

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07425

研究課題名(和文) 新規リソソーム分布制御機構に着目したPD治療薬の探索

研究課題名(英文) Exploring Novel Mechanisms of Lysosome Distribution for Parkinson's Disease Therapy

研究代表者

笹澤 有紀子 (Sasazawa, Yukiko)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20594922

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)：パーキンソン病(PD)は進行性の神経変性疾患であり、年々患者数は増大している。我々はPD患者の血清を用いたメタボローム解析でポリアミン代謝変動と毒性物質アクロレインの上昇を発見した。アクロレインの細胞応答を解析した結果、リン酸化JIP4を介した新規メカニズムでリソソームが微小管形成中心に集積しオートファジーが誘導されることを見出した。本応答は酸化ストレスに対する細胞防御機構であった。さらに、毒性なくリソソーム集積を誘導する化合物をスクリーニングし、アルベンダゾールがリソソーム集積を伴うオートファジーを誘導し、PD原因タンパク質 α -Synucleinを分解することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はリソソーム分布を調節する新規メカニズムを提示し、JIP4の新しい役割を明らかにしたという点で学術的意義は大きい。さらに、同定した薬剤はリソソーム分布を変化させるというこれまでにない新しいタイプのオートファジー促進薬であり、根本的治療薬のないパーキンソン病治療薬へ応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder with an increasing number of patients each year. Our metabolomic analysis using serum from PD patients revealed alterations in polyamine metabolism and elevated levels of the toxic substance acrolein. Analysis of the cellular response to acrolein identified a novel mechanism in which lysosomes accumulate at the microtubule-organizing center (MTOC) and autophagy is induced via phosphorylated JIP4. Furthermore, this response was found to be a cellular defense mechanism against oxidative stress. Additionally, screening for compounds that induce lysosome accumulation without toxicity identified albendazole, which promotes autophagy with lysosome accumulation and degrades the PD-associated protein α -synuclein.

研究分野：細胞生物学

キーワード：パーキンソン病 リソソーム トラフィッキング オートファジー 酸化ストレス

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)はドパミン神経細胞死が原因で発症する神経変性疾患であり、我が国では高齢化に伴い患者数は増加している。PDの診断は専門医による詳細な問診と神経学的診察に基づいて行われているが、簡便にPDを診断できる血液学的な検査法等は現在までに確立されておらず、PDを診断できるバイオマーカーが求められている。さらに、現状では欠乏したドパミンを補充するなどの対症療法しかなく、分子病態に即した新たな治療薬が希求される。我々は、PDの分子病態の理解、およびバイオマーカー同定のため、PD患者血清を用いたメタボローム解析を行い、ポリアミン代謝変動を見出した(*Ann Neurol* 2019;86(2):251-263.)。また、このポリアミン代謝の過程で生産される毒性物質アクロレインがPD患者血清中で高値を示すことを明らかにした。以上より、反応性に富んだアクロレインがPD患者体内で上昇していることから、この物質が引き起こす細胞応答を解明すれば、PD分子病態の理解、ひいては治療薬開発へと繋がると思われ、研究を推進した。

2. 研究の目的

研究開始までに、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において、アクロレインは「リソソームを微小管形成中心(MTOC)周辺に集め、オートファジーを誘導する」という非常にユニークな活性を示すことを発見した。このため本研究では、アクロレインによるリソソーム逆行輸送機構を解明すると同時に、毒性なくリソソーム分布変化を誘導する化合物を取得し、パーキンソン病治療薬への応用へ挑む。

3. 研究の方法

全ての細胞実験で神経芽腫 SH-SY5Y 細胞を用いた。リソソームは LAMP2 抗体で免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で検出した。また、リソソーム分布の定量化は、リソソームを LAMP2 抗体で染色し、MTOC を γ tubulin 抗体で染色し、INCellAnalyzer2200 で撮影したのち、ImageJ を用いて、MTOC 近傍にあるリソソームの割合を定量化した。ノックダウン実験は Sigma-Aldrich 社より購入した siRNA を Lipofectamine RNAiMax (Thermo Scientific) を用いて遺伝子導入し、48 時間後に実験に用いた。リン酸化 JIP4 の検出は Phostag PAGE で行った。

4. 研究成果

(1)アクロレインによるリソソーム逆行輸送機構の解明

アクロレインはダイニン依存的にリソソームを微小管形成中心(MTOC)へ集積させた(図 1 a)。逆行輸送に関わるシグナルとして主に TRPML1-ALG2 を介した経路 (*Nat Cell Biol.* 18:404-17, 2016)、TMEM55B-JIP4 (*Nat Commun* 8:1580, 2017)を介した経路、Rab7-RILP を介した逆行輸送 (*J Cell Biol* 176:459-471, 2007)が報告されている。そこで、ノックダウン実験によりアクロレインがどの分子を介してリソソーム逆行輸送を誘導するか検討した。その結果、アクロレインによるリソソームの逆行輸送にかかわるアダプタータンパク質として JIP4 を同定した。一方、上述の通り、JIP4 は TMEM55B と結合し、リソソームの逆行輸送を担うとされるが(*Nat Commun* 8:1580, 2017)、TMEM55B はほとんどアクロレイン誘導性の逆行輸送には関与しなかった。一方で、アクロレインによるリソソーム輸送は、JIP4 だけでなく、TRPML1, ALG2 も関与することがノックダウン実験により明らかになった(図 1b)。さらに、アクロレインにより JIP4 と ALG2 が相互作用することが確認されたことから、JIP4 は TRPML1-ALG2 と協調してリソソーム分布を制御することが示唆された。

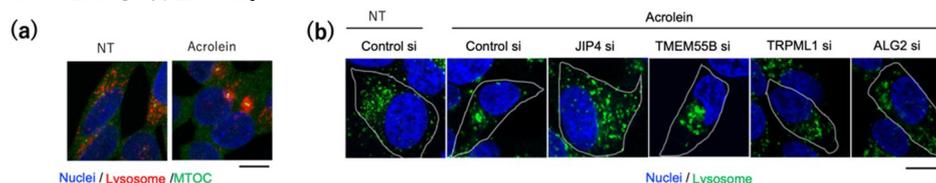


図 1. (a)SH-SY5Y 細胞におけるアクロレインによる微小管形成中心(MTOC)へのリソソーム集積 (b)各リソソーム分布制御タンパク質のノックダウンがアクロレインのリソソーム集積に与える影響 bar, 20 μ m

(2)アクロレインが誘導する JIP4 のリン酸化部位の同定、リン酸化酵素の同定

我々は、アクロレインが JIP4 のリン酸化を誘導することに気付き、リン酸化 JIP4 がリソソーム輸送に重要な役割を果たすのではないかと推察した。そこで、キナーゼ阻害剤ライブラリを用いて、リソソーム集積を抑制するキナーゼ阻害剤を探索し、Jak3 inhibitor VI、Gö6976 を見出し

た。これらはアクロレインによるリソソーム集積および JIP4 のリン酸化を阻害したことから、JIP4 のリン酸化がアクロレインによるリソソーム集積に必要であることが明らかとなった。しかし、ノックダウン実験や他の阻害剤を用いた実験により、Jak3 inhibitor VI, Gö6976 の標的キナーゼ (それぞれ Jak3 と PKC) は JIP4 のキナーゼではないことが明らかとなり、真の JIP4 キナーゼを同定する必要があった。そこで、キナーゼ阻害剤の活性プロファイリングデータベース (*Nat Biotechnol* 29, 1039-1045 (2011)) を参考に、キナーゼ阻害剤のオフ・ターゲットに着目した解析を行い、Ca²⁺/カルモジュリン依存性キナーゼの一つである CaMK2G をリソソーム集積に関わる JIP4 の真の Kinase として同定した (図 2 a, b)。さらに、In vitro Kinase assay により、CaMK2G が JIP4 を直接リン酸化すること、質量分析でリン酸化部位が T217 であることを明らかにした。TRPML1 は酸化ストレスにตอบสนองするリソソーム膜上の Ca²⁺チャネルである。以上から、アクロレインによる酸化ストレスにより TRPML1 から Ca²⁺放出され、それにตอบสนองして活性化された CaMK2G が JIP4 のリン酸化を誘導すること、それによりリン酸化された JIP4 が TRPML1/ALG2 複合体と相互作用することでリソソームが逆行輸送される、という新しいリソソーム輸送制御機構を明らかにした (*EMBO J* 41, e111476, 2022)。

一方、リン酸化 JIP4 は TRPML1-ALG2 と間接的な相互作用をするため、近接依存性標識法を用いてアクロレインによるリソソーム輸送を担うタンパク質複合体の網羅的同定を試みた。ビオチン添加により近接タンパク質をビオチン標識することが可能な TurboID タグを用い、アクロレインにตอบสนองし TRPML1 近傍に局在変化するタンパク質を質量分析により同定した結果、これまでリソソーム輸送に関する報告のない 6 種のタンパク質の関与を明らかにした(投稿準備中)。

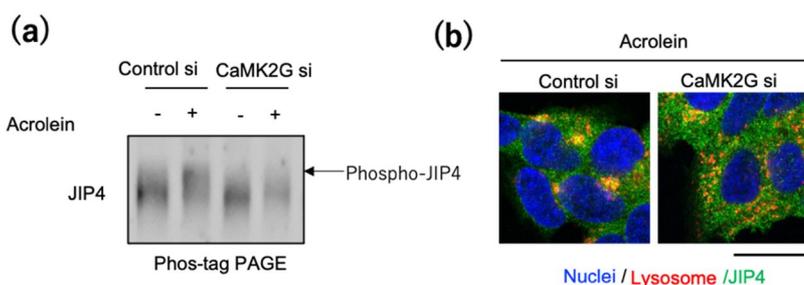


図 2. (a) CaMK2G のノックダウンはアクロレインによる JIP4 のリン酸化を抑制する。(b) CaMK2G のノックダウンはアクロレインによるリソソーム集積を阻害する。bar, 20 μ m

(3) リソソーム分布変化の生理的意義

アクロレインは酸化ストレスを引き起こすことから、アクロレインによる上記メカニズムを介したリソソーム輸送は、酸化ストレスに共通するか検討するため、過酸化水素を用いた実験で検証した。その結果、過酸化水素でもアクロレインと同様の JIP4 のリン酸化を介したリソソーム輸送が活性化されたことから、本機構は酸化ストレス応答の一つであることが示された。

また、JIP4 ノックアウト細胞にアクロレインを添加すると、細胞死が増加したことから、JIP4 を介したリソソーム輸送とそれによるオートファジーは、酸化ストレスに対する細胞の防御応答であることが示された(図 3)。

一方、栄養飢餓によるリソソームの逆行輸送も JIP4 によって制御されるが、リン酸化非依存的な経路で誘導された。このことから JIP4 のリン酸化状態は、ストレスの種類によって リソソームの逆行輸送経路を決定する分子スイッチとして重要な役割を果たしていることを初めて明らかにした(*EMBO J* 41, e111476, 2022)。

(4) リソソーム分布変化誘導剤の探索

上述の通り、PD 患者血清中で増加しているアクロレインに対する防御応答として、MTOC でのリソソームの集積を伴うオートファジーが促進されることが明らかとなった。PD では MTOC 周辺に異常凝集タンパク質が蓄積することも考慮すると、リソソーム集積を誘導する化合物は、PD に対する有用な治療薬となりうると思われる。そこで、既存薬ライブラリ 1200 化合物よりリソソーム集積を誘導しオートファジーを活性化させる化合物をスクリーニングした。その結果、トポイソメラーゼ阻害剤 3 種、ベンゾイミダゾール系駆虫薬 3 種にその活性を見出した。そのうち、アルベンダゾールは PD の原因タンパク質である alpha-synuclein を分解することを見出した。以上より、リソソーム分布変化促進によるオートファジーは PD 治療薬探索として重要な標的であることが示されたと同時に、アルベンダゾールの PD 治療薬としての可能性を示唆した。(eLife, 2024 in press)

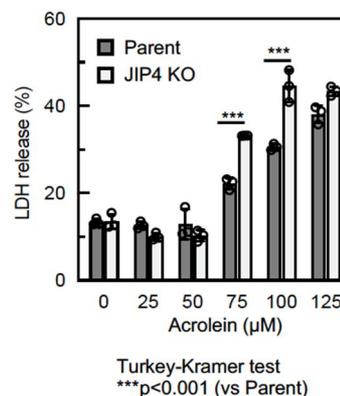


図 3. LDH assay を用いた細胞死誘導活性評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9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 3件）

1. 著者名 Matagawa Tomoe, Sasazawa Yukiko, Agui Koki, Fujimaki Motoki, Kawano Sayaka, Ogura Akihiro, Takao Ken-ichi, Igarashi Masayuki, Simizu Siro	4. 巻 104
2. 論文標題 Antiproliferative activities through accelerating autophagic flux by basidalin and its analogs in human cancer cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Bioorganic Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 129713 ~ 129713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2024.129713	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 Sasazawa Yukiko, Hattori Nobutaka, Saiki Shinji	4. 巻 45
2. 論文標題 JNK interacting protein 4 is a central molecule for lysosomal retrograde trafficking	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioEssays	6. 最初と最後の頁 e2300052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bies.202300052	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 笹澤有紀子、斉木臣二	4. 巻 41
2. 論文標題 リソソームの細胞内分布制御の破綻と神経変性疾患	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1748 ~ 1753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18958/7277-00001-0000514-00	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 -
1. 著者名 笹澤 有紀子、斉木 臣二	4. 巻 95
2. 論文標題 酸化ストレスに応答したリソソームの細胞内局在制御機構の解明	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 797 ~ 801
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950797	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 -

1. 著者名 Miyamoto Kengo, Saiki Shinji, Matsumoto Hirota, Suzuki Ayami, Yamashita Yuri, Iseki Tatou, Ueno Shin Ichi, Shiina Kenta, Kataura Tetsushi, Kamagata Koji, Imamichi Yoko, Sasazawa Yukiko, Fujimaki Motoki, Akamatsu Wado, Hattori Nobutaka	4. 巻 93
2. 論文標題 Systemic Metabolic Alteration Dependent on the Thyroid Liver Axis in Early PD	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 303 ~ 316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ana.26510	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 Sasazawa Yukiko, Souma Sanae, Furuya Norihiko, Miura Yoshiki, Kazuno Saiko, Kakuta Soichiro, Suzuki Ayami, Hashimoto Ryota, Hirawake Mogi Hiroko, Date Yuki, Imoto Masaya, Ueno Takashi, Kataura Tetsushi, Korolchuk Viktor I, Tsunemi Taiji, Hattori Nobutaka, Saiki Shinji	4. 巻 41
2. 論文標題 Oxidative stress induced phosphorylation of JIP4 regulates lysosomal positioning in coordination with TRPML1 and ALG2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e111476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022111476	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 Saegusa Junya, Osada Yoshiyuki, Miura Kazuki, Sasazawa Yukiko, Ogura Akihiro, Takao Ken-ichi, Simizu Siro	4. 巻 60
2. 論文標題 Elucidation of structure-activity relationship of humulanolides and identification of humulanolide analog as a novel HSP90 inhibitor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128589 ~ 128589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2022.128589	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 Nakamura Atsuo, Kurihara Shin, Takahashi Daisuke, Ohashi Wakana, Nakamura Yutaka, Kimura Shunsuke, Onuki Masayoshi, Kume Aiko, Sasazawa Yukiko, Furusawa Yukihiko, Obata Yuuki, Fukuda Shinji, Saiki Shinji, Matsumoto Mitsuharu, Hase Koji	4. 巻 12
2. 論文標題 Symbiotic polyamine metabolism regulates epithelial proliferation and macrophage differentiation in the colon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22212-1	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 Date Yuki, Sasazawa Yukiko, Kitagawa Mitsuhiro, Gejima Kentaro, Suzuki Ayami, Saya Hideyuki, Imoto Masaya, Itakura Eisuke, Hattori Nobutaka, Saiki Shinji	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of novel autophagy inducers by accelerating lysosomal clustering against Parkinson's disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
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 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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 笹澤有紀子、斉木臣二、相馬早苗、三浦芳樹、鈴木絢未、井本正哉、上野隆、服部信孝
2. 発表標題 オートファジーを制御する新規リソソーム分布制御機構の発見
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第17回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sasazawa Y, Souma S, Miura Y, Suzuki A, Hashimoro R, Date Y, Imoto M, Ueno T, Saiki S, Hattori N.
2. 発表標題 Phosphorylated JIP4 mediates lysosomal clustering and autophagy in response to oxidative stress.
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水俊平、笹澤有紀子、三浦芳樹、斉木臣二、服部信孝
2. 発表標題 Comprehensive Analysis of TRPML1 complex involved in lysosomal clustering using proximity labelling
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 笹澤 有紀子、三浦芳樹、斉木臣二、井本正哉、服部信孝
2. 発表標題 凝集タンパク質分解物質の作用機序解明から見えてきた脂肪滴を介する新たなタンパク質分解経路
3. 学会等名 第33回新薬創製談話会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 笹澤有紀子、斉木臣二、相馬早苗、三浦芳樹、鈴木絢未、井本正哉、服部信孝
2. 発表標題 酸化ストレスが誘導する新規リソソーム逆行輸送機構
3. 学会等名 第53回日本精神神経薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sasazawa Y, Saiki S, Miura Y, Imoto M, Hattori N.
2. 発表標題 Analysis of regulatory mechanisms of acrolein-induced lysosomal retrograde transport by chemical biological approach.
3. 学会等名 5th KRIBB-RIKEN Chemical Biology Joint Symposium. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 笹澤有紀子、斉木臣二、三浦芳樹、井本正哉、服部信孝
2. 発表標題 PD治療を目指した脂肪滴分解を介する新たなタンパク質分解経路の理解
3. 学会等名 第15回オートファジー研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水俊平, 笹澤有紀子, 三浦芳樹, 斉木臣二, 服部信孝
2. 発表標題 リソソーム細胞内分布変化を調節するTRPML1複合体の総合的理解
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 Sasazawa Y, Souma S, Miura Y, Suzuki A, Kakuta S, Hashimoto R, Imoto M, Ueno T, Hattori N, Saiki S.
2. 発表標題 JIP4 phosphorylation regulates lysosomal positioning in coordination with TRPML1 and ALG2.
3. 学会等名 The 10th international symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Saiki S, Sasazawa Y.
2. 発表標題 Polyamine metabolic changes and autophagy in Parkinson's disease.
3. 学会等名 The 10th international symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Date Y, Sasazawa Y, Imoto M, Saya H, Itakura E, Saiki S, Hattori N.
2. 発表標題 Chemical Screening based on the lysosomal positioning against Parkinson's disease. The 10th international symposium on Autophagy.
3. 学会等名 The 10th international symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sasazawa Y, Saiki S, Souma S, Suzuki A, Miura Y, Imoto M, Ueno T, Hattori N.
2. 発表標題 A novel biological defense response against neurotoxic aldehyde, acrolein in PD patients.
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笹澤有紀子、斉木臣二、相馬早苗、三浦芳樹、鈴木絢未、井本正哉、上野隆、服部信孝
2. 発表標題 リソソーム分布制御を介したオートファジーによる生体防御応答
3. 学会等名 日本Cell death学会第30回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笹澤有紀子
2. 発表標題 酸化ストレスによる新規リソソーム分布調節機構の発見
3. 学会等名 文部科学省学術変革領域研究学術研究支援基盤形成先端モデル動物支援プラットフォーム成果報告（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 笹澤 有紀子、斉木 臣二、相馬 早苗、鈴木 絢未、三浦 芳樹、井本 正哉、上野 隆、服部 信孝
2. 発表標題 A novel biological defense response against neurotoxic aldehyde, acrolein in PD patients.
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Sasazawa Y, Hattori N, Saiki S	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Academic Press Book-Elsevier UK	5. 総ページ数 356
3. 書名 Development of autophagy enhancers for Parkinson's disease. Autophagy Dysfunction in Alzheimer's Disease and Dementia, Editors: Tadanori Hamano & Tatsuro Mutoh.	

1. 著者名 笹澤有紀子、斉木臣二 (服部信孝編)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 224
3. 書名 順天堂大脳神経内科ではこうしている 最新 パーキンソン病診療【電子版付】「メタボロミクス」	

〔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		
英国	Newcastle University		