小胞体ストレスと β 細胞死

β 細胞死の抑制を目指した創薬アプローチ

原 崇, 浦野 文彦

要約: 近年の研究成果より, 小胞体ストレスが糖尿病における β 細胞死に深く関わっていることが明らかとなっている. 本稿では, 小胞体ストレスに起因する β 細胞死を抑制するための創薬アプローチとして二つの方法を紹介する. 一つは小胞体ストレス依存性のアポトーシス誘導因子を見出し抑制する方法である. β 細胞は小胞体ストレスに対して脆弱であり, 閾値を越えた小胞体ストレスを受けると積極的にアポトーシスを誘導する. 我々はこの小胞体ストレス依存性のアポトーシス誘導因子として thioredoxin-interacting protein (TXNIP) を見出した. TXNIP は小胞体ストレスを受けると発現が上昇し, インフラマソーム活性化を介して細胞死を誘導した. TXNIP の発現を抑制すると小胞体ストレスによる β 細胞死が減少したことから, TXNIP を標的とした創薬の可能性を提示した. もう一つのアプローチは, ストレスによって生じる小胞体カルシウムの減少を抑制して細胞死を防ぐ方法である. 我々は β 細胞に有害な高グルコース, 脂肪酸, サイトカインなど様々な糖尿病の増悪因子が β 細胞の小胞体カルシウム量を減少させ, 小胞体ストレスを引き起こし, 細胞死を誘導することを示した. 実際に小胞体カルシウムの減少を抑制する化合物は小胞体ストレスによる β 細胞死を防いだことから, 小胞体カルシウム量を指標とした化合物スクリーニングが β 細胞死を防ぐ化合物探索に有効であることを示した. ここで示したアプローチ以外でも様々な切り口で小胞体ストレスに由来する β 細胞死を抑制することが可能であるが, それには小胞体ストレスの特性をよく知っておくことが重要である. ここでは小胞体ストレスの概要を紹介しながら, 我々が検討してきた基盤研究について紹介したい.

1. はじめに

小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質を合成し, 正しい高次構造へと折りたたむ役割を担っている. 小胞体で正しい品質のタンパク質を生産するには, 折りたたみが可能な範囲内に生産量を制御する必要がある. しかし, 許容量を超えた大量のタンパク質の生産が必要となったとき, または細胞障害によって折りたたみ能力が大幅に低下したときには, タンパク質の折りたたみが追いつかず, 小胞体内に高次構造が異常なタンパク質が蓄積する. この状態を「小胞体ストレス」という. 小胞体ストレスに陥ると, 小胞体膜上に局在する3つのストレスセンサー, PERK, IRE1 および ATF6 は積極的に異常タンパク質を感知し, 「小胞体ストレス応答」を発動する (図1). 小胞体ストレス応答はまずストレス環境に適応するため, ①タンパク質の折りたたみを担うシャペロン等を増員し, 折りたたみの能力を向上させる. また, ②合成負荷を緩和するために, 一過的にタンパク質の翻訳を抑制する. さらに, ③小胞体内に蓄積してしまった異常タンパク質を除去するため, 積極的にタンパク質の分解を促進する (endoplasmic reticulum associated degradation: ERAD). 通常の生理的条件下で認められる小胞体ストレスの多くは一過的であり, 一連の小胞体ストレス応答によってストレス環境を乗り越えることができる. しかし, 病的な要因によって生じる小胞体ストレスは, 重篤かつ慢性的なことが多く, そのような状況下では④積極的にアポトーシスを誘導し, ストレスがかかっている細胞を除去する. このように小胞体ストレス応答は細胞に対する「保護作用」と「障害作用」の両方を併せ持っている (1, 2). 小胞体ストレスに関わる疾

患では「障害作用」の亢進が確認されており、様々な病態の進行に深く関与していることが知られている。

β 細胞はインスリンの合成と分泌に特化した細胞であるため、非常に発達した小胞体を持つ。 β 細胞内のインスリン mRNA 量は全 mRNA 量の 20%, インスリンタンパク質合成量は時に全タンパク質合成量の 50% を占める (3)。このように大量のインスリン合成を担う β 細胞の小胞体には常に大きな負荷がかかりやすく、小胞体ストレスに対して特に脆弱である。実際に 1 型糖尿病、2 型糖尿病または遺伝性糖尿病の患者やモデル動物に由来する β 細胞では小胞体ストレスレベルが高いことが報告されており、慢性的な小胞体ストレスによって生じる β 細胞死が糖尿病発症の一因として挙げられている (1, 2, 4)。現状の糖尿病治療薬では糖尿病患者の β 細胞減少を防ぐことはできないため、いかにして残存する β 細胞を維持していくかが重要である。そこで本稿では、小胞体ストレスに由来した β 細胞死をどのようにして防ぎ、創薬へ結びつけていくのか、その可能性について紹介していきたい。

2. 小胞体ストレス応答を標的とした創薬の可能性

上述のように、小胞体ストレス応答は小胞体ストレスから細胞を保護する役割と、ストレスをうけた細胞を細胞死へと導く二つの役割を合わせ持つ。例えば小胞体ストレスセンサーの一つである ATF6 を欠損したマウス胎児繊維芽細胞では小胞体ストレスに適応できないため、野生型に比べ小胞体ストレスに対して脆弱である。そこに外因性の活性型 ATF6 遺伝子を導入し発現誘導すると、野生型のように小胞体ストレスに対して耐性を示すようになる。一方で、さらに活性型 ATF6 の発現量を上昇し続けると、むしろ細胞死が起きやすくなる。これは CHOP をはじめとしたアポトーシス促進因子の働きが優位となり細胞保護から細胞死へとスイッチが切り変わったためだと考えられる。このように小胞体ストレス応答は小胞体ストレス環境へ適応するために重要な役割を果たす一方で、継続した過剰活性は細胞死を引き起こす可能性をはらんでいる。

それでは実際に、化合物で小胞体ストレス応答を制御するとどのようなことがおきるであろうか？ 現在までに報告されている小胞体ストレスを標的とした化合物の多くは抗腫瘍薬を目指したものであり、PERK 阻害薬 (GSK2606414: 脾臓がん)、IRE1 α 阻害薬 (STF-083010: 多発性骨髄腫)、小胞体ストレスで誘導されるシャペロン、Bip の阻害薬 (Honokiol: 脳腫

瘍)、ERAD に関わるプロテアソーム阻害薬 (Bortezomib: 多発性骨髄腫) など、いずれも小胞体ストレスへの適応力を阻害することによって細胞死を誘導する (5, 6)。これとは逆に小胞体ストレス応答を活性化する化合物は、小胞体ストレスに対する適応力を高めることによってホルミシス効果に似た細胞保護作用を期待することができる。しかし、継続した小胞体ストレス応答の活性化は同時にアポトーシス経路も活性化し、細胞死を誘導してしまうリスクがあるため、長期的な安全性の観点から単純に活性化することは望ましくない。

そこで我々は β 細胞の小胞体ストレス応答の中でも、特にアポトーシス促進のみに強くかかわる分子標的を探索し、抑制することで細胞死を減らすことはできないのか (アプローチ 1)、さらに、小胞体ストレス応答を操作するのではなく、疾患に関わる小胞体ストレスの根源を探し、緩和することで細胞死を減らすことができるのか (アプローチ 2)、この 2 つのポイントに焦点をあてることにした (図 1)。アプローチ 1 に関しては小胞体ストレスから細胞死へと誘導する thioredoxin-interacting protein (TXNIP) を例に、アプローチ 2 に関しては小胞体カルシウムホメオスタシスの制御を例に紹介する。

3. アポトーシス促進因子 TXNIP の制御による細胞死の抑制 (アプローチ 1)

1) TXNIP は小胞体ストレスで発現誘導を受ける

我々は DNA マイクロアレイを用いて、小胞体ストレスで誘導される遺伝子の中でも、アポトーシスに強く関連する遺伝子候補として TXNIP に着目した。TXNIP はユビキタスに発現しているが、 β 細胞で特に強く発現していた。TXNIP の発現は野生型マウスに比べて、小胞体ストレスモデルとして用いられる Akita マウスの脾臓で有意に発現が高かったことから、TXNIP と小胞体ストレスの関連性が示唆された。そこで、 β 細胞株である INS1 や単離脾臓に様々な小胞体ストレス誘導因子を加えると、いずれも TXNIP の発現が著しく上昇した (図 2)。これらのストレスによる TXNIP の発現誘導は、小胞体ストレスセンサーである PERK や IRE1 のノックダウン、もしくはノックアウト細胞ではほとんど認められなかったことから、PERK や IRE1 に依存した小胞体ストレス応答であることが判明した (7)。

2) TXNIP による細胞死への誘導

では TXNIP はどのような働きをしているのであろうか？ TXNIP はチオレドキシンの活性部位に結合し、

図1 小胞体ストレス応答とそれを標的とした候補薬

図2 小胞体ストレスによるTXNIPの発現誘導と細胞死

A：小胞体ストレスによるTXNIPの発現誘導（INS1細胞）。UT：未処置，TG：タプシガルジン，TM：ツニカマイシン，HG：高グルコース，DTT：ジチオスレイトール。B：TXNIP発現抑制による細胞死の抑制。（文献7から転用）

チオレドキシンの抗酸化作用を阻害する因子として報告されていた。しかし、最近の報告では、TXNIPはインフラマソームのコンポーネントでもあるNLRP3と直接結合することで、インフラマソームを活性化し、炎症性サイトカインであるIL1 β 産生を促進することが報告されている(8)。以前より小胞体ストレスと炎症には深い関係があることが知られているが、どのようにして小胞体ストレスが炎症を引き起こしているのか不明であった。そこで我々は、TXNIPが小胞体ストレスと炎症を結びつけている重要な分子ではないかと考えた。実際にTXNIPをノックアウトした膵島もしくはTXNIPをノックダウンしたINS1細胞では小胞体ストレスによるIL1 β の分泌や、IL1 β 分泌によってオートクライン型の転写誘導を受けるIL1 β やIL6の遺伝子発現を抑制した。IL1 β は小胞体ストレスをさらに悪化させ、細胞死を誘導する。そこで、TXNIPをノックダウンしたINS1細胞で小胞体ストレスによる細胞死への影響を調べると、細胞死が有意に減少することが明らかとなった(図2, 3)。これらの結果から、小

胞体ストレスによって誘導されるTXNIPは炎症を介してアポトーシスを促進する重要な因子であることが明らかとなった(7)。

3) TXNIP欠損マウスのフェノタイプと創薬標的としての可能性

TXNIPの抑制が β 細胞の生存に有利に働くことは遺伝子変異マウスの研究からも明らかになってきている。例えば、TXNIP欠損マウスは野生型に比べて β 細胞死を誘導するSTZ投与に対して耐性を示す(9)。また、ob/obマウスにTXNIP欠損マウスを掛け合わせると、耐糖能が改善し、 β 細胞のアポトーシスが抑制される(10)。同様に、AkitaマウスとTXNIP欠損マウスを掛け合わせると、Akitaマウスで認められる小胞体ストレスに依存した β 細胞死が有意に抑制される(11)。げっ歯類動物において β 細胞の保護作用が認められているGLP-1は、TXNIPの発現を強く抑制することも興味深い(12)。このように小胞体ストレスによって誘導されるTXNIPは糖尿病による β 細胞死に深く関わっていることから、創薬の標的として大きな可能性を

図3 TXNIP 活性化による膵β細胞死

秘めている。今後 TXNIP の発現や機能を制御できる化合物が見出せれば、β細胞減少を抑制する新たなタイプの糖尿病薬として期待できる。

4. 小胞体環境改善による小胞体ストレスの緩和（アプローチ 2）

1) 小胞体ホメオスタシスの測定

糖尿病患者のβ細胞はインスリン抵抗性を補うために、大量のインスリンを合成している。この合成負荷に加えて、糖毒性、脂肪酸毒性、酸化ストレス、炎症、膵島アミロイドポリペプチド (IAPP) 沈着など様々なストレスが小胞体環境の悪化を招き、小胞体ストレスを引き起こしていると考えられている(1)。この様々な種類のストレスがどのようにして小胞体ストレスを惹起しているのかを正しく理解できれば、より具体的な解決策を見出すことができる。

小胞体でのタンパク質の折りたたみに特に強く影響を与える環境要因として、小胞体のカルシウム恒常性とレドックス恒常性が挙げられる。小胞体は高い濃度のカルシウムを蓄えている。このカルシウムは細胞内シグナル伝達物質として機能するだけでなく、カルシウム依存性の小胞体シャペロンの機能に必要不可欠である。そのため、小胞体カルシウムポンプである Serca をタプシガルジンで阻害すると、小胞体カルシウム濃度の低下によってタンパク質の折りたたみを担うシャペロンが機能しなくなり小胞体ストレスが生じる。同様に、小胞体内腔ではタンパク質の高次構造を安定化させるジスルフィド結合を形成するために酸化

的環境を維持している。そのため、還元薬で細胞を処理すると正しくタンパク質の高次構造が形成できずに小胞体ストレスが生じる。このような小胞体ホメオスタシスの破綻が小胞体ストレスの原因であれば、小胞体ストレス応答を測定するより小胞体ホメオスタシスの変化を直接測定することが重要であると考えた。そこで INS1 細胞の小胞体内腔にカルシウムセンサーとレドックスセンサーを発現させ、FRET や蛍光変化で小胞体カルシウム量とレドックス状態を測定できるような評価系を作成した(13-15)。

2) 様々なストレスによる小胞体カルシウムへの影響

ここでは研究が先行している小胞体カルシウム評価を中心に紹介する。まず、ポジティブコントロールとして INS1 にタプシガルジンを加えると、数分で小胞体カルシウムが枯渇し、約 2 時間後に小胞体ストレス応答が観察され、さらに 6 時間後から細胞死が認められた。そこで次に、糖毒性や脂肪酸毒性の原因となる高グルコースや高飽和脂肪酸で処理すると、同様に小胞体カルシウムが減少し、小胞体ストレスが生じ、細胞死が確認された(図 4)。このほかにもβ細胞にとって有害なサイトカイン、アミロイドペプチド、酸化ストレスなどでも同様の現象が確認された(図 5)。

ではなぜ小胞体カルシウムの減少が起こるのだろうか？ 高グルコース処置したβ細胞ではカルシウムポンプである Serca の発現量が減少し、その結果、小胞体カルシウムが枯渇していた。実際に糖尿病モデルマウスである db/db やヒト糖尿病患者の膵島では Serca の大幅な発現の減少が認められた。一方、飽和脂肪酸処置の場合は小胞体膜組成の変化によって小胞体構造が維持できなくなり、カルシウムが流出していた。小胞体は小胞輸送に携わることから流動性の高い膜組成を持っている。しかし、飽和脂肪酸を処置した INS1 やヒト膵島の小胞体膜組成は、膜流動性の低い飽和脂肪酸を含む脂質に置き換わっており、電子顕微鏡観察では小胞体構造が大きく破壊されている様子が確認された。このような膜構造の破壊は流動性の高い不飽和脂肪酸処置では起きない。そこで、INS1 細胞に飽和脂肪酸を不飽和脂肪酸に変換する SCD を小胞体に発現させたのち、飽和脂肪酸で処置すると、飽和脂肪酸による小胞体カルシウムの減少が有意に抑制された。このことから、小胞体膜組成の変化が小胞体カルシウムの減少を引き起こしていることが明らかとなった。実際の糖尿病環境におけるβ細胞ではさらに複雑なメカニズムが重なり合って小胞体カルシウムの減少が生じていると考えられる。

小胞体カルシウムの減少は環境要因だけで起きるも

図4 INS1における小胞体カルシウムの減少と細胞死

A: 小胞体カルシウムを枯渇した細胞 (%). UT: 未処置, HG: 高グルコース, OA: オレイン酸 (不飽和脂肪酸), PA: パルミチン酸 (飽和脂肪酸). B: アポトーシス活性と細胞死 (%). (文献 13 から転用)

図5 小胞体カルシウム減少による細胞死誘導

のではなく遺伝子疾患でも生じる。Wolfram 症候群は小胞体に発現する WFS1 の変異によって生じる劣性遺伝子疾患であり、インスリン欠乏による糖尿病、視神経萎縮、尿崩症、難聴などを呈する希少疾患である。小胞体ストレスを介したβ細胞や神経細胞のアポトーシスが原因と考えられているが、WFS1 の欠損がどの

ように小胞体ストレスを起こしているのかは未だ明らかではない。ただし、以前より WFS1 が細胞内カルシウムホメオスタシスに関わっている情報が存在することから(16)、INS1 細胞で WFS1 をノックダウンし、小胞体カルシウムレベルを直接測定した結果、小胞体カルシウムは減少し、小胞体ストレスレベルが上昇していた。Wolfram 症候群は劣性遺伝子疾患であるが、WFS1 の H313Y 変異に関してはヘテロ変異保有者でも発症が認められたことから優性阻害を示すことが示唆された。そこで細胞に H313Y を発現させると他の変異体では大きな変化がない中で、H313Y 発現細胞のみ小胞体カルシウムの減少と小胞体ストレスが生じた。これらの結果より WFS1 が小胞体カルシウムの維持に深く関わっており、WFS1 が欠損することで小胞体カルシウムホメオスタシスが崩壊し、その結果小胞体ストレスが生じていることが強く示唆された(13)。

3) 小胞体ホメオスタシスセンサーを用いた創薬への可能性

小胞体カルシウムの減少がβ細胞死の一因であるならば、これを阻止する化合物を見出せば新たな治療薬につながる可能性がある。特に Wolfram 症候群は現時点で有効な治療法がないため、上市薬の化合物ライブラリーを優先的に用いて、カルシウムの減少を阻止する化合物のスクリーニングを実施した(図6)。この

図6 小胞体カルシウム流出を抑制する化合物スクリーニング (文献13から転用)

結果、糖尿病薬である Pioglitazone と免疫抑制薬である Rapamycin がヒットした。実際にこれらの化合物で処理した細胞は様々なタイプのカルシウム減少を抑制し、INS1 細胞の小胞体ストレス誘導と細胞死を抑制した(13)。Pioglitazone は膵島の Serca 発現を誘導した(17)、Rapamycin は小胞体カルシウムチャネルである IP3R の活性を制御することが報告されている(18)。さらに Pioglitazone に関しては WFS1^{-/-}Ay/a マウスの β 細胞死を減少させる報告があることから、Wolfram 症候群への適応の可能性が示唆される(19)。今後は、小胞体カルシウムのみならず、小胞体レドックスや、その他の小胞体ホメオスタシスのマーカーを

指標にスクリーニングを実施することで、それぞれの疾患の小胞体ストレス機序により適した化合物を収集できるのではないかと考える。

5. おわりに

本稿では小胞体ストレスによるアポトーシス経路の阻害と、小胞体カルシウムを制御することで細胞死を防ぐという2つのアプローチについて紹介した。近年は治療への応用を目的とした化合物スクリーニングが様々な機関で行われるようになり、徐々に小胞体ストレスを標的とした化合物報告例も増え始めている。その中には、ケミカルシャペロンのように異常タンパク質の凝集を防ぐような化合物も見出されており、将来的には小胞体ストレス疾患の根本治療の可能性も考えられるようになってきた。今後さらなる研究の進展より、小胞体ストレス疾患に有効な新薬が見出されることに期待したい。

著者の利益相反：原 崇（第一三共株式会社）。

文 献

- 1) Fonseca SG, et al. Trends Endocrinol Metab. 2011;22:266-274.
- 2) Papa FR. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2:1-17.
- 3) Alarcón C, et al. Av Diabetol. 2002;18:168-174.
- 4) Back SH, et al. Annu Rev Biochem. 2012;81:767-793.
- 5) Hetz C, et al. Nat Rev Drug Discov. 2013;12:703-719.
- 6) Kraskiewicz H. Trends Pharmacol Sci. 2012;33:53-63.
- 7) Osowski CM, et al. Cell Metab. 2012;16:265-273.
- 8) Zhou R, et al. Nat Immunol. 2010;11:136-140.
- 9) Masson E, et al. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009;296:E1251- E1261.
- 10) Yoshihara E, et al. Nat Commun. 2010;1:127.
- 11) Lerner AG, et al. Cell Metab. 2012;16:250-264.
- 12) Shao W, et al. Cell Signal. 2010;22:1240-1246.
- 13) Hara T, et al. Endocrinology. 2013;en20131519.
- 14) Palmer AE, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:17404-17409.
- 15) Kanekura K, et al. Lab Invest. 2013;93:1254-1258.
- 16) Takei D, et al. FEBS Lett. 2006;580:5635-5640.
- 17) Kono T, et al. Mol Endocrinol. 2012;26:257-271.
- 18) MacMillan D. Eur J Pharmacol. 2013;700:181-193.
- 19) Akiyama M, et al. Diabetologia. 2009;52:653-663.