

「生体恒常性維持・変容・破綻機構のネットワーク的理解に基づく
最適医療実現のための技術創出」

平成 24 年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

吉森 保

大阪大学大学院生命機能研究科・教授

恒常性維持機構オートファジーに着目した
栄養素過剰摂取に起因する疾患の原因解明と治療法確立

§1. 研究実施体制

(1)「吉森」グループ

- ① 研究代表者: 吉森 保 (大阪大学、教授)
- ② 研究項目: オートファジー制御の破綻と生活習慣病の発症

(2)「藤谷」グループ

- ① 主たる共同研究者: 藤谷 与士夫 (順天堂大学、先任准教授)
- ② 研究項目: 内分泌代謝器官の恒常性破綻と生活習慣病の発症

(3)「齊藤」グループ

- ① 主たる共同研究者: 齊藤 達哉 (大阪大学、特任准教授)
- ② 研究項目: 自然免疫系の恒常性破綻と生活習慣病の発症

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

吉森グループ研究実施内容

研究項目:リソファジーおよびミトファジーの制御機構を解明する。

我々は、損傷を受けたリソソームが特異的にオートファジーにより除去されるという現象を、世界で初めて見出しリソファジーと名付けた。今年度は、このリソファジーの分子機構の解析に着手し、損傷リソソームが選択的にユビキチン化されてオートファジーの標的となること、リソファジーの欠損は、尿酸負荷マウスにおける腎症を増悪させることを明らかにした(EMBO J, 投稿中)。ミトファジー(損傷ミトコンドリアを選択的に除去するオートファジー)については、オートファジー関連たんぱく質群のリクルートを人為的に起こし、ユビキチン化の後にオートファゴソームが形成される分子機構の解析を行い、予備的な結果を得ている。また長年論争的となってきたオートファゴソームが形成される場所を特定した(Nature, 2013)。この研究は本プロジェクトには含まれていないが、本プロジェクトにおけるオートファジー制御の分子機構解明の大きな手がかりとなるものである。

研究項目:過栄養によるオートファジー抑制の分子機構を解明する。

過栄養状態においてオートファジーが低下する原因について、脂肪酸に着目し、各種脂肪酸を培養細胞に添加しオートファジー活性を測定した。その結果、ある種の脂肪酸がオートファジーを強く抑制することを見出した。

研究項目:Rubicon によるオートファジー抑制の分子機構を解明する。

既に作成していた Rubicon-KO 線維芽細胞では基底レベルのオートファジーが、飢餓誘導時と同じ値まで恒常的に亢進していることを示した。また Rubicon-KD ではエンドサイトーシス経路にも影響があったが、KO では無いことも見出した。Rubicon のコンディショナル KO マウスを、肝臓、膵臓について作成した。

研究項目:オートファジー誘導剤の探索

理化学研究所の天然化合物を多く含む低分子化合物ライブラリーについて、既に開発した S/N 比の高いハイスループットなオートファジーアッセイ系を用いてスクリーニングを行い複数のオートファジー亢進剤を同定した。

藤谷グループ研究実施内容

研究項目:生活習慣病モデルマウスを用いて、内分泌組織においてオートファジーが果たす役割を解明する。

これまでの研究で膵β細胞におけるオートファジー機構の破綻は、ブドウ糖応答性インスリン分

泌不全、インスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償不全等、2型糖尿病の本質的欠陥に類似した病態を呈することを見出した。本研究は、これを発展させ、ヒト膵β細胞においてオートファジーにより分解処理される基質としての IAPP の重要性を検証する。アミノ酸一次配列の違いから、マウスの IAPP はヒトのものとは異なり、amyloid 形成や毒性を示さない。IAPP の毒性とオートファジーの関係を解析するためにマウス IAPP 遺伝子 locus にヒト IAPP 遺伝子をノックインした変異マウスを開発した。これを用いて、ヒト IAPP を有し、膵β細胞でオートファジー機能が低下したマウスを得た。平成 24 年度はこのマウスの耐糖能、膵β細胞量等を評価することにより、ヒト IAPP の細胞毒性制御にオートファジーが関与している可能性について検討を加えた。膵β細胞特異的 Atg7KO マウスの IAPP をヒト型に入れ替えたマウスに、高脂肪食を与えてβ細胞特異的 Atg7KO と比較したところ、有意に耐糖能が悪化すること、アポトーシス細胞数が増加しそれに伴いβ細胞量が低下することが明らかとなった。以上の結果は、ヒト IAPP の毒性の制御にオートファジーが関与することを生体において初めて明らかにした研究であり、意義深い。この研究は、ヒト IAPP toxic oligomer に起因する 2 型糖尿病の発症とオートファジーに関して、2 年目以降に解析する上での基盤となる。

研究項目：生活習慣病モデルマウスを用いて、内分泌・代謝器官においてオートファジーを亢進させることにより生体恒常性を維持して疾患症状を軽減する手法の有用性を検討する。

膵β細胞において Rubicon 遺伝子を欠失したマウスを吉森グループで作製中であり、平成 25 年度以降に糖尿病モデルマウスと交配させるなどにより、この研究課題に取り組む準備を進めている。

齊藤グループ研究実施内容

研究項目：生活習慣病の発症要因となる膜障害性因子による炎症惹起の分子機序を解明する。

過栄養摂取により蓄積する尿酸結晶は、免疫細胞による強い炎症応答を誘導して関節部位に組織障害を引き起こすため、痛風の発症要因となる。尿酸結晶による炎症の誘導には、Nod 様受容体ファミリーに属する NLRP3 が深く関わっている。本年度は化合物ライブラリーを用いた解析から、マクロファージによる NLRP3 依存的な炎症性サイトカイン IL-1beta の産生を制御する化合物として、痛風の治療薬であるコルヒチンを含めたチューブリン重合阻害剤を同定した。NLRP3 は、下流のシグナル伝達因子 ASC と共に NLRP3 インフラマソームと呼ばれる複合体を形成し、IL-1beta の産生を誘導する。この NLRP3 インフラマソームの活性化は、小胞体上に局在する NLRP3 とミトコンドリア上に局在する ASC が、刺激に応じて微小管依存的に会合することにより惹起される。コルヒチンは、尿酸結晶の刺激によりミトコンドリアが障害を受けて微小管依存的に小胞体近傍へ移動することを阻害する。これらの結果は、尿酸結晶による炎症にはオートファジーの標的となる損傷ミトコンドリアが深く関わることを示しており、今後の研究基盤となるものである。

研究項目：生活習慣病モデルマウスを用いて、自然免疫担当細胞においてオートファジーが果た

す役割を解明する。

次年度の解析の準備として、貪食細胞においてオートファジー関連遺伝子を欠失したマウス (Atg7_Flox/LysM-Cre マウス、Atg14_Flox/LysM-Cre マウス) を作製した。

研究項目:生活習慣病モデルマウスを用いて、自然免疫担当細胞におけるオートファジー不全が、内分泌・代謝器官に与える影響を解析する。

次年度の解析の準備として、糖尿病モデルマウス(ヒト IAPP 発現マウス)の移入を進めた。

研究項目:生活習慣病モデルマウスを用いて、自然免疫担当細胞においてオートファジーを亢進させることにより生体恒常性を維持して疾患症状を軽減する手法の有用性を検討する。

次年度の解析の準備として、貪食細胞においてオートファジーの負の制御因子を欠失したマウス (Rubicon_Flox/LysM-Cre マウス) を作製した。