

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06501

研究課題名（和文）骨形成過程で見出したAtg9a依存的細胞死のメバロン酸経路による制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanisms of Atg9a-dependent necrosis

研究代表者

今川 佑介（Imagawa, Yusuke）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター（研究所）・その他部局等・主任研究員

研究者番号：20614770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、研究代表が以前に発見した骨形成に関わる生理的ネクロシスであるAtg9a依存的ネクロシスの分子メカニズムを明らかにした。まず、Atg9a依存的ネクロシスの誘導剤として、メバロン酸経路の律速酵素であるHMG-CoA レダクターゼの阻害剤スタチンを同定し、Atg9a依存的ネクロシスの原因として、メバロン酸経路の下流の代謝産物であるFPPとGGPPの枯渇がこの細胞死において重要な役割を担っていることを明らかにした。また、Atg9a欠損細胞においてはメバロン酸経路をバイパスする経路が存在し、FPPやGGPPの枯渇を回避することで細胞死を回避することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者はこれまでにAtg9a依存的ネクロシスが骨形成に関与することをすでに報告している。また、in vitroの解析においてスタチンがAtg9a依存的に骨形成を誘導することも見出した。また、高脂血症の治療薬であるスタチンの副作用として横紋筋融解症が知られているが、これは、骨格筋を構成する筋細胞が融解・細胞の壊死（ネクロシス）することが原因となっている。本研究において、スタチン誘導性ネクロシスにおけるAtg9aの関わりが明らかになったことから、骨形成におけるAtg9a依存的ネクロシス生理的役割だけでなく、スタチンが及ぼす副作用のコントロールに貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, the molecular mechanism of Atg9a-dependent necrosis, a physiological necrosis in bone formation previously discovered by the Principal Investigator, was elucidated. First, an HMG-CoA reductase inhibitor statin, the rate-limiting enzyme of the mevalonate pathway, was identified as an inducer of Atg9a-dependent necrosis, and the depletion of FPP and GGPP, downstream metabolites of the mevalonate pathway, was identified as the cause of Atg9a-dependent necrosis, which is important in this cell death. It was also suggested that a pathway exists in Atg9a-deficient cells that bypass the mevalonate pathway and avoids cell death by circumventing the depletion of FPP and GGPP.

研究分野：細胞死

キーワード：プログラム細胞死 生理的ネクロシス メバロン酸経路 Atg9a 骨形成

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞死研究においてアポトーシスだけでなく制御されたネクローシスが注目されている。これまで「アポトーシス=制御された細胞死」「ネクローシス=偶発的な(制御できない)細胞死」と認識され、ネクローシスは制御不能であると考えられていたが、最近ではネクローシスにも制御可能なものが多数報告され、その関連遺伝子および実行メカニズムの違いによってオートファジー依存的細胞死やネクロプトーシス(RIP1/RIP3依存的ネクローシス)、パイロトーシス(Caspase-1依存的ネクローシス)などいくつかの種類に分類されている。これらの制御されたネクローシス型細胞死は、心筋梗塞や神経変性疾患、細菌感染など様々な疾患において重要な役割を果たしていることが報告され、制御されたネクローシスが病的に重要な意味を持つことが知られてきている。

研究代表者も最近、新しい制御されたネクローシス型細胞死(Atg9a依存的ネクローシス)を同定し報告した(Imagawa et al., *Nat Commun*, 2016)。この細胞死は、正常マウスの胚発生過程において見出しており、他のグループの知見とは異なる生理的な条件下で誘導されるネクローシス型細胞死であることが特徴の一つである。さらに、この細胞死はオートファジー関連遺伝子Atg9aによって制御されるが、オートファジーに必須の他の遺伝子であるAtg5には影響を受けないことを見出し、オートファジー依存的細胞死とも異なる新たな制御された細胞死であることを確認した。加えて、Atg9a遺伝子ノックアウトマウスの解析から、このネクローシス型細胞死が誘導されないと骨形成不全が引き起こされることを見出し、胚発生期の骨形成に必須であることを明らかにした。このことは、生理的な役割を持つ制御されたネクローシス型細胞死の発見と同時に、これまで不要な細胞や傷害された細胞の除去にあると考えられてきた生理的な細胞死の役割に加えて、組織形成というこれまでに知られていない細胞死の役割が存在する可能性を示している。すなわち、生体内で誘導される細胞死はいくつかのメカニズム(アポトーシス[カパーゼ依存的細胞死]やAtg9a依存的ネクローシス)で実行されており、実行メカニズムごとにその役割(それぞれ不要細胞の除去、石灰化・骨形成)が異なっている可能性を示している。

2. 研究の目的

生理的なネクローシスであるAtg9a依存的ネクローシスの実行メカニズムの詳細を明らかにし、生体内でのこの細胞死の制御機構を理解することは、これまでに知られていない細胞死の役割を明らかにする上で非常に重要であると考えられる。そこで本研究では、申請者が同定したAtg9a依存的ネクローシスの実行メカニズムの詳細を明らかにすることで、生体内における細胞死の制御機構と、その細胞死が果たす役割の関係を明らかにすることを目指している。

3. 研究の方法

Atg9a依存的細胞死の分子メカニズムを明らかにするために、まず、*in vitro*でAtg9a依存的ネクローシスを再現することを試みた。具体的には、Atg9a遺伝子欠損マウス線維芽細胞(MEF)と野生型MEFを用いてAtg9a依存的に細胞死を誘導する化合物をスクリーニングする。次に、*in vitro*でAtg9a依存的に細胞死を誘導する化合物による細胞死を抑制する化合物や遺伝子のスクリーニングまたは遺伝子発現解析を行い、この細胞死に重要なシグナル伝達経路および遺伝

子を同定した。また、in vitro で同定した化合物による Atg9a 依存的な細胞死が骨形成に関与するか、in vivo または ex vivo の解析により明らかにした。加えて、in vitro の解析で明らかにした Atg9a 依存的な細胞死経路がマウス胚発生過程の骨形成領域においても誘導されているかについても確認した。最後に、in vitro で明らかにした細胞死の分子メカニズムが、どのように骨形成につながるかを明らかにする。

4. 研究成果

Atg9a 遺伝子欠損 MEF と野生型 MEF とを用いて Atg9a 依存的 (Atg5 非依存的) ネクロシスを誘導する化合物のケミカルスクリーニングを行い、in vitro で Atg9a 依存的にネクロシスを誘導する化合物として、高脂血症の治療薬であるスタチンを同定した。さらに、マウス新生児頭頂骨の ex vivo 器官培養系を用いた解析により、スタチンが Atg9a 依存的に骨形成を誘導することも明らかにした。スタチンは、コレステロールの生合成に重要な役割を果たすメバロン酸経路の律速酵素 HMG-CoA レダクターゼを阻害し血中コレステロールを低下させる薬剤の総称である。In vivo において、マウス胚発生期の骨形成過程で観察される細胞死領域の遺伝子発現解析を行った結果、メバロン酸経路に関わる酵素の一つであるジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (Mvd) の遺伝子発現が細胞死領域特異的に減少していることを見出した。このことから、生体内においてもメバロン酸経路の減弱が Atg9a 依存的ネクロシスの原因となっている可能性が示唆された。そこで、スタチンによって誘導される細胞死の分子メカニズムを解析することで、Atg9a 依存的ネクロシスの分子メカニズムを明らかにすることを試みた。スタチンは、メバロン酸経路を阻害することで、コレステロールをはじめとするメバロン酸以下の代謝産物の枯渇が生じる。そこで、メバロン酸以下のメバロン酸経路の代謝産物を細胞に添加し、スタチン誘導性細胞死を抑制することができるか確認した。その結果、ファルネシルニリン酸 (FPP) およびゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) によってスタチン誘導性細胞死がキャンセルされることを明らかにした。すなわち、スタチンによって誘導された FPP と GGPP の枯渇が Atg9a 依存的ネクロシスを誘導することが示唆された。FPP および GGPP は Ras や Rho、Rac、Rap、Rab といった small G タンパク質のプレニル化の基質として利用される。プレニル化はタンパク質の翻訳後修飾の一つで、標的タンパク質の細胞膜やオルガネラ膜への結合に重要な役割を果たす。このことから、これらの small G タンパク質の修飾が Atg9a 依存的ネクロシスを制御している可能性が考えられた。そこで、プレニル化酵素 (FTase、GGTase-I および Rab GGTase) の阻害剤およびプレニル化酵素の各遺伝子に対する siRNA を用いて small G タンパク質のプレニル化の阻害が Atg9a 依存的ネクロシスを誘導するか検証した。しかし、全てのプレニル化酵素を阻害した条件下においても細胞死は誘導されなかった。このことから、プレニル化される small G タンパク質などの異常は細胞死とは関連しないことが示唆された。また、FPP や GGPP からさらに代謝されることが知られている他の代謝産物の添加では細胞死は抑制できなかった。よって、FPP と GGPP の Atg9a 依存的ネクロシスへの関わりは、これまでに知られていない新たな経路によるものであると考えられた。

一方で、メバロン酸経路を阻害することが知られている骨粗しょう症治療薬ビスホスホネートによってもネクロシスが誘導されたが、その細胞死はスタチンと同様に FPP および GGPP の添加により抑制される一方で、Atg9a には依存しなかった (Atg9a 遺伝子欠損 MEF においても細胞死を誘導した)。ビスホスホネートは、スタチンがターゲットにする HMG-CoA レダクターゼよりも下流のメバロン酸経路の代謝酵素のひとつであるファルネシルニリン酸合成酵素を阻害する。このことから、Atg9a 遺伝子欠損 MEF はメバロン酸経路の一部をバイパスし、HMG-

CoA レダクターゼにより産生されるメバロン酸からファルネシル二リン酸合成酵素の基質となるゲラニル二リン酸 (GPP) を合成する経路をバイパスしている可能性が示唆された。これに関連して、Atg9a 遺伝子欠損 MEF では、スタチン刺激時におけるメバロン酸経路の一群の代謝酵素の遺伝子発現が増加していた。このことから、Atg9a 遺伝子欠損 MEF は、スタチンによる FPP と GGPP の枯渇を抑制し、細胞死から逃れていることが示唆された。そこで、Atg9a 遺伝子欠損 MEF と野生型 MEF で、スタチン刺激時の FPP および GGPP を含むメバロン酸経路の代謝産物を CE-MS を用いた標的メタボローム解析により確認した。しかし、この実験系においてはメバロン酸経路の代謝産物を検出することができなかった。しかしながら、Atg9a 遺伝子欠損 MEF では、スタチン刺激下において野生型 MEF と比較してプレニル化されたタンパク質の量が多く保たれていたことから、Atg9a 遺伝子欠損 MEF では、FPP や GGPP の枯渇が抑えられている可能性が間接的ではあるが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Daniel J Klionsky, Yusuke Imagawa, et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1~382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2020.1797280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Harada Yoichiro, Mizote Yu, Suzuki Takehiro, Hirayama Akiyoshi, Ikeda Satsuki, Nishida Mikako, Hiratsuka Toru, Ueda Ayaka, Imagawa Yusuke, Maeda Kento, Ohkawa Yuki, Murai Junko, Freeze Hudson H, Miyoshi Eiji, Higashiyama Shigeki, Uono Heiichiro, Dohmae Naoshi, Tahara Hideaki, Taniguchi Naoyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Metabolic clogging of mannose triggers dNTP loss and genomic instability in human cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e83870
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.83870	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 LI TAIBO, 辻本賀英, 東山繁樹, 今川佑介
2. 発表標題 マウス胚発生期に誘導される生理的ネクローシスの解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今川佑介, 高野慶子, 田宮大也, 東山繁樹, 辻本賀英
2. 発表標題 Trial for Osteosarcoma Treatment by Non-apoptotic Cell Death Regulation
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今川佑介、松岡洋祐
2. 発表標題 生理的条件下で誘導されるネクローシス型細胞死
3. 学会等名 第3回細胞死コロキウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今川佑介
2. 発表標題 独自のin vivo細胞死イメージングによる制御されたネクローシス型細胞死の生理的役割の解明
3. 学会等名 第2回細胞死コロキウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今川佑介、辻本賀英
2. 発表標題 生理的なネクローシス（Atg9a依存的ネクローシス）の分子メカニズム
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野慶子、今川佑介、辻本賀英
2. 発表標題 非アポトーシス型細胞死機構誘導による骨肉腫細胞治療への応用
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今川佑介
2. 発表標題 生体内で起こる生理的なネクローシス型プログラム細胞死機構の解析
3. 学会等名 第1回細胞死コロキウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 今川佑介	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 260
3. 書名 細胞死のすべて そのメカニズムと、生命現象・疾患との関わり	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------