PBA reduced caspase-12 activation, DNA fragmentation and cell death induced by hypoxia/reoxygenation. That agent protected against ER stress-induced but not mitochondria-mediated cell death. Additionally, 4-PBA inhibited the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and TNF α and IL-1 β in primary cultured glial cells under hypoxia/reoxygenation. These results indicate that 4-PBA could protect against cerebral ischemia through inhibition of ER stress-mediated apoptosis and inflammation. Therefore, the multiple actions of 4-PBA may provide a strong effect in

treatment of cerebral ischemia and its use as a chemical chaperone would provide a novel approach for therapy of stroke.

Moreover, we found that edaravone (3-methyl-1-phenyl-pyrazolin-5-one), a free radical scavenger, can protect against ER damage induced by hypoxia/ischemia. Moreover, edaravone suppressed ER stress-mediated apoptotic signals. In mouse primary cultured glial cells, edaravone attenuated ER stress as evidenced by inhibition of the induction of GRP78 and CHOP and XBP-1 splicing under treatment with tunicamycin (Tm) which induces ER stress. Tm did not induce the production of reactive oxygen species (ROS) in primary cultured glial cells. In addition, the free radical scavengers NAC (N-acetyl-L-cysteine) and ebselen (2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one) did not affect ER stress response caused by Tm. Further, edaravone dose-dependently inhibited the protein aggregation, suggesting its chaperone-like activity. These results demonstrated a novel action of edaravone which can protect against ER dysfunction in cerebral ischemia through its possible chaperone-like activity.

In the next series, Hrd1p in yeast plays an important role in endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD). Hypoxia/ischemia induced a significant increase in mRNA levels of genes including GRP78, CHOP and MyD116 in the brain, the expression of which are specifically activated under conditions associated with ER dysfunction. The level of mHRD1 mRNA in the brain was significantly increased after ischemia. Interestingly, induction of mHRD1 was elevated at a later time point (12 to 48 h) in the ischemic cortex, whereas it increased at an earlier time point (3 - 12 h) in the injured striatum. We also examined the changes of mHRD1 mRNA expression in neuroblastoma Neuro2a and primary glial cells exposed to hypoxia/reoxygenation. The expression of mHRD1 mRNA was remarkably up-regulated in glial cells subjected to 24 h hypoxia, whereas no significant changes were observed in Neuro2a cells under hypoxia/reoxygenation. In addition, the levels of mHRD1 mRNA were markedly elevated in glial cells exposed to treatment with tunicamycin (Tm, an ER stress inducer). These findings suggest that mHRD1 may play a role in ischemia-induced ER dysfunction.

Chemical chaperones, such as 4-PBA and edaravone, may be a novel therapeutic approach for cerebral ischemia through targeting in ER. Further, application of chemical chaperone may provide new insight into understanding mechanisms of diseases such as neurodegenerative diseases and stroke, and developing therapeutic approaches. Therefore, the present findings suggest that targeting ER will provide a novel therapeutic target for treatment of diseases, such as stroke, Alzheimer's disease and Parkinson's disease.

学位論文審査の要旨

主 査	助教授	大 熊 康 修
副 査	教 授	野 村 靖 幸
副 査	助教授	有 賀 寛 芳
副 査	助教授	平 敬 宏

学 位 論 文 題 名

Endoplasmic Reticulum Dysfunction an A Possible Therapeutic Target for Cerebral Ischemia

(脳虚血に対する治療標的としての小胞体機能障害)

平成 16 年 12 月 15 日に当該申請者に対する学位論文の発表、同月 16 日口頭試問を行い、また平成 17 年 1 月 21 日に、主論文に関する審査員による書面審査を実施した。

本研究は、脳虚血における治療標的としての小胞体機能障害と、それに基づく治療薬物の保護作用および作用機構について検討したものである。具体的には、1) 脳虚血における小胞体ストレス応答が関与することを明らかにし、chemical chaperoneである 4-フェニル酪酸の投与は、脳虚血における小胞体ストレスに関連したapoptosisおよび虚血性炎症を抑えたことで、虚血に伴う細胞死を抑えることを明らかにした。また、脳梗塞治療薬edaravone が特異的に小胞体ストレスを抑制することを見出した。さらに、edaravone は4-フェニル酪酸と同様に、chemical chaperoneとしての活性も有し、蛋白質凝集を防ぐ作用を有する可能性を初めて示した。2) 細胞の低酸素虚血モデルを用いて、4-フェニル酪酸を投与した時の神経細胞死への作用を検討した結果、4-フェニル酪酸に脳虚血障害改善作用が認められた。さらに4-フェニル酪酸の作用機序を明らかにする目的で、小胞体ストレス反応におけるGRP78誘導、転写因子CHOPの誘導、小胞体ストレスセンサーIRE1の下流で惹起されるXBP-1のスプライシング、eIF2 α リン酸化に及ぼす4-フェニル酪酸の作用を検討した結果、4-フェニル酪酸はこれらの小胞体ストレス応答を軽減した。3) 小胞体ストレス関連分子、とくに折りたたみ不完全な蛋白質を分解する小胞体関連分解（ユビキチン-プロテアソーム系）に重要なユビキチンリガーゼ(HRD1)の発現が、脳虚血時にどのように変化するかを脳虚血モデル動物および低酸素負荷した神経細胞・グリア細胞を用いて検討した結果、脳虚血モデ

ル動物および低酸素負荷した神経細胞・グリア細胞においてHRD1mRNA発現が誘導された。従って、HRD1は脳虚血時の神経保護に重要な役割を演じていることが示唆された。

これらの研究成果は以下の学術雑誌に発表された。

- 1) Qi X, Hosoi T, Okuma Y, Kaneko M and Nomura Y. Sodium 4-phenylbutyrate protects against cerebral ischemic injury. *Molecular Pharmacology*, 66: 899-908, 2004.
- 2) Qi X, Okuma Y, Hosoi T and Nomura Y. Edaravone protects against hypoxia/ischemia-induced endoplasmic reticulum dysfunction. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311: 388-393, 2004.
- 3) Qi X, Okuma Y, Kaneko M, Hosoi T and Nomura Y. Induction of murine HRD1 in experimental cerebral ischemia. *Molecular Brain Research* 130: 30-38, 2004.

論文発表に続いて発表内容を中心として、また、関連する専門分野を含めた口頭試問を実施した。その内容は、本研究の背景、目的および関連分野等における知識力、実験結果の考察、また、脳虚血における小胞体ストレス応答の役割と意義、疾患との関連性と薬物の治療などにわたった。これらに対する回答は、適切かつ高度なものであって、博士の学位を有するものとして相応しいと判断した。

提出された学位論文の内容はよくまとまっており、その研究成果は独創的かつ有用性に富み、本専門研究分野の中で極めて高く評価される内容であると判断した。

以上の結果、本論文審査委員会は、セイ・キン (Xin Qi) 氏を博士（薬学）の学位を授与するに相応しい十分な学力と研究能力を有するものと認めた。