

令和 2 年 11 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05151

研究課題名(和文)細胞内主要ATP分解酵素VCPの新規機能の解析

研究課題名(英文)Analyses on novel functions of VCP, a major ATPase in the cell

研究代表者

垣塚 彰(KAKIZUKA, Akira)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：80204329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトは一日あたりその体重に相当する重さのATPの合成と分解を行っていると言われており、ATPとATPaseは、生物の活動になくてはならないものである。可溶性ATPaseの中で最も豊富に存在するATPaseがVCPであるがその機能はよく解っていない。本研究によって、VCPは、飢餓状態になると細胞内で独特の構造体を形成し、細胞死の回避に貢献していること、さらに、パーキンソン病、心筋梗塞、脳梗塞のモデル動物に対するKUSs(我々が開発したVCPのATPase活性の阻害剤)の介入実験により、KUSsは、これらの疾患の病態を改善する効果を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物の生存にとって最大の脅威の1つが飢餓であるが、飢餓に対して細胞がどのような対応を行っているかはよく解っていなかった。本研究によって、細胞内で重要な働きをするVCPと呼ばれる主要なATPaseが、飢餓時に細胞内での局在を変化させることで、自身のATPase活性を抑制し、飢餓時の細胞死を回避していることが明らかになった。一方、パーキンソン病、心筋梗塞、脳梗塞に対し、このVCPのATPase活性を抑制する薬剤の投与が、有効な治療に繋がる可能性を動物実験で示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Humans are said to perform the synthesis and degradation of ATP equivalent to their weight per day, and ATP and ATPase are essential for the activity of the organism. Among the soluble ATPases, VCP is the most abundant but its function is not well understood. By this study, it has been shown that VCP forms unique structures in cells when starved and contributes to the avoidance of cell death. In addition, intervention experiments of KUSs (inhibitors of the ATPase activity of VCP that we developed) in model animals of Parkinson disease, myocardial infarction, and cerebral infarction, indicated that KUSs had the effects of improving the disease states of these disorders.

研究分野：分子医学、創薬

キーワード：VCP/p97 ATP制御 神経細胞死 飢餓 恒常性維持 パーキンソン病 心筋梗塞 脳梗塞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、ポリグルタミン病の分子解析を行う過程で、ポリグルタミンを認識・結合する蛋白質として VCP と呼ばれる ATPase を同定した。また、VCP の機能が低下したショウジョウバエでは、ポリグルタミンによる神経変性が軽減することを見いだした。その後、VCP 内の 1 アミノ酸置換により、IBMPFD (inclusion body myopathy with Paget disease of bone and frontotemporal dementia) という骨格筋・心筋・骨・神経が傷害を受けるヒトの優性遺伝病が引き起こされること、さらに、同様な 1 アミノ酸置換が優性遺伝性の家族性 ALS (筋萎縮性側索硬化症) を引き起こすことが報告された。我々の解析で、これらの変異 VCP は、解析した全てで ATPase 活性が亢進していることが判明した。これらの知見は、VCP の ATPase 活性を抑制することが、神経変性疾患の治療に有効である可能性を示唆した。そこで、我々は、VCP の機能阻害を起さず、VCP の ATPase 活性を特異的に阻害する低分子化合物を開発し KUS (Kyoto University Substance) と命名した。KUS は、血清やグルコースを除去した時に、細胞内の ATP の低下を防ぎ、細胞を細胞死から保護する作用が確認された。

一方、VCP 蛋白質は、細胞がストレスに曝されると細胞内での局在を大きく変える。例えば、ポリグルタミンに代表される異常蛋白質が神経細胞内に蓄積すると、VCP はまず異常蛋白質の凝集体を形成し凝集体と共局在するが、時間が進むと残りの VCP が核に移動する。核内移行した VCP はヒストンの脱アセチル化を伴う転写の抑制とそれに引き続く蛋白質合成の抑制を引き起こし、神経細胞を萎縮させることを明らかにした。

KUS を緑内障や網膜色素変性の遺伝性モデルマウスに投与することで、これらの疾患での神経細胞死を防ぎ、発症を抑制できることが判明した。さらに、KUS は、高脂肪食が誘導する肥満、糖尿病、脂質代謝異常を劇的に改善することが判明し、VCP の ATPase 活

性は、成体のエネルギー代謝に密接に関わっていることが示唆された。また、細胞を飢餓状態にすると VCP が細胞内で局在を変え、特異的な構造体を形成することが見いだされ、このような構造体が生じるメカニズムとどのような意味をもつのか？という疑問が生じた。

2. 研究の目的

ヒトは一日あたりその体重に相当する重さの ATP の合成と分解を行っていると言われており、ATP と ATPase は、生物 (細胞) の活動になくてはならないものである。可溶性 ATPase の中で最も豊富に存在するのが VCP と呼ばれる ATPase で、細胞に必須の蛋白質であるがその詳細な機能はよく解っていない。VCP の働きとして、ATP を分解することは自明であるが、本研究では、分子細胞生物学、薬理学、生化学的手法を駆使し、VCP が果たす細胞・生体での新規役割と、そのメカニズムの解明を目指した。併せて、我々が独自に開発した KUS を種々の疾患モデル動物に投与し、KUS の有用性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

○飢餓時に VCP が特殊な構造体を形成するメカニズムとその意義の解明。

・飢餓時に VCP が特殊な構造体を形成する時に欠乏している栄養素の候補として糖、脂質、アミノ酸を想定し、それぞれが欠乏した培地で該当する構造体が生じるかどうかの検証を行った。

・該当する構造体の形成に関与する可能性がある細胞骨格蛋白質及び VCP のコファクターのノックダウンを行い、該当する VCP の構造体が消失するかどうかの検証をおこなった。

・ATeam (ATP に対する FRET バイオセンサー) を発現させた細胞を観察することで、VCP の構造体の有無と細胞内 ATP レベルとの相関関係の解析を行った。

・ Glut 1 などの細胞内へのグルコースの取り込みに関わるトランスポーターの mRNA の定量と免疫染色での細胞内の局在の解析を行った。

○KUS を用いた疾患モデル動物への介入実験。

これまでの研究で、KUS は細胞内の ATP の低下に伴う ER ストレスを抑制し、神経細胞を細胞死から保護する作用があることを示してきた。そこで、ATP の低下が病態に深く関与していることが推定されている MPTP (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetra- hydro-pyridine) 誘導性のパーキンソン病モデルマウスに対する治療効果を検証した。併せて、心筋梗塞及び脳梗塞の動物モデルにおいても、KUS の治療効果の検証をおこなった。

4. 研究成果

本研究では、細胞自身が VCP の ATPase 活性を抑制して、栄養飢餓に対処するメカニズムが存在する可能性の検証と KUS を用いた疾患モデルへの介入実験を行い、以下の点を明らかにした。

○飢餓時に VCP が特殊な構造体を形成するメカニズムとその意義の解明。

HEK 細胞を飢餓状態にすると VCP が繊維状の構造体 (以下 VCP ファイバーと呼ぶ) に変化することを見いだしていたことを受け、その形成に必要な栄養素と細胞内タンパク質の検索を行った。その結果、VCP ファイバーの形成は脂肪酸の欠乏によること、この形成にはビメンチンとチュブリンが必要であることを見いだした。また、ビメンチンとチュブリンをノックダウンした HEK 細胞では、VCP ファイバーが形成されないばかりか、飢餓時に ATP の急激な減少が引き起こされることが観察された。以上のことから、細胞は、脂肪酸の減少から飢餓を感知し、VCP ファイバーを形成することで、VCP の ATPase 活性を抑制し、細胞全体としての ATP の消費を抑制していることが考えられた。

一方、PC3 など幾つかの癌細胞を飢餓状態にすると VCP は細胞内でドット状の構造体 (以下、VCP ドットと呼ぶ) をとることが見いだされた。上記と同様に、この VCP ドットの形成に必要な栄養素の検索を行った。その結果、このドット状の構造体は、アミノ酸の欠乏が引き起こしていること、さらに、これらの癌細胞は、この VCP ドットを形成することで、アミノ酸欠乏による細胞死を回避している可能性を見いだした。

○KUS を用いた疾患モデル動物への介入実験。

KUS は、VCP の ATP の消費を抑制して細胞内 ATP の減少を抑制する効果を持つが、細胞内の ATP 量を維持するためには、ATP の産生を増強することも重要である。そこで、細胞内の ATP の産生を増強する化合物として、ERR(estrogen receptor-related receptor) と呼ばれる核内受容体を活性化する化合物をスクリーニングし、エスクレチンを同定した。そして、我々は、KUS とエスクレチンを併せて「ATP 制御薬」と呼ぶこととした。

ドーパミン神経細胞様の PC12 細胞に対し、MPTP の代謝物で、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体 I を阻害することで神経毒性を示す化合物 MPP+ (1-methyl-4-phenyl-pyridinium) を添加したところ、ATP の減少と ER ストレスが誘起され、その後、細胞が死滅した、この時、「ATP 制御薬」を添加すると、容量依存的に ATP の減少、ER ストレス、細胞死が抑制された。

次に、MPTP 誘導性のパーキンソン病モデルマウスに対し、パーキンソン病様の症状を再現性よく誘導する MPTP の投与量の設定をおこなった。その後、MPTP 投与による中脳黒質のドーパミン神経の細胞死に対し、ATP 制御薬 (KUS もしくはエスクレチン) が抑制効果を示すかどうかの検証を行った。結果、MPTP を投与したマウスは、ロータロッド試験で運動機能低下が観察されたが、ATP 制御薬の投与によって、この運動機能低下が有意に抑制

された。MPTPを投与したマウスの中脳黒質では、抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体で染色されるドーパミン神経細胞数の減少が観察されたが、その減少はATP制御薬の投与によって抑制された。以上の結果は、KUSとエスクレチンは、予想を超えた類似性で、培養細胞及びマウスのパーキンソン病モデルの病態の改善をもたらすことを示している。さらに、MPTPの投与によって、中脳黒質のドーパミン神経細胞内に α シヌクレイン蛋白質の顕著な蓄積が観察され、その蓄積が、KUSもしくはエスクレチンの投与によってほぼ完全に消失した。これらの結果から、 α シヌクレイン蛋白質の凝集体であるLewy小体の存在は、かつてATPの減少が脳内のその部位に起こったことを示唆していると考えられた。

他の疾患動物モデルとして、心筋梗塞と脳梗塞の動物モデルに対して、KUSの投与実験を行った。結果、KUSの投与によって、心筋梗塞モデルにおける心筋の梗塞領域が抑制できることに加え、心拍出量の低下に代表される心機能低下も抑制できることが明らかになった。さらに、KUSの投与によって脳梗塞領域も抑制できることも明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

- ① Nakano N, Ikeda HO, Hasegawa T, Muraoka Y, Iwai S, Tsuruyama T, Nakano M, Fuchigami T, Shudo T, Kakizuka A, Yoshimura N. (2016) Neuroprotective effects of VCP modulators in mouse models of glaucoma. *Heliyon*. 2016 Apr 19;2(4):e00096. doi:10.1016/j.heliyon.2016.e00096.
- ② Ikura M, Furuya K, Fukuto A, Matsuda R, Adachi J, Matsuda T, Kakizuka A, Ikura T. Coordinated Regulation of TIP60 and Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 in Damaged-Chromatin Dynamics. *Mol Cell Biol*. 2016 May 2;36(10):1595-607. doi: 10.1128/MCB.01085-15.
- ③ Hasegawa T, Muraoka Y, Ikeda HO, Tsuruyama T, Kondo M, Terasaki H, Kakizuka A, Yoshimura N. Neuroprotective efficacies by KUS121, a VCP modulator, on animal models of retinal degeneration. *Sci Rep*. 2016 Aug 9;6:31184. doi: 10.1038/srep31184.
- ④ Yoshida T, Kakizuka A, Imamura H. BTeam, a novel BRET-based biosensor for the accurate quantification of ATP concentration within living cells. *Sci Rep*. 2016 Dec 21;6:39618. doi: 10.1038/srep39618.
- ⑤ Hata M, Ikeda HO, Kikkawa C, Iwai S, Muraoka Y, Hasegawa T, Kakizuka A, Yoshimura N. KUS121, a VCP modulator, attenuates ischemic retinal cell death via suppressing endoplasmic reticulum stress. *Sci Rep*. 2017 Mar 20;7:44873. doi: 10.1038/srep44873.
- ⑥ Nakano M, Imamura H, Sasaoka N, Yamamoto M, Uemura N, Shudo T, Fuchigami T, Takahashi R, Kakizuka A. ATP Maintenance via Two Types of ATP Regulators Mitigates Pathological Phenotypes in Mouse Models of Parkinson's Disease. *EBioMedicine*. 2017 Aug;22:225-241. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.07.024.
- ⑦ Konagaya Y, Terai K, Hirao Y, Takakura K, Imajo M, Kamioka Y, Sasaoka N, Kakizuka A, Sumiyama K, Asano T, Matsuda M. A Highly Sensitive FRET Biosensor for AMPK Exhibits Heterogeneous AMPK Responses among Cells and Organs. *Cell Rep*. 2017 Nov 28;21(9):2628-2638. doi:10.1016/j.celrep.2017.10.113.
- ⑧ Matsubara M, Kanda H, Imamura H, Inoue M, Noguchi M, Hosoda K, Kakizuka A, Nakao K. Analysis of mitochondrial function in human induced pluripotent stem cells from patients with mitochondrial diabetes

- due to the A3243G mutation. *Sci Rep.* 2018 Jan 17;8(1):949.
doi: 10.1038/s41598-018-19264-7.
- ⑨ Hasegawa T, Ikeda HO, Iwai S, Muraoka Y, Tsuruyama T, Okamoto-Furuta K, Kohda H, Kakizuka A, Yoshimura N. Branched chain amino acids attenuate major pathologies in mouse models of retinal degeneration and glaucoma. *Heliyon.* 2018 Mar 1;4(2):e00544. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00544. Erratum in: *Heliyon.* 2018 Aug 21;4(8):e00739.
- ⑩ Muraoka Y, Iida Y, Ikeda HO, Iwai S, Hata M, Iwata T, Nakayama M, Shimozawa N, Katakai Y, Kakizuka A, Yoshimura N, Tsujikawa A. KUS121, an ATP regulator, mitigates chorioretinal pathologies in animal models of age-related macular degeneration. *Heliyon.* 2018 May 14;4(5):e00624. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00624.
- ⑪ Nie X, Kitaoka S, Tanaka K, Segi-Nishida E, Imoto Y, Ogawa A, Nakano F, Tomohiro A, Nakayama K, Taniguchi M, Mimori-Kiyosue Y, Kakizuka A, Narumiya S, Furuyashiki T. The Innate Immune Receptors TLR2/4 Mediate Repeated Social Defeat Stress-Induced Social Avoidance through Prefrontal Microglial Activation. *Neuron.* 2018 Aug 8;99(3):464-479.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2018.06.035.
- ⑫ Tanaka S, Yoshioka S, Nishida K, Hosokawa H, Kakizuka A, Maegawa S. In vivo targeted single-nucleotide editing in zebrafish. *Sci Rep.* 2018 Jul 30;8(1):11423. doi: 10.1038/s41598-018-29794-9.
- ⑬ Sasaoka N, Imamura H, Kakizuka A. A Trace Amount of Galactose, a Major Component of Milk Sugar, Allows Maturation of Glycoproteins during Sugar Starvation. *iScience.* 2018 Dec 21;10:211-221. doi: 10.1016/j.isci.2018.11.035. Epub 2018 Nov 23.
- ⑭ Alfaqaan S, Yoshida T, Imamura H, Tsukano C, Takemoto Y, Kakizuka A. PPAR α -Mediated Positive-Feedback Loop Contributes to Cold Exposure Memory. *Sci Rep.* 2019 Mar 14;9(1):4538. doi: 10.1038/s41598-019-40633-3.
- [学会発表] (計 4 件)
- ① 垣塚 彰「ATP 制御による難治性疾患の予防・治療戦略」第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会合同年会(招待講演) 2016 年 9 月 9 日 福岡国際会議場(福岡市)
- ② 垣塚 彰「難病への挑戦:Challenges against incurable diseases」第 19 回 京大生命科学研究科シンポジウム 2017 年 2016 年 7 月 6 日 京都大学 (京都市)
- ③ 垣塚 彰「ATP 制御による包括的な疾患の予防・治療戦略:Comprehensive therapeutic strategies for diseases by ATP regulations」第 90 回日本生化学会大会 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会) 2017 年 12 月 7 日 神戸国際会議場 (神戸市)
- ④ 垣塚 彰「難治性疾患の克服への挑戦」京都大学第 2 回創薬医療シンポジウム、第 5 回バイオ・フロンティア・プラットフォームシンポジウム「オープンイノベーションから創薬へ」 2018 年 6 月 4 日 京都大学 (京都市)
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 7 件)
- ①名称: 眼用医薬組成物
発明者: 垣塚彰、池田華子、吉村長久、須田謙史、三輪裕子、村上達也
権利者: 国立大学法人京都大学
種類: 特許
番号: 特願 2016-125860
出願日: 平成 28 年 6 月 24 日
国内外の別: 国内

②名称：眼用医薬組成物

発明者：垣塚彰、池田華子、吉村長久、須田謙史、三輪裕子、村上達也

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：PCT/JP2017/023170

出願日：平成 29 年 6 月 23 日

国内外の別： 国外

③名称：角膜保護の組成物

発明者：垣塚彰、池田華子、木下茂、中村隆宏、永田真帆、小泉範子、野村直毅

権利者：国立大学法人京都大学、京都府公立大学法人、学校法人同志社

種類：特許

番号：特願 2017-251839

出願日：平成 29 年 12 月 27 日

国内外の別： 国内

④名称：角膜保護の組成物

発明者：垣塚彰、池田華子、木下茂、中村隆宏、永田真帆、小泉範子、野村直毅

権利者：国立大学法人京都大学、京都府公立大学法人、学校法人同志社

種類：特許

番号：PCT/JP2018/27749

出願日：平成 30 年 12 月 26 日

国内外の別： 国外

⑤名称：心筋細胞の保護用の医薬組成物

発明者：垣塚彰、尾野亘、堀江貴裕、井手裕也、斉藤成達、木村剛

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：特願 2018-078272

出願日：平成 30 年 4 月 16 日

国内外の別： 国内

⑥名称：心筋細胞の保護用の医薬組成物

発明者：垣塚彰、尾野亘、堀江貴裕、井手裕也、斉藤成達、木村剛

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：PCT/JP2019/16083

出願日：平成 31 年 4 月 15 日

国内外の別： 国外

⑦名称：脳梗塞の処置用の医薬組成物

発明者：垣塚彰、木下久徳、眞木崇州、高橋良輔

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：特願 2018-143437

出願日：平成 30 年 7 月 31 日

国内外の別： 国内

○取得状況（計 0 件）

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：今村博臣

ローマ字氏名：Hiromi Imamura

研究協力者氏名：笹岡紀男

ローマ字氏名：Norio Sasaoka

研究協力者氏名：杉山悠真

ローマ字氏名：Yuma Sugiyama

研究協力者氏名：中野将希

ローマ字氏名：Masaki Nakano