

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07422

研究課題名（和文）Basal Autophagyを標的とする神経変性疾患治療薬スクリーニング法開発

研究課題名（英文）Targeting basal autophagy as therapeutic drugs in neurodegenerative diseases

研究代表者

渡邊 義久（Yoshihisa, Watanabe）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：50363990

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：神経変性疾患の新たな治療法の開発を目指し、NanoBiTテクノロジーを用いたオートファジー活性の測定法の構築、培養細胞を用いた神経変性疾患モデルの作製、それを用いた疾患タンパク質凝集体の迅速な測定法の開発を行った。NanoBiTを用いたBeclin1複合体の相互作用の定量化は、バックグラウンドの活性が高く、特異的な結合の定量化は不可能であった。一方、神経変性疾患モデルを作製し、タンパク質の凝集体の蓄積を迅速に解析できるシステムを構築した。タンパク質メタボリズムに関連する遺伝子のKOによって、Tau凝集体の蓄積が認められた。また、オレイン酸が凝集体の蓄積を抑制することも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は神経変性疾患の治療を最終目標に、その基礎となる研究を行った。各種レポーターを利用した神経変性疾患モデルを作製できたことは、今後新たな治療薬のスクリーニングや既存薬等の評価につながる。また、タンパク質メタボリズム関連遺伝子のノックアウトによりタウの蓄積が認められたことから、これらの遺伝子をターゲットに治療法の開発へ応用したい。また、オレイン酸がタウ凝集体形成の抑制に効果があったことから、さらに詳細に分子メカニズムを明らかにし、認知症などの予防法として応用したい。

研究成果の概要（英文）：Aiming to develop new treatments for neurodegenerative diseases, we established a method to measure autophagy activity using NanoBiT technology, created neurodegenerative disease models using cultured cells, and developed a rapid measurement method for disease protein aggregates using these models. Quantification of Beclin1 complex interactions using NanoBiT showed high background activity, making it impossible to quantify specific binding. On the other hand, we created neurodegenerative disease models and established a system that can rapidly analyze the accumulation of protein aggregates. The accumulation of Tau aggregates was observed by knocking out genes related to protein metabolism. Additionally, it was found that oleic acid suppresses the accumulation of aggregates.

研究分野：神経内科学、細胞生物学

キーワード：神経変性疾患 オートファジー 基礎研究 アルツハイマー病 パーキンソン病

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) やパーキンソン病 (PD) などの神経変性疾患の多くは、有害な異常タンパク質が脳内に蓄積することで発症することが知られている。健常者では有害なタンパク質は主にユビキチン・プロテアソーム系やオートファジーによって速やかに除去されるが、加齢、遺伝子異常や生活習慣などによってこれらの除去機能が低下することが発症原因の1つである。従って、薬剤などで有害タンパク質の除去を促進できれば神経変性疾患の有効な治療法になる。研究代表者はオートファジーによる有害タンパク質の除去メカニズムに関する基礎研究を長年行ってきた。オートファジーレセプターp62がPD関連タンパク質  $\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ -Syn) の凝集体の分解に関与することや、p62の活性化(リン酸化)にストレス応答のマスター転写因子であるHSF-1が関与することを解明した。さらに、神経変性疾患の予防や治療にオートファジー機能の亢進が有効であることを明らかにしてきた。PD培養細胞モデルにおいて、Atg5のノックダウンによってオートファジーを阻害すると細胞内レビー小体様  $\alpha$ -Syn 凝集体の蓄積が増加する。また、Rubiconの神経特異的ノックアウトによってBasal Autophagy活性を上昇させると、脳内インジェクションした線維化  $\alpha$ -Syn による病態伝播が抑制できることを明らかにした。従って、長期間 Basal Autophagy 活性を上昇させることができればPDやその他の神経変性疾患の発症を抑制できることが示唆された。

以前より神経変性疾患の治療ターゲットとしてオートファジーは注目されている。オートファジー促進効果のある Rapamycin などが培養細胞やマウスを用いた実験から治療効果があることが複数の研究グループにより報告されている。しかし、これら報告のあった薬剤はほとんど臨床試験が行われていない現状にある。その理由として、Rapamycinには免疫抑制作用があることや、オートファジー活性に対し非常に強い促進作用を有することで細胞死の誘導原因にもなり得る。従って、マイルドで持続的にオートファジー活性を亢進できる薬剤の開発が神経変性疾患の治療に向け重要である。

## 2. 研究の目的

本研究では上記の問題点を解決するために、Basal Autophagy 活性を上昇する薬剤のスクリーニング方法の新規開発とそれを用いた薬剤スクリーニングを行う。オートファジー抑制因子 Rubicon のノックアウトでは  $\alpha$ -Syn 病態の脳内伝播が阻止されたことから、Basal Autophagy 活性の継続的な上昇はPDの病態進行を抑制に効果的である。PI3キナーゼ複合体 (Beclin-1/VPS34/VPS15/Atg14L) はオートファゴソーム形成に必須である。この複合体は Rubicon や Bcl-2 と相互作用することで抑制される。一方、UVRAGは促進させる。そこで、本研究では Beclin-1 とこれら調節因子の相互作用を指標として Basal Autophagy を上昇させる化合物のスクリーニングシステムを開発し、実際に化合物の探索を行う。

また、オートファジーをターゲットにした神経変性疾患の治療法の確立を目指し、神経変性疾患に関する新たなモデル細胞と解析方法を構築する。

## 3. 研究の方法

### NanoBiTを利用したオートファジー活性測定システムの構築

LgBiT-Beclin1, SmBiT-Beclin1, LgBiT-UVRAG, SmBiT-UVRAG, LgBiT-Rubicon, SmBiT-Rubicon のコンストラクトをPCRで作製した。LgBiTとSmBiTの組み合わせで各々の相互作用を測定するために、96-wellマイクロプレートのHEK293ヘプラスミドをコトランスフェクションした後、24時間後にNano-Glo基質を加え、マイクロプレートリーダーで化学発光を測定した。

神経変性疾患モデル細胞の作製とフローサイトメーターによるタンパク質凝集体の測定  
GFP- $\alpha$ -Synuclein, GFP-Tau, GFP-Tau(RD)P301L, GFP-TDP43の発現ベクターをPCRで構築し、HEK293にトランスフェクション後、安定発現株をクローニングした。それぞれのタンパク質の凝集体形成のシードとなるFibrilを*in vitro*で作製した。リポフェクタミンでシードを細胞内に導入してサポニン処理後、凝集体形成をフローサイトメーターで測定した。

### WDR45とG3BPsノックアウト細胞の作製とオートファジー活性の測定

TrueGuide Synthetic gRNA (WDR45: ATGACTCAACAGCCACTTCG, G3BP1: GCTCATGCCACGCTAAATGA, G3BP2: GACAACTACTCCATCACTCA)とTrueCut Cas9 Proteinをミックスし、Lipofectamine CRISPRMAX Cas9 Transfection ReagentでHEK293へ導入した。その後、96-wellプレートに細胞をまき、各クローンをシークエンスしノックアウト細胞を選別した。ノックアウト細胞にオートファジー活性測定用プローブ (GFP-LC3-RFP-LC3 $\Delta$ G) を導入し、安定発現株を作製した。それぞれの細胞のGFPおよびRFPの蛍光強度は、トリプシンで分散した後フローサイトメーターで測定した。なお、オートファジーFluxはBafilomycin A1の有無により同様の解析を行なった。

### WDR45とG3BPsノックアウト細胞におけるタンパク質凝集体の蓄積

WDR45とG3BPsノックアウト細胞にGFP- $\alpha$ -SynucleinまたはGFP-Tau(RD)P301Lレポーター遺伝子を発現し、それぞれのFibrilを導入後、レポーターの凝集体形成をフローサイトメーター

で測定した。

#### オレイン酸による Tau 凝集体蓄積の抑制

HEK293 GFP-Tau(RD)P301L 細胞に Tau Fibril をリポフェクトアミンで導入した後、オレイン酸を培地に添加し、12 時間培養した。トリプシンで細胞を分散してサポニン処理した細胞をフローサイトメータで測定した。

#### 4. 研究成果

##### NanoBiT を利用したオートファジー活性測定システムの構築

LgBiT-Beclin1、SmBiT-Beclin1、LgBiT-UVRAG、SmBiT-UVRAG、LgBiT-Rubicon、SmBiT-Rubicon、LgBiT のみ、SmBiT のみそれぞれの組み合わせでコトランスフェクションして相互作用を測定した。各組み合わせの結果は 1 に示す。ネガティブコントロールである LgBiT-SmBiT の組み合わせでも RLU は高く、本システムはバックグラウンドが高く非常に強い結合を示すターゲットでしか測定が困難であった。

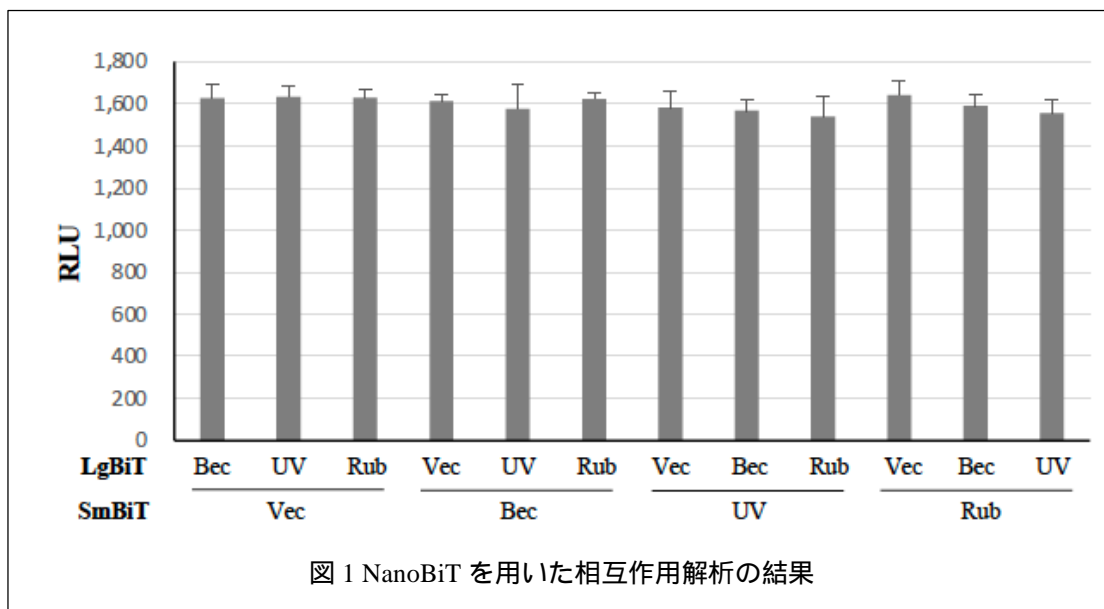


図 1 NanoBiT を用いた相互作用解析の結果

##### 神経変性疾患モデル細胞の作製とフローサイトメータによるタンパク質凝集体の測定

GFP- $\alpha$ -Synuclein、GFP-Tau、GFP-Tau(RD)P301L、GFP-TDP43 レポーター遺伝子を導入した細胞を作製した (図 2) それぞれの細胞に  $\alpha$ -Synuclein, Tau (R3), TDP43 の Fibril を導入した。その結果、GFP- $\alpha$ -Synuclein と GFP-Tau(RD)P301L はシードによる凝集化が観察できた (図 2)。サポニン処理後フローサイトメータで凝集を測定することも可能であった (図 3)。

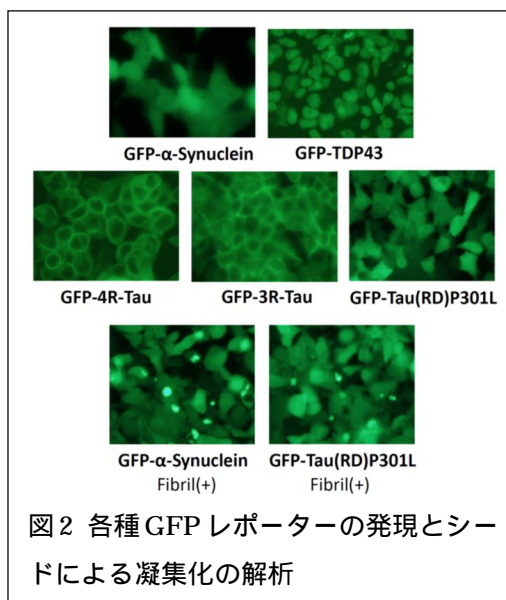


図 2 各種 GFP レポーターの発現とシードによる凝集化の解析

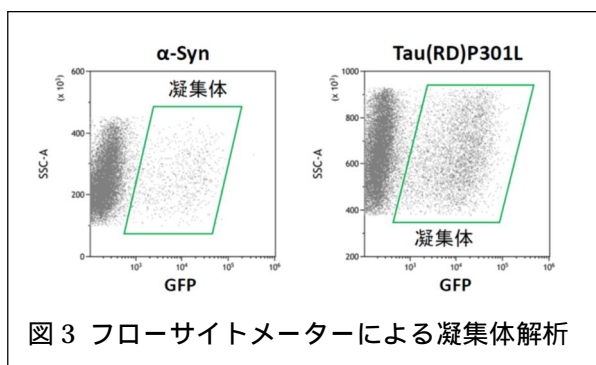


図 3 フローサイトメータによる凝集体解析

##### WDR45 と G3BP<sub>s</sub> ノックアウト細胞の作製とオートファジー活性の測定

CRISPR/Cas9 を利用して WDR45、G3BP1、G3BP2、G3BP1-2 の KO 細胞を作製した。それぞれの細胞に GFP-LC3-RFP-LC3 $\Delta$ G をトランスフェクションして、安定発現株を作製した。オートファジー活性をフローサイトメータで測定したところ、ATG7 KO 細胞ではオートファジー活性の抑制が測定できたが、WDR45 や G3BP1、G3BP2、G3BP1-2 DKO 細胞ではオートファジー活性の低下は認められなかった (図 4)。

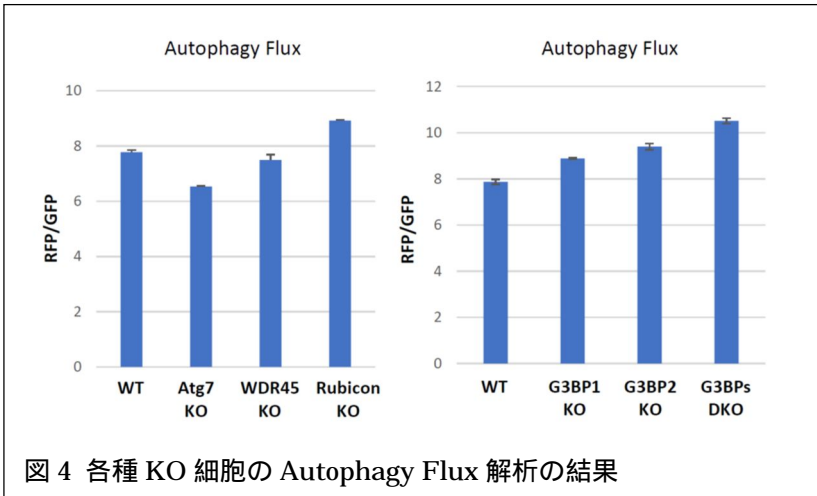


図4 各種 KO 細胞の Autophagy Flux 解析の結果

WDR45 と G3BP1 ノックアウト細胞におけるタンパク質凝集体の蓄積

WDR45 KO と G3BP1KO 細胞におけるタンパク質凝集体形成を測定した。GFP- $\alpha$ -Synuclein に関しては、どちらの KO 細胞でも凝集体形成に影響はなかった。しかし、GFP-Tau(RD)P301L は WDR45 KO と G3BP1-2 DKO 細胞において凝集体形成が亢進した (図5)。上記のオートファジー活性の結果から、この凝集体蓄積にはオートファジー以外の細胞機能障害が関与している可能性がある。

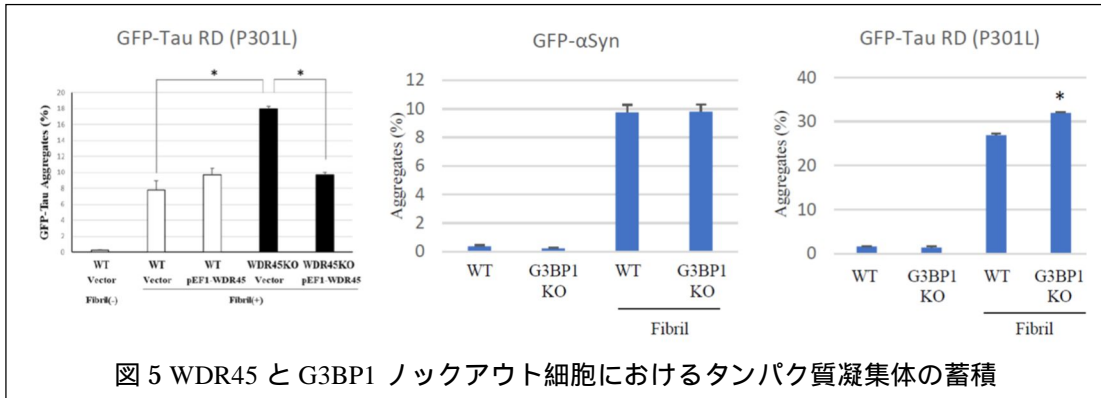


図5 WDR45 と G3BP1 ノックアウト細胞におけるタンパク質凝集体の蓄積

オレイン酸による Tau 凝集体蓄積の抑制

オレイン酸は血管の健康を保つことが知られているが、認知症の予防効果もあることが報告されている。そこで、我々が構築した神経変性のモデル細胞を用いて、Tau 凝集体形成への影響を調べた。Tau Fibril の導入後に 200 $\mu$ M のオレイン酸で処理をすると、Tau 凝集体形成が抑制された (図6)。今後、オレイン酸によるオートファジーの亢進について測定する予定である。

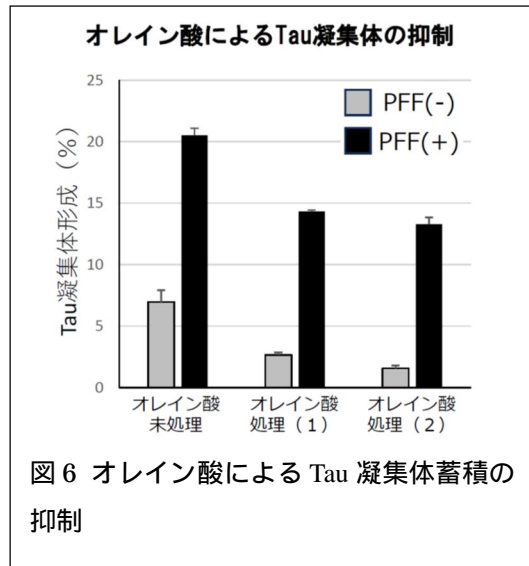


図6 オレイン酸による Tau 凝集体蓄積の抑制

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Yoshihisa, Taguchi Katsutoshi, Tanaka Masaki	4. 巻 24
2. 論文標題 Roles of Stress Response in Autophagy Processes and Aging-Related Diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13804 ~ 13804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms241813804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuki Ayumi, Watanabe Yoshihisa, Hashimoto Sho, Hoshino Atsushi, Matoba Satoaki	4. 巻 29
2. 論文標題 Cathepsin L prevents the accumulation of alpha synuclein fibrils in the cell	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 328 ~ 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13099	査読の有無 有
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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 雅樹、岡崎 興徳、田口 勝敏、渡邊 義久
2. 発表標題 神経特異的なオートファジー可視化トランスジェニックマウス の脳組織解析の試み
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・ 全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田口 勝敏、渡邊 義久、辻村 敦、澤村 正典、高橋 良輔、 田中 雅樹
2. 発表標題 霊長類脳におけるパーキンソン病関連分子 -シヌクレインの 内在性発現プロファイル解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・ 全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊 義久、田口 勝敏、上山 盛夫、永井 義隆、田中 雅樹
2. 発表標題 ALS-FTD変異SQSTM1/p62はNrf2-Keap1を介した酸化ストレス応答を抑制する
3. 学会等名 第44回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口 勝敏、渡邊 義久、辻村 敦、田中 雅樹
2. 発表標題 パーキンソン病関連分子 -シヌクレインのヒト脳内における内在性発現プロファイルについて
3. 学会等名 第44回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2021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 分 担 者	田口 勝敏  (Taguchi Katsutoshi)  (60462701)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師   (24303)	

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
---------	---------