

## 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）らによる、酵母でのオートファジーに関与する遺伝子群の同定を break through として(Tsukada and Ohsumi, 1993)、オートファジーに関する研究が爆発的に進んでいる(Mizushima and Komatsu, 2011)。特に2003年以降神経変性疾患病態（特にハンチントン病）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(Rubinsztein, 2006)、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、その重要性が認識されている(Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006)。古屋は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(Furuya et al., 2005; Qu et al., 2003)、現在骨格筋萎縮におけるオートファジーの分子生物学的メカニズムの検討を行っている。斉木は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 Rubinstein 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(Korolchuk et al., 2011; Williams et al., 2008)、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(Kawajiri et al., 2010; Matsuda et al., 2010)、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(Saiki et al., 2011)しており、本研究推進に必要な準備を2013年に終えた。

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基づく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、石川景一大学院生が担当）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のできる点が当グループの最大の利点である。さらに多数の神経変性疾患に罹患する患者さんが当院に通院されており、ご協力頂いた患者さんの血清成分より得られる網羅的/多面的な情報によりフィードバックをかけることが可能であることも強みである。

### 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(SENDA 病)の疾患責任遺伝子が同定され、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(Saitsu et al., 2013)。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ズ(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、山田大介大学院生が変異型 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ている。また2008年以降優れた研究者との共同研究基盤構築が曲がりなりにも進み、ようやく幾つかのアウトプットを出す目途が立ってきた。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ると考えられ、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。

### 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(2010-2013)

文部科学省・日本学術振興会科学研究費補助金

1. 新学術領域研究領域提案型 計画研究(2013-2018) 齊木臣二
2. 若手研究A(2011-2014) 齊木臣二
3. 挑戦的萌芽研究(2012-2014) 齊木臣二
4. 基盤研究C(2012-2015) 古屋徳彦

公益財団法人・民間財団(2010-2014)

1. 持田記念医学薬学研究振興財団研究助成
2. 全日本コーヒー協会研究助成

3. 細胞科学研究財団研究助成
4. 中島記念国際交流財団研究助成
5. 武田科学振興財団研究助成

## VII. 主な共同研究者

1. 岡野栄之先生（慶應義塾大学医学部生理学）
2. 井本正哉先生（慶應義塾大学理工学部生命情報学科）
3. 福原武志先生（東京薬科大学生命科学部）
4. 天羽 拓先生（防衛大学校理工学群化学科）
5. 山崎正幸先生（京都大学再生医科学研究所）
6. 矢野浩二郎先生（大阪工業大学情報科学部）
7. 上野 隆先生（順天堂大学医学部生体機能部門）
8. 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 25 年 11 月現在）

石川景一（大学院 4 年生）  
今道洋子（技術員）  
河村美巴子（大学院 3 年生）  
斉木臣二  
佐々木寛典（技術員）  
平野一興（大学院 1 年生）  
古屋徳彦  
山田大介（大学院 3 年生）

## IX. 参考文献

1. Furuya, N., J. Yu, M. Byfield, S. Pattingre, and B. Levine. 2005. The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy*. 1:46-52.
2. Hara, T., K. Nakamura, M. Matsui, A. Yamamoto, Y. Nakahara, R. Suzuki-Migishima, M. Yokoyama, K. Mishima, I. Saito, H. Okano, and N. Mizushima. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 441:885-889.
3. Kawajiri, S., S. Saiki, S. Sato, F. Sato, T. Hatano, H. Eguchi, and N. Hattori. 2010. PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy. *FEBS Lett*. 584:1073-1079.
4. Komatsu, M., S. Waguri, T. Chiba, S. Murata, J. Iwata, I. Tanida, T. Ueno, M. Koike, Y.

- Uchiyama, E. Kominami, and K. Tanaka. 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 441:880-884.
5. Korolchuk, V.I., S. Saiki, M. Lichtenberg, F.H. Siddiqi, E.A. Roberts, S. Imarisio, L. Jahreiss, S. Sarkar, M. Futter, F.M. Menzies, C.J. O'Kane, V. Deretic, and D.C. Rubinsztein. 2011. Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat Cell Biol*. 13:453-460.
  6. Matsuda, N., S. Sato, K. Shiba, K. Okatsu, K. Saisho, C.A. Gautier, Y.S. Sou, S. Saiki, S. Kawajiri, F. Sato, M. Kimura, M. Komatsu, N. Hattori, and K. Tanaka. 2010. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol*. 189:211-221.
  7. Mizushima, N., and M. Komatsu. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 147:728-741.
  8. Qu, X., J. Yu, G. Bhagat, N. Furuya, H. Hibshoosh, A. Troxel, J. Rosen, E.L. Eskelinen, N. Mizushima, Y. Ohsumi, G. Cattoretti, and B. Levine. 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*. 112:1809-1820.
  9. Rubinsztein, D.C. 2006. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*. 443:780-786.
  10. Saiki, S., Y. Sasazawa, Y. Imamichi, S. Kawajiri, T. Fujimaki, I. Tanida, H. Kobayashi, F. Sato, S. Sato, K. Ishikawa, M. Imoto, and N. Hattori. 2011. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy*. 7:176-187.
  11. Saitsu, H., T. Nishimura, K. Muramatsu, H. Kodera, S. Kumada, K. Sugai, E. Kasai-Yoshida, N. Sawaura, H. Nishida, A. Hoshino, F. Ryujin, S. Yoshioka, K. Nishiyama, Y. Kondo, Y. Tsurusaki, M. Nakashima, N. Miyake, H. Arakawa, M. Kato, N. Mizushima, and N. Matsumoto. 2013. De novo mutations in the autophagy gene WDR45 cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nat Genet*. 45:445-449, 449e441.
  12. Tsukada, M., and Y. Ohsumi. 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 333:169-174.
  13. Williams, A., S. Sarkar, P. Cuddon, E.K. Ttofi, S. Saiki, F.H. Siddiqi, L. Jahreiss, A. Fleming, D. Pask, P. Goldsmith, C.J. O'Kane, R.A. Floto, and D.C. Rubinsztein. 2008. Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat Chem Biol*. 4:295-305.