

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04843

研究課題名(和文) リソソーム機能によるオートファジー調節機構の解明とそれに基づくPD治療薬開発

研究課題名(英文) Development of anti-PD chemicals modulating autophagic activity based on lysosomal function

研究代表者

斉木 臣二 (Shinji, Saiki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00339996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではオートファジー促進をリソソーム分布を含むリソソーム機能調節によって行い、その調節化合物をパーキンソン病治療に応用することを目標として研究を行った。ポリアミン代謝産物がリソソーム分布を核周囲に変化させ、同時にmTORC1阻害作用を持つこと、リソソーム酸性化に対しては影響を与えないことを確認した。また同化合物のアセチル化体がパーキンソン病患者血清にて上昇していることを確認した。以上の成果をまとめ、現在論文投稿準備を進めている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to develop small chemicals for Parkinson's disease therapy by modulating lysosomal functions including its localization control. First of all, we have identified polyamine metabolites inhibiting mTORC1 activity by lysosomal redistribution without any effects on lysosomal acidification. Also, we detected acetylated polyamine was elevated in serum of Parkinson's disease. I am preparing for a paper submission.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経内科学 オートファジー リソソーム

1. 研究開始当初の背景

ハンチントン病 (HD)・アルツハイマー病 (AD)・パーキンソン病 (PD) の分子病態に広義のオートファジーが深く関与することが 2002 年以降徐々に明らかになっている (Nat Rev Neurol 8:108, 2011; J Neurol Neurosurg Psychiatry 83:430, 2012)。広義のオートファジーの中でもマクロオートファジー (以下オートファジー) は HD 病因遺伝子産物変異型 huntingtin、amyloid- β 、野生型・変異型 α -synuclein などの病因蛋白の分解に重要とされ (Cell 147:728, 2010)、またオートファジー欠損マウスでは神経細胞内蛋白凝集・進行性の神経細胞死を呈する (Nature 441:880; 441:885, 2006)。さらにオートファジー促進薬ラパマイシンアナログ投与により病因異常蛋白分解が促進され、運動障害が改善するとされ (Nat Genet 37:771, 2005)、神経細胞での化合物によるオートファジー誘導は理に叶った治療戦略といえる (Nat Rev Drug Discov 11:709, 2012)。研究代表者はオートファジー調節及び細胞死誘導/抑制作用を持つ化合物同定・分子作用機序解明を 2005 年より一貫して研究しており、十分な知識・細胞・マウス実験経験を持つ (Nat Chem Biol 4:295, 2008; Hum Mol Genet 17:170, 2008; Autophagy 7:176, 2011)。また家族性 PD 病因遺伝子 PINK1、parkin によってミトコンドリアオートファジー (以下マイトファジー) が調節される分子機構についても、PINK1/parkin の病因変異との関連について報告するなど PD 分子病態とオートファジー全般について実験施行・データ解析能力を持つ (J Cell Biol 189:211, 2010; FEBS Lett 584:1073, 2010)。

オートファジーの分子メカニズムは PI3K/Akt/mTOR などの細胞外からのシグナル伝達による調節機構、オートファゴソーム形成に関与する Atg 蛋白の機構を中心に解明が進んできたが、オートファゴソームが最終的にリソソームと融合しオートリソソームを形成した後に、内容物が分解されるため、リソソームによるオートファジー調節機構が近年注目を集めている (Trends Biochem Sci 39:61, 2014)。左図 1 のように、飢餓状態では細胞内 pH が上昇しリソソームが核方向に移動・mTORC1 シグナル伝達を抑制することによりオートファゴソーム形成促進・オートリソソーム形成促進 (会合機会の増加による) が図られることを研究代表者は small GTPase である Arl8b、KIF1b などに着目して解明し (図 1, Nat Cell Biol 13:453, 2011) 同論文は同誌 News and Views でも取り上げられた (Nat Cell Biol 13:342, 2011)。

2. 研究の目的

本研究の目的は研究代表者らが既存薬ライブラリーのスクリーニングから既に同定済みのオートファジー促進作用を持つヒット化合物群 (30 以上) の中から、リソソーム

核周囲集積によるオートファジー促進作用による異常蛋白分解促進作用/細胞死抑制作用を持つ化合物を同定し、*in vivo* モデル/iPS 細胞由来モデルを用いて薬効薬理作用を評価・確認し、創薬シーズを決定し毒性試験・臨床応用に繋げることである。

3. 研究の方法

H27 年度: 30 以上の既同定オートファジー促進薬から オートリソソーム (AL) 産生亢進の確認、リソソーム分布変化の検証、pH 維持機構の確認、を行い、核周囲リソソーム集積/AL 産生促進/リソソーム pH 維持を介する機序で薬効を有する「オートファジー促進ヒット」を同定する。

以下に方法を詳述する。

mRFP-GFP-LC3 HeLa 安定発現細胞によるオートリソソーム産生亢進の確認

図 5 のようにオートファジー促進/阻害の両者を評価可能な安定発現細胞を既に樹立済みである。同細胞ラインに既同定ヒット 38 種を添加し、図 5 左のようにオートリソソーム増加を示す「オートファジー促進作用」を持つ化合物を同定する。

Igp120-GFP 安定発現 HeLa 細胞によるリソソーム分布変化に着目した化合物スクリーニング

Igp120 (LAMP1 マウスホモログ)-GFP 細胞に、既存薬ライブラリーからのヒット化合物を添加し、既に研究代表者施設に設置済みの蛍光顕微鏡 (Fluor Life Technologies 社) にてプレート上で観察することにより、リソソームがより細胞核周囲に集積するものをヒットとする。

LysoSensor 添加型 Huh7 細胞を用いたリソソーム pH 維持機構の確認

既存薬ライブラリーからのヒット化合物群の中で、リソソーム内 pH を変化させることにより、autophagic flux を調節する作用を持つ化合物が存在する可能性がある。特にリソソーム pH を上昇させ、酸性化を妨げる化合物は結果としてオートファジー抑制に働く可能性があるため、除外する必要がある。Huh7 細胞に LysoSensor Yellow/Blue 100 nM を添加し、30 分インキュベート後、既に所属施設に設置済みの InCell Analyzer-2000 にて pH 定量評価を行い、リソソーム pH を測定する。図 6 のように同評価システムを既に確立済みである。

H28-9 年度: - に加え、A53T α -synuclein TG マウス・MPTP 投与型 PD モデルマウス・R6/2 マウスへの投与による表現型改善・神経細胞内凝集体数減弱を確認、PD 患者 iPS 細胞由来神経細胞での薬効確認、ヒット化合物の構造活性相関を検討し薬理作用を解明、を行い、リソソームを作用点とするオートファジー調節ヒット化合物を同定し、最適化試験・前臨床試験に繋げる。以下に方法について詳述する。

PD・HD モデルマウスでのヒット化合物作用検証

1. A53T- α -synuclein トランスジェニックマウス (以下 A53T マウス)

実験動物: A53T マウス (Neuron 34:521, 2002 参照) は 24 週から神経細胞 (視床・線条体・脊髄前角) に変異型 α -synuclein の蓄積を認める。同マウス 20 匹 (DMSO 治療グループ; ヒット化合物治療グループ (濃度は 2 種類を設定) を Jackson Lab より購入し、4 週齢のマウスに、DMSO またはヒット化合物を 1 回/週で 20 週間連続で腹腔内投与する。

行動解析: Rotor rod および赤外線計測装置を用いたケージ内自発運動検査。上記文献では 40 週後にほぼ全例が死亡するため、生存率も合せて評価する。同動物実験を 3 回施行する。

病理学的解析: 先述のように本マウスは、視床・線条体・脊髄前角神経細胞質内に α -synuclein 陽性構造物を形成するため、本凝集物がヒット化合物投与により減少することを確認する。

2. R6/2 マウス (ポリグルタミン異常伸長 huntingtin トランスジェニックマウス)

本マウスは研究代表者が英国留学中に用いており (Nat Genet 36:585, 2004 参照) 既にラパマイシンアナログ CCI-779 が血液脳関門を透過し、同モデル線条体にてオートファジーを亢進させることにより huntingtin 凝集による細胞質内封入体を減少させる (図 7) ことを報告しており、オートファジー促進をモニタリングできる動物モデルとして確立されている。本マウスにヒット化合物を週 1 回、10 mg/kg にて腹腔内投与し、以降週に 1 回ずつ体重・Rotor rod による評価を行い、併せて病理学的検討 (週齢 4 週毎) を行い、オートファジー促進薬の薬効を評価する。

4. 研究成果

、 : 当初のヒット化合物 30 種からは、作用機序の異なる 3 種のオートファジー促進剤 (特許をそのうち 2 種について取得) を同定できたが、リソソームに特異的に作用するものはなかった。そのため、パーキンソン病患者体内で変化する代謝産物に着目し、その中からオートファジー促進剤を特定し、さらにその分子作用機序を検証し、リソソームに対して作用するものの同定を図った。その結果、パーキンソン病患者血清で上昇する、N-acetylspermine を同定した。同化合物はオートファジーを誘導し、さらにリソソーム分布を核周囲に変化させ、mTORC1 を抑制する作用を持っていた。

: N-acetylspermine はリソソーム酸性化機構に影響を与えず、従って蛋白分解酵素活性に対して特に影響を与えなかった。

、 : まず R6/2 マウスに対して同化合物を投与し、その薬効を検証した。体重減少に対する改善効果を認めなかった。現在病理学的検討を進めている。 のトランスジェニックマウスでの検討については、交付研究費

では購入が困難であったため、実施できなかった。

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 10 件)

1. Sato S, Uchihara T, Fukuda T, Noda S, Kondo H, Saiki S, Komatsu M, Uchiyama Y, Tanaka K, Hattori N. Loss of autophagy in dopaminergic neurons causes Lewy pathology and motor dysfunction in aged mice. *Sci Rep* 8:2813 (2018)

2. Fujimaki M, Saiki S*, Li Y, Kaga N, Taka H, Hatano T, Ishikawa KI, Oji Y, Mori A, Okuzumi A, Koinuma T, Ueno SI, Imamichi Y, Ueno T, Miura Y, Funayama M, Hattori N*. Serum caffeine and metabolites are reliable biomarkers of early Parkinson's disease. *Neurology* 9:e1-8 (2018)

3. Kamagata K, Zalesky A, Taku Hatano, Di Biase MA, Samad OE, Saiki S, Shimoji K, Kumamaru KK, Kamiya K, Horii M, Hattori N, Aoki S, Pantelis C. Connectome Analysis with Diffusion MRI in Idiopathic Parkinson's Disease: Evaluation Using Multi-shell, Multi-tissue, Constrained Spherical Deconvolution. *Neuroimage: clinical* 17:518-529 (2017)

4. Saiki S (16 人中 1 番目), Hattori N. Decreased long-chain acylcarnitines from insufficient β -oxidation as potential early diagnostic markers for Parkinson's disease. *Sci Rep* 7:7328 (2017)

5. Yamada D, Saiki S, Furuya N, Ishikawa KI, Imamichi Y, Kambe T, Fujimura T, Ueno T, Koike M, Sumiyoshi K, Hattori N. Ethambutol neutralizes lysosomes and causes lysosomal zinc accumulation. *Biochem Biophys Res Commun* 471:109-116 (2016)

6. Hatano, T., Saiki, S., Okuzumi, A., Mohney, RP., *Hattori, N. Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomic technologies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87:295-301 (2016).

7. Fuse A, Furuya N, Kakuta S, Inose A, Sato M, Koike M, Saiki S, Hattori N. VPS29-VPS35 intermediate of retromer is stable and may be involved in the retromer complex assembly process. *FEBS Lett* 589:1430-6 (2015)

8. *Amo, T., Saiki, S., Sawayama, T., Sato, S., Hattori, N.. Detailed analysis of mitochondrial respiratory chain defects caused by loss of PINK1. *Neurosci Lett* 580C:37-40 (2014)

9. Fujimaki, T., Saiki, S., Tashiro, E.,

Yamada, D., Kitagawa, M., *Hattori, N., *Imoto, M.. Identification of licopyranocoumarin and glycyrrulol from herbal medicines as neuroprotective compounds for Parkinson's disease. PLOS ONE 9:e100395 (2014)

10. Ishikawa KI, Saiki S, Furuya N, Yamada D, Imamichi Y, Li Y, Kawajiri S, Sasaki H, Koike M, Tsuboi Y, Hattori N. p150glued-associated disorders are caused by activation of intrinsic apoptotic pathway. PLOS ONE 9:e94645 (2014)

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Shinji Saiki “Metabolomics and Parkinson's disease and related disorders” Takamatsu International Symposium for PD and MD in Tokyo, Odaiba, Tokyo 23-24Feb2018

2. Shinji Saiki “Development of plasma metabolite biomarker for Parkinson's disease” RIKEN Young Researcher Workshop, RIKEN, Wako 31May2017.

3. Shinji Saiki “Novel autophagy inducers against Parkinson Disease” The 8th International Symposium on Autophagy. Nara, 29May2017-1June2017

4. 斉木臣二 「オートファジー制御によるパーキンソン病治療薬探索」日本学術振興会 A3 事業 日本オートファジー合同セミナー セレクトン福島、福島市、福島県、2017 年 3 月 8 日

5. 斉木臣二 「パーキンソン病とオートファジー」第 2 回日本パーキンソン病コンgres 日本教育会館、千代田区、東京都 2017 年 4 月 15 日~16 日

6. 斉木臣二 「オートファジーを標的としたパーキンソン病治療薬開発」日経バイオテク プロフェッショナルセミナー Learning Square 新橋、新橋、東京、2017 年 3 月 6 日

7. Shinji Saiki “Autophagy and mitophagy regulation by small chemicals” The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, Shinagawa, Tokyo Japan, 30Oct2016-1Nov2016

8. 斉木臣二 「オートファジー調節による神経変性疾患の治療戦略」AMED 難治性疾患実用化研究事業『筋萎縮性側索硬化症の新規治療法開発を目指した病態解明』平成 28 年度ワークショップ 都市センターホテル、千代田区、東京都、2016 年 9 月 30 日

9. 斉木臣二 “The role of microglia in the pathogenesis of Parkinson's disease” 第 41 回日本微小循環学会 コクヨホール、品川区、東京都、2016 年 9 月 23 日~24 日

10. 斉木臣二 “Blood biomarkers for Parkinson's disease” 第 57 回日本神

経学会 Neuroscience Frontier Symposium 神戸国際会議場、神戸市、兵庫県 2016 年 5 月 18-21 日

11. Shinji Saiki “Drug development for Parkinson's disease and autophagy” The 4th Sino-Japan Symposium on Autophagy, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China, 23-24 April 2016

12. Shinji Saiki “Plasma Biomarkers for Parkinson's disease.” XXI World Congress on Parkinson's disease and related disorders. Milan, Italy. 6-9 Dec 2015

13. 斉木臣二 第 9 回オートファジー研究会パーキンソン病分子病態解析に基づくオートファジー促進小分子化合物の同定 兵庫県 2015 年 11 月 17-20 日

〔図書〕(計 3 件)

1. Saiki S and Hattori N. *Mitophagy. Methods in Molecular Biology.* Berlin: Springer-Verlag (2017)

2. Fujimaki M, Saiki S*, Sasazawa Y, Ishikawa KI, Imamichi Y, Sumiyoshi K, Hattori N. (*Corresponding author) In: Saiki S and Hattori N, eds. Immunocytochemical Monitoring of PINK1/Parkin-Mediated Mitophagy in Cultured Cells. *Methods Mol Biol* (2017) doi: 10.1007/7651_2017_20.

3. Saiki S. Neuroacanthocytosis. In: Jankovic J, Tolosa E, eds. *Parkinson's Disease and Movement disorders. 6th ed.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins p456-463 (2015)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称:「オートファジー誘導剤」(斉木)出願番号 2017-226641、出願日 2017 年 11 月 27 日 (国内)

発明者: 斉木臣二、笹澤有紀子、他

権利者: 学校法人順天堂

種類: 用途特許

番号: 2017-226641

出願年月日: 2017 年 11 月 27 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 2 件)

名称:「パーキンソン病の重症度判定方法」(斉木)出願番号 2016-210465、出願日 2016 年 10 月 27 日 (国内)

発明者: 斉木臣二、他

権利者: 学校法人順天堂

種類: 用途特許

番号: 2016-210465

取得年月日：申請中
国内外の別：国内

名称：「化合物又はその塩、及びパーキンソン病治療薬又は予防薬」(斉木) 出願番号 2013-091903、出願日 2016 年 7 月 7 日 (国内、海外)

発明者：斉木臣二、井本正哉、笹澤有紀子、他

権利者：学校法人順天堂、学校法人慶應義塾

種類：物質特許

番号：2013-091903

取得年月日： 2016 年 7 月 7 日

国内外の別：国内、海外

〔その他〕

順天堂大学脳神経内科ホームページ

<http://www.juntendo-neurology.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉木臣二 (SAIKI, Shinji)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00339996

(2) 研究分担者

井本正哉 (IMOTO, Masaya)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：60213253

福原武志 (FUKUHARA, Takeshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20359673

住吉克彦 (SUMIYOSHI, Katsuhiko)

常磐大学・人間科学部・准教授

研究者番号：10445471

赤松和土 (AKAMATSU, Wado)

順天堂大学・ゲノム再生医療センター・特任教授

研究者番号：60338184

石川景一 (ISHIKAWA, Kei-ichi)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：90733973

古屋徳彦 (FURUYA, Norihiko)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50401188

笹澤有紀子 (SASAZAWA, Yukiko)

日本学術振興会特別研究員 (RPD)

研究者番号：20594922

(3) 連携研究者

該当無し。

(4) 研究協力者
該当無し。