

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580417

研究課題名(和文)食品成分由来オートファジー誘導物質の単離及び臨床応用に関わる研究

研究課題名(英文)Clinical application of autophagy-inducing factors from food supplements

研究代表者

守村 敏史 (Morimura, Toshifumi)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助教

研究者番号：20333338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：多くの神経変性疾患では、細胞内に構造不良な蛋白質(ミスフォールド蛋白質)の蓄積する共通した病理像が認められる。オートファジーの活性化はミスフォールド蛋白質の除去に有望な治療法として注目されている。私は安全性の点から食品成分中のオートファジー誘導成分を検索し、治療に用いる試みを進め、オートファジー誘導可能な新規の食品成分3種類を同定した。また、カレーの有効成分でオートファジー誘導効果のあるクルクミンが小胞体ストレスによる疾患の一つPMDに有効である事、またオートファジー阻害薬として知られている抗マラリア剤のクロロキンが、蛋白質合成を止める事により同じ疾患に対して有効に働く事を報告した。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of misfolded protein is a common pathological feature of many neurodegenerative disorders. Activation of autophagy is focused on an effective therapy against these diseases. Based on safety, I tried to perform clinical application of autophagy-inducing factors derived from food supplements. I first screened autophagy-inducing supplements from a food library using green fluorescence protein fused with microtubule associated protein 1 light chain 3, and identified three novel autophagy-inducing factors.

I also contributed to clarify protective effects of curcumin, an effective component of the curry spice turmeric, and known as an autophagy-inducing food supplement, against Pelizaeus-Merzbacher disease caused by endoplasmic reticulum stress. Furthermore, I demonstrated that chloroquine, which is used as an anti-malaria drug and well-known as an anti-autophagy compound, attenuates endoplasmic reticulum stress of the same disease by blocking protein translation.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：オートファジー 小胞体ストレス ミスフォールド蛋白質 食品成分

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患の共通病理像として、ユビキチン陽性封入体の出現が挙げられる。この封入体の主要構成(ユビキチン化蛋白質)は正常な構造から大きく逸脱した立体構造を有する蛋白質(ミスフォールド蛋白質)であり、ミスフォールドの結果、毒性の獲得、正常蛋白質の封入体への取り込み(sequester)、seeding等の病態進行に深く関係する性状を獲得する。それ故、ミスフォールド蛋白質の除去機構の活性化は、これら難治性疾患はもとより、感染症やある種の生活習慣病の制御にも有効な治療戦略と広く認識されている。生体からミスフォールド蛋白質を除去する機構として、ユビキチン・プロテアソーム系による特異的除去機構と、オートファジーによる非特異的除去機構が知られている。特に後者は、除去能力が非常に高い事や、オートファジー活性化に伴い細胞内寄生体や不良細胞内小器官の除去にも貢献し、幅広い疾患に応用可能である事が示唆されて来た。

2. 研究の目的

本研究は、安全性の観点から自然界に存在する物質、とりわけ私たちが日頃口にしている食品成分から、オートファジーを誘導する成分の同定を最初の目的とした。また、このような食品成分が実際に疾患制御に有効に働くか否かについて、モデル動物や培養細胞を用いて明らかにする事を次の目的とした。更に、これら研究を通じて、各種オートファジー関連試薬を細胞及び動物モデルに適用する事により、神経変性疾患に代表されるミスフォールド蛋白質に起因する難治性疾患に対する新たな治療戦略の構築を第三の目的とした。

3. 研究の方法

オートファジーのインディケータとして green fluorescence protein (GFP) に融合した microtubule associate protein 1 light chain 3 (GFP-LC3) が、比較的広く用いられる。そこで GFP-LC3 遺伝子を恒常的に発現する HeLa 細胞を樹立して、種々の成分のオートファジー誘導に関わる能力を検討した。このようなスクリーニングからヒットした食品成分については、オートファジー活性化のどのステージに関わるかという点について、特に各種リン酸化の変化について解析した。次に、疾患のモデル系として、オートファジーの不全や小胞体ストレスが疾患進行に深く関与する事が報告されている Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因蛋白質である Proteolipid protein 1 (PLP1) や Superoxide dismutase 1 (SOD1) の野生型及び変異体を用いて、候補成分のミスフォールド蛋白質の除去における有効性について検証した。同時に、既知の各種オートファジー関連試薬の効果を検証し、ミスフォールド蛋白質に対する新

たな治療法の検索や細胞病態、ミスフォールド化に関わるメカニズムに関わる研究も進めた。

4. 研究成果

GFP-LC3 を恒常的に発現する HeLa 細胞を用いて、およそ 140 種類の食品成分から、リンゴの皮に多く含まれるウルソール酸、イチゴの成分であるヘデラゲニン、それに日本人の生活に欠かせないお茶の有効成分の一つガロカテキンガレートの 3 種類の新規のオートファジー誘導成分を同定した。この内、ガロカテキンガレートはよく知られたオートファジー誘導薬である rapamycin 同様 mammalian target of rapamycin (mTOR) キナーゼの活性を低下させる事がオートファジー誘導の薬理作用である事を明らかにした。一方、残るウルソール酸及びヘデラゲニンについては、mTOR キナーゼの基質のリン酸化に変化が認められなかった事から、別の経路によりオートファジーを活性化させる事が示唆された。これら成分のミスフォールド蛋白質に対する効果を調べる目的で、家族性 ALS の原因蛋白質であり、構造不良から半減期の短い SOD1 (G93A) 変異体と半減期が 24 時間と非常に長い野生型 SOD1 を用いて解析した。その結果、変異 SOD1 の安定性には殆ど影響を及ぼさなかったが、野生型 SOD1 の半減期については、3 種類のどの成分も低下させる事が明らかとなった。即ち、オートファジー活性化の標的は遺伝子の重複など発現亢進に伴う疾患に有効である可能性が示唆された。

カレー(ウコン)の有効成分であり、古くから広く薬として利用されているクルクミンは、プロテアソームの抑制を介してオートファジーを活性化する事が知られている。私は共同研究として、小胞体ストレスに起因し小児の白質形成不全の代表的疾患である PMD に対するクルクミンの臨床応用研究を進めた。小胞体ストレス蛋白質は、ユビキチン・プロテアソーム依存的な経路とオートファジー依存的な経路で分解され知られている。実際に培養細胞に変異 PLP1 を強制発現させ、クルクミンで処理すると、変異 PLP1 の発現が亢進することから、変異 PLP1 は主にプロテアソームにより分解されている事が示唆された。それにも関わらず、変異 PLP1 発現自然発症変異マウスに対し、クルクミンは有為にその寿命を延長する効果がある事を明らかにした。

更に、野生型及び変異 PLP1 をモデル系に、ミスフォールド蛋白質の除去機構の研究を、各種オートファジー関連試薬を用いて進めた。驚いた事に、オートファジーの阻害剤として広く使用され、抗マラリア薬として世界中で古くから使われて来たクロロキンが、最も効果的に変異 PLP1 の発現を抑制する事を発見した。この効果は野生型 PLP1 でも認められ、各種解析から、クロロキンは蛋白質の翻訳の

中枢であるeukaryotic initiation factor 2 alpha (eIF2 α)のリン酸化を誘導する事により蛋白質の翻訳抑制し、結果として変異PLP1の小胞体内への流入低下を来す事により、小胞体ストレスを軽減する事を *in vitro*並びに *in vivo*の実験事で明らかにした。これまでに、salbrinalと呼ばれる新規薬剤が、同じようにeIF2 α のリン酸化を亢進し、翻訳抑制を介して小胞体ストレス関連疾患の一つであるALS治療に有効である事が報告されている。他方、クロロキンは、抗マalaria薬として世界中で広く利用されており、薬用量や副作用が詳細に調べられている。それ故、クロロキンは小胞体ストレスを含め、ミスフォールド蛋白質に起因する疾患に有効な治療薬となる可能性が示唆された。

これら研究を進める過程で、ミスフォールド蛋白質による細胞病態の解明にも着手し、PLP1に限らず小胞体ストレスを誘導する変異蛋白質は、C末端にKDEL配列を有する小胞体シャペロンの小胞体内からの消失とGolgi体の分断化を誘導する事を発見した。また、このような細胞病態の結果、小胞体ストレスは蛋白質の分泌効率の低下を誘導し、蛋白質の分泌効率をモニターする事により小胞体ストレスを定量的に表す系を考案した。また、孤発性ALSの病変主要構成蛋白質である TAR DNA binding protein of 43KDaのミスフォール化の分子基盤の解明に貢献した。

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)

[雑誌論文](計5件)

(1) Morimura T, Numata Y, Nakamura S, Hirano E, Gotoh L, Goto YI, Urushitani M, Inoue K. (2014) Attenuation of endoplasmic reticulum stress in Pelizaeus-Merzbacher disease by an anti-malaria medicine, chloroquine. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 239:489-501. (査読有)

(2) Shodai A, Morimura T, Ido A, Uchida T, Ayaki T, Takahashi R, Kitazawa S, Suzuki S, Shirouzu M, Kigawa T, Muto Y, Yokoyama S, Takahashi R, Kitahara R, Ito H, Fujiwara N, Urushitani M. (2013) Aberrant assembly of RNA recognition motif 1 links to pathogenic conversion of TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43). *J. Biol. Chem.* 288:14886-14905. (査読有)

(3) Numata Y, Morimura T, Nakamura S, Hirano E, Kure S, Goto YI, Inoue K. (2013) Depletion of molecular chaperones from the endoplasmic reticulum and fragmentation of the Golgi apparatus associated with pathogenesis in Pelizaeus-Merzbacher

disease. *J. Biol. Chem.* 288:7451-7466. (査読有)

(4) Shodai A, Ido A, Fujiwara N, Ayaki T, Morimura T, Oono M, Uchida T, Takahashi R, Ito H, Urushitani M. (2012) Conserved acidic amino acid residues in a second RNA recognition motif regulate assembly and function of TDP-43. *PLoS One.* 7:e52776. (査読有)

(5) Yu LH, Morimura T, Numata Y, Yamamoto R, Inoue N, Antalffy B, Goto Y, Deguchi K, Osaka H, Inoue K. (2012) Effect of curcumin in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Mol. Genet. Metab.* 106:108-114. (査読有)

[学会発表](計10件)

(1) Numata Y, Morimura T, Nakamura S, Hirano E, Kure S, Goto Y, Inoue K. More than ER stress: molecular mechanism for misfolded PLP1 that impacts subcellular dynamics and clinical severity of Pelizaeus-Merzbacher disease. 2013.10.22-26. 62rd Annual meeting of the American Society of Human Genetics, Boston, USA. (一般)

(2) Inoue K, Morimura T, Numata Y, Yu L-H, Gotoh L, Yamamoto R, Inoue N, Antalffy B, Deguchi K, Osaka H, Goto Y. Preclinical studies for the treatment of Pelizaeus-Merzbacher disease with clinically applicable compounds, curcumin and chloroquine. 2013.6.8-11. 23rd Meeting of the European Neurological Society, Barcelona, Spain. (一般)

(3) Inoue K, Morimura T, Numata Y, Yu H, Gotoh L, Yamamoto R, Inoue N, Antalffy B, Deguchi K, Osaka H, Goto Y. Treating Pelizaeus-Merzbacher disease with clinically applicable compounds, curcumin and chloroquine: preclinical studies. 62nd Annual meeting of the American Society of Human Genetics, 2012, 11.8., San Francisco, USA. (一般)

(4) 井上 健, 守村 敏史, 沼田 有里佳, Li-Hua Yu, 後藤 玲央, 山本 良子, 井上 直子, 出口 貴美子, 小坂 仁, 後藤 雄一 Pelizaeus-Merzbacher病の治療法開発への試み 第57回日本人類遺伝学会 2012年10月26日 東京(一般)

(5) 内田 司, 井戸 明美, 小代 明美, 大野 美樹, 守村 敏史, 高橋 良輔, 漆谷 真 培養細胞モデルを用いたALSにおけるTDP-43の分子的機構の解析 第35回神経科学大会 2012年9月19日 名古屋(一般)

(6) 沼田 有里佳, 守村 敏史, 有馬 恵里子, 後藤 雄一, 井上 健 小胞体ストレス関連疾患 (Pelizaeus-Merzbacher病) における、小胞体からのシャペロンの排除 第35回神経科学大会 2012年9月19日 名古屋 (一般)

(7) 守村 敏史, 沼田 由里佳, 有馬 恵里子, 後藤 玲央, 後藤 雄一, 井上 健 小胞体ストレス型Pelizaeus-Merzbacher病に対する抗マラリア薬であるクロロキンの応用 第35回神経科学大会 2012年9月19日 名古屋(一般)

(8) 内田 司, 井戸 明美, 小代 明美, 守村 敏史, 高橋 良輔, 漆谷 真 テトラサイクリン誘導性にTDP-43を発現するヒト神経由来細胞の樹立とその応用第53回日本神経学会学術大会 2012年5月25日 東京 (一般)

(9) 沼田 有里佳, 守村 敏史, 畠山 英之, 横田 睦美, 後藤 雄一, 涌澤 圭介, 植松 貢, 大沼 晃, 井上 健 フレームシフト変異によるPLP1mRNAの不安定化: 軽症型 Pelizaeus-Merzbacher病の分子病態 第56回人類遺伝学会, 2011年11月12日 千葉(一般)

(10) 守村 敏史, 沼田 由里佳, 有馬 恵里子, 後藤 雄一, 井上 健 小胞体ストレスを標的とした Pelizaeus-Merzbacher 病に対する治療薬の確立 第33回 日本神経科学大会, 2011年9月11日 横浜(一般)

〔図書〕(計2件)

(1) 守村 敏史, 高橋 良輔, 漆谷 真 (2013) ミスフォールド蛋白質による神経細胞死と治療戦略 辻本賀英(編) 遺伝子医学 MOOK 別冊 細胞死研究の今—疾患との関わり、創薬に向けてのアプローチ メディカルドゥ社 pp44-51.

(2) Urushitani M, Morimura T. (2012) Molecular target therapy against Amyotrophic Lateral Sclerosis. In K. Segawa & R. Ijichi (Eds.) Amyotrophic Lateral Sclerosis. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, Inc. pp85-108.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守村 敏史 (MORIMURA TOSHIFUMI)
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助教
研究者番号: 20333338

(2) 研究分担者

井上 健 (INOUE KEN)
独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・疾病研究第二部・室長
研究者番号: 30392418

(3) 連携研究者

()

研究者番号: