

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07029

研究課題名(和文)細胞の防御機構を制御する遺伝子導入法の開発

研究課題名(英文)Development of Gene Delivery Method to Control of Autophagy mechanisms

研究代表者

小川 英知(Ogawa, Hidesato)

大阪大学・大学院生命機能研究科・招へい教授

研究者番号：20370132

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)：外来の異物を分解する選択的オートファジーp62は、細胞内に侵入した核酸を速やかに分解し核酸の導入を著しく阻害する。化合物スクリーニングの結果、この活性制御を行うTBK1の阻害剤で遺伝子導入効率が強く促進されること明らかにした。さらに核酸のみならずアデノウイルスの感染効率もこれらの薬剤で上昇させることが明らかとなった。p62複合体の解析からアデノウイルスたんぱく質が実際に結合し機能阻害することが判明した。本研究成果は核酸導入のみならずウイルスベクターを用いた様々な医療に貢献できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、遺伝子導入やウイルス感染などの分野で大きな社会的な意義を持っている。遺伝子導入においては、p62が細胞内で核酸の分解を促進することに着目し、p62の機能抑制による遺伝子導入効率の促進は、新たな遺伝子治療法の開発につながる事が予測される。また世界中で問題となったCOVID-19パンデミックにおいて、ワクチンの開発は極めて重要な課題であり、そのなかで本研究は、アデノウイルス感染制御剤を可能とすることで危険性の少ないアデノウイルスベクターを用いたワクチンの基盤技術を提供することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Autophagy plays an important role in the defense against pathogen infection. Since most pathogens possess DNA or RNA, this system may play a role in the removal of foreign nucleic acids. The selective autophagy receptor p62 can rapidly degrade transfected nucleic acids and significantly inhibit gene delivery. High throughput screening of chemical compounds has shown that the inhibition of TBK1, which controls p62 activity, significantly increases gene transfection efficiency. In addition, these inhibitors can also enhance adenovirus infection. It was also found that adenoviral proteins form the complex that inhibits p62. These research results are expected to contribute not only to nucleic acid delivery, but also to medical applications using viral vectors.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子導入 核酸医薬 ウイルスベクター オートファジー アデノウイルス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細菌やウイルス、大気中の微小粒子状有害物質など様々な外来因子の侵入に対し、細胞は xenophagy と呼ばれる選択的オートファジー機構によってそれらを排除する。この防御機構は核酸導入時においても活性化されるため、導入された核酸の多くは核内など機能する領域に達する前に分解・排除されてしまう。細胞工学では遺伝子の導入は必須であり、導入効率は基礎研究だけでなく、iPS 細胞の作製やゲノム編集など臨床応用にも大きく影響する。また近年多くの核酸医薬品が開発され、核酸を効率良く導入するための導入試薬やキャリアの開発、安定性を維持するためのリンカー付加などが行われているが、導入した核酸の多くは十分機能する前に失われてしまうことが大きな問題である。

申請者はこれまでに、外来因子が細胞質に取り込まれた際に短時間のうちに選択的オートファジーを受けることに着目し、オートファジーレセプター p62 がこのメカニズムに重要な役割を持つことを明らかにしてきた。野生型マウス繊維芽細胞 (MEF 細胞) と p62 ノックアウトマウスから樹立した p62KOMEF 細胞とに GFP レポーター遺伝子を導入したところ、p62KOMEF 細胞では野生型 MEF 細胞に比べ導入効率が約 10 倍上昇した。さらに p62KOMEF 細胞に p62 を一過的に発現させるレスキュー実験を行ったところ、遺伝子導入効率は顕著に減少した。この結果は p62 が導入された外来核酸の排除機構に極めて重要な因子であることを示している。この分子機構を理解するために、細胞への異物導入からオートファジー関連因子の異物へのリクルートまでのライブイメージングを試みた。しかし一般的なリポフェクション法のような核酸の導入は、核酸の細胞質への露出の瞬間であるエンドソーム膜崩壊のタイミングを捉えることが難しく、導入直後に核酸周囲に集まる分子を観察することが困難であった。そこで申請者のグループはマグネットビーズにエンドソーム内の酸性下で強い蛍光を発する試薬を付加し、ビーズを外來異物として細胞に取り込ませ、侵入直後にビーズ周囲に集まる細胞内タンパク質の動きを観察することに成功した。これまでの実験から、導入されたビーズ周囲に p62 やユビキチン (Ub) などが短時間で集結することが明らかとなっている。さらにこの Ub 化の効率と遺伝子導入の効率には明確な相関があることが明らかとなっている。

これらの知見を元に、申請者は p62 を中心とした異物排除機構の分子メカニズムを理解しその仕組みを制御することで、効率の良い新たな遺伝子導入法が構築できると考えた。この方法は近年発展している再生医療における iPS 細胞作製や CAR-T 細胞への遺伝子導入、血球での遺伝子疾患治療の際のゲノム編集に必要なクリスパーベクターの導入など、広い範囲での応用が可能となる。またこの仕組みを細胞の防御機構と捉え、この制御機構を利用することでウイルスや細菌に対する感染防御への応用も期待できる。

### 2. 研究の目的

外來核酸導入により活性化されるオートファジー機構に着目し、導入により核酸周囲に集結する p62 複合体を同定し、その構成因子の機能を解析する。これにより核酸導入直後におこるオートファジー機構の分子メカニズムの全体像を明らかにし、ここに関わる p62 複合体の機能を特異的に抑制し、遺伝子導入効率を促進させる化合物を探索する。得られた化合物について、複合体構成因子に及ぼす作用を生化学的解析及びライブイメージングにて解析し、新規核酸導入試薬としての可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

これまでの実験結果から、核酸の導入に対し p62 が抑制的に働くこと、また p62 のリン酸化が遺伝子導入効率に大きく影響を与えることが明らかとなっている。本研究では p62 の複合体を明らかにして、その機能を阻害する薬剤をスクリーニングする。これらの薬剤の p62 への影響を生化学的、細胞生物学的に明らかにすると共に応用を視野に入れ p62 とそれらの因子の相互作用の生理的な意味について解析を行う。

これらを踏まえ以下の項目で研究を進める。

- 1) p62 複合体構成因子の同定
- 2) 核酸の導入促進化合物スクリーニング法の確立
- 3) 化合物の p62 複合体への作用点の解明とその応用

## 4. 研究成果

### (1) p62 複合体構成因子の同定

HEK293 細胞にシャケ精子由来の DNA を遺伝子導入したのち細胞を回収し、遺伝子導入しない細胞と並行して p62 複合体を精製した。その構成因子を質量分析によって同定し比較して、常に結合している因子および新たに結合が増えたものを選出し検討した。

その結果、常に結合している因子として HEK293 細胞に常に発現しているアデノウィルスの E1B たんぱく質が同定された。興味深いことにこの結合は他の結合たんぱく質よりも非常に強く、p62 の翻訳後修飾による影響を受けることはなかった。一方遺伝子導入後 p62 と結合が増加したものの中には、ミトコンドリア関連因子が非常に多く含まれていた。外来の異物が細胞質に侵入した際に細胞の異物 DNA 応答を引き起こすためにミトコンドリアが自らのゲノム DNA を放出することが知られているが、遺伝子導入の際にはこのような応答が細胞で起きていることが、今回の結果で示唆された。

### (2) 核酸の導入促進化合物スクリーニング法の確立

p62 複合体に影響する化合物の探索のため、核酸の導入効率を定量化するアッセイ系の構築を行った。恒常的にルシフェラーゼ遺伝子を発現するレポーターベクターを遺伝子導入効率の低い野生型 MEF 細胞へ導入し、化合物の添加によるルシフェラーゼ発現量の差を比較した。p62KOMEF 細胞と薬剤の効果を比較することによって p62 依存性のある薬剤の選定を行った結果、高いもので 250-300 倍程度、導入効率を促進する薬剤が同定された。それらトップヒットの中から既知薬を選定しそれらの作用機序を検討した結果、微小管阻害剤を低濃度で使用することで強い遺伝子導入の促進効果がみられることが判明した。興味深いことに微小管の重合阻害のみならず重合の安定化においても同様の遺伝子導入促進効果がみられることから、p62 を介した遺伝子導入の阻害効果は微小管の正常な機能を維持することが重要であることが判明した(Fig.1)。

これらの結果はこれまでのオートファジー機能において微小管の機能が重要であることと一致している。この成果は微小管阻害剤にすでに承認されている抗がん剤が多く含まれることから、本遺伝子導入法が、がん治療においても使用できる可能性を示唆している。

### (3) 化合物の p62 複合体への作用点の解明とその応用

上記の化合物スクリーニングに並行して、すでに判明している p62 の機能調節を標的とした化合物のスクリーニングを行った。p62 は Ub と結合するために S403 のリン酸化が必要となる。そのため、このリン酸化酵素の制御が p62 を介した遺伝子導入の調節にかかわると考えた。S403 のリン酸化には TBK1 が関与していることがすでに分かっていたため、TBK1 のノックアウト細胞をゲノム編集によって作成したところ、野生型の MEF 細胞

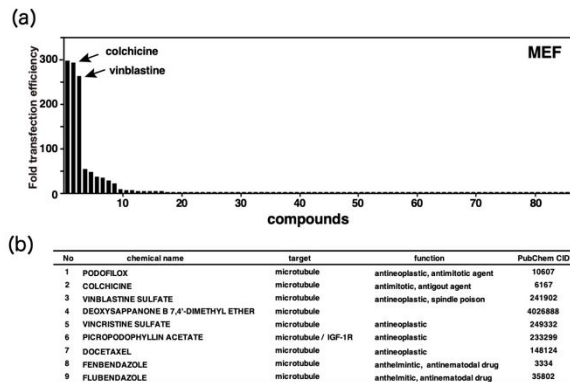


Fig.1 (a) トップ80化合物の遺伝子導入促進効果。化合物未処理を1としたfold activity (b) 上位化合物の名称と作用機序

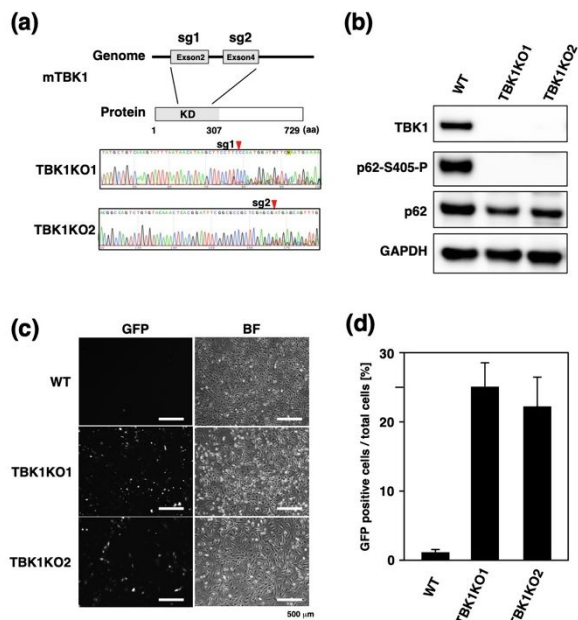


Fig.2 (a) TBK1のKO細胞戦略 (b) 遺伝子導入時のTBK1の有無によるp62のリン酸化状態の変化 (c) TBK1KO細胞の遺伝子導入効率のGFPによる可視化 (d) TBK1KO細胞の遺伝子導入効率の定量化

いたため、TBK1 のノックアウト細胞をゲノム編集によって作成したところ、野生型の MEF 細胞

に対して TBK1KO MEF 細胞では著しく遺伝子導入効率が上昇した。興味深い点として、この KO 細胞においては遺伝子導入で見られる S403 の強いリン酸化が見られなくなることから、この経路での主要なキナーゼが TBK1 であるということが明らかとなった (Fig.2)。TBK1 には既存の阻害剤が多数あるため、これらのライブラリーを構築し導入効率の促進を検討した。その結果、細胞へのダメージが少なく遺伝子導入効率を促進する薬剤を検索したところ、BX795 を導入前 1 時間程度で処理するだけで 5-10 倍の導入効率の促進がみられることを発見した。さらに薬剤の中には作用機序の異なる阻害剤があることから、2 剤併用によって促進効果がみられるかを検討したところ、いくつかの組み合わせで最大 25 倍程度まで導入効率が促進することが判明した。またこの 2 剤併用の効果は MEF 細胞だけではなく複数の細胞種で同様の効果を示すことが明らかとなった (Fig.3)。

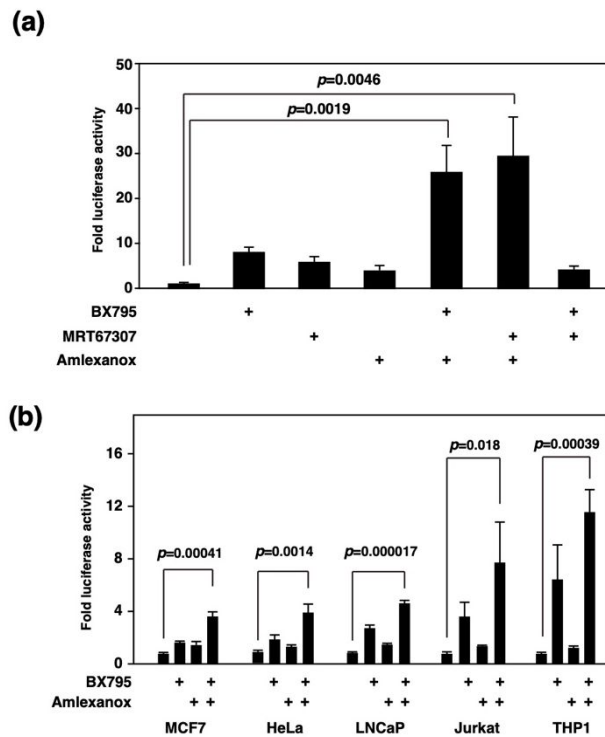


Fig.3 (a) TBK1阻害剤の単剤処理と二剤併用による遺伝子導入促進効果。化合物未処理を1としたfold activity  
 (b)様々な細胞を用いた二剤併用による遺伝子導入促進効果

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tsuchiya Megumi, Kong Weixia, Hiraoka Yasushi, Haraguchi Tokuko, Ogawa Hidesato	4. 巻 28
2. 論文標題 TBK1 inhibitors enhance transfection efficiency by suppressing p62/SQSTM1 phosphorylation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 68 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12987	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takada Ichiro, Hidano Shinya, Takahashi Sayuri, Yanaka Kaori, Ogawa Hidesato, Tsuchiya Megumi, Yokoyama Atsushi, Sato Shingo, Ochi Hiroki, Nakagawa Tohru, Kobayashi Takashi, Nakagawa Shinichi, Makishima Makoto	4. 巻 298
2. 論文標題 Transcriptional coregulator Ess2 controls survival of post-thymic CD4+ T cells through the Myc and IL-7 signaling pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102342 ~ 102342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102342	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 -
1. 著者名 Yamamoto-Imoto Hitomi, Ogawa Hidesato, Nakamura Shuhei, Yoshimori Tamotsu	4. 巻 38
2. 論文標題 Age-associated decline of MondoA drives cellular senescence through impaired autophagy and mitochondrial homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110444 ~ 110444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110444	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 -
1. 著者名 Tsuchiya Megumi, Ogawa Hidesato, Watanabe Kento, Koujin Takako, Mori Chie, Nunomura Kazuto, Lin Bangzhong, Tani Akiyoshi, Hiraoka Yasushi, Haraguchi Tokuko	4. 巻 26
2. 論文標題 Microtubule inhibitors identified through nonbiased screening enhance DNA transfection efficiency by delaying p62 dependent ubiquitin recruitment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 739 ~ 751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12881	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Toshiharu, Kubo Sayaka, Shioda Tatsuya, Tokumura Ayaka, Minami Satoshi, Tsuchiya Megumi, Isaka Yoshitaka, Ogawa Hidesato, Hamasaki Maho, Yu Li, Yoshimori Tamotsu, Nakamura Shuhei	4. 巻 134
2. 論文標題 THOC4 regulates energy homeostasis by stabilizing TFEB mRNA during prolonged starvation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 248203-248203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.248203	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 -

1. 著者名 Ihara Kensuke, Sasano Tetsuo, Hiraoka Yuichi, Togo-Ohno Marina, Soejima Yurie, Sawabe Motoji, Tsuchiya Megumi, Ogawa Hidesato, Furukawa Tetsushi, Kuroyanagi Hidehito	4. 巻 10
2. 論文標題 A missense mutation in the RSRSP stretch of Rbm20 causes dilated cardiomyopathy and atrial fibrillation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74800-8	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 -

1. 著者名 Leszczynski Pawel, Smiech Magdalena, Salam Teeli Aamir, Haque Effi, Viger Robert, Ogawa Hidesato, Pierzchaia Mariusz, Taniguchi Hiroaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Deletion of the Prdm3 Gene Causes a Neuronal Differentiation Deficiency in P19 Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7192 ~ 7192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21197192	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小川 英知、土屋 恵、渡邊 賢人、荒神 尚子、森 知栄、布村 一人、林 邦忠、谷 昭義、平岡 泰、原口 徳子
2. 発表標題 選択的オートファジー制御を介した遺伝子導入促進剤のスクリーニング
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hidesato Ogawa, Megumi Tsuchiya, Kento Watanabe, Takako Koujin, Chie Mori, Kazuto Nunomura, Bangzhong Lin, Akiyoshi Tani, Yasushi Hiraoka, and Tokuko Haraguch
2. 発表標題 High-Throughput Screening for the enhancement of transfection efficiency via selective autophagy
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 2 種類の TBK1/IKKe 阻害剤を利用した核酸導入	発明者 小川英知, 土屋恵, 渡邊賢人, 平岡泰, 原口徳子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/000080	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 2 種類の TBK1/IKKe 阻害剤を利用した核酸導入	発明者 小川英知, 土屋恵, 渡邊賢人, 平岡泰, 原口徳子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-000088	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<a href="https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hiraoka/index.html">https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hiraoka/index.html</a> <a href="https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hiraoka/">https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hiraoka/</a>
--

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
---------	---------