

統合的ストレス応答の異常に起因した疾患における治療薬開発

井上 靖道, 林 秀敏

1. はじめに

統合的ストレス応答 (integrated stress response : ISR) は, 進化的に保存された細胞内シグナル伝達経路であり, さまざまなストレスによって引き起こされる細胞応答である. 異なる細胞性ストレスによって活性化された4種類のリン酸化酵素が, 翻訳開始因子群の構成サブユニットの一つ eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α) を共通の基質としてリン酸化することによりシグナル伝達を惹起することから, ISR と呼ばれている. PERK (double-stranded RNA-dependent protein kinase) はウイルス感染, PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase) は小胞体 (endoplasmic reticulum : ER) ストレス, GCN2 (general control nonderepressible 2) はアミノ酸飢餓, HRI (heme-regulated eIF2 α kinase) はヘム欠乏を感知して, 自己リン酸化し活性化され, eIF2 α をリン酸化する. リン酸化された eIF2 α はキャップ依存的な mRNA の翻訳を抑制し全般的なタンパク質の合成を阻害することで, 細胞内の恒常性の維持に寄与する. 一方で, ATF4 (activating transcription factor 4) のように, その mRNA の5'側非翻訳領域に複数の uORF (upstream open reading frame) を持つ場合は, ISR が作動した際には逆に翻訳を促進させる. 誘導された ATF4 は, 小胞体内の不良タンパク質分解に関する分子やオートファジー関連因子, アミノ酸トランスポーターなどを誘導して, ストレスの軽減を図る. しかし, 細胞内外からのストレスが持続し, 恒常性を保てないほどの過剰なストレス下では, CHOP (C/EBP homologous protein) などのアポトーシスを促す分子を誘導して細胞死へと導くことで, 異常な細胞を生体より除去する (図1)¹⁾.

赤血球前駆体での HRI によるヘモグロビン合成調節や, 膵臓 β 細胞における PERK によるインスリン合成制御をはじめ

め, ISR は重要な生理的な役割を担っている. 一方で, 近年, がんや糖尿病などのさまざまな疾患において, ISR が発症や病態の進行に関与していることが明らかにされつつある²⁾. 本稿では, ISR を構成する分子群について概説するとともに, 疾患発症機構と治療薬開発に関して解説する.

2. ISR の活性化を担う4種類の eIF2 α リン酸化酵素

1) PERK

PERK は ER 膜上に存在し, ER 内腔側の領域で ER 分子シャペロン GRP78 (別名 Bip, HSPA5) と結合し, 不活性状態にある. ER 内に折りたたみ不全の不良タンパク質が蓄積すると, GRP78 は不良タンパク質と優先的に結合するようになる. すると, PERK は GRP78 を解離し, 二量体あるいは多量体を形成後, 自己リン酸化により活性化する. ER 膜には, PERK の他に二つのセンサータンパク質 IRE1 (inositol requiring enzyme-1) と ATF6 (activating transcription factor 6) が存在しており, PERK と一部類似した分子メカニズムで活性化され, 協働して UPR (unfolded protein response) と呼ばれる応答を引き起こし, ER ストレスを軽

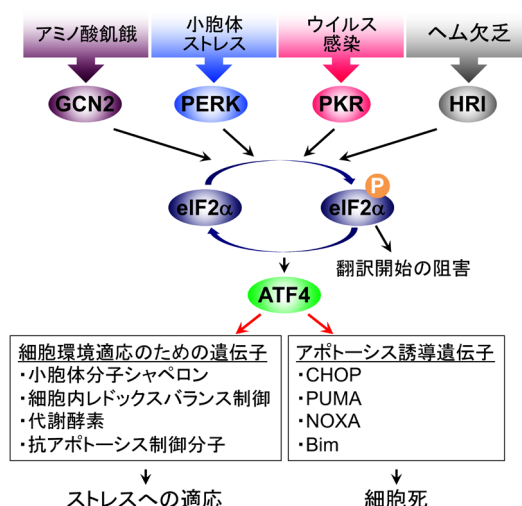


図1 統合的ストレス応答

統合的ストレス応答とは, 異なるストレスによって活性化された4種類の eIF2 α リン酸化酵素により開始するシグナル伝達である. タンパク質への翻訳反応を停止させストレスに対処する一方で, 慢性的なストレスなどで細胞内恒常性 (ホメオスタシス) が維持できない場合は細胞死を誘導する.

名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞情報学分野 (〒467-8603 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通3-1)

Development of therapeutic agents for diseases caused by abnormal integrative stress response

Yasumichi Inoue and Hidetoshi Hayashi (Department of Cell Signaling, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Tanabe-dori 3-1, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8603, Japan) 本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載.

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940423

© 2022 公益社団法人日本生化学会

減させる。PERKの活性化はERストレスの他、グルコース欠乏や、RASやMYCなどががん原遺伝子の活性化によっても引き起こされることが報告されている³⁾。

2) GCN2

GCN2は酵母から哺乳類まで進化的に高度に保存されたタンパク質である。GCN2の制御に関する知見は、主に酵母の研究から得られたものであり、アミノ酸欠乏に反応してGCN2は自身のヒスチジルtRNA (transfer RNA) 合成酵素関連ドメインを介して脱アシル化したtRNAに結合し活性化することが明らかにされている⁴⁾。GCN2はアミノ酸枯渇以外にも、紫外線照射やグルコース欠乏下においても活性化することが知られている。

3) PKR

PKRは抗ウイルス作用を持つRNA結合タンパク質の一つである。ウイルス非感染時には、PKRは不活化状態で存在しているが、感染によって細胞内に侵入したウイルス二本鎖RNA (dsRNA) により活性化され、eIF2 α のリン酸化を介してウイルスと宿主のタンパク質合成を阻害することで、抗ウイルス作用を示す。ウイルス感染以外にも、種々のサイトカインや酸化ストレスに応答して活性化することも報告されているが、その活性化メカニズムは不明な点が多い。

4) HRI

HRIは細胞内でのヘムの濃度を調節するヘムセンサータンパク質の一つである。構造中に2か所のヘム結合ドメインを持ち、ヘムが存在すると不活性化状態の構造を形成し、HRI自身のキナーゼ活性が阻害される。しかし、ヘム濃度が低下すると、HRIタンパク質の構造変化が生じ、その結果HRIの自己リン酸化が誘導され活性化される。当初は、HRIは主に赤血球系の細胞に発現し、赤血球分化に関与していると考えられた。ところが最近では、HRIはヘム濃度の調節のみならず、さまざまな細胞に発現し、酸化ストレスやプロテアソーム阻害、ミトコンドリアストレスなど幅広いストレスに反応して活性化し、さまざまな生理作用を発揮することも明らかになってきている⁵⁾。

5) eIF2 α リン酸化酵素間のクロストーク

上述した4種のeIF2 α リン酸化酵素は、それぞれ特異的なストレス感知システムを有しながらも、さまざまなストレスに対し同時に複数のeIF2 α リン酸化酵素の活性化を生じ、協調的に作用することも明らかにされつつある。たとえば、PERK欠損マウス胎仔線維芽細胞において、GCN2はERストレスによるeIF2 α のリン酸化を補完している。逆に、PERKが軟部肉腫のモデルマウスやアルツハイマー病のモデルマウスにおけるGCN2欠損を相補することも報

告されている。また、ボルテゾミブなどのプロテアソーム阻害時には、PERK, GCN2, HRIがいずれも活性化することも報告されており、さまざまなストレス応答におけるeIF2 α リン酸化酵素活性化機構の全貌の解明は、ISRに関係した疾患の治療法開発には必須と思われる。

3. ISR下で細胞運命を決定する転写因子ATF4

ATF4はATF/CREB (cyclic AMP response element binding domain) ファミリーに属する塩基性ロイシンジッパー型転写因子である。ATF4にはさまざまな二量体を形成する種々のパートナー分子が存在し、遺伝子の転写制御に多様性をもたらすことで細胞の運命決定を調節することができる。ISR下においても、ATF4はさまざまなストレスに応答して細胞運命を決定する重要な役割を担っている。中でも、ATF4は細胞生存と細胞死を制御することが知られながらもその制御については未解明であった。我々は、サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質p21 (Cip1, Waf1) をATF4の新規標的遺伝子として同定した⁶⁾。そこで、p21をノックダウンさせた細胞にERストレスを与えたところ、細胞死が顕著に誘導された。一方で、p21を過剰発現させると、ERストレスに対し細胞保護的に作用した(図2)。p21はがん抑制遺伝子p53の標的遺伝子としてもよく知られており、p53による細胞運命決定にも関与すると報告されているが、ERストレスによるp21の誘導はp53非依存的であった。p21以外にも、ATF4の標的遺伝子で細胞に対し保護的に作用する分子としてMcl-1 (myeloid-cell leukemia 1) やSestrin-2などが細胞の生存に寄与することが報告されている。

一方で、ISRによるストレス適応応答が細胞の恒常性を回復できない場合、細胞死が誘導される。この細胞死の制御についてもATF4とその下流の標的遺伝子により媒介され、中でも代表的なアポトーシス誘導因子がCHOPである。ATF4により誘導されたCHOPは、アポトーシス実行因子であるBimやPUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) を転写活性化して細胞死を誘導するとともに、DR5 (death receptor 5) の発現を上昇させアポトーシスの誘導に関与する。また、我々は以前にATF4とCHOPにより誘導される分子としてTRB3 (tribbles related protein 3) を同定した⁷⁾。誘導されたTRB3は、ATF4とCHOPの転写活性を抑制することで自身の転写を抑制するというネガティブフィードバックを形成している(図2)。加えて、TRB3はAktの活性化を抑制して細胞死を促す作用も持っている。

ATF4は他にも、オートファジーやタンパク質のフォールディング、レドックス代謝などに関わるストレス関連遺伝子の転写を制御することで、細胞のストレス適応ならびに運命決定に関与している。

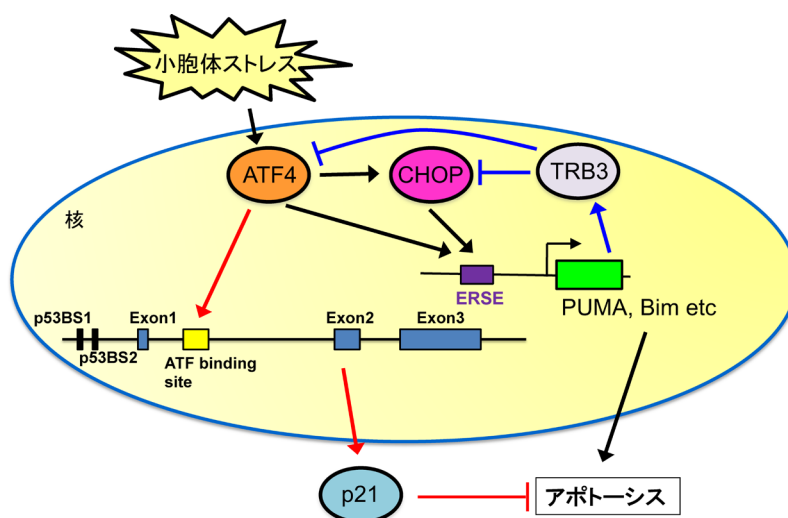


図2 ストレス応答下の細胞運命決定における ATF4 の役割

小胞体ストレスなどのストレス応答において、ATF4はp21やMcl-1などの遺伝子を誘導して細胞保護的な作用を示す。一方で、慢性的なストレス応答下では、ATF4はPUMAやNOXAなどの遺伝子を誘導してアポトーシスによる異常な細胞の除去を行う。TRB3はATF4やCHOPにより誘導され、ネガティブフィードバック機構を担うとともに、アポトーシスの誘導にも関与している。

4. ISRの制御異常に起因した疾患と治療薬開発の現状

ISRはがんや糖尿病、神経変性疾患、代謝異常などの多くの疾患の発症にも関与することが明らかにされつつある²⁾。したがって、ISRを制御する低分子化合物などのツール開発は、ISRに起因する病態を克服する新規治療法の開発につながることを期待される。以下、いくつかの疾患を取り上げて治療薬開発の現状を含め解説したい。

がん細胞は無秩序な増殖のために、血管網の形成が追いつかず酸素や栄養が不十分となり、慢性的なストレス状態のがん微小環境にさらされている。しかし、ISRを巧みに利用することで、無秩序な増殖によるストレス環境下での生存を可能としている。そこで、恒常的にISRが活性化しているがん細胞に対し、より強力にATF4を誘導して持続的なISRを引き起こす化合物はがん細胞にアポトーシスを誘導することができると想定され、EI-DeiryらによりONC201が発見された。ONC201は、HRIとPKRの活性化を介してISR経路による細胞死を誘導する作用を持つ⁸⁾。我々も、ATF4を活性化する化合物スクリーニングにより、フラバノンであるkurarinoneを同定した。kurarinoneはPERK-ATF4経路のみを選択的に活性化して抗がん作用を示したことから、がん治療における創薬シードとして期待される⁹⁾。

糖尿病は慢性的な高血糖が原因でいくつかの重大な合併症を引き起こす病気である。高血糖状態によるインスリンの過剰生産に加え、炎症反応が加わり、膵臓のβ細胞にERストレスが生じアポトーシスが誘導されることで、膵β細胞の脱落が生じる。GSK2656157などのPERK阻害剤の

投与で、2型糖尿病を模倣したマウスの高血糖症状を改善したことから、PERK阻害剤は2型糖尿病に対する新規治療アプローチとしての可能性が示唆されている¹⁰⁾。

脳において、長期記憶の形成には新たなタンパク質合成が必要であることは以前から認識されていた。近年、ISRが長期記憶の形成を制御することが明らかにされている。ISRの阻害は長期記憶の形成を促進し、逆にISRの活性化は長期記憶の形成を阻害することが報告された^{11, 12)}。加えて、ゲノムワイド関連解析により、知的障害を持つヒトにおいてISRの主要な構成要素に変異が見つかっている¹³⁾。また、脳では虚血や加齢、酸化に伴いERストレスが生じ、フォールディング不全のタンパク質の蓄積が、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の発症に関与することが明らかにされている。また、それら疾患の病態においてeIF2αのリン酸化が亢進していることも報告されている。ISR経路を抑制する低分子化合物のスクリーニングで発見されたISRIBは、細胞内でリン酸化eIF2αと翻訳開始因子eIF2B (eukaryotic translation initiation factor 2B) との結合を阻害することで、ISR経路の活性化を抑制する作用を有する¹⁴⁾。脳損傷マウスモデルやアルツハイマー病マウスモデルへのISRIBの投与で、これら病状の進行を抑制できることが報告されており、ISR経路の抑制アプローチが神経変性疾患に対する新規治療法になることが期待されている。

5. おわりに

ISR経路は細胞および生体において、タンパク質の恒常

性を制御する中心的な役割を果たしている一方で、そのメカニズムについては未解明な点も多く残されている。加えて、ISR経路の活性化時に細胞が生死を決定するための制御機構もまだ全貌がみえていないといえる。今後の詳細な解析が待たれる。

また、本稿で解説したように、ISR経路を制御するアプローチがさまざまな疾患に有効であることが明らかになりつつある。その一方で、さまざまなストレスと惹起されるeIF2 α リン酸化酵素との関係は、当初想定された以上に複雑かつ多様性に富み、eIF2 α リン酸化酵素活性化制御の全貌の解明が、ISR関係疾患の治療法開発には必須と思われる。

文 献

- 1) Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A., & Gorman, A.M. (2016) The integrated stress response. *EMBO Rep.*, **17**, 1374–1395.
- 2) Costa-Mattioli, M. & Walter, P. (2020) The integrated stress response: From mechanism to disease. *Science*, **368**, eaat5314.
- 3) Hart, L.S., Cunningham, J.T., Datta, T., Dey, S., Tameire, F., Lehman, S.L., Qiu, B., Zhang, H., Cerniglia, G., Bi, M., et al. (2012) ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *J. Clin. Invest.*, **122**, 4621–4634.
- 4) Vazquez de Aldana, C.R., Wek, R.C., Segundo, P.S., Truesdell, A.G., & Hinnebusch, A.G. (1994) Multicopy tRNA genes functionally suppress mutations in yeast eIF-2 alpha kinase GCN2: evidence for separate pathways coupling GCN4 expression to unchanged tRNA. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7920–7932.
- 5) Girardin, S.E., Cuziol, C., Philpott, D.J., & Arnoult, D. (2021) The eIF2 α kinase HRI in innate immunity, proteostasis, and mitochondrial stress. *FEBS J.*, **288**, 3094–3107.
- 6) Inoue, Y., Kawachi, S., Ohkubo, T., Nagasaka, M., Ito, S., Fukaura, K., Itoh, Y., Ohoka, N., Morishita, D., & Hayashi, H. (2017) The CDK inhibitor p21 is a novel target gene of ATF4 and contributes to cell survival under ER stress. *FEBS Lett.*, **591**, 3682–3691.
- 7) Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., & Hayashi, H. (2005) TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J.*, **24**, 1243–1255.
- 8) Kline, C.L., Van den Heuvel, A.P., Allen, J.E., Prabhu, V.V., Dicker, D.T., & El-Deiry, W.S. (2016) ONC201 kills solid tumor cells by triggering an integrated stress response dependent on ATF4 activation by specific eIF2 α kinases. *Sci. Signal.*, **9**, ra18.
- 9) Nishikawa, S., Itoh, Y., Tokugawa, M., Inoue, Y., Nakashima, K.I., Hori, Y., Miyajima, C., Yoshida, K., Morishita, D., Ohoka, N., et al. (2019) Kurarinone from *Sophora flavescens* roots triggers ATF4 activation and cytostatic effects through PERK phosphorylation. *Molecules*, **24**, 3110.
- 10) Kim, M.J., Kim, M.N., Min, S.H., Ham, D.S., Kim, J.W., Yoon, K.H., Park, K.S., & Jung, H.S. (2019) Specific PERK inhibitors enhanced glucose-stimulated insulin secretion in a mouse model of type 2 diabetes. *Metabolism*, **97**, 87–91.
- 11) Costa-Mattioli, M., Gobert, D., Stern, E., Gamache, K., Colina, R., Cuellar, C., Sossin, W., Kaufman, R., Pelletier, J., Rosenblum, K., et al. (2007) eIF2 α phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*, **129**, 195–206.
- 12) Zhu, P.J., Huang, W., Kalikulov, D., Yoo, J.W., Placzek, A.N., Stoica, L., Zhou, H., Bell, J.C., Friedlander, M.J., Krnjević, K., et al. (2011) Suppression of PKR promotes network excitability and enhanced cognition by interferon- γ -mediated disinhibition. *Cell*, **147**, 1384–1396.
- 13) Kernohan, K.D., Tetreault, M., Liwak-Muir, U., Geraghty, M.T., Qin, W., Venkateswaran, S., Davila, J., Holcik, M., Majewski, J., Richer, J., et al. (2015) Homozygous mutation in the eukaryotic translation initiation factor 2 α phosphatase gene, PPP1R15B, is associated with severe microcephaly, short stature and intellectual disability. *Hum. Mol. Genet.*, **24**, 6293–6300.
- 14) Sekine, Y., Zyryanova, A., Crespiello-Casado, A., Fischer, P.M., Harding, H.P., & Ron, D. (2015) Stress responses. Mutations in a translation initiation factor identify the target of a memory-enhancing compound. *Science*, **348**, 1027–1030.

著者寸描

●井上 靖道 (いのう え やすみち)



名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞情報学分野准教授。博士（薬学）。

■略歴 1999年名古屋市立大学薬学部卒業。2004年同大学院薬学研究科博士後期課程修了。04～07年国立がんセンター研究所放射線研究部リサーチレジデント。07～11年財団法人癌研究会癌研究所生化学部研究員。11年より現所属。

■研究テーマと抱負 がんにおけるシグナル伝達異常の解析を行うとともに、それを標的とした分子標的薬の創製を目指している。

■ウェブサイト <http://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/grad/iryo/yakugaku/joho/>

●林 秀敏 (はやし ひでとし)



名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞情報学分野教授。薬学博士。

■略歴 1982年東京大学薬学部卒業。87年同大学院薬学系研究科博士後期課程修了。帝京大学薬学部、金沢大学薬学部を経て、90年より名古屋市立大学薬学部助手。同講師、准教授を経て、2008年より現職。この間、カナダトロントThe Hospital for Sick Children研究所にて客員研究員。

■研究テーマと抱負 細胞性ストレス応答、がん関連タンパクの安定性の機序を解明し、創薬を目指す。

■ウェブサイト <http://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/grad/iryo/yakugaku/joho/>