

平成30年6月11日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15230

研究課題名(和文)ケミカルバイオロジーを用いた新規オートファジー制御機構の開発

研究課題名(英文)Development of small compounds that induce alternative autophagy

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、細胞が自己成分を消化し、新陳代謝などに貢献する機構である。新規オートファジー(Atg5を利用しないオートファジー)の変調は、貧血、神経変性疾患、皮膚炎、炎症性腸疾患など様々な疾患の原因となりうる。本研究では、新規オートファジーを誘導できる低分子化合物/天然物から、種々の疾患治療に資する化合物/天然物の同定を目的として研究を行なった。その結果、がん、ポリグルタミン病、タウオパチーに対して有効性を示す化合物を各々3種類、2種類、2種類開発できた。また、脂肪肝に対して有効性を示す天然物を2種類同定できた。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a cellular function that degrades subcellular constituents to contribute cellular homeostasis. The defect of alternative autophagy (Atg5-independent autophagy) may cause various diseases, such as anemia, neurodegenerative diseases, dermatitis, and colitis. In this study, we aimed to identify small chemical compounds/natural compounds that activate alternative autophagy and improve various diseases. As a result, we identified three anti-cancer compounds, two anti-polyglutamine disease compounds, and two anti-tauopathy compounds. We also identified two anti-fatty liver natural compounds.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ケミカルバイオロジー オートファジー 実験病理学

1. 研究開始当初の背景

オートファジーとは、リソソームを利用して自己構成成分を分解するマシナリーであり、細胞の新陳代謝や細胞浄化などに決定的な役割を果たしている。従来、オートファジーの実行には 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。一方、新規オートファジーは、Atg5/Atg7 を使わずに実行されるオートファジーとして、我々が発見した細胞機能である。その後の研究で、新規オートファジーは、①酵母細胞から哺乳動物細胞まで種を越えて保存されていること、②新規オートファジーと Atg5 依存的オートファジーは役割を分担していること、③赤血球の最終分化をはじめ、様々な生理現象に関わっていること、などが明らかにされてきた。即ち、新規オートファジーは、生体にとって欠かすことができない細胞機能である。

特定の細胞機能に関わる低分子化合物を同定してケミカルバイオロジーの手法を用いることにより、細胞機能を制御している分子の同定や病態メカニズムの解明が可能になると共に、医薬品開発への応用も可能となる。我々は、これまでに2万種類の低分子化合物ライブラリーから、82種類の新規オートファジー誘導化合物を同定している。

2. 研究の目的

本研究では、現在保有している82種類の新規オートファジー誘導化合物の中から、疾患モデルマウスの病態改善に効果がある化合物を同定すること、その化合物の標的分子を明らかにして薬理機能を解析することを目的として研究を行なった。

3. 研究の方法

(1)病態モデル細胞でのスクリーニング

[1]神経変性疾患: ポリグルタミン病やタウオパチーなどの神経変性疾患を模倣したモデル細胞に対して、種々の新規オートファジー誘導化合物を投与した。具体的には、テトラサイクリン誘導性にポリグルタミンタンパク質を発現するPC12細胞、タウタンパク質を過剰発現したNeuro2a細胞に対して、82種類の化合物を投与し、ポリグルタミンタンパク質あるいはタウタンパク質を減少させる化合物を探索した。

[2]がん: 新規オートファジーは一般的に細胞

生存に寄与するが、無制限に活性化すると細胞死を誘導する場合がある。そこで、正常線維芽細胞とがん細胞株に対して、82種類の化合物を投与し、がん細胞株特異的に殺細胞効果のある化合物を探索した。

[3]炎症性腸疾患: 2000種類の天然物ライブラリーを、腸管上皮細胞株であるCaco2細胞に投与し、新規オートファジーを誘導できる天然物を探索した。

[4]脂肪肝: パルミチン酸投与肝細胞に新規オートファジー誘導化合物を投与し、脂肪的現象効果のある化合物を探索した。

[5]紫外線誘導性皮膚炎: 2000種類の天然物ライブラリーを、皮膚細胞株であるHacat細胞に投与し、新規オートファジーを誘導できる天然物を探索した。

(2)病態モデルマウスでの有効性検討

[1]神経変性疾患: ポリグルタミン病モデルマウスやタウオパチーモデルマウスの脳室内に新規オートファジー誘導化合物を投与し、その有効性を検討した。

[2]がん: 担がんマウスの腹腔内に新規オートファジー誘導化合物を投与し、その抗がん作用を検討した。

[3]炎症性腸疾患: DSS誘導性腸炎マウスに、新規オートファジー誘導天然物を経口投与し、腸炎を緩和できる天然物を探索した。

[4]脂肪肝: 高脂肪食摂取マウスに新規オートファジー誘導天然物を経口投与し、抗脂肪効果を示す天然物を探索した。

4. 研究成果

約25000種類の低分子化合物ライブラリーと約2000種類の天然物ライブラリーから、新規オートファジー誘導化合物/天然物を同定した。具体的には、化合物を86種類、天然物を23種類同定した。その後、これらの化合物/天然物を、がん、神経変性疾患、炎症性腸疾患、紫外線誘導性皮膚炎、脂肪肝などのin vitro病態モデル細胞に投与し、その有効性を検討した。その結果、各々4種類、4種類、2種類、10種類、10種類の新規オートファジー誘導化合物/天然物において、細胞レベルでの有効性が認められた。

これらのうち、がん、神経変性疾患に有効性を発揮した化合物に関しては、さらに化合物の合成展開を行なった。その結果、担がん

マウス、ポリグルタミン病モデルマウス、タウオパチーモデルマウスに対して抗がん作用、抗神経変性作用を発揮する化合物を各々3種類、2種類、2種類開発することができた。また、脂肪肝に関しては、2種類の天然物においてマウスの個体レベルでの有効性を確認できた。これらの結果より、化合物/天然物を用いて新規オートファジーを誘導することに、種々の疾患治療が可能であることが示された。

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28件)以下は査読あり

- (1) Nagata M, Arakawa S, Yamaguchi H, Torii S, Endo H, Tsujioka M, Honda S, Nishida Y, Konishi A, Shimizu S. *Dram1 regulates DNA damage-induced alternative autophagy.* **Cell Stress** 2,2018.55-65; doi:10.15698/cst2018.03.127
- (2) Iwashita H, Tajima-Sakurai H, Nagahora N, Ishiyama M, Shioji K, Sasamoto K, Okuma K, Shimizu S, Ueno Y. *Fluorescent small molecules for monitoring autophagic flux.* **FEBS Let.** 592,2018.559-567;doi:10.1002/1873-3468.12979.
- (3) Yamaguchi T, Suzuki T, Sato T, Takahashi A, Watanabe H, Kadowaki A, Natsui M, Inagaki H, Arakawa S, Nakaoka S, Koizumi Y, Seki S, Adachi S, Fukao A, Fujiwara T, Natsume T, Kimura A, Komatsu M, Shimizu S, Ito H, Suzuki Y, Penninger J-M, Yamamoto T, Imai Y, Kuba K. *The CCR4-NOT deadenylase complex controls Atg7-dependent cell death and heart function.* **Scientific Signalling** 11,2018. pii:eaan3638;doi:10.1126/scisignal.aan3638.
- (4) Yotsumoto S, Muroi Y, Chiba T, Ohmura R, Yoneyama M, Magarisawa M, Dodo K, Terayama N, Sodeoka M, Aoyagi R, Arita M, Arakawa S, Shimizu S, Tanaka M. *Hyperoxidation of ether-linked phospholipids accelerates neutrophil extracellular trap formation.* **Scientific Reports** 7,2017. Article number:16026;doi:10.1038/s41598-017-15668-z
- (5) Kanemoto K, Sugimura Y, Shimizu S, Yoshida S, Hosoya T. *Rhodium-catalyzed odorless synthesis of diaryl sulfides from borylarenes and S-aryl thiosulfonates.* **Chem. Commun.** 53,2017. 10640-10643;doi:10.1039/C7CC05868C
- (6) Iwashita H, Torii S, Nagahora N, Ishiyama M, Shioji K, Sasamoto K, Shimizu S, Okuma K. *Live Cell Imaging of Mitochondrial Autophagy with a Novel Fluorescent Small Molecule.* **ACS Chemical Biology** 12,2017.2546-2551; doi:10.1021/acscchembio.7b00647.
- (7) Asano J, Sato T, Ichinose S, Kajita M, Onai N, Shimizu S, Ohteki T. *Intrinsic autophagy is required for the maintenance of intestinal stem cells and for irradiation-induced intestinal regeneration.* **Cell Reports** 20,2017. 1050-1060;doi:10.1016/j.celrep.2017.07.019.
- (8) Arakawa S, Tsujioka M, Yoshida T, Tajima-Sakurai H, Nishida Y, Matsuoka Y, Yoshino I, Tsujimoto Y, Shimizu S. *Role of Atg5-dependent cell death in the embryonic development of *Bax/Bak* double-knockout mice.* **Cell death and differ.**24,2017.1598-1608;doi:10.1038/cdd.2017.84.
- (9) Kozaki T, Komano J, Kanbayashi D, Takahama M, Misawa T, Satoh T, Takeuchi O, Kawai T, Shimizu S, Matsuura Y, Akira S, Saitoh T. *Mitochondrial damage elicits a TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase-mediated antiviral response.* **Proc Natl. Acad. Sci. USA** 114,2017.2681-2686;doi:10.1073/pnas.1621508114.
- (10) Watanabe Y, Honda S, Konishi A, Arakawa S, Murohashi M, Yamaguchi H, Torii S, Tanabe M, Tanaka S, Warabi E, Shimizu S. *Autophagy controls centrosome number by degrading Cep63.* **Nature Commun** 7,2016. Article number:13508;doi:10.1038/ncomms13508.
- (11) Torii S, Yoshida T, Arakawa S, Honda S, Nakanishi A, Shimizu S. *Identification of PPM1D as an essential Uik1 phosphatase for genotoxic stress-induced autophagy.* **EMBO R** 11,2016.1552-1564;doi:10.15252/embr.201642565
- (12) Konishi A, Izumi T, Shimizu S. *TRF2 interacts with core Histones to stabilize chromosome ends.* **J. Biol. Chem.** 291,2016.20798-810;doi:10.1074/jbc.M116.719021.

- (13) Yamaguchi H, Arakawa S, Kanaseki T, Miyatsuka T, Fujitani Y, Watada H, Tsujimoto Y, Shimizu S. Golgi membrane-associated degradation pathway in yeast and mammals. *EMBO J.* 35,2016.1991-2007;doi: 10.15252/embj.201593191.
- (14) Nasu Y, Benke A, Arakawa S, Yoshida G, Kawamura G, Manley S, Shimizu S, Ozawa T. In situ characterization of Bak clusters responsible for cell death using single molecule localization microscopy. *Scientific Reports* 6,2016. Article number:27505; doi: 10.1038/srep27505.
- (15) Yoshida T, Tsujioka M, Honda S, Shimizu S. Autophagy suppresses cell migration by degrading GEF-H1, a RhoA GEF. *Oncotarget* 7,2016.34420-9;doi: 10.18632/oncotarget.8883.

[学会発表](計 21件)

- (1) Shimizu S: "Identification of natural product against fatty liver disease based on the induction of alternative autophagy" ICNIM2016 (July 15-17, 2016, Sapporo, Japan)
- (2) Shimizu S: "Alternative Autophagy is Essential for Neuronal Cell Maintenance" Brain Protein Aging and Dementia Control International Workshop (Sep 9, 2016, Nagoya)
- (3) Shimizu S: "Mitophagy and alternative autophagy" The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (Oct 31, 2016, Shinagawa)
- (4) 清水重臣: 「Macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes」第78回日本血液学会、招待(2016/10/13 横浜)
- (5) 本田真也、清水重臣: 「オートファジーによる中心体タンパク質 Cep63 の分解を介した中心体数の制御」第10回オートファジー研究会 (2016/11/14 上越)
- (6) 辻岡政経、吉田達士、本田真也、田中正人、清水重臣: 「RhoA 活性化因子 GEF-H1 の分解を介したオートファジーの細胞運動制御」第10回オートファジー研究会 (2016/11/14 上越)
- (7) 山口啓史、荒川聡子、金関恵、清水重臣: 「ゴルジ膜を用いたタンパク質分解機構の解析」第10回オートファジー研究会 (2016/11/14 上越)
- (8) 鳥居 暁、吉田達士、荒川聡子、本田真也、清水重臣: 「DNA 傷害誘導性オートファジーを制御する PPM1D 分子の役割」第10回オートファジー研究会、(2016/11/14 上越)
- (9) 荒川聡子、清水重臣: 「ゴルジ体を介したタンパク質分解システムの発見」第10回オートファジー研究会 (2016/11/14 上越)
- (10) 山口啓史、荒川聡子、金関恵、清水重臣: 「ゴルジ膜を用いたタンパク質分解機構の解析」第39回分子生物学会 (2016/11/30-12/2 横浜)
- (11) 荒川聡子、山口啓史、金関恵、清水重臣: 「ゴルジ体を介したタンパク質分解システムの発見」第39回分子生物学会 (2016/11/30-12/2 横浜)
- (12) 藤掛伸宏、山口啓史、荒川聡子、清水重臣: 「脳における Atg5/Atg7 非依存的オートファジーの役割」第39回分子生物学会(2016/11/30-12/2 横浜)
- (13) 鳥居 暁、吉田達士、荒川聡子、清水重臣: 「DNA 傷害誘導性オートファジーを制御する PPM1D 分子の役割」第39回分子生物学会(2016/11/30-12/2 横浜)
- (14) 本田 真也、渡辺雄一郎、小西昭充、室橋道子、荒川聡子、山口啓史、清水重臣: 「オートファジーによる Cep63 の分解を介した中心体数の制御」第39回分子生物学会(2016/11/30-12/2 横浜)
- (15) 砂田麻里子、山口啓史、荒川聡子、清水重臣: 「新規マクロオートファジー経路で働く AAG3 の機能解析」第39回分子生物学会(2016/11/30-12/2 横浜)
- (16) 遠藤葉月、辻岡政経、清水重臣: 「アポトーシス非依存的な新規アノキス機構の発見」第39回分子生物学会 (2016/11/30-12/2 横浜)
- (17) 清水重臣: 「新規オートファジーを介した神経変性疾患治療薬の開発研究」第1回武田薬品 COCKPI-T 発表会、招待 (2017/6/28 藤沢)
- (18) 清水重臣: 「オートファジーが関わる細胞死」日本 Cell Death 学会、招待 (2017/6/28 大田区)
- (19) 清水重臣: 「新規オートファジーの分子機構とその破綻による疾患」第22回日本病態プロテアーゼ学会、招待 (2017/8/11 吹田市)
- (20) 清水重臣: 「オートファジーの世界」第45回日本臨床免疫学会総会、招待 (2017/9/29 新宿区)
- (21) 清水重臣: 「Development of molecularly targeted anticancer agents based on the regulation of autophagic cell death」第76回日本癌学会(2017/9/30 横浜)

〔その他〕
ホームページ等
病態細胞生物学分野ホームページ
<http://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/index.html>

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