

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689046

研究課題名(和文)新規A2A受容体阻害薬による新たなオートファジー調節機構の解明とPD治療への応用

研究課題名(英文)Effects of A2A-receptor antagonists on PD models via autophagy regulation.

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) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、抗パーキンソン病作用を持つとされるcaffeineに類似した化合物8種のオートファジー調節効果に着目し、パーキンソン病予防・治療薬としての可能性を検討した。まず、8種の化合物の中で3種に強いオートファジー阻害作用を見出し、MPP+誘導性神経細胞死に対する抑制効果を確認した。さらに同オートファジー抑制作用がmTOR非依存的経路の中で、cAMP調節を介することを解明した。また同化合物の細胞死への影響を評価したところ、内一つが強いアポトーシス誘導効果を示すことを確認した。同作用は由来の異なる腫瘍細胞によって異なることを確認でき、将来的に抗腫瘍薬としての応用の可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Considering caffeine preventive effects on Parkinson's disease, we examined effects of caffeine analogues on PD cellular models via autophagic regulation using cellular models. HeLa cells treated with a caffeine analogue have shown characteristics of autophagic inhibition via mTOR independent pathway, especially via cAMP. Also, one of them induced cell death in some cell lines but not in others. Taken together, some caffeine analogues might be potential candidates for anti-cancer agents.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

研究開始時の 2010 年当時もパーキンソン病 (以下 PD) は進行性の黒質神経細胞死を特徴とする疾患で、現在でも発症機序は完全には解明されておらず、治療法も対症療法に留まり、2014 年時点でも未曾有の高齢化が進行する我が国において、患者人口の増大する PD の根本的治療が希求され、特に神経保護作用による症状進行抑制・予防薬の開発は保健医療・介護福祉の点からもその必要性が重要視されている。本研究の目的は、研究代表者らが PD モデル細胞において autophagy 調節・細胞死抑制効果を証明済みの、新規 adenosine 2A receptor (以下 A2A-R) 拮抗薬を用い、近年明らかになりつつある mTOR 非依存性 autophagy 調節機構をさらに解明するとともに、臨床応用への可能性を検証する。

2. 研究の目的

Caffeine 誘導体である新規 adenosine 2A 受容体拮抗薬によるオートファジー制御機構を利用して、パーキンソン病に対する病態に基く根本的な治療薬としての可能性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

1) CA のオートファジーへの調節効果証明
HeLa 細胞に 24 時間、8 種類の A2A 受容体拮抗薬 (CA1-8 と命名する) を添加後、細胞から蛋白を RIPA Buffer にて抽出し、ウェスタンブロッティング法により LC3, actin, p62 量を測定し、autophagy への影響を定量化した。

GFP-LC3 安定発現 HeLa 細胞に 24 時間、濃度を 5、25、50 μ M に振った各化合物を投与し、細胞から蛋白を RIPA buffer にて抽出し、ウェスタンブロッティング法により LC3, actin, p62 量を測定し、さらに蛍光顕微鏡を用いて GFP-LC3 顆粒数をカウントし、autophagy への影響を定量化した。

autophagic flux の定量: HeLa 細胞に CA1-8 の各化合物に加え、E64d (10 μ g/ml) + pepstatinA (10 μ g/ml) を投与し、autophagy への影響を、ウェスタンブロッティングによる上記方法で評価した。

autophagy 調節効果の検証: Atg7^{-/-}細胞および Atg7^{+/+}細胞に、オートファジー抑制効果が最も強かった CA8 を添加し、24 時間後に LC3, actin をウェスタンブロッティングにて評価した。

2) CA のパーキンソン病モデル細胞への薬効評価

MPP⁺を投与し、24 時間経過した PC12D 細胞に、CA1-8 を 3 種の濃度で投与し、細胞死抑制効果をトリパンプルー-exclusion テストで評価し、カウントした。

3) CA のオートファジー調節の分子作用機序

検証

HeLa 細胞に CA8 を 50 μ M で添加し、24 時間後に細胞内の cAMP 濃度を ELISA 法を用いて評価した。

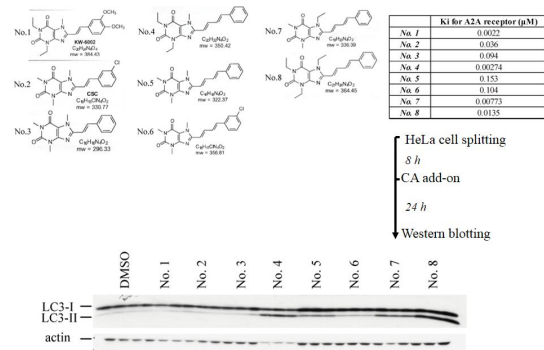
HeLa 細胞に CA8 を 50 μ M にて添加し、24 時間後にウェスタンブロッティング法にて EPAC1/2、S6K/pS6K、p70S6K/p-p70S6K、4E-BP1/p-4E-BP1 を評価した

HeLa 細胞に CA8 を 50 μ M で添加し、同時に cAMP のアナログ 8-CPT-2Me-cAMP を添加し、ウェスタンブロッティング法にて LC3 および actin 量を評価した。

4. 研究成果

1) CA のオートファジー調節効果

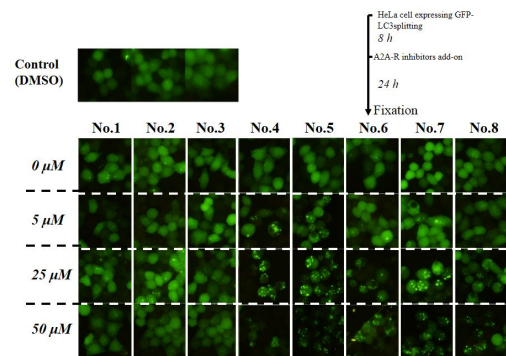
ウェスタンブロッティング法による評価



上図表説明

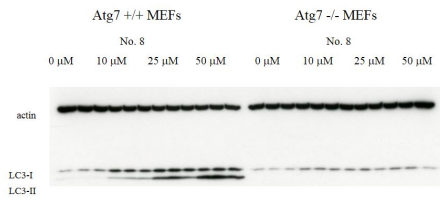
CA1-8 の各構造を示す。LC3/actin のウェスタンブロッティングデータでは、LC3-II レベルが、No.4/7/8 投与にて著明に上昇していることを示す。

蛍光顆粒数による評価



上図表説明

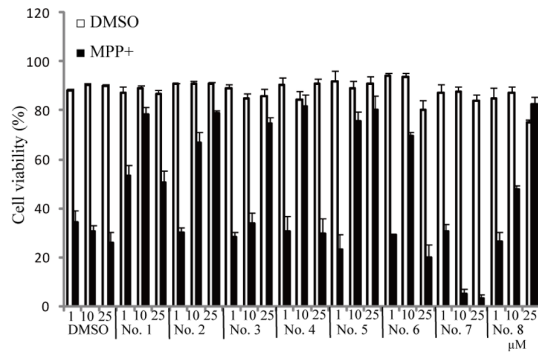
CA1-8 を 0-50 μ M 投与すると、明らかな GFP-LC3 顆粒の増加を認める。特に No.4/5/7/8 では低濃度でも明瞭な GFP-LC3 顆粒の増加が観察できる。これらは adenosine2 受容体への affinity と相関があるため、同レセプターを介する作用と理解できる。



上図表説明

Atg7^{-/-}細胞においては、LC3-II/actin 比の CA8 投与による増加は認めない。

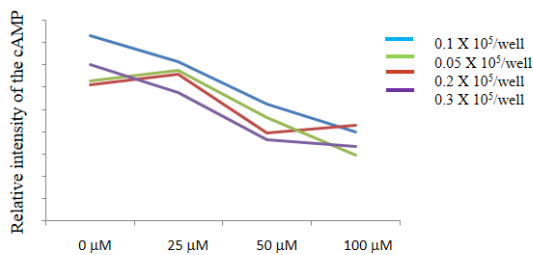
2) CA の細胞死抑制効果の評価



上図表説明

CA1-8 各濃度における MPP+ によって誘導された細胞死への抑制効果を示す。Dose-dependent に No.4/5/8 にて細胞死抑制効果を認める。

3) cAMP 量の評価



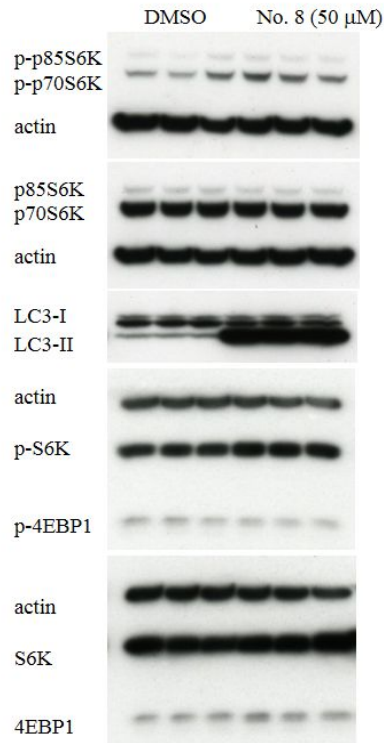
上図表説明

各細胞数における、細胞内 cAMP 濃度の変化を示す。CA8 添加により著明な cAMP 濃度の低下を生じる。

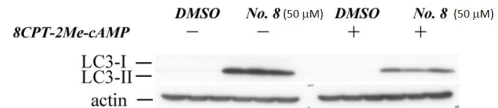
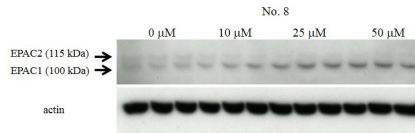
mTOR 経路との関連

右図表説明

CA8 (50 μM) 添加後、mTOR の下流の kinase の発現レベルを示す。示すように p70S6K/S6K のリン酸化は大きな変化を示しておらず、CA8 によるオートファジー誘導効果を説明できない。



mTOR 非依存性経路との関連



上図表説明

CA8 投与により、容量依存的に EPAC1 の発現レベルが増加している。また CA8 投与による LC3-II/actin 比の増大効果は、8CPT-2Me-cAMP の添加により、それが著明に抑制されている。

結論

CA7, 8 は強いオートファジー阻害効果を示すことにより、MPP+投与型パーキンソン病モデル細胞において著明な細胞死抑制効果を示した。同化合物のオートファジー抑制効果は mTOR 非依存性経路における cAMP 抑制作用を中心に発現し、以下 EPAC 以下の下流シグナル経路を抑制することによりオートファジー阻害効果を示すことが確認された。Autophagic flux 抑制作用を持ち、かつ形態学的には LC3 陽性顆粒の貯留を認めるため、オートファゴソーム・リソソーム融合阻害作用を併せ持つことも示唆された。

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)

英文総説

1. Saiki S, Sato S, Hattori N. Molecular pathogenesis of Parkinson disease: update. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 83:430-6 (2012)
2. Kawajiri S, Saiki S, Sato S, Hattori N. Genetic mutations and functions of PINK1. *Trends Pharmacol Sci* 32:573-80 (2011)

英文原著

1. 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* (in press)
2. Ishikawa K, Saiki S, Furuya N, Yamada D, Imamichi Y, Li Y, Kawajiri S, Sasaki H, Koike M, Tsuboi Y, Hattori N. p150^{glued}-associated disorders are caused by activation of intrinsic apoptotic pathway. *PLOS ONE* 2014 9:e94645
3. Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. *FEBS Lett* 587:1316-25 (2013)
4. Lee HY, Huang Y, Bruneau N, Roll P, Roberson EDO, Hermann M, Quinn E, Maas J, Edwards R, Ashizawa T, Baykan B, Bhatia K, Bressman S, Bruno MK, Brunt ER, Caraballo R, Echenne B, Fejerman N, Frucht S, Gurnett CA, Hirsch E, Houlden H, Jankovic J, Lee WL, Lynch DR, Mohamed S, Müller U, Nespeca MP, Renner D, Rochette J, Rudolf G, Saiki S, Soong BW, Swoboda KJ, Tucker S, Wood N, Hanna M, Bowcock A, Szepietowski P, Fu YH, Ptáček LJ. Mutations in the novel protein PRRT2 cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia with infantile convulsions. *Cell Reports* 1:2-12 (2012)
5. Usami Y, Hatano T, Imai S, Kubo S, Sato S, Saiki S, Fujioka Y, Ohba Y, Sato F, Funayama M, Eguchi H, Shiba K, Ariga H, Shen J, Hattori N. DJ-1 associates with synaptic membranes. *Neurobiol Dis* 43:651-62 (2011)
6. Korolchuk V*, Saiki S*, Lichtenberg M, Siddiqi F, Roberts EA, Imarisio S, Jahreiss L, Sarkar S, Futter M, O' Kane CJ, Deretic V and Rubinsztein DC. Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat Cell Biol* 13:453-60 (2011) (*Joint first authors)

7. Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, Kawajiri S, Fujimaki T, Tanida I, Kobayashi H, Sato F, Kei-Ichi Ishikawa, Sato S, Imoto M, Hattori N. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy* 7:176-87 (2011)
8. Amo T, Sato S, Saiki S, Wolf AM, Toyomizu M, Gautier CA, Shen J, Ohta S, Hattori N. Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. *Neurobiol Dis* 41:111-8 (2011)

〔学会発表〕(計4件)

1. 斉木臣二 「パーキンソン病と慢性炎症」 第55回日本神経学会総会 福岡国際会議場等 福岡県 2014年5月21-24日
2. 斉木臣二 「パーキンソン病の臨床と創薬 -オートファジーとの関連を中心に -」 第33回ゲノム創薬フォーラム 東京大学医科学研究所 東京都 2013年7月25日
3. 斉木臣二 「パーキンソン病病態とオートファジーの関連について」 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域 細胞内ロジスティクス・シンポジウム 淡路夢舞台国際会議場 兵庫県 2013年9月17-18日
4. 斉木臣二 「オートファジーを標的としたパーキンソン病治療について」 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域 オートファジーの集学的研究シンポジウム・オートファジー研究会 ヤマハリゾート嬢恋 静岡県 2013年12月19-21日

〔図書〕(計1件)

Saiki S. Neuroacanthocytosis. In: Jankovic J, Tolosa E, eds. Parkinson's disease and movement disorders. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins (in press) (2014)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: パーキンソン病予防治療剤
発明者: 服部信孝、斉木臣二、井本正哉、藤巻貴宏
権利者: 学校法人順天堂
種類: 特許
番号: 2013-091903
出願年月日: 2013年4月25日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
所属教室ホームページ(順天堂大学脳神経内科)

<http://www.juntendo-neurology.com/>

研究グループ紹介ページ

<http://www.juntendo-neurology.com/pdf/kenkyu-saeki-furuya.pdf>

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