

最先端・次世代研究開発支援プログラム  
事後評価書

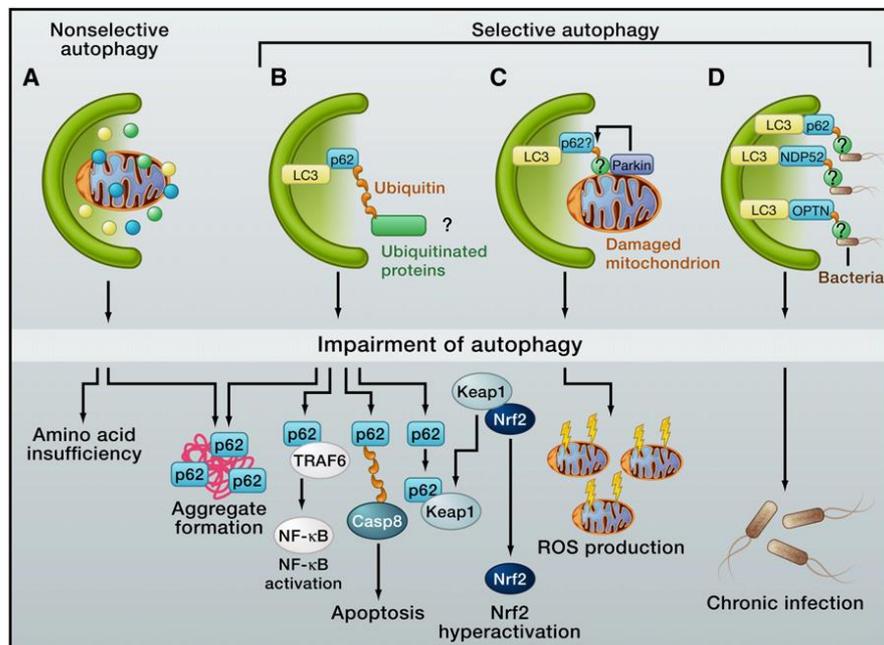
研究課題名	オートファジーの異常に伴う疾患の克服：健康社会実現へ向けて
研究機関・部局・職名	公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・副参事研究員
氏名	小松 雅明

【研究目的】

1) 何を開発し、または明らかにするのか

オートファジーは、細胞質の単膜構造体・隔離膜が伸長しオルガネラを含む細胞質成分を取り囲んだ脂質二重膜構造体（オートファゴソーム）が形成される過程と、オートファゴソームがリソソームと融合し、その内容物がリソソーム内の消化酵素により構成成分（タンパク質の場合、アミノ酸）に分解される過程からなる。この分解系は、タンパク質やオルガネラをランダムにオートファゴソームに取り囲み分解する非

選択的な分解経路であると考えられてきた。しかし、我々のマウス遺伝学を駆使した一連の発生工学的研究から、壊すべきタンパク質やオルガネラを厳密に選別する**選択的なオートファジー**



が生理的に重要であり、その破綻が様々なヒト疾患の発症原因（肝障害、肝細胞がん等）となることが証明された（上図、Mizushima N & Komatsu M, Cell, 2011）。即ち、オートファジーは生命活動の作動原理や多彩な病態生理学的機能に密接に関係しており、生命の謎を解くキープレイヤーであると共に高齢化社会における健康を守るための重要な生体監視システムであることが判明したのである。本研究プログラムでは、選択的オートファジーの分子機構の解明と共に、オートファジー選択的基質群の遺伝子改変マウスを作出、解析する。次に、オートファジー不能マウスやヒト肝細胞がん細胞における基質タンパク質群の蓄積、その結果として起こる代謝物の変化や、

細胞内タンパク質代謝変動を明らかにし、**肝機能障害、肝細胞がんの病態発症機構の解明**を目指す。また、選択的オートファジーを促進する低分子化合物や天然物をスクリーニングし、上記疾患の**新たな創薬**の足がかりとする。

## 2) 本研究の目的を達成するための研究目標

### ・オートファジー選択的基質群の遺伝子改変マウスの作出

研究代表者は、オートファゴソーム局在タンパク質 LC3 と相互作用する分子群（オートファジーアクセサリ分子群）としてユビキチン結合能を持つタンパク質 p62、Nbr1、Alfy を同定してきた (Komatsu et al., Cell 2007, Kirkin et al., Mol Cell 2009 and Alf et al., EMBO reports 2014)。重要なことに、これらのタンパク質は、肝疾患 (p62、Nbr1)、肝細胞がんやグリオーマ (p62)、神経変性疾患 (p62、Alfy) で確認されるユビキチン陽性封入体の主要な構成成分である。さらに、我々は、オートファジー不能肝、神経細胞における p62 の蓄積と凝集化を確認するとともに、選択的オートファジーによる p62 の分解阻害が封入体形成の主因であることをマウス遺伝学により証明した (Komatsu et al., Cell 2007)。これらの結果は、**様々な疾患で観察される封入体形成がオートファジーの減弱に起因し、そして p62 が封入体形成の責任分子であることを強く示唆している**。従って、**オートファジー選択的基質のレベルを監視**することが病態の状態を見極める上で非常に重要である。本研究では、作成済み、もしくは作成中であるオートファジー選択的基質ノックアウトマウスの表現型解析を行う。特に、ヒト病態発症に関与することを明らかにしてきた p62 について重点的に解析する。

### ・選択的オートファジー基質 p62 と肝細胞がんの研究

研究代表者は、p62 がユビキチンリガーゼアダプタータンパク質 Keap1 と直接相互作用し、Keap1 のターゲットであるストレス応答性転写因子 Nrf2 の分解を阻害することを見出した (Komatsu et al., Nature Cell Biol 2010)。つまり、細胞は、p62 の凝集体形成を介して酸化ストレスを巧みに回避する機構があることを見つけた。肝細胞がんにおいて、オートファジーの障害ないしは p62 遺伝子の発現上昇により p62 が過剰に蓄積されている。それを起因に、**新しく見出した酸化ストレス防御システムを恒常的に活性化させ、自身を酸化ストレスから守る**という生存戦略がとられていると想定される。一方、オートファジー欠損が長期間継続すると、**p62 蓄積依存的に肝臓に腫瘍が特異的に形成**されることを見出した (Inami et al., JCB 2011, Takamura et al., Gene Dev 2011)。本研究では、オートファジーの障害による腫瘍増殖機構の解明を行う。更に、オートファジー不能マウスおよびヒト肝細胞がん組織における基質タンパク質群の蓄積、その結果として起こる代謝物の変化や、細胞内タンパク質代謝変動を明らかにし、p62 蓄積を伴う肝機能障害や肝細胞がんの病態発症機構の解明を目指す。

### ・オートファジー選択的基質を標的とした抗がん剤スクリーニング

恒常的に p62 が蓄積している肝細胞がん患者組織においては上記の機構を介して Nrf2 が活性化されていることが予想される。この Nrf2 の活性化は、肝細胞がんの微小環境下での生存を可能にする。この事実は、**p62-Keap1 結合を標的とした化合物が肝細胞がんの新しい創薬候補**となることを意味する。p62-Keap1 結合を容易に判定で

きる *in vitro* アッセイ法を開発し、p62 を標的とした抗がん剤スクリーニングを行う。

### 【総合評価】

○	特に優れた成果が得られている
	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

### 【所見】

#### ① 総合所見

本研究課題全体の目的は、「選択的オートファジーの機能解析とその疾患応用」である。得られた基礎的知見の質と量は十分であり、当初目的は概ね達成しているものと思われる。具体的には、研究代表者らのこれまでの研究実績を活かし、オートファジー不全を起こす遺伝子改変マウスの詳細な病態解析を行い、肝細胞のがん化における Keap1-Nrf2 経路、PPAR $\alpha$ による脂肪酸酸化、トランスフェリン受容体の発現などがオートファジー因子と密接に関連することを明らかにしている。近年発展しているオートファジーの研究をさらに発展する内容として、研究成果は高く評価できる。p62-Keap1-Nrf2 に着目した新規抗がん剤の開発も進行しており、得られた化合物は、今後のオートファジーやがんの研究に貢献が期待でき、また臨床応用の可能性も有している。もっとも、創薬は時間がかかるものであり、更なる研究の継続が必要である。なお、本事業は補助事業者が他の補助金を獲得したため、途中で終了となっている。

#### ② 目的の達成状況

・所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

オートファジーは細胞内の蛋白質やオルガネラを分解する機構であるが、壊すべき蛋白質やオルガネラ（オートファジーの基質）がどのように選択されているか、この選択的オートファジーが破綻するとどうなるか、という課題は、様々な生命現象を理解する上で極めて重要な問題である。本研究課題では、この問題を解決する為に、当初2つの基礎的研究と2つの疾患研究が提案された。すなわち、①選択的オートファジーの多寡をモニターできるマウスを作製し、如何なる生命現象の時に選択的オートファジーが活性化するかを明らかにすること、②選択的オートファジーを破綻させたマウスを作製し、選択的オートファジーの役割を明らかにすること、③選択的オートファジー認識分子である p62 の過剰発現から肝がん発症に至るメカニズムの解明とこれを応用した肝がん治療薬開発、④パーキンソン病発症に関わる不良ミトコンドリア除去機構の解明、である。ただし、指摘事項「研究課題にフォーカスを絞ることが求められる」に対応して、研究④は実施されていない。①～③の成果を勘案すると、

この指摘は妥当であったと思われる。

研究①「選択的オートファジーモニターマウスの解析」に関しては、基質認識分子である p62 と Nbr1 に関して、GFP 融合ノックインマウス（選択的オートファジーモニターマウス）の作製に成功し、マウスの解析が進行しつつある。これらのことから、研究は順調に経過しており、所期の目的は達成されることが見込まれる。研究②「選択的オートファジー欠損マウスの解析」に関しては、基質認識分子である Nbr1 と Alf1 の欠損マウス（選択的オートファジーを破綻させたマウス）の作製に成功している。また、メタボローム解析により、Nbr1 が  $\beta$  酸化抑制機構に関わっていることを発見しており、順調に選択的オートファジーの役割解析が進行している。研究③「p62 を起点とした肝がん発症メカニズムの解明とその応用研究」に関しては、(1) p62 の過剰発現が Keap1 との結合依存的に転写因子 Nrf2 の活性化を促し肝がんが増殖すること (Gene Dev, 2011; JCB, 2011)、(2) この系には p62 の翻訳後修飾が重要であること (PNAS, 2012)、(3) p62 と Keap1 の結合は p62 の翻訳後修飾によること (投稿中)、を発見し、大きな成果を収めている。また、p62 を標的とした肝がん治療化合物のスクリーニングに関しても、16 万化合物から約 50 個のヒット化合物への絞り込みが終了しており、概ね順調に経過してきている。

いずれの課題においても順調に進捗しており、目的はすでに達成されたものも多く、今後さらなる達成が見込まれる。希望を追記すると、p62 を標的とした肝がん治療化合物の開発のスピードをもう少し速め、社会貢献を早期に目に見える形にしてほしい。

### ③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が  
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が  
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

研究代表者らは、これまでオートファジーの研究において先駆的な実績をあげているが、その研究背景とオリジナリティーを活かして、本研究計画を実施している。オートファジー選択的基質 p62 の研究において、リン酸化 p62 と Keap1 の相互作用、その結果誘導される Nrf2 の活性化の肝細胞がんにおける意義を発見した。細胞株を用いた生化学・分子生物学的解析のみならず、臨床サンプルの解析も行っている。成果はトップジャーナルに報告しているが、オートファジーの基礎研究を臨床医学へ発展させた内容は、国際的な先進性・優位性を有するものであり、大きなブレークスルーであると評価できる。さらに、リン酸化 p62 と Keap1 の相互作用に着目した抗がん剤のスクリーニングを行っており、これまでにない新規作用メカニズムによる薬剤開発が期待できる。一方、オートファジー選択的基質 Nbr1 の過剰蓄積が脂肪酸酸化を抑制すること、選択的オートファジー関連タンパク質 Alf1 の欠損細胞の解析から Alf1 がリサイクリングエンドソーム輸送を調節しトランスフェリン受容体の発現に影響を与えることを見出しており、これらの成果は、オートファジー因子の脂肪酸代謝お

よび鉄代謝における役割の解明に繋がることが期待できる。

研究代表者は、オートファジーに関連する遺伝子の遺伝子改変マウスを詳細に解析することで、オートファジー不能細胞における蓄積タンパク質に着目し、p62 が Keap1-Nrf2 経路、Nrb1 が脂肪酸代謝、そして Alfy が鉄代謝に関与することを見出している。いずれもオートファジーの新規の機能を示したブレークスルーであり、今後の研究の発展に大きく貢献できる。

p62 の Nrf2-Keap1 への作用に着目した新規化合物のスクリーニング方法を確立して、16 万化合物のスクリーニングを行い、約 50 個の候補化合物をピックアップしている。当初の計画では、指摘事項への対応として、薬剤スクリーニングの比重を下げることが提案されていたが、病態基礎研究成果に基づいた薬剤スクリーニングにおいても成果をあげていることは高く評価できる。

#### ④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

オートファジーの基質認識に関わる研究は、オートファジー研究全体において重要な部分である。本研究成果によるオートファジー基質認識分子を欠損させたマウスの作製は、オートファジーの基質認識機構の生理的、病理的意義を知る上で欠かせない重要な研究であり、オートファジー研究分野の発展に大きく寄与する。一方で、オートファジーが、酸化ストレス制御機構やβ酸化抑制機構とクロストークしているという知見は、ストレス応答や代謝応答の観点からも重要な意味を持っている。

研究代表者らの研究によって、オートファジーの機能不全は、がんや神経変性疾患など加齢に伴う疾患の病態と密接に関連することが明らかになった。一部の特殊な病態への関与ではなく、研究成果は、長寿社会（高齢化社会）における様々な健康障害や疾患の予防・治療に貢献できると考えられる。P62 分子が、肝がん治療の新たな標的になるという知見は、新たな抗がん剤の開発の期待に繋がり、経済的な貢献の可能性も考えられる。

#### ⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

研究体制において、研究室内外の連携がよくとられており、効果的かつ相乗的に研究成果に結びついている。メタボローム解析において、受託解析から実験計画を得た後、その成果をもとにして外部の研究者との共同研究を効果的に立ち上げている。したがって、研究実施マネジメントには問題がない。

以下の指摘事項への対応も評価できる。すなわち、①「研究対象を絞るべき」という指摘に対しては、パーキンソン病に関わる研究を実施せずに肝がん研究に集中している。その結果、肝がん増悪機構に関する明確な知見が得られていることより、妥当

な選択であったと考える。②「チャレンジングな領域に踏み込むべき」という指摘に対しては、メタボロームを研究対象に追加している。その結果、Nbr1 分子がβ酸化抑制機構に関わっていることを見出している。③「臨床との連携を行うべき」という指摘に対しては、新潟大学の外科教室と共同研究を行い、臨床の肝がん細胞を用いた研究につながっている。

助成金の支出項目は妥当なものであり、効果的に利活用され、研究成果に連結している。国際的なトップジャーナルへ複数の論文を報告しており、研究内容が国際的には高く評価されていることが明らかである。国内外の学会・研究会で積極的に発表を行っており、特許の出願・取得状況も適切である。専門誌・一般雑誌等に研究成果を解説する総説を発表している。一般向けにも、ホームページ、都政新報、科学新聞などで、その成果が公開されており適切である。一般向けシンポジウム、都民講座、高校生対象の啓発活動が3回なされている。