

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06684

研究課題名(和文)新規ミトコンドリア因子に着目した慢性炎症性疾患の創薬・育薬研究

研究課題名(英文)A drug discovery and fostering research for chronic inflammatory diseases from a viewpoint of a novel mitochondrial factor

研究代表者

新谷 紀人(Norihito, Shintani)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：10335367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、慢性炎症性疾患に対する創薬・育成研究を、新規ミトコンドリア因子p13の観点から推進することを目的に実施した。創薬研究としては、p13が膵ラ氏島と関連した血糖値制御システムの異常に関与することを示すと共に、脂肪組織や生殖器、脳や頭蓋骨などの萎縮や変性などいわゆる“組織形成の異常”に対する創薬標的となることを明らかにした。また、p13欠損マウスを疾患モデル動物として用いる場合のボトルネックとなる繁殖性の低さについても解消することができた。一方、育薬研究としては、p13の発現誘導化合物harmineが抗がん剤として利用できることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では糖尿病や神経変性疾患との関連が示唆されている一方、その機能解明がほとんど進んでいないミトコンドリア因子p13に注目した研究を推進した。その結果、p13は膵臓を中心とした血糖値制御の異常に深く関与することが示されると共に、脂肪や生殖器、頭蓋骨などの“組織形成の異常”に対する新薬の創出にとって、重要な研究対象になることが明らかになった。また本研究によって、p13を増やす性質をもつ化合物harmineが抗がん剤として利用できる可能性も示された。このようにp13に関する創薬・育薬研究が推進された。

研究成果の概要(英文)：This research was conducted to promote a drug discovery and fostering research for chronic inflammatory diseases from a viewpoint of a novel mitochondrial factor p13. As a drug discovery research, p13 was shown to be involved in abnormalities in the pancreatic islets-related blood glucose control system, and furthermore, was characterized as a possible drug target for "abnormal tissue formation" including the atrophy/degeneration of adipose tissue, genital organs, brain, and skull. This study also solved the low producibility of p13 knockout mice, which is bottleneck for the research using the mutant as a disease model animal. On the other hand, as a drug fostering research, we have obtained results suggesting that the p13 expression inducer "harmine" could be used as an anticancer drug.

研究分野：分子薬理学

キーワード：ミトコンドリア 疾患モデル動物 生後致死性 神経細胞死 糖脂質代謝 組織形成 Harmine

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来に伴い、代謝性疾患や神経変性疾患など、慢性炎症性疾患に対する新規治療薬開発が喫緊の課題となっている。研究代表者らはこれまで、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスなど遺伝子改変動物の作製と利用を通じ、分子量 13 kDa の新規ミトコンドリア因子 p13 が、2 型糖尿病病態下の膵ラ氏島や、パーキンソン病病態下の脳ドパミン神経の機能制御に関与することを明らかにした (Higashi et al. 2015, Inoue et al. 2018a)。また p13 遺伝子のプロモーター解析の過程で、p13 mRNA の発現促進因子として PGC1-alpha を同定すると共に、既知の化合物ライブラリーを用いた検討で、p13 の発現誘導/抑制化合物を数種同定した (Inoue et al. 2018b)。これらの結果は、p13 に注目した研究が、脳や膵臓における新規創薬標的・薬物作用機序の研究として有用であることを示すと共に、その発現制御化合物に関する研究が、いわゆる慢性炎症性疾患の治療への適用を目指したドラッグリポジショニングに資する、育薬研究としても有用になることを示すと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では特に脳と膵臓における新規ミトコンドリア因子 p13 に着目した *in vivo/in vitro* の研究を通じて p13 の生理・病態的役割の詳細を明らかにすると共に、特に、神経変性疾患や糖尿病など慢性炎症性疾患の創薬・育薬研究の推進を目的として実施した。

3. 研究の方法

大阪大学組換え DNA 実験委員会・動物実験委員会で承認された計画に従って実施した。

(1)脳神経関連： p13 の遺伝子欠損マウス (p13-KO) や培養細胞を用いて、*in vivo/in vitro* のパーキンソン病モデル等での検討を行った。Inoue et al. 2018a (EMBO Rep) の方法に従って *in vivo* モデルを作製し、脳グリア細胞の活性化について活性化アストロサイトマーカーの GFAP や活性化ミクログリアマーカー Iba1 の発現を指標に検討した。*In vitro* モデルではヒト由来神経芽細胞腫の SH-SY5Y 細胞を用い、Inoue et al. 2018b (BBRC) で同定した種々の化合物について PARP (Poly ADP-ribose polymerase) の切断を指標にしたアポトーシスの判定や、qPCR 法による p13 mRNA 発現変動の解析を行い、それぞれの化合物の特性や分子機構を解析した。

(2)繁殖性など： Inoue et al. 2018a で報告したように p13-KO は生後早期に一定の致死性を示すが、様々な要因を併せると、c57BL/6 の遺伝的背景における生存率は約 1 割程度であることが明らかになった (後述)。p13 の創薬・育薬研究にとって、p13-KO の利用は疾患モデル動物として極めて重要になることから、本研究では p13-KO の繁殖性・生存率・行動表現型の詳細を解析すると共に、その繁殖性の向上を目指して、p13-KO の致死性改善に関する検討を行った (抗酸化剤投与、骨化促進剤投与、遺伝的背景の変更 (Balb/c, ICR との 5 回の戻し交配))。また精巣や卵巣等についても若干の解析を加えた。

(3)糖尿病関連： Higashi et al. 2015 の方法に従って、p13-KO マウス膵組織切片を作製し、膵島サイズを解析した。さらに同切片を抗インスリン抗体や抗グルカゴン抗体で染色する解析も行った。また糖恒常性に関わる他の組織として、心臓と脂肪に着目した検討も行った。組織重量や組織切片の解析を行うと共に、同サンプル中の mRNA 発現について qPCR による半網羅的解析を行った。また *in vivo* の検討としてグルコースやインスリンの負荷試験を行う一方、*in vitro* の検討としてはマウス線維芽細胞腫の 3T3-L1 を用いた脂肪細胞分化系での検討も行った。

4. 研究成果

(1)脳神経関連： パーキンソン病モデル (MPTP 投与モデル) における検討から、p13 ヘテロ欠損マウスでは、ドパミン神経細胞死が著明に軽減される一方で、グリア細胞の活性化は野生型とほぼ同等であることが確認された。例えば野生型マウスの脳黒質におけるミクログリアの活性化に関するスコアは MPTP 投与 1~3 日後で最大となるが、これらのスコア上昇の程度は p13 ヘテロ欠損マウスでも同程度であり、遺伝子型間で有意な差は認められなかった。なおホモ欠損マウスの解析から、p13-KO では脳や小脳の重量が若干ながら減少していることが見いだされた。一方で p13 の発現制御化合物に関する *in vitro* における検討では、harmine を初めとするいくつかの化合物で p13 の発現制御に関する用量依存性が確認された。またヒト膵細胞の増殖促進作用に harmine-DYRK1A 系が関わるという知見 (Wang et al. 2015) に従って神経系での検討を行ったところ、harmine-DYRK1A 系は少なくとも SH-SY5Y 細胞ではアポトーシス誘導に関与することが示唆された。例えば harmine と骨格が類似する harmarine では p13 の発現誘導が起こらない一方、DYRK1A 阻害剤 (INDY) の投与では harmine と同様に p13 の用量依存的な発現誘導が起こること、また harmine や INDY は単独あるいは rotenone との併用によって SH-SY5Y 細胞のアポトーシス誘導を促進することを明らかにした。

以上により、パーキンソン病病態下において p13 はグリア細胞よりもむしろ神経細胞の生理病態に深く関わること、内因性の p13 は *in vivo* での生理的な脳組織形成に関与することが示された。また p13 の発現誘導化合物として harmine に加え INDY が同定され、これら化合物の抗神経芽細胞腫剤 (抗がん剤) としての適用が示唆された。

(2)致死性など： c57BL/6 を遺伝的背景に有する p13-K0 (B6:p13-K0) を用いた検討から、同マウスはヘテロ欠損では野生型と遜色ない生存率・繁殖性・行動表現型を示す一方で、ホモ欠損ではこれらが著明に障害されることを見出した。例えば B6:p13-K0 はその 8 割程度が生後 1 日以内に死亡し、かつ全例が 14 週齢までに死亡することがわかった。そこでまず類似の表現型を示す Zfp148 欠損マウスの結果 (Sayin et al, 2013) を参考に、抗酸化剤 N-acetyl-L-cysteine (NAC) を母親に接種させたが、生後の生存率に大きな改善は認められなかった。そこで研究代表者らの過去の研究 (Shintani et al, 2003) を参考に、マウスの遺伝的背景を変更して検討を行った結果、Balb/c や ICR の遺伝的背景では p13-K0 の生後生存率が 5 倍以上となった。しかしいずれの遺伝的背景でも、ホモ欠損マウス特異的な致死性は観察され、その時期は B6 と同じ生後 1 日以内であった。一方この致死性についてこれら 3 種のマウスを用いて検討すると、先ずどの遺伝的背景でも、p13-K0 はメンデルの法則に従った割合で出生し、かつ出生時の胃にはある程度のミルクが蓄えられていた。しかし p13-K0 はいずれの遺伝的背景でも、出産当日の時点において、すでに有意な低体重と低血糖を示すことが明らかになった。また主に ICR:p13-K0 を用いて更なる解析を進めたところ、p13-K0 は幼若期の発声頻度等が少なく、頭蓋骨形成に異常がある (骨が柔らかく、頭蓋骨癒合に異常がある) 傾向を見出した。そこで類似の表現型を示す変異マウスの結果 (Xie et al, 2012) を参考にして副甲状腺ホルモンを母体に皮下投与したところ、非常に興味深いことに、ICR:p13-K0 について生後致死性の改善傾向が認められた。なお B6:p13-K0 や ICR:p13-K0 で 7 週齢の性成熟まで生き残った個体を観察すると、雌雄共に繁殖能力が認められず、かつ自発運動量をはじめ様々な表現型異常を示すことが分かった。そこで組織重量を解析したところ、p13-K0 では全般的に小さくなっており、特に下記の白色脂肪の他、精巣と卵巣の重量が大きく減少していた。また組織切片の解析から、精巣の変性も確認された。以上により、p13-K0 は低体重と低血糖を伴う生後 1 日以内の致死性を示し、これらは遺伝的背景の影響を受けるものの、表現型としては頑強なものであること、さらに、繁殖性が改善された ICR:p13-K0 ではこれらに加え発声や骨形成の異常等も見られ、これらが複合的に関わりあって p13-K0 の生後致死性に関与していることが示唆された。また生殖器の形成異常も併せ、p13-K0 は繁殖性が大きく障害された遺伝子改変動物であることも分かった。

(3)糖尿病関連： 代表者らはこれまで、膵細胞特異的な p13 の過剰発現マウス (p13-bTg) において、高脂肪食負荷条件下選択的な膵島サイズ増大の亢進や経口糖負荷試験における耐糖能の改善を見出している (Higashi et al, 2015)。今回 B6:p13-K0 と ICR:p13-K0 を用いた解析から、通常飼育条件では両マウスとも野生型マウスと比較して膵島サイズが減少することを明らかにした。またインスリンとグルカゴンに着目した検討を行ったところ、非常に興味深いことに、グルカゴン陽性細胞割合が選択的に増加していることを見出した。なお ICR:p13-K0 を用いて経口あるいは腹腔内の糖負荷試験を行うと、いずれも血糖値の上昇が少なく、かつ消失が早くなるという結果を得た。また上述のとおり p13-K0 は生後直後の時点ですでに低体重・低血糖だが、これは 7 週齢の成体でも有意に観察された。しかし定常状態では低血糖を示すのに対し、空腹時の血糖値は野生型マウスと同程度であり、摂食に依存した血糖値異常を示すことが示唆された。またインスリン負荷試験を行ったところ、ICR:p13-K0 では血糖値の抑制作用が長時間続くことが明らかになり、個体内でのインスリンシグナルの亢進が示唆された。一方インスリンの作用標的として心臓と脂肪組織に注目した検討を行ったところ、まず両組織において、少なくとも数種類の遺伝子の発現が p13-K0 で大きく変動するという結果を得た。しかし重量や組織像については、白色脂肪で B6:p13-K0 と ICR:p13-K0 の両方で著明な重量減、さらには脂肪細胞や脂肪滴のサイズの著明な減少を認めたが、心臓では著変が認められなかった。なお褐色脂肪組織でも白色脂肪組織と類似の傾向を認めたが、その程度は白色脂肪組織よりも少なかった。また脂肪細胞の分化という視点から、マウス線維芽細胞種の 3T3-L1 や ICR:p13-K0 由来の線維芽細胞を用いた検討も行ったが、現時点では再現性のある結果は得られていない。以上により、p13-K0 は膵ラ氏島のサイズやグルカゴン陽性細胞割合、白色脂肪組織の形成において著明な異常を示すことが明らかになり、主としてインスリンシグナルの亢進により、低血糖状態に陥りやすい状態になっていることが示唆された。現在、定常時あるいは糖負荷試験時の血中インスリン/グルカゴン濃度の変化について解析を行っているところである。

【まとめ】 以上、新規ミトコンドリア因子 p13 に着目した慢性炎症性疾患の創薬・育薬研究の推進を目的に研究を実施した。期間中に COVID-19 の流行があり一部の研究が遅れることになったが、予想外の発見を併せ当初の目標以上の成果が得られたと考えている。創薬研究としては、p13 が膵ラ氏を中心とする血糖値制御システムの異常に関わることを示すと共に、予想外の発見として、脂肪組織や生殖器、脳や頭蓋骨など“組織の形成異常”の創薬標的になることを示した。また p13-K0 が低繁殖性であることを多角的に実証すると共に、この疾患モデル動物としてのボトルネック (繁殖性の問題) について、その遺伝的背景を変更することで改善が可能であることを示した。本マウスは今後公的機関に寄託する予定であり、世界中で本マウスを用いた研究が開かれると期待している。一方育薬研究としては、p13 発現誘導剤 harmine について、その抗がん剤としての適用を示唆する結果を得た。しかし本化合物では既に神経保護や膵細胞分化、脂肪細胞分化作用など様々な作用が報告されているため、今後は別の化合物についても同様の育薬研究を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 新谷 紀人、植野 寛貴、中田 正範 | 4. 巻 47(7) |
| 2. 論文標題 ミトコンドリアからの創薬研究 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Medical Science Digest | 6. 最初と最後の頁 52-53 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 新谷 紀人 |
| 2. 発表標題 ミトコンドリア局在タンパク質p13/FMC1に注目した創薬研究 |
| 3. 学会等名 第3回日本比較薬理学毒性学会春季研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 植野 寛貴ほか |
| 2. 発表標題 ミトコンドリア蛋白p13の遺伝子欠損マウスにおけるグルコース恒常性の変化 |
| 3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松尾 若菜ほか |
| 2. 発表標題 ミトコンドリア局在性タンパク質p13欠損マウスの生後早期の致死性 |
| 3. 学会等名 第64回日本神経化学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 新谷 紀人ほか |
| 2. 発表標題 p13欠損マウスの表現型変化に対する遺伝的背景の影響 |
| 3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 原 さとみ ほか |
| 2. 発表標題 ミトコンドリア蛋白p13欠損マウスにおける白色脂肪組織量の減少 |
| 3. 学会等名 日本薬理学会第94回年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 原 さとみ ほか |
| 2. 発表標題 ミトコンドリアタンパクp13欠損マウスの心臓組織の分子解析 |
| 3. 学会等名 日本薬理学会第93回年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 新谷 紀人 ほか |
| 2. 発表標題 ミトコンドリア蛋白p13欠損マウスの生後早期の致死性 |
| 3. 学会等名 日本薬理学会第93回年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Norihiro Shintani, Naoki Inoue, Sae Ogura, Yohei Morota, Hitoshi Hashimoto |
| 2. 発表標題 Reduction of the mitochondria-localized protein p13 protects against experimental parkinsonism |
| 3. 学会等名 18th world congress of basic and clinical pharmacology (WCP2018) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 新谷 紀人、小椋 紗恵、井上 直紀、師田 洋平、植野 寛貴、橋本 均 |
| 2. 発表標題 ミトコンドリア蛋白p13の遺伝子サイレンシングは実験的パーキンソン病モデルに保護的に働く |
| 3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会/第61回日本神経化学会大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小椋 紗恵、井上 直紀、新谷 紀人、笠井 淳司、師田 洋平、植野 寛貴、橋本 均 |
| 2. 発表標題 ミトコンドリア局在蛋白p13遺伝子欠損マウスの表現型変化 |
| 3. 学会等名 第134回日本薬理学会近畿部会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 新谷 紀人、小椋 紗恵、師田 洋平、植野 寛貴、井上 直紀、橋本 均 |
| 2. 発表標題 ミトコンドリア局在蛋白p13遺伝子欠損マウスの表現型解析 |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 植野 寛貴、新谷 紀人、小椋 紗恵、師田 洋平、橋本 均 |
| 2. 発表標題 ミトコンドリア局在蛋白質p13欠損マウスの腓ランゲルハンス島サイズの減少 |
| 3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 新谷 紀人、小椋 紗恵、師田 洋平、植野 寛貴、井上 直紀、橋本 均 |
| 2. 発表標題 ノックアウトマウスを用いたミトコンドリア蛋白質p13の機能解析 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第139年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 新谷 紀人 |
| 2. 発表標題 新規ミトコンドリア蛋白質p13のin vivo機能の解析 |
| 3. 学会等名 第15回関西バイオ創薬研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|----------------------------|-----------------------|------------------|
| 研究協力者 | 植野 寛貴 (Ueno Hiroki) | 大阪大学 (14401) | 研究の補助および実施(学部学生) |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|------------------------------|-----------------------|
| 研究協力者 | 原 さとみ (Hara Satomi) | 大阪大学 (14401) | 研究の補助および実施（学部学生・大学院生） |
| 研究協力者 | 松尾 若菜 (Matsuo Wakana) | 大阪大学 (14401) | 研究の補助および実施（学部学生） |
| 研究協力者 | 師田 洋平 (Morota Yohei) | 大阪大学 (14401) | 研究の補助および実施（学部学生） |
| 研究協力者 | 小椋 紗恵 (Ogura Sae) | | 研究の補助および実施（大学院生） |
| 研究協力者 | 橋本 均 (Hashimoto Hitoshi) (30240849) | 大阪大学・薬学研究科・教授 (14401) | 研究方針の決定に関する助言 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |