

## 化合物による治療探索研究・オートファジー関連研究 斉木臣二・古屋徳彦

### I. 研究の背景・ミッション

1993年に大隅良典教授（現東工大）らが酵母でのオートファジーに関与する遺伝子群の同定を行い<sup>1</sup>、その後続くオートファジー分子機構の解明とその生体内での意義を証明した功績により、大隅教授は2017年にノーベル医学生理学賞を受賞された<sup>2</sup>。神経変性疾患とオートファジーとの関連については、2003年よりハンチントン病におけるマクロオートファジー（以下オートファジー）の関与が報告され<sup>3</sup>、さらに2006年にコンディショナルオートファジー欠損マウスにおける神経細胞内凝集体形成・進行性神経細胞死が確認されることで、その重要性が認識されている<sup>4,5</sup>。オートファジーの基質である alpha-synuclein 凝集を病理学的特徴とするパーキンソン病において、USでは慢性骨髄性白血病治療薬 nilotinib のオートファジー誘導作用による治療効果を検証する臨床試験が第2相まで進んでおり(ClinicalTrials.gov)、オートファジーを標的とした神経変性疾患治療薬開発が徐々に進んでいる。

古屋徳彦は1997年よりオートファジーの生化学的研究を開始し、米国 Columbia 大学(Beth Levin 研究室)にてオートファジーと腫瘍についての検討を行い<sup>6,7</sup>、2014年には骨格筋萎縮におけるオートファジーの役割をマウスモデルを用いて明らかにした<sup>8</sup>。斉木臣二は2005年よりオートファジーと神経変性疾患分子病態の研究を英国 Cambridge 大学(David Rubinsztein 研究室)で開始し、特にリソソーム機能とオートファジーの関連に着目し検討を進め<sup>9,10</sup>、2008年に現施設に異動後はパーキンソン病（以下 PD）モデル細胞・動物を利用し、新規オートファジー調節薬の開発を目指して研究を進めている。当グループからは遺伝性 PD 関連遺伝子とミトコンドリアオートファジー（マイトファジー）との関連や<sup>11,12</sup>、PD 発症予防効果が示唆されている caffeine によるオートファジー調節機構などを報告<sup>13</sup>しており、本研究における必要な準備を2013年に終えた。石川景一は、dynein subunit の一つである p150<sup>glued</sup> のリソソーム・オートファゴソーム動態への影響を、飢餓状態との関連を含め報告している<sup>14</sup>（および未発表データ）。

我々のミッションはマクロオートファジーの分子機構に作用する小分子化合物を同定し治療薬としての開発を進めること、及び同化合物の分子作用機序を解明し治療に繋がる知見を確立することであるが、フォワード的なアプローチを古屋が進め、リバース的な手法を斉木が主導している。

### II. 研究手法の特徴

まずモデル培養細胞を用いた病態解析・治療薬候補の化合物スクリーニングを行い、疾患モデルマウス（主に PD）、及び遺伝性 PD 患者 iPS 細胞由来神経細胞（慶大生理学岡野先生との共同研究、赤松和土特任教授（順天堂大学ゲノム再生医療センター）、石川景一が担

当)にて検証するという一貫した *in vitro-in vivo* システムを用いることできる点が当グループの最大の利点である。2009 年より一貫してケミカルバイオロジーを専門とされる井本正哉教授との共同研究を遂行し、漢方薬構成生薬甘草から抗パーキンソン病作用 (アポトーシス抑制作用) を持つ、有効活性成分リコピラノクマリン・グリシルロールを同定・報告しており<sup>15</sup>、特許を取得したオートファジー誘導シース (3 種) についての *in vivo* での薬理作用検証などを AMED 創薬支援事業を受け、進めている。

当院には多数の神経変性疾患に罹患する患者さんが通院されており、ご協力頂いた患者さんの血液成分より得られる網羅的/多面的な情報により実験データの検証を行うことが可能であることも強みである。実際に、パーキンソン病モデル細胞 (MPP+添加型)、MPTP 投与型モデルマウス、PD 患者さん血液成分のオミクスデータを統合し、臨床的に有用と考えられるバイオマーカーに基づく、創薬研究に着手し、一部の生体内小分子化合物 (代謝産物) が PD 特異的に変化していることを報告しており、PD 診断の一助となる可能性を秘める<sup>16</sup> (AMED-CREST 研究、服部信孝研究開発者)。また 2017 年にオートファジー誘導作用を持つ *ethanolamine* 類の化合物が PD 患者血漿で上昇していることを含め、生体内小分子化合物とオートファジー誘導メカニズムについての検討を行っている<sup>17,18</sup>。

### III. 我々が期待する結果及び将来の神経変性疾患治療戦略

上述のように生物におけるオートファジーの重要性が確立されている中で、オートファジー病とされる神経変性疾患 (SEND A) の疾患責任遺伝子 *WDR45* が同定され、不可逆的神経細胞死におけるオートファジーの重要性が改めて確認された<sup>19</sup>。また *Vici* 症候群 (責任遺伝子 *EPG5*) ・常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺の一型 (責任遺伝子 *TCPR2*) もオートファジー機能不全が主病態であることが確認されている<sup>20</sup>。今後神経変性疾患主病態におけるオートファジーの分子機構の解明がさらに進むと思われるが、我々は臨床医学の研究室として、治療薬開発というアウトプットを常に意識している。ポテンシャルの高い創薬シース (リード化合物) の同定には、優れたアッセイシステム確立が不可欠であるため、特に *in vivo* 評価系の確立に注力しており、山田大介が変異型 *alpha-synuclein* トランスジェニックマウスおよび MPTP 投与型マウスの評価に習熟しており大きな貢献をした。オートファジー促進による神経変性の発症予防・進行阻止は、いわゆる発症前治療・超早期診断に基づく先制医療に繋がりと考えられ、今後も本研究を進めることにより PD をはじめとした神経変性疾患撲滅に繋がる貢献をしたいと考える。

### IV. 大学院生募集

順天堂大学では、共用施設としての共焦点レーザー顕微鏡やフローサイトメーターがフォローアップ体制も含め非常に充実している。また現時点では幸いなことに当教室のオートファジーアッセイシステムを含め、本研究に係る大学院生にまずまずのハード・ソフトを提供しうる環境が整っている。医歯薬学過程卒業者の博士課程 (4 年制) および修士 (2

年制) 過程を含め、当教室を一つのステップとして更なる飛躍を遂げる強い意思を持った若い方たちに参加していただきたいと切望している。自分のキャリアは自分で創るという姿勢のある方には、最大限の機会を得られるよう当方は努力する。

(連絡先 齊木臣二 ssaiki@juntendo.ac.jp 古屋徳彦 nohuruya@juntendo.ac.jp)

## V. 主要論文

下記参考文献を参考にしてください。

## VI. 主たる競争的研究資金 (2013-2016)

文部科学省・日本学術振興会科学研究費補助金 (研究代表者のみ)

1. 基盤研究 B (一般、2018-2021) 齊木臣二
2. 基盤研究 B (特設研究分野、2018-2020) 齊木臣二
3. 日本医療研究開発機構橋渡し事業 (慶應義塾大学拠点) (2017-2018) 齊木臣二
4. 新学術領域研究領域提案型 計画研究 (2013-2017) 齊木臣二
5. 基盤研究 B (2015-2017) 齊木臣二
6. 若手研究 A (2011-2013) 齊木臣二
7. 挑戦的萌芽研究 (2012-2013) 齊木臣二
8. 基盤研究 C (2015-2017) 古屋徳彦
9. 基盤研究 C (2012-2014) 古屋徳彦
10. 若手研究 (2018-2019) 笹澤有紀子
11. 特別研究員奨励費 (2016-2017) 笹澤有紀子
12. 若手研究 B (2014-2015) 笹澤有紀子
13. 研究活動スタート支援 (2013-2014) 河尻澄宏
14. 若手研究 (2018-2019) 石川景一
15. 研究活動スタート支援 (2014-2015) 石川景一

公益財団法人・民間財団 (2013-2018)

1. 持田記念医学薬学研究振興財団研究助成 (2013)
2. 大日本住友製薬株式会社神経内科領域研究助成 (2018)
3. 中富健康科学振興財団研究助成 (2018)

## VII. 主な共同研究者 (順不同)

- 岡野栄之先生 (慶應義塾大学医学部生理学)
- 井本正哉先生 (慶應義塾大学理工学部生命情報学科)
- 天羽 拓先生 (防衛大学校理工学群化学科)
- 上野 隆先生 (順天堂大学医学部生体機能部門)
- 小池正人先生 (順天堂大学解剖学・神経生物学)

#### VIII. 参加メンバー（平成 28 年 12 月現在）

石川景一（江東病院）

今道洋子（技術員）

斉木臣二

笹澤有紀子

鈴木絢未（技術員）

相馬早苗（技術員）

中鏡暁子（大学院博士課程 2 年生）

野中里紗

古屋徳彦

藤巻基紀（博士課程大学院 4 年生）

竹重遙香（博士課程大学院 1 年生）

#### IX. 主な共同研究企業

- 大日本住友製薬株式会社
- 協同乳業株式会社
- 花王株式会社

#### X. 参考文献

- 1 Tsukada, M. & Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **333**, 169-174 (1993).
- 2 Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728-741, doi:10.1016/j.cell.2011.10.026 (2011).
- 3 Rubinsztein, D. C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* **443**, 780-786, doi:nature05291 [pii] 10.1038/nature05291 (2006).
- 4 Hara, T. *et al.* Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885-889, doi:nature04724 [pii] 10.1038/nature04724 (2006).
- 5 Komatsu, M. *et al.* Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**, 880-884, doi:nature04723 [pii] 10.1038/nature04723 (2006).
- 6 Qu, X. *et al.* Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* **112**, 1809-1820, doi:10.1172/JCI20039

JCI200320039 [pii] (2003).

- 7 Furuya, N., Yu, J., Byfield, M., Patingre, S. & Levine, B. The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy* **1**, 46-52 (2005).
- 8 Furuya, N. *et al.* PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy* **10**, 631-641, doi:10.4161/auto.27785 (2014).
- 9 Korolchuk, V. I. *et al.* Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat Cell Biol* **13**, 453-460, doi:10.1038/ncb2204 (2011).
- 10 Williams, A. *et al.* Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat Chem Biol* **4**, 295-305, doi:nchembio.79 [pii] 10.1038/nchembio.79 (2008).
- 11 Kawajiri, S. *et al.* PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy. *FEBS Lett* **584**, 1073-1079, doi:S0014-5793(10)00110-9 [pii] 10.1016/j.febslet.2010.02.016 (2010).
- 12 Matsuda, N. *et al.* PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* **189**, 211-221, doi:jcb.200910140 [pii] 10.1083/jcb.200910140 (2010).
- 13 Saiki, S. *et al.* Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy* **7**, 176-187 (2011).
- 14 Ishikawa, K. *et al.* P150glued-associated disorders are caused by activation of intrinsic apoptotic pathway. *PLoS One* **9**, e94645, doi:10.1371/journal.pone.0094645 (2014).
- 15 Fujimaki, T. *et al.* Identification of licopyranocoumarin and glycyrrulol from herbal medicines as neuroprotective compounds for Parkinson's disease. *PLoS One* **9**, e100395, doi:10.1371/journal.pone.0100395 (2014).
- 16 Hatano, T., Saiki, S., Okuzumi, A., Mohny, R. P. & Hattori, N. Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomic technologies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, doi:10.1136/jnnp-2014-309676 (2015).
- 17 Saiki, S. *et al.* Decreased long-chain acylcarnitines from insufficient beta-oxidation as potential early diagnostic markers for Parkinson's disease. *Sci Rep* **7**, 7328, doi:10.1038/s41598-017-06767-y (2017).
- 18 Fujimaki, M. *et al.* Serum caffeine and metabolites are reliable biomarkers of early Parkinson disease. *Neurology* **90**, e404-e411, doi:10.1212/WNL.0000000000004888 (2018).

- 19 Saitsu, H. *et al.* De novo mutations in the autophagy gene WDR45 cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nat Genet* **45**, 445-449, 449e441, doi:10.1038/ng.2562 (2013).
- 20 Frake, R. A., Ricketts, T., Menzies, F. M. & Rubinsztein, D. C. Autophagy and neurodegeneration. *J Clin Invest* **125**, 65-74, doi:10.1172/JCI73944 (2015).