

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：24302

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K19675

研究課題名(和文)オートファジー活性のin vivoイメージング法の確立と新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Establishment of an in vivo imaging system and novel biomarkers for monitoring autophagy flux

研究代表者

大西 康太(OHNISHI, Kohta)

京都府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号：80723816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーを適切に活性化できれば、ヒトの健康寿命延伸戦略となり得る。本研究では、動物個体レベルに応用可能な本活性の定量評価法の確立を目的とした。

AAV-2/9ベクターを用い、新規遺伝子プローブ「miRFP720-LC3-miRFP670-FLAGx3」をマウス生体で発現させた。肝臓組織におけるプローブタンパク質の発現を確認した後、マウスを短期麻酔下でIVISに供し、生体外部から非侵襲的にプローブ由来の近赤外蛍光を定量検出した。陽性/陰性対照としてオートファジー誘導/阻害剤を腹腔内投与したマウスをイメージングしたが、本対照実験において想定される蛍光強度の増減を確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーは細胞内に生じた異常分子に対する分解機構であり、その機能不全が様々な難治性疾患(がん・神経変性疾患・糖尿病など)の発症要因となる可能性が示されている。本機構を適切に活性化できれば、ヒトの健康寿命の延伸に寄与する新しい疾病予防戦略となり得るが、実験動物やヒト試験に応用可能な簡便・精確な活性評価法は確立されておらず、本機構を作用標的とした薬剤や機能性食品の研究開発は遅れている。本研究では動物個体レベルのオートファジー活性を定量評価する新規手法を確立できなかったが、構築した遺伝子プローブの課題点が明らかとなったため、今後、改良遺伝子プローブを用いた活性評価系の構築が期待される。

研究成果の概要(英文)：Activation of autophagy could be a possible strategy for extension of health life expectancy. In this study, we aimed the establishment of a quantitative evaluation method available for in vivo models.

A novel gene probe "miRFP720-LC3-miRFP670-FLAGx3" was expressed in mice organs using AAV-2/9 vector. Protein expression of the probe in mice liver was checked by Western blot, and furthermore, NIR-imaging using IVIS spectrum enabled to quantify the probe expression in living mice non-invasively. However, the intensities of NIR fluorescence from probe were not altered by intraperitoneal injection of autophagy-inducing/inhibiting agents, which indicated the probe was not available for quantitative evaluation methods.

研究分野：食品機能学

キーワード：オートファジー in vivoイメージング 遺伝子プローブ 近赤外蛍光イメージング AAVベクター

## 1. 研究開始当初の背景

(1) オートファジーは、細胞内に生じた障害オルガネラや変性タンパク質など、様々な異常高分子に対する分解機構の一つである。オートファジーが誘導されると、まず、小胞体とミトコンドリアの接触部位において隔離膜が形成される。この扁平膜構造が伸長し、細胞質に存在する様々な生体高分子が隔離され、二重膜小胞構造のオートファゴソームが形成される。その後、オートファゴソームは70種類以上の加水分解酵素を有するリソソームと融合してオートリソソームとなり、内容物をアミノ酸やグルコースなどの栄養素に分解し、細胞質に供給する。

オートファジーの重要な生理的意義の一つは栄養飢餓への適応であり、特にアミノ酸飢餓条件下でオートファジーは顕著に活性化される。栄養飢餓応答性オートファジーは、アミノ酸だけでなく、インスリンなどのホルモンや transcription factor EB (TFEB)、peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) などの栄養素応答性転写因子により厳密に制御されている。興味深いことに、オートファゴソームの形成に不可欠なオートファジー関連遺伝子 autophagy-related genes (atgs) の全身欠損マウスは、出生後栄養飢餓に適応できず、生後2日以内に死亡する。オートファジーのもう一つの重要な生理的意義として、細胞内異常高分子に対するクリアランス作用が挙げられる。Atgs を各種組織特異的に欠損させたマウスは、多くが成獣にまで成長するが、神経変性疾患や筋萎縮症、肝腫瘍、糸球体硬化症といった幅広い疾病様の表現型を示すことから、オートファジー不全是様々な難治性疾患の発症機構に深く関与すると考えられる。このように、オートファジーは生体恒常性の維持に重要な役割を果たしている。

さらに、近年、加齢に伴い、オートファジー抑制因子である Rubicon の発現が腎臓や肝臓で増加することが報告された。この遺伝子発現をノックダウンした線虫は野生型と比較して寿命が延長する。また、Rubicon ノックアウトマウスでは、加齢に伴う腎臓の線維化が抑制された。これらのことから、加齢に伴うオートファジー活性の低下を抑制することが、健康寿命の延伸や加齢に伴う老化現象の改善につながる可能性が期待されている。一方で、最近、脂肪細胞では、他の多くの臓器の結果とは逆に、老化に伴い Rubicon が顕著に減少し、オートファジーが異常活性化することが報告された。脂肪細胞特異的 Rubicon ノックアウトマウスにおいては、糖・脂質代謝異常が引き起こされ、糖尿病や脂肪肝などの生活習慣病を発症する。以上の先行研究から、オートファジー活性を組織ごとに適切に制御することが、広範囲の疾病に対する予防戦略となり、健康寿命の延伸につながると考えられる。この戦略を実現させるための基盤知見として、ライフステージや栄養状態によって変動するオートファジー活性を組織ごとに理解する必要がある。しかし、現在、生理的条件下におけるマウス各組織のオートファジー活性を定量評価する方法は確立されていない。

(2) *In vitro* におけるオートファジー活性の評価法として、オートファゴソーム膜に局在する light chain 3-II (LC3-II) や、LC3 と結合する p62/sequestosome 1 (SQSTM1) をマーカータンパク質として用いる方法が広く利用されている。LC3-II と結合するカーゴレセプターとして、p62 や neighbor of BRCA1 gene 1 (NBR1) などが同定されているが、中でも p62 は、LC3-interacting-region (LIR) の他に、Phox and Bem1 (PB1) や Ubiquitin-Associated (UBA) を含む6つのドメイン (Supplemental information 1A) を有しており、Keap1 や Raptor などの多様なシグナル伝達分子とも相互作用する。p62 などのカーゴレセプターは、オートファジーの進行に伴ってオートファゴソーム膜内に隔離され、最終的には内膜に結合する LC3-II タンパク質とともに分解される。このような分解基質性から、p62 や LC3-II はオートファジーに特異的なマーカー分子として用いられている。

2016年、水島らは新規オートファジー活性測定プローブとして LC3 に緑色蛍光タンパク質 (GFP) と赤色蛍光タンパク質 (RFP) を融合させた、GFP-LC3-RFP-LC3 $\Delta$ G プローブを開発した。このプローブタンパク質は、翻訳後、内因性 Atg4 の酵素活性により、LC3-RFP 間が直ちに切断され、GFP-LC3 と RFP-LC3 $\Delta$ G に分断される。LC3 は phosphatidylethanolamine (PE) 修飾を介してオートファゴソームに局在し、オートファジーにより分解されるが、PE 化に重要な C 末端のグリシンを欠失した LC3 $\Delta$ G はオートファジー分解を免れるため、細胞質内に留まる。これを利用して、GFP/RFP 蛍光強度比を算出することで、オートファジーフラックス (オートファジーによる一連の分解過程) を定量する。水島らはこの遺伝子プローブを導入したゼブラフィッシュ、及び、トランスジェニックマウスを作成した。ゼブラフィッシュの胚を用いた実験により、水晶体では、網膜などの他の組織と比較してオートファジー活性が高いことが見出された。さらに、トランスジェニックマウスの骨格筋組織では、筋繊維型によってオートファジー活性が大きく異なることが明らかとなった。また、最近、脳神経細胞におけるオートファジーを可視化するための PK-LC3 (pHluorin-mKate2-human LC3B) 蛍光プローブが開発された。このプローブは、LC3 に、pH 感受性の緑色蛍光タンパク質 pHluorin と赤色蛍光タンパク質 mKate2 を融合させたタンパク質であり、オートファジーが誘導されるとオートファゴソームに局在し、黄色蛍光を発する。リソソームとの融合により小胞内が酸性化すると、蛍光が赤

色に変化するため、オートファゴソームとオートリソソームを区別して観察することが可能である。しかし、水島プローブに搭載されている GFP と RFP の励起/発光波長は、生体内に多量に存在するヘモグロビンによる吸収・干渉を受けるため、生きた動物深部に位置する臓器のオートファジー活性を評価することは困難である。また、PK-LC3 蛍光プローブ導入マウスは、蛍光顕微鏡を用いて脳神経内のオートファジーを定量評価するために頭蓋骨を切除する必要があり、マウスの生理的条件におけるオートファジー活性を継続的に評価するには不向きである。

## 2. 研究の目的

上述した背景から、我々は二種類の近赤外蛍光タンパク質 ( miRFP670, miRFP720 ) によるプローブの標識を着想した。これらのタンパク質の励起/発光波長は近赤外光領域と呼ばれる 650-900 nm の間にあるため、生体分子の吸収・干渉をほとんど受けず、近年、哺乳動物の生体深部イメージング技術に広く用いられている。これまでに、GFP-LC3-RFP-LC3ΔG プローブの蛍光タンパク質部分を近赤外蛍光タンパク質に載せ替えた miRFP720-LC3-miRFP670-FLAGx3 プローブを作成したが、本プローブが *in vivo* ライブイメージングに応用可能かについて検証する必要が残されている。そこで本研究では、新規に作出した本遺伝子プローブのオートファジー活性評価系としての妥当性を検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

- ( 1 ) AAV-2/9 ベクターを用いて新規プローブ ( miRFP720-LC3-miRFP670-FLAGx3 ) を BALB/c-nu/nu マウスに発現させる。
- ( 2 ) マウス肝臓組織を回収し、ウェスタンブロット法によりプローブの発現を確認する。また、IVIS spectrum による近赤外蛍光イメージングにより、生きたマウス個体内でプローブの発現を確認する。
- ( 3 ) オートファジー誘導剤 ( Torin1 ) もしくは、阻害剤 ( leupeptin ) を投与したマウス個体において、オートファジー活性の変動を近赤外蛍光イメージングで定量評価できるか検証する。

## 4. 研究成果

( 1、2 ) 眼窩静脈叢から AAV-2/9 ベクターを  $6 \times 10^{12}$  vg 投与した雄性 BALB/c-nu/nu マウスを 2 週間飼育した後、屠殺し、肝臓組織を回収した。ウェスタンブロット法により肝臓組織におけるプローブの発現について検証したところ、確かにプローブタンパク質の発現を確認できた。また、屠殺前のマウスをイソフルラン吸入麻酔下で近赤外蛍光イメージングに供したところ、肝臓に相当する領域からの近赤外蛍光を生体外から定量検出することができた。

( 3 ) プローブを発現させた雄性 BALB/c-nu/nu マウスに対して、Torin1 を 20 mg/kg、または、leupeptin を 40 mg/kg、腹腔投与し、4、もしくは、15 時間後にイソフルラン麻酔下で近赤外イメージングに供した。その結果、肝臓組織に相当する領域からの近赤外蛍光強度は、薬剤投与によって変動しなかった。マウスを屠殺後、ウェスタンブロット法によりタンパク質レベルでもプローブの応答性を検証したが、想定される発現変動は認められなかった。

以上の結果から、本プローブを用いて、オートファジー活性の変動を *in vivo* レベルで評価することは不可能であると結論づけた。この原因として、*in vivo* イメージングに十分な蛍光強度を得るために、マウスにプローブを過剰発現させていることが考えられる。miRFP720-LC3 が肝細胞内に過剰に発現するため、PE 化反応が律速となり、十分に LC3-II へと変換されていない可能性が高い。この仮説を裏付けるように、*in vitro* においても、HeLa 細胞にプローブを高発現させると、オートファジー誘導剤・阻害剤による miRFP720-LC3 発現の変動が見られなくなった。これらのことから、現在、オートファジー活性を評価するためのプローブ遺伝子として新たに p62 に着目しており、LC3 遺伝子を用いるプローブの問題点を解決できるのではないかと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakai Maiko, Ohnishi Kohta, Masuda Masashi, Ohnishi Hirokazu, Yamanaka-Okumura Hisami, Hara Taichi, Taketani Yutaka	4. 巻 84
2. 論文標題 Isorhamnetin, a 3'-methoxylated flavonol, enhances the lysosomal proteolysis in J774.1 murine macrophages in a TFEB-independent manner.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1221 ~ 1231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1727309	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 Ohnishi Kohta, Yano Satoshi, Fujimoto Moe, Sakai Maiko, Harumoto Erika, Furuichi Airi, Masuda Masashi, Ohnishi Hirokazu, Yamanaka-Okumura Hisami, Hara Taichi, Taketani Yutaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of Dietary Phytochemicals Capable of Enhancing the Autophagy Flux in HeLa and Caco-2 Human Cell Lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1193 ~ 1193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9121193	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 坂井 麻衣子, 大西 康太, 増田 真志, 大南 博和, 奥村 仙示, 原 太一, 竹谷 豊	4. 巻 94
2. 論文標題 イソラムネチンは J774.1 マウスマクロファージ様細胞株において TFEB 非依存的にリソソームのタンパク質分解を促進する	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 524 ~ 527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田 哲平, 大西 康太, 増田 真志, 松崎 泰教, 今野 歩, 藤元 萌, 大西 愛花, 坂井 麻衣子, 大南 博和, 奥村 仙示, 原 太一, 平井 宏和, 竹谷 豊
2. 発表標題 近赤外蛍光イメージングを用いたin vivoオートファジー活性評価法の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山越 正汰, 坂井 麻衣子, 藤元 萌, 大西 康太, 原 太一
2. 発表標題 食品による栄養飢餓非依存性オートファジーの分子機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂井 麻衣子, 大西 康太, 増田 真志, 大南 博和, 奥村 仙示, 原 太一, 竹谷 豊
2. 発表標題 栄養素応答シグナルmTORC2を介したリソソーム活性制御機構の解明
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢野 敏史, 山越 正汰, 太田 智絵, 宇都 拓洋, 坂井 麻衣子, 大西 康太, 原 太一
2. 発表標題 新規機能性食品によるmTORC1シグナルに依存しないオートファジーの活性化機構と作用成分
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂井 麻衣子, 大西 康太, 増田 真志, 大南 博和, 奥村 仙示, 板倉 英祐, 原 太一, 竹谷 豊
2. 発表標題 M における異常タンパク質分解を促進するイソラムネチンの作用機序解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度 中四国支部大会 (第57回講演会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂井 麻衣子, 大西 康太, 春本 恵里花, 増田 真志, 大南 博和, 奥村 仙示, 板倉 英祐, 原 太一, 竹谷 豊
2. 発表標題 イソラムネチンによるエンドソーム成熟過程の亢進を介した異常分子除去作用
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 萌, 大西 康太, 新居 美香, 黒田 雅士, 堤 理恵, 阪上 浩
2. 発表標題 ココウ果皮に含まれるポリメトキシフラボノイド類の抗真菌活性の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大西 康太, 坂井 麻衣子, 藤元 萌, 春本 恵里花, 古市 愛莉, 増田 真志, 大南 博和, 奥村 仙示, 板倉 英祐, 原 太一, 米村 重信, 竹谷 豊
2. 発表標題 異常タンパク質分解系を亢進する食品成分の探索とその作用機序解析
3. 学会等名 第262回徳島医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大西 康太(内田 浩二 編)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 5
3. 書名 “食”とオートファジー(食と健康を結ぶメディカルサイエンス)	

〔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
---------	---------