

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25111007

研究課題名(和文)パーキンソン病病態解析に基づくオートファジー調節化合物の開発

研究課題名(英文)Development of autophagy enhancing chemicals based on Parkinson's disease pathogenesis.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 81,100,000円

研究成果の概要(和文)：SENDA責任遺伝子WDR45について、表現型を満たす28例の変異を検討し7例に病変変異を認めた

進行性黒質神経細胞死・呼吸不全を呈するPerry症候群責任遺伝子産物p150glued変異型により、オートファジー不全・アポトーシス誘導を確認するなど、オートファジー機能不全と神経変性との関連をより強固にした。家族性PD原因遺伝子CHCHD2(同遺伝子産物はミトコンドリアに局在)に変異を持つPARK22患者より疾患iPS細胞の樹立を終えた。黒質神経細胞選択的にオートファジー不全を呈するマウスの病理学的表現型解析を進め、黒質・縫線核・青斑核のTH陽性神経細胞内封入体が形成されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：According to mutation screening of the WDR45 gene responsible for SENDA, we identified high prevalence of the disease in patients with characteristic phenotype. We revealed that Dynactin mutant, with pathogenic mutant of Perry syndrome, one of the parkinsonian disorders, has inhibiting effect on autophagic flux by decreased autophagosome-lysosome fusion step, resulting in apoptosis. Also, CHCHD2, a novel gene responsible for autosomal dominant Parkinson's disease, was identified and now its molecular function is investigated within the mitochondria. Using TH neurons selective autophagy deficient mice, intraneuronal inclusions have been detected in the affected lesions.

研究分野：神経内科学

キーワード：オートファジー 神経内科学 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(以下 PD)は有病率 150 人/10 万人の我が国で 2 番目に多い神経変性疾患で、中脳黒質の進行性神経細胞死を特徴とする。PD 病態では α -synuclein(以下 α Syn)などの異常蛋白蓄積、ミトコンドリア機能異常が深く関与するため、それぞれオートファジー、マイトファジーが重要な役割を果たすことが確立されつつある。本領域発足直前に領域代表者らは鉄沈着を伴う進行性黒質神経細胞死によるパーキンソニズムを一症状とする SENDA の責任遺伝子 WDR45 を同定し(Nat Genet 2013)、進行性黒質神経細胞死におけるオートファジー不全の一端を明らかにしたため、研究代表者らは臨床的に SENDA と考えられる日本人症例において同遺伝子変異を検索し高頻度であることを報告した(Neurobiol Aging 2015)。さらに新規家族性 PD 責任遺伝子 CHCHD2 を同定し、同遺伝子産物のミトコンドリア局在を確認しており(Lancet Neurol 2015)、オートファジー/マイトファジー分子機構との関連解明のため疾患 iPS 細胞樹立・分化誘導・病態解明を進めている。さらにオートファジー基質でもある α 1-antitrypsin(以下 AAT)(認知症を伴う PD 髄液中で有意に高値とされる。PLOS ONE 2012)が α Syn からなる中脳黒質神経細胞質内のレビー小体構成成分であることを確認するなど、本計画研究 4 プロジェクトの一つ(1)PD 黒質神経細胞死へのオートファジーの関与の検討、を推進し、成果を上げている。また根本的治療法が確立されていない PD では、経年的なミトコンドリア機能不全状態が示唆されるため、オートファジー調節機構に立脚した新規治療法は、発症/進行予防による先制医療に繋がる可能性を秘める。代表者は遺伝性 PD 原因遺伝子産物 PINK1/parkin によるミトコンドリア機能・マイトファジー制御(JCB 2010, FEBS Lett 2010, Neurosci Lett 2015)、リソソームの空間的制御によるオートファジー調節機構(Nat Cell Biol 2011)、小分子化合物を用いたオートファジー調節による神経変性疾患治療薬開発(Autophagy 2011, Nat Chem Biol 2008, HMG 2008)を一貫して研究しており、(2)PINK1/parkin 介在性マイトファジー特異的促進化合物の探索・同定、(3)オートリソソーム形成特異的に作用する化合物の薬効評価を行い、(2)、(3)にて同定した化合物(既存薬 26 個、新規化合物 2 種、生体内小分子化合物・その誘導体など)は(4)PD 特異的 iPS 細胞由来神経細胞での標的・薬効評価を完遂することにより、オートファジー分子機構に基づく臨床応用に繋がりうる化合物の特定を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は上記の 4 つのプロジェクトを並行して進め、PD 病態におけるオートファジーの役割を明らかにすると共に、それを制御する化合物を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PD 黒質神経細胞死へのオートファジーの関与解明

a) PARK22、SENDA 疾患 iPS 細胞の解析: 既に患者由来 iPS 細胞の樹立を終えており、分化誘導後に細胞外フラックスアナライザー XFe24 によるミトコンドリア機能評価およびオートファジー活性を評価する。同定された機能障害に対し種々のミトコンドリア毒・各種オートファジー調節化合物添加による検証を加え、必要であれば CHCHD2/WDR45 KO マウスでの検証を行い、黒質神経細胞死への CHCHD2 および WDR45 の寄与を評価する。

b) 黒質神経細胞死における AAT の役割について: 精製 AAT を定位脳手術にて中脳黒質に注入したモデルマウスを独自に樹立したモノクローナル抗体を用いて病理学的・生化学的に解析しオートファジー不全状態をより詳細に評価し、 α Syn 凝集機構分子メカニズムとの関連を明らかにする。

c) Atg7flox/flox TH-IRES Cre マウス (tyrosine hydroxylase 発現神経細胞特異的オートファジーノックアウトマウス)にて神経細胞内封入体を確認しており、27 年度以降は同マウスの行動解析・寿命などの評価を行う。

(2) PINK1/parkin 介在性マイトファジー特異的調節化合物の探索・同定

既存薬ライブラリースクリーニングを約 1000 種まで継続し、1st スクリーニングでのオートファジー誘導作用を持つヒット(現時点で 26 個)、オートファジー誘導作用を持つ内因性小分子化合物(ポリアミンの一部)・その誘導体のマイトファジーへの薬理作用を Mito-monomeric Keima Tet-on 安定発現 HeLa 細胞に、parkin を強制発現した状態で添加し、マイトファジー誘導効果を評価し、同定されたヒット化合物の分子薬理作用を化合物結合蛋白同定及びその結合部位などを中心に解明する。

(3) オートリソソーム形成促進化合物 S0286 の PD 疾患モデルでの薬効評価

S0286 およびその誘導体(最もオートファジー誘導効果の高いもの)を MPTP 添加型モデルマウス・A53T α Syn モデルマウスへ投与し、薬理作用を行動学的・病理学的・生化学的に評価する。

(4) PD 特異的 iPS 細胞由来神経細胞でのヒット化合物の標的・薬効評価

(2)にて同定されたマイトファジー制御化合物、(3)にて S0286 およびその誘導体の中から最も薬効が期待できるものについて、PARK2/6/9 および孤発性 PD 患者由来 iPS 細胞由来神経細胞に添加し、薬効を評価する。

4. 研究成果

当初計画の(1)-(4)について進展状況をまとめる。(下図参照。下線文献は本計画研究による成果を示す。)

(1) PD 黒質神経細胞死へのオートファジーの関与の検討

2013年4月に領域代表者水島らにより黒質神経細胞死によってパーキンソニズムを呈しオートファジー機能不全が病態に關与する static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood (SENDA)の責任遺伝子 WDR45 が同定されたため、我が国での罹患率を検証すべく精神発達遅滞を伴い、10歳以降にパーキンソニズムを発症し、中脳黒質に鉄沈着を認める症例群(28例)の WDR45 変異を検討し、7例(すべて女性)に病因変異を認められた(Neurobiol Aging 2015)。さらに進行性黒質神経細胞死・呼吸不全を呈する Perry 症候群責任遺伝子産物 p150glued 変異型により、オートファジー不全・アポトーシス誘導を確認するなど(PLOS ONE 2014、未発表データ)、オートファジー機能不全と神経変性との関連をより強固にする報告を行った。また SENDA 患者に加え、新規同定した家族性 PD 原因遺伝子 CHCHD2 (同遺伝子産物はミトコンドリアに局在し、呼吸機能に關与する)に変異を持つ PARK22 患者より疾患 iPS 細胞の樹立を終え(Lancet Neurol 2015)、オートファジー・ミトコンドリア機能評価を行うため神経細胞への分化誘導・解析を進めている。さらに PD 病理変化のメルクマールとされるレビー小体構成成分である α 1-antitrypsin (以下 AAT。患者血清・血漿でも中等度重症度群において減少傾向を確認)を新たに同定し、PD 剖検脳では黒質神経細胞脱落に比例し発現量が低下していることを突き止め、現在 MPTP 投与型マウスモデル・A53T- α Syn トランスジェニックモデルでのオートファジー不全状態への影響を解析している。また研究分担者佐藤は Atg7flox/flox tyrosine hydroxylase (TH)-IRES Cre マウスの病理学的表現型解析を進め、黒質・縫線核・青斑核の TH 陽性神経細胞内封入体(ユビキチン陽性・p62 陽性)が形成されることを確認しており、現在寿命・行動解析を行い、オートファジー不全状態によるレビー小体形成を再現することができた(Sci Rep 2018)。

(2) PINK1/parkin 介在性ミトファジー特異的促進化合物の探索・同定

化合物スクリーニングに必要な parkin-Keima コンストラクトを用いた Tet-on 安定発現 HeLa 細胞の樹立を試みたが、Keima のリーク発現の毒性を回避できず同モデル細胞樹立を断念し、従来の GFP-LC3 安定発現 HeLa 細胞による 1st スクリーニングを経て、mito-Keima コンストラクトを用いた Tet-on 安定発現 HeLa 細胞による 2nd スクリーニングを用いる方法に切り替えた。1st スクリーニングでは既に既存薬ライブラリー(600強の化合物を含む)から26個のオートファジー促進化合物を同定し、それぞれの作用機序解明を進めている。さらに分化した MPP+添加型 SH-SY5Y 細胞の24時間後における細胞ライセート・培養上清中の代謝産物の網羅的解析(capillary electrophoresis

mass spectrometry による)を行い、小分子化合物であるポリアミンの一部が細胞ライセート・培養上清いずれにおいても上昇し、オートファジー誘導に働くことを確認し、そのうちの一部が神経細胞特異的に mTORC1 阻害効果などを持つことを確認している。

また、ミトファジーレセプターである NDP52 が、ミトコンドリアマトリクス蛋白と相互作用し、ミトファジーを誘導するメカニズムを解明した(EMBO Rep (in revision))、(3) オートリソソーム形成特異的に作用する化合物の薬効評価

連携研究者井本正哉らと共同で in-house ライブラリーから新たな2つのオートファジー誘導剤(mTORC1 経路の新たな作用点を持つ化合物、オートリソソーム産生促進化合物)を同定した。その一つである S0286 は HeLa 細胞及び分化型 PC12D 細胞においてオートリソソーム形成促進による細胞保護効果を示した。作用機序探索のためピオチン化誘導体を作製し、HPLC を用いて同化合物の結合蛋白を2種同定し、さらに deletion mutant を用いたアッセイにより2つの結合蛋白との結合部位同定を終えた。現在 S0286 誘導体を20以上作製し構造活性相関の検証を行っており、より薬効の高い誘導体の作製・開発を進めている(特許取得完了)。

(4) PD 特異的 iPS 細胞由来神経細胞での標的・薬効評価

既に PARK2/6/9 疾患 iPS 細胞の樹立を終え、GFP トランスポーターを分化誘導過程で発現させ、60%程度の純度で神経細胞を誘導することに成功している。現在は孤発性 PD 患者由来 iPS 細胞のライブラリー樹立を進めており、同 iPS 細胞を 96-well プレート上で神経細胞に分化誘導する技術を、岡野栄之(慶大生理学)・赤松和土(順天堂大学ゲノム・再生医療センター)らと共同で開発済みである。上記に加え、オートファジー・ミトファジー機能に着目した創薬スクリーニングに利用可能な iPS 細胞の性質を検証するためには、十分な評価系樹立が必要であることから、一過性 mRFP-GFP-LC3 強制発現 HeLa 細胞を用いた In Cell Analyzer 2100 による解析、フラックスアナライザーによる PD モデル細胞でのミトコンドリア評価のバックグラウンドデータ収集を進めた。特に PINK1-/- マウス胚性線維芽細胞(MEF)およびオートファジー機能異常が報告されている家族性 PD 原因遺伝子産物 VPS35 ノックダウン条件下での SH-SY5Y 細胞での機能変化を報告した(Neurosci Lett 2015、FEBS Lett 2015)

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12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, Hori 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., Mohny, 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. VPS29-VPS35 intermediate of retromer is stable and may be involved in the retromer complex assembly process. *FEBS Lett* 589:1430-6 (2015)
8. Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Li Y, Ogaki K, Ando M, Yoshino H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, Hattori N. Identification of a gene associated with autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol* 14:274-82 (2015)
9. Nishioka K, Oyama G, Yoshino H, Li Y, Matsushima T, Takeuchi C, Mochizuki Y, Mori-Yoshimura M, Murata M, Yamasita C, Nakamura N, Konishi Y, Ohi K, Ichikawa K, Terada T, Obi T, Funayama M, Saiki S, Hattori N. High frequency of beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN) among patients with intellectual disability and young-onset parkinsonism. *Neurobiol Aging* 36:2004.e9-2004.e15 (2015)
10. *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)
11. 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)
12. 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. 齊木臣二 「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. 齊木臣二 「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. 齊木臣二 「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. 齊木臣二 「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. 齊木臣二 “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. 齊木臣二 “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. 齊木臣二 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」(齊木) 出願番号 2017-226641、出願日 2017年11月27日(国内)
発明者: 齊木臣二、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」(齊木) 出願番号 2016-210465、出願日 2016年10月27日(国内)
発明者: 齊木臣二、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」(齊木) 出願番号 2013-091903、出願日 2016年7月7日(国内、海外)
発明者: 齊木臣二、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

齊木臣二 (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

佐藤栄人 (SATO, Shigeto)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 00445537

(3) 連携研究者

井本正哉 (IMOTO, Masaya)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号: 60213253

服部信孝 (HATTORI, Nobutaka)

順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 80218510

(4) 研究協力者

船山 学 (FUNAYAMA, Manabu)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 70468578

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

山田大介 (YAMADA, Daisuke)

順天堂大学・医学部・助教 (2018年4月現在退職)

研究者番号： 30757539