

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22229002

研究課題名(和文)新しく発見したオートファジー機構の包括的理解とその「オートファジー病」への応用

研究課題名(英文)Studies of alternative macroautophagy and its application for "Autophagic Diseases"

研究代表者

清水 重臣 (Shimizu, Shigeomi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：70271020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,200,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、自己構成成分を消化、再利用するための細胞機能である。本研究では、新規オートファジーが、種を越えて保存された細胞機能であることを見いだした。また、14種類の実行分子を同定し、分子機構の詳細を明らかにした。さらに、11種類の新規オートファジー欠損マウスを作製して、新規オートファジーが、生理的には個体発生や細胞分化などに関わっていること、病的には発がん、神経変性疾患、脂肪肝などに関わっていることを明らかにした。さらに、新規オートファジーを標的とした抗がん剤、神経変性疾患治療薬の開発研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a process that leads to the bulk degradation of subcellular constituents through the creation of autophagosomes/ autolysosomes. Previously, it was believed that Atg5 is essential for induction of autophagy. However, we found that cells lacking Atg5 can still induce autophagy. Therefore, we here analyzed Atg5-independent alternative autophagy. We first discovered that alternative autophagy is conserved phylogenetically from yeast to mammals. We next identified 14 novel genes that are required for alternative autophagy and unveiled the molecular mechanisms. Using 11 different types of alternative autophagy-deficient mice, we discovered the involvement of alternative autophagy in the development and cell differentiation. We also identified the defect of alternative autophagy causes various diseases, including cancer and neurodegenerative diseases. We further discovered autophagy-inducing small compounds for applying "Autophagy Diseases"

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー Atg5非依存性 がん 神経変性疾患 発生

1. 研究開始当初の背景

(1) オートファジーは、リソソームを利用し、自己構成成分を大規模に分解するマシナリーである。このマシナリーは、新陳代謝や細胞リモデリングなどに貢献している。

(2) 哺乳動物のオートファジー機構においては、長く Atg5 や Atg7 などの分子が必要不可欠であると考えられてきたが、私達は、Atg5 や Atg7 に依存しない新しいメカニズムによるオートファジーを発見した。即ち、オートファジーの全容を理解する為には、これら両経路のオートファジーを解析する必要がある。

(3) 両経路のオートファジーの破綻は種々の疾患の温床となりうる。そこで、オートファジー変調による一連の疾患群の病態機序を解析することによって、これらの疾患に通底する基本原理を明らかにできる。

2. 研究の目的

(1)新規オートファジー機構の解析

①新規オートファジーの分子機構に関わる分子を同定する。②各分子の生化学機能を解明することにより、オートファゴソーム形成の素過程を明らかにする。

(2)両方のオートファジーの生理機能解析

①両系統のオートファジーが、生体のどこで、いつ誘導されているかを明らかにする。②各々ならびに全体としてのオートファジーが、細胞分化や細胞死などの基本生命現象にどの程度関与しているかを解析する。

(3)『オートファジー病』の基本原理解明

①オートファジーの変調によって発症する疾患に関して、その病態メカニズムを解析する。②癌、神経変性疾患、炎症性腸疾患、心不全のモデルマウスを用いて、オートファジーの変調と疾患重症度との相関、罹患細胞がオートファジー変調に至るメカニズムなど、を検討する。

(4)『オートファジー病』の評価系確立と治療法開発

①オートファジー変調による疾患の評価系を開発する。②ケミカルスクリーニングで同定したオートファジー誘導化合物を疾患モデルマウスに応用し、その治療効果を判定する。③疾患モデルマウスやヒト疾患サンプルを対象に、上記の評価法や治療法の有効性を検討する。

3. 研究の方法

(1)新規オートファジー機構の解析

①新規オートファジー機構に関わる分子を、酵母遺伝学や、ケミカルバイオロジーを駆使して同定する。②当該遺伝子を欠損させた細胞を作成して、電子顕微鏡観察し、オートファジー実行機構のどこで異常が生じているかを確認する。

(2)両方のオートファジーの生理機能解析

①新規オートファジーをモニターできるマウスや両オートファジーを同時にモニターできるマウスを作製して、これらオートファジーが誘導される部位を明らかにする。②新規オートファジー実行遺伝子を欠損したマウスと両オートファジーを同時に欠損させたマウスを作製して、新規オートファジーあるいは総体としてのオートファジーの生理機能を明らかにする。

(3)『オートファジー病』の基本原理解明

①オートファジー欠損マウスで見られる表現型を解析し、疾患との関連を検討する。②癌、神経変性疾患、炎症性腸疾患、心不全のモデルマウスを用いて、オートファジーの変調の有無、変調が生じる分子メカニズムなどを検討する。

(4)『オートファジー病』の評価系確立と治療法開発

①オートファジー変調をモニターできる評価法を開発し、疾患モデルに応用する。②オートファジー誘導化合物を複数同定し、種々の疾患モデルマウスに投与し、その治療効果を判定する。さらに、化合物を構造展開し、治療薬開発の基盤とする。③疾患モデルマウスやヒト疾患サンプルを対象に、上記の評価法や治療法の有効性を検討する。

4. 研究成果

(1)新規オートファジー機構の解析

①Atg5 依存的オートファジーは、酵母から哺乳動物まで種を越えて保存された細胞機能であることが知られている。そこで、新規オートファジーが哺乳動物細胞以外にも誘導されるか否かを検証したところ、

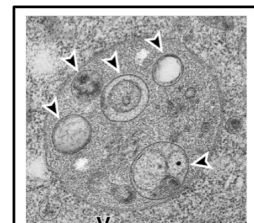


図1: 酵母で観察された新規オートファジー(矢印)

①哺乳動物細胞と同様に、新規オートファジーは酵母細胞でも誘導されること(図1)、②酵母の新規オートファジーは、哺乳動物細胞と同様に、ゴルジ膜を起源とし、Atg1, Vps34 などの分子を必要とすることが明らかとなった。即ち、新規オートファジーは、種を越えて保存されている重要な細胞機能であることが判明した。

次に、酵母の遺伝学を用いて、新規オートファジーに関わる 12 の遺伝子を同定した。このうち、9 つの遺伝子 Alternative Autophagy (Aag) 1~5, 8~11 において哺乳動物ホモログが確認できた。さらに、新規オートファジーを誘導できる化合物の標的分子探索から、2 つの Aag 遺伝子 (Aag6, 7) の同定に成功した。即ち、これまでに同定していた、Ulk1, Rab9, Beclin1 に加えて、新たに 11 種類の新規オートファジー実行遺伝子の取得に成功した。

②上述した 14 遺伝子のうち 11 遺伝子に関して、ノックアウトマウスを作成し(表 1 参照)、マウス胎仔線維芽細胞(MEF)を採取した。また、残りの 3 遺伝子に関しては、crisper を用いて遺伝子欠損細胞を作製した。これらの新規オートファジー欠損細胞を用いて、当該分子が機能しているオートファジーの素過程を解析したところ、2 遺伝子がオートファジーの初期段階、8 遺伝子が隔離膜形成、4 遺伝子がオートファゴソーム形成に関与していることが明らかとなった(表 1)。また、多くの遺

	KOマウス	機能部位	Atg5依存的オートファジーへの影響
Ulk1	解析済み	IM	あり
Beclin1	解析済み	IM	あり
Rab9	-	AP	軽度
Aag1	作成済み	IM	なし
2	解析済み	IM	なし
3	作成済み	IM	なし
4	作成済み	IM	なし
5	作成済み	IM	なし
6	解析済み	AP	軽度
7		AP	なし
8		AP	逆方向
9	作成済み	IM	なし
10	解析済み	初期	なし
11	解析済み	初期	逆方向

機能部位: IMは隔離膜形成、APはオートファゴソーム形成

伝子は、新規オートファジーのみを制御していたが、従来型オートファジーにも軽度関与している遺伝子、従来型オートファジーとは逆方向に機能している遺伝子も同定できた。

(2)両方のオートファジーの生理機能解析

①オートファジー可視化マウスを作出し、オートファジーの時空間解析を行った。具体的には、新規オートファジーを赤色蛍光で、従来型オートファジーを緑色蛍光でモニターできるマウスを作出し、マウスの発生過程での両オートファジーの誘導部位を検討した。その結果、新規オートファジーは、心臓(図 2)や赤血球分化において強く活性化されていることが判明した。

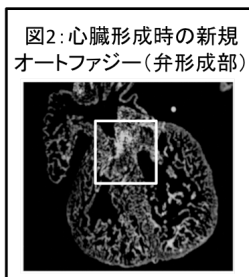


図2: 心臓形成時の新規オートファジー(弁形成部)

また、新たに、両オートファジーの総量をモニターすることができる蛍光プローブを開発できた。

②オートファジー欠損マウスを用いて、生理機能解析を行った。その結果、新規オートファジーは複数の臓器の発生に関わっていることが明らかとなった。

①**①**個体発生: 新規オートファジーを全身で欠損させたマウスの多くは、胎生 9.5 日までに死亡した。即ち、新規オートファジーは、個体発生に重要な役割を担っていることが明らかとなった。②**②**赤血球の分化: 赤血球は、最終分化の時にミトコンドリアが除去される。このミトコンドリア除去は、従来型オートファジーではなく、新規オートファジーが実行していることを見いだした。③**③**両方のオートファジーを臓器特異的に欠損させたところ、膀胱、腸管の発生に異常が生じた。これらの臓器が発生するためには、少なくともどちらかのオートファジーが必要であることが明らかとなった。

細胞機能との関連では、①**①**細胞死に関しては、新規オートファジーが過剰に誘導されることによって、JNK 依存的なオートファジー細胞死が誘導されることを発見した。②**②**細胞分化に関しては、血球や免疫細胞の分化に関わっていることを見出した。③**③**細胞老化に関しては、細胞老化を維持する時に、オートファジーによる蛋白質異化作用と蛋白質同化作用(サイトカイン産生)が共役して、同じ場所(TASCC と命名)で行なわれていることを発見した(図 3)。

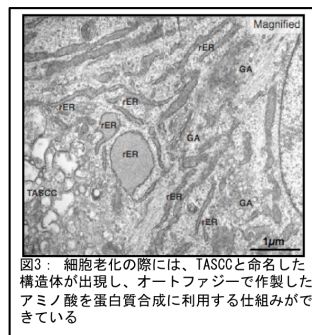


図3: 細胞老化の際には、TASCCと命名した構造体が出現し、オートファジーで作製したアミノ酸を蛋白質合成に利用する仕組みができています

(3)『オートファジー病』の基本原理解明

Atg5 依存的オートファジーの破綻が、種々の疾患発症に関連していることは既に報告されている。今回は、新規オートファジーの破綻やオートファジー全体の破綻が疾患発症に如何に関与しているかを検討した。

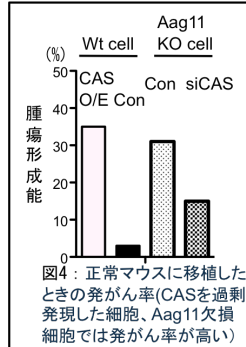
①**①**新規オートファジー欠損マウスの表現型を解析したところ、前述した発生異常の他に、ヒトの疾患に関連する表現型が認められた。具体的には、Aag11 マウスにおいては、8 ヶ月令以降に発がんが認められた。また、神経特異的 Aag3 欠損マウスでは自閉症様の症状(オープンフィールド試験における活動量低下)が観察され、血球特異的 Aag3 欠損マウスでは慢性骨髄性白血病様の病態が認められた。これらの疾患の発症には、新規オートファジーが関わっているものと考えられた。

②**②**癌、神経変性疾患、炎症性腸疾患、心不全

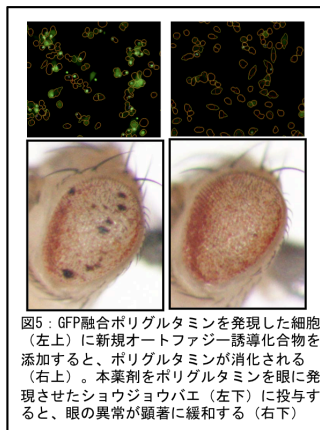
などのモデルマウスを用いて、オートファジーの変調の有無、変調が生じる分子メカニズムなどを検討した。

①発癌：多くのがん細胞の特徴の1つに、染色体の分離異常がある。実際に、正常細胞から Aag11 などのオートファジー遺伝子を欠損させると、染色体の分離異常が観察された。私たちは、オートファジーの変調によって分解されなくなった特定のタンパク質の蓄積が、染色体異常の原因となっているものと考えて、オートファジーの基質分子を探索した。その結果、CAS (cancer-inducing autophagy

substrate) と仮称する分子の同定に成功した。実際に、この分子を過剰発現した細胞をマウスに移植すると、染色体の不等分裂を伴う発がんを発症した (図4)。また、自然発癌マウスである Aag11 マウス由来の細胞を移植する際に、CAS をノックダウンしておく、がん発生率が有意に減少した (図4)。即ち、オートファジーに変調が生じると、基質の CAS が蓄積し、発がんを誘導することが明らかとなった。



②神経変性疾患 (ポリグルタミン病): 本疾患は、特定の蛋白質のグルタミンが異常伸長し、神経細胞内でβシート構造となって、神経機能異常を生じる疾患である。(1)オートファジー変調細胞では、ポリグルタミンの蓄積がより顕著になること、(2)新規オートファジー誘導化合物を投与すると、ポリグルタミン蓄積が改善すること (図5上)、(3)複眼にポリグルタミンを発現させたショウジョウバエに、新規オートファジー誘導化合物を投与すると、眼の異常が顕著に緩和すること (図5下) を見いだした。即ち、新規オートファジーの多寡は、ポリグルタミン病の病態を左右することが明らかとなった。



③炎症性腸疾患: 炎症性腸疾患では、腸内細菌が腸管上皮細胞内に侵入することが発症の契機となっている。新規オートファジー欠損マウスに薬剤性腸炎を誘導したところ、腸管上皮細胞内の細菌がオートファジーによ

って消化されず腸炎が著しく増悪した。即ち、オートファジーによる腸内細菌の除去は腸炎の病態に大きな影響を与えることが明らかとなった。

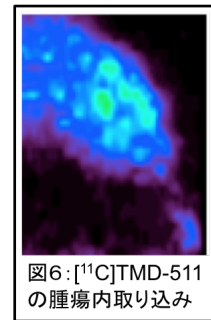
④心不全、脂肪肝: 心臓特異的あるいは肝臓特異的に新規オートファジーを欠損させたマウスを作成すると、それぞれ心機能低下あるいは脂肪肝を呈した。即ち、新規オートファジーの変調は心臓や肝臓の異常を招来することが明らかとなった。

(4)『オートファジー病』の評価系確立と治療法開発

①評価法確立: 前述のように、オートファジーの総量をモニターできる蛍光プローブを開発しており、疾患診断への応用の可能性を模索した。しかし、個々の疾患にはそれぞれ特徴があり、単一の方法で疾患の重篤度を評価することは困難であった。

②治療法開発: 約2万種類の低分子化合物、約4千種類の天然物を対象に、オートファジー活性を評価するハイスループットアッセイを行った。その結果、新規オートファジーを強く誘導する化合物を35種類、同天然物を32種類同定した。これらを用いて、以下の創薬開発研究を行った。

①がん: これらの低分子化合物を ex vivo の担癌マウスに投与し、抗がん効果を有する5種類の化合物を同定した。この中から、最も活性の強い化合物#9の側鎖置換を行い、より活性の高い化合物 TMD-511 を開発した。この化合物を PET プローブ化してマウスに投与したところ、本化合物ががんを集積することが明らかとなった (図6)。本化合物は、膵臓がんなどに有効性を示した。また、この化合物の標的分子は Aag7 分子であり、新規オートファジーを直接活性化することによって抗がん効果を発揮しているものと思われる。



②ポリグルタミン病: 新規オートファジー誘導化合物の中から、細胞レベルやショウジョウバエの複眼モデルで、ポリグルタミンタンパク質蓄積を抑制できる低分子化合物を2種類同定した。これらをポリグルタミン病モデルマウスである SCA1 マウスに投与したところ、行動の改善 (roter rod テスト)、神経病理像の改善、ポリグルタミン蓄積の減少が認められた。また、この化合物の分子標的を同定したところ、Aag3 に結合する分子である

ことが判明した。即ち、当該化合物を投与すると、Aag3 を介して新規オートファジーが活性化され、ポリグルタミンタンパク質が分解されるものと考えられた。

③脂肪肝：新規オートファジー誘導天然物を高脂肪食摂取マウスに投与し、脂肪肝を抑制できる天然物を探索したところ、8 種類の天然物が有効に機能することが明らかとなり、今後抗脂肪肝天然物として応用できる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 40 件) 下記全論文査読有り

- ①Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes. S. Honda, S. Arakawa, Y. Nishida, H. Yamaguchi, E. Ishii, S. Shimizu. **Nature Commun.** 5 Article number:4004, 2014. doi: 10.1038/ncomms5004.
- ②Inhibition of epithelial cell death by Bcl-2 improved chronic colitis in IL10 KO mice. T. Mizushima, S. Arakawa, Y. Sanada, I. Yoshino, D. Miyazaki, H. Urushima, Y. Tsujimoto, T. Ito, S. Shimizu. **Am J Pathol.** 183:1936-44, 2013. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.08.012.
- ③Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. Y. Miyaoka, K. Ebato, H. Kato, S. Arakawa, S. Shimizu, A. Miyajima. **Curr Biol.** 22: 1166-1175, 2012. doi:10.1016/j.cub.2012.05.016
- ④Shigella targets epithelial tricellular junctions to spread between cells via a noncanonical clathrin-dependent endocytic pathway. M. Fukamatsu, M. Ogawa, S. Arakawa, H. Ashida, M. Suzuki, M. Furuse, K. Nakayama, S. Shimizu, M. Kin, H. Mimuro, C. Sasakawa. **Cell Host Microbe.** 11: 325-336, 2012. doi: 10.1016/j.chom.2012.03.001.
- ⑤Involvement of Beclin 1 in the engulfment of apoptotic cells. A. Konishi, S. Arakawa, Z. Yue, S. Shimizu. **J. Biol. Chem.** 287: 13919-29, 2012. doi: 10.1074/jbc.M112.348375.
- ⑥Transformation of an antimicrobial peptide into a plasma membrane-permeable, mitochondria-targeted peptide via the substitution of lysine with arginine. I. Nakase, S. Okumura, S. Katayama, H. Hirose, S. Pujals, H. Yamaguchi, S. Arakawa, S. Shimizu, S. Futaki. **Chemical Commun.** 48: 11097-99,

2012. doi: 10.1039/c2cc35872g.

- ⑦Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. M. Narita, A.R.J. Young, S. Arakawa, S.A. Samarajiwa, T. Nakashima, S. Yoshida, S.K. Hong, L.S. Berry, S. Reichelt, M. Ferreira, S. Tavaré, K. Inoki, S. Shimizu, M. Narita. **Science** 332: 966-970, 2011. doi:10.1126/science.1205407
- ⑧Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. T. Yamasaki, H. Kawasaki, S. Arakawa, K. Shimizu, S. Shimizu, O. Reiner, H. Okano, S. Nishina, N. Azuma, J.M. Penninger, T. Katada, H. Nishina. **Journal of Neuroscience** 31: 16872-16883, 2011. doi:10.1523/JNEUROSCI.1111-11.2011.
- ⑨Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. H. Hikita, T. Takehara, T. Kodama, S. Shimizu, M. Shigekawa, A. Hosui, T. Miyagi, T. Tatsumi, H. Ishida, Li W, T. Kanto, N. Hiramatsu, S. Shimizu, Y. Tsujimoto, N. Hayashi. **Hepatology** 54: 240-251, 2011. doi: 10.1002/hep.24305.
- ⑩xCT deficiency accelerates chemically induced tumorigenesis. A. Nabeyama, A. Kurita, K. Asano, Y. Miyake, T. Yasuda, I. Miura, G. Nishitai, S. Arakawa, S. Shimizu, S. Wakana, H. Yoshida, M. Tanaka. **Proc. Natl. Acad. Ssi. USA** 107: 6436-6441, 2010. doi: 10.1073/pnas.0912827107.
- ⑪Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. S. Shimizu, A. Konishi, Y. Nishida, T. Mizuta, H. Nishina, A. Yamamoto, Y. Tsujimoto. **Oncogene** 29: 2070-2082, 2010. doi: 10.1038/onc.2009.487.

[学会発表] (計 73 件)

- 1, Shimizu S : Physiological Role of Atg5-independent macroautophagy. The 16th Northeastern Asian Symposium. (2014/12/19-20, Busan, Korea)
- 2, Shimizu S : Molecular Mechanisms of Alternative Macroautophagy. Gordon research Conference (2014/3/17-21; Barga, Italy)
- 3, Shimizu S : Biological Roles of Autophagic Cell Death. CSH Asia conference on Mechanisms and Functions

of Non-apoptotic Cell Death (2013/4/18;
Suzhou, China)

〔図書〕 (計 2 件)

1, Innovative Medicine : Basic Research and
Development. (Edit K. Nakao) “Autophagic Cell
Death and Cancer Chemotherapeutics.” S.
Shimizu. Springer in press

2, AUTOPHAGY: Cancer, Other Pathologies,
Inflammation, Immunity, and Infection. Vol. 2
(Edit MA Hayat) “Mammalian autophagy can
occur through an Atg5/Atg7-independent
pathway.” S. Shimizu, S. Arakawa, Y. Nishida,
H. Yamaguchi, T. Yoshida. Academic Press,
49-59 (2013)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：抗癌活性を有する化合物をスクリー
ニングするための方法

発明者：清水重臣、室橋道子

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学

種類：特願

番号：2012-026377

出願年月日：2012年2月9日

国内外の別：国内

名称：ベンゾチオフェン化合物、並びに該化
合物を有効成分とするオルタナティブオート
ファジー誘導剤及び抗癌剤

発明者：清水重臣、細谷孝充、室橋道子、
吉田優

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学

種類：特願

番号：2012-026373

出願年月日：2012年2月9日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：ベンゾチオフェン化合物、該化合物を
有効成分とするオルタナティブオートファジ
ー誘導剤及び抗癌剤、並びに抗癌活性を有す
る化合物をスクリーニングするための方法

発明者：Shigeomi SHIMIZU, Takamitsu
HOSOYA, Michiko MUROHASHI, Suguru
YOSHIDA

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学

種類：PCT 出願

番号：PCT/JP2013/052947

出願年月日：2013/02/07

取得年月日：2014/12/17(EU), 2015/2/26(US)

国内外の別：国外

〔その他〕

(1) ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/index.html>

http://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/eng/index_e.html

(2) 主催学会

1、第23回日本Cell Death学会 2014年7
月18, 19日

2、国際シンポジウム “Parkinson Disease
and Mitophagy” 2011年6月11日

(3) 報道関連

1、Newton 2014年9月号「細胞の不要成分
を除去する新たなしくみ」掲載

2、NatureAsia 特集 2014年8月「赤血球か
らミトコンドリアが除かれるしくみを解
明！」

3、日経産業新聞 2014年6月18日「ハンチ
ントン病症状改善に道」

4、日経産業新聞 2014年6月13日「赤血球
しくみに光」

5、対がん協会主催一般向けパネルディスカ
ッション 2011年9月15日

(4) オープンキャンパス／サイエンスカフェ、
高大連携(2014: 12/15, 8/4, 6/3, 3/24;
2013: 11/1, 10/11, 8/1, 6/6; 2012: 8/3,
7/26, 7/19, 6/7, 3/27; 2011: 8/10, 8/5, 8/1,
6/2; 2010: 8/2, 7/30, 6/3, 6/1)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 重臣 (Shimizu, Shigeomi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号：70271020

(2) 研究分担者

小西 昭充 (Konishi, Akimitsu)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・講師
研究者番号：50381877

吉田 達士 (Yoshida, Tatsushi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・講師
研究者番号：80315936

(3) 連携研究者

荒川 聡子 (Arakawa, Satoko)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号：90415159