

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 脳科学研究戦略推進プログラム
(英語) Strategic Research Program for Brain Sciences

研究開発課題名： (日本語) タウ蛋白質の分解異常に由来する認知症、神経疾患に対する診断法、
治療法の開発研究
(英語) Development of innovative research on tauopathy diagnosis
and therapeutics

研究開発担当者 (日本語) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 病態細胞生物学分野 教授 清水重臣
所属 役職 氏名： (英語) Medical Research Institute, Pathological Cell Biology,
Tokyo Medical and Dental University, Professor, Shigeomi Shimizu

実施期間： 平成 28 年 11 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 新規オートファジーを介して作用する化合物の
PET イメージングによる動態解析

開発課題名： (英語) Pharmacokinetic Analysis of Novel Autophagy-Regulating Compounds
by PET Imaging

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
チームリーダー 細谷 孝充
所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Center for Life Science Technologies,
Team Leader, Takamitsu Hosoya

II. 成果の概要（総括研究報告）

タウ蛋白質の異常蓄積は、アルツハイマー型認知症などの病態形成に極めて重要である。申請者は、タウ蛋白質の分解に、申請者が発見した新規オートファジー（Atg5 非依存的オートファジー：*nature* 2009）が関与していることを見出した。即ち、(1)神経特異的新規オートファジー欠損マウスにおいて、リン酸化タウの蓄積と神経変性症状が観察されること、(2)新規オートファジー誘導化合物の投与によって、蓄積したタウ蛋白質の分解を促進させること、を見出したのである。本研究では、これらの事実を基盤に以下の研究を行う。即ち、**①**タウ蛋白質の分解機構の面からの病態解明を目指す。**②**タウ蛋白質の分解を促進できる低分子化合物を改良し、最適化を図る。**③**これらの低分子化合物を基盤に PET プローブを作製し、新規オートファジー（あるいはタウ分解）の多寡をモニターできる系を開発する。さらに、新規オートファジー誘導化合物は、ポリグルタミン病モデルマウスに対しても有効性を示すことから、新規オートファジーはミスフォールディング蛋白質全般を分解できる可能性がある。そこで、**④**新規オートファジーの変調が関与するミスフォールディング病を同定し、上記**②**で開発した低分子化合物の有効性を検討する。本年度は、以下の成果を得た。

(1)タウ蛋白質分解機構の面からの病態解明

神経特異的新規オートファジー欠損マウスの脳や新規オートファジー欠損 Neuro2a 細胞において蓄積しているタウの性状を解析した。その結果、これらの欠損脳や欠損細胞では、S²⁰²/T²⁰⁵ リン酸化タウの発現上昇が顕著であった。この発現量は、通常型オートファジー欠損マウスである Atg7 cKO マウスを凌駕するものであった。その他、様々なアミノ酸のリン酸化が認められたが、多くは正常マウス由来のタウにおいても観察された。また、新規オートファジー欠損マウスの脳を電子顕微鏡にて観察したところ、細胞質中に線維状フィブリルの蓄積や形成途中で止まっているオートファジー膜が認められた。これらの結果より、新規オートファジー欠損マウスでは、リン酸化タウが細胞質中に過剰に蓄積しているものと考えられた。

(2)タウオパチーに有効な低分子化合物の開発

新規オートファジー誘導化合物 X のタウオパチーへの有効性を検証するために、タウオパチーモデルマウス (rTg4510) の飼育を開始した。生後 3 ヶ月頃より行動異常が顕著にみられるようになり、Rotor-rod テストで評価が可能であった。また化合物 X を投与すると、軽度の症状改善傾向を示した。

さらに、12 種類の類縁体を設計、合成し、新規オートファジー誘導活性を検討したところ、1 種類の化合物が、化合物 X とほぼ同様の活性を有していることが明らかとなった。

また、約 120 種類の新規オートファジー誘導化合物ライブラリーから、Neuro2a 細胞においてタウ分解活性が高い化合物を探索した。その結果、新たに 3 種類のタウ分解化合物を同定することができた。

(3)低分子のポジトロン核種での標識技術の高度化

新規オートファジー誘導化合物の脳移行性や局在を、PET イメージングにより解析することを目指している。まず、低分子化合物のポジトロン核種による標識技術の高度化に取り組んだ。とくに、本研究で

開発された化合物を、将来、ヒトに応用することを想定した場合、半減期が 110 分と比較的長く、また高精度の PET 画像を与える ^{18}F による標識が好ましいことから、 ^{18}F 標識技術の高度化に注力した。その結果、高い放射化学収率で高純度の ^{18}F 標識体を得る条件を見いだすことに成功した。今回確立した標識技術を用いることにより、今後、実際の PET イメージング研究を円滑に進めることができると考えられる。

Result

Alzheimer's disease (AD) is a devastating neurodegenerative disorder with a relentless progression. Accumulation of tau protein is considered to be crucial for the AD pathogenesis. Recently, we found that tau protein degradation is mainly mediated by the Atg5-independent alternative autophagy (nature 2009), because (1) accumulation of tau and neurodegeneration was observed in neuron-specific alternative autophagy deficient mice, and (2) alternative autophagy-inducing compounds were useful to degrade tau protein. Based on the data, we are going to perform the following experiments: (1) analysis of the AD pathogenesis from the tau protein degradation, (2) improvement of the alternative autophagy-inducing compound that degrade tau protein, (3) development of the PET probe that evaluate alternative autophagy activity. We also identify other misfolding diseases derived from the alternative autophagy impairment, and develop compounds that are useful to degrade these misfolding proteins.

Specifically, this year, we obtained following results.

(1) Analysis of the AD pathogenesis from the tau protein degradation

We analyzed the tau protein modifications in the brain of alternative autophagy-deficient mice and in the alternative autophagy-deficient Neuro2a cells. In both cases, we found the accumulation of phosphorylated tau protein at S²⁰²/T²⁰⁵. We also found other tau modifications, but they were also identified in the brain of healthy mice. When we examined neurons in alternative autophagy-deficient mice using electron microscopy, we observed accumulation of fibrils and incomplete autophagic membranes in the cytosolic compartment. These results indicated that phospho-tau is accumulated in the brain of alternative autophagy-deficient mice.

(2) Improvement of the alternative autophagy-inducing compound that degrade tau protein

To examine whether alternative autophagy-inducing compound X is useful for the improvement of tauopathy, we applied this compound in tauopathy model mice (rTg4510), in which we observed behavior disorder from 3 month of age. Preliminary assessment using Rotor-rod test suggested that administration of compound X weakly improved tauopathy.

We synthesized 12 relative compounds of compound X, and examined their alternative autophagy-inducing activity. Among them, we identified one good compound that has an equivalent activity with compound X.

We also searched tau-degrading compounds among 120 alternative autophagy-inducing compounds using tau-expressing Neuro2a cells. As a result, we identified novel 3 compounds that have tau-degrading activity.

(3) Improvement studies on labeling technology of small molecules

In order to analyze the brain uptake and accumulation of novel autophagy-inducing compounds by PET

imaging study, we performed improvement studies on labeling technology of small molecules with a positron nucleus. Among the positron nuclei available, we focused on fluorine-18 (^{18}F) due to its preferable properties in terms of application to human clinical studies; ^{18}F has relatively long half-life ($t_{1/2}$ = approx. 110 min), and PET images obtained using ^{18}F -labeled PET probes generally provide highly precise data. After optimization of a labeling method, we successfully found efficient reaction conditions for preparation of an ^{18}F -labeled compound in pure form in high radiochemical yield.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 8 件、国際誌 10 件)

1. Yoshida T, Tsujioka M, Honda S, Shimizu S. Autophagy suppresses cell migration by degrading GEF-H1, a RhoA GEF. *OncoTarget*. 2016, 7, 34420-9.
2. Nasu Y, Benke A, Arakawa S, Yoshida G, Kawamura G, Manley S, Shimizu S, Ozawa T. In situ characterization of Bak clusters responsible for cell death using single molecule localization microscopy. *Scientific Reports*. 2016, 6, Article number: 27505.
3. Yamaguchi H, Arakawa S, Kanaseki T, Miyatsuka T, Fujitani Y, Watada H, Tsujimoto Y, Shimizu S. Golgi membrane-associated degradation pathway in yeast and mammals. *EMBO J*. 2016, 35, 1991-2007.
4. Konishi A, Izumi T, Shimizu S. TRF2 interacts with core histones to stabilize chromosome ends. *J. Biol. Chem*. 2016, 291, 20798-810.
5. Torii S, Yoshida T, Arakawa S, Honda S, Nakanishi A, Shimizu S. Identification of PPM1D as an essential Ulk1 phosphatase for genotoxic stress-induced autophagy. *EMBO R*. 2016, 11, 1552-1564.
6. Watanabe Y, Honda S, Konishi A, Arakawa S, Murohashi M, Yamaguchi H, Torii S, Tanabe M, Tanaka S, Warabi E, Shimizu S. Autophagy controls centrosome number by degrading Cep63. *Nature Commun*. 2016, 7, Article number: 13508.
7. Arakawa S, Honda S, Torii S, Tsujioka M, Shimizu S. Monitoring of Atg5-independent Mitophagy. "Mitophagy" Volume in "Methods in Molecular Biology Springer Press, 2016, *in press*.
8. Kozaki T, Komano J, Kanbayashi D, Takahama M, Misawa T, Satoh T, Takeuchi O, Kawai T, Shimizu S, Matsuura Y, Akira S, Saitoh T. Mitochondrial damage elicits a TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase-mediated antiviral response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017, 114, 2681-2686.
9. Arakawa S, Tsujioka M, Yoshida T, Tajima-Sakurai H, Nishida Y, Matsuoka Y, Yoshino I, Tsujimoto Y, Shimizu S. Role of Atg5-dependent cell death in the embryonic development of Bax/Bak double-knockout mice. *Cell Death and Differ*. 2017, *in press*

10. Arakawa S, Honda S, Yamaguchi H, Shimizu S. Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy Proceedings of the Japan Academy, Series B. 2017, *in press*

- 1, 清水重臣. オートファジーと細胞死. 実験医学増刊号「細胞死」2016, 55-61.
- 2, 清水重臣. 細胞を浄化する新たなメカニズムの発見. 「御茶の水医学雑誌」2016, 64: 91-103.
- 3, 清水重臣. Autophagy、細胞死と疾患. 「日本外科学会雑誌」2016, 117: 622-624.
- 4, 清水重臣. オートファジーと細胞死. 「肝胆膵」2016, 73: 157-162.
- 5, 清水重臣. ミトコンドリア変調を病因とする脳神経疾患. 「脳 21」2016, 19: 38-43.
- 6, 清水重臣. ミトコンドリア消失機構の分子基盤. 「医学のあゆみ」2017, 260: 31-36.
- 7, 清水重臣. 新たなオートファジー機構の発見. 「DOJIN news」2017, 160: 1-7.
- 8, 清水重臣. オートファジー欠損マウスの解析から見出した新規オートファジー機構. 「LABIO」2017, 印刷中.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「Autophagy、細胞死と疾患」口頭、清水重臣、第 89 回 外科学会 卒後教育セミナー, 2016/4/16、国内.
2. “Identification of natural product against fatty liver disease based on the induction of alternative autophagy” 口頭、清水重臣、ICNIM2016, 2016/7/15 国内.
3. 「オートファジーと細胞死の接点」口頭、清水重臣、日本 Cell Death 学会主催セミナー, 2016/8/25、国内.
4. “Alternative Autophagy is Essential for Neuronal Cell Maintenance” 口頭、清水重臣、Brain Protein Aging and Dementia Control International Workshop, 2016/9/9 国内.
5. 「ミトコンドリアの品質管理とその破綻による疾患」口頭、清水重臣、同仁化学研究所セミナー, 2016/9/29、国内.
6. “Macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes” 口頭、清水重臣、第 78 回日本血液学会, 2016/10/13、国内.
7. “Mitophagy and alternative autophagy” 口頭、清水重臣、The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, 2016/10/31、国内.
8. 「DNA 傷害誘導性オートファジーを制御する PPM1D 分子の役割」口頭、鳥居暁, 吉田達士, 荒川聡子, 本田真也, 清水重臣、第 10 回オートファジー研究会, 2016/11/14、国内.
9. 「DNA 傷害誘導性オートファジーを制御する PPM1D 分子の役割」ポスター、鳥居暁, 吉田達士, 荒川聡子, 清水重臣、第 39 回分子生物学会, 2016/11/30-12/02、国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 高校生への生物学紹介, 清水重臣, 海城高校, 2016/7/22, 国内.
2. 「細胞内のタンパク質を分解する新しい仕組み GOMED を発見—糖尿病罹患者の血糖調節への関与の可能性」, 清水重臣, プレスリリース(EMBO J), 2016/8/16, 国内.
3. 「放射線による細胞死を抑制するメカニズムを解明—オートファジーの新たな細胞保護機構—」, 清水重臣, プレスリリース(EMBO R), 2016/9/12, 国内.
4. 「体の中のゴミ処理機構とその異常による病気」, 清水重臣, 文京区市民公開講座, 2016/10/21, 国内.
5. 「染色体の均等分配に必須の中心体数を正確に制御する新たなメカニズムを解明」, 清水重臣, プレスリリース(Nature Commun), 2016/11/21, 国内.
6. 「オートファジーと疾患」, 清水重臣, 東京医科歯科大学平成 28 年度第 5 回記者懇談会, 2016/12/15, 国内.

(4) 特許出願

なし