11　漢方薬によるオートファジー抑止を通じた薬効の研究	野田　健司

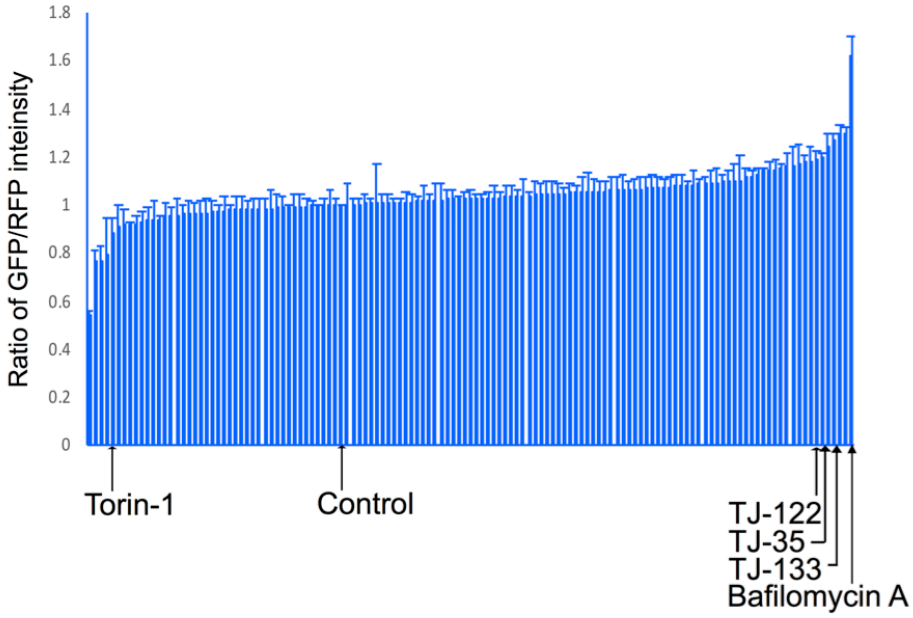
【目的】オートファジーは真核生物における細胞内の自己分解機構である。その機構は真核生物に広く保存されており、ヒトやマウスをはじめとする哺乳類でも、オートファジーの研究が近年盛んに行われ、その結果オートファジーは様々な疾病や生理現象に深く関わることが明らかにされてきた。このような観点から、オートファジー活性を薬剤などにより人為的に制御することが様々な企業や研究所などにより目指されているが、まだ理想的な薬剤の登場には至っていない。漢方薬は中医学を起源とし、日本の文化などに適応しながら受容されてきた生薬の組み合わせの体系である。その薬効をもとに古来より伝達されてきたが、その作用機序に対する理解は未だ十分とは言えない。ツムラより販売されている医療用漢方 145 種類のうち、その薬効がオートファジー活性の調節を介在しているものがある可能性を検討するため、本研究を開始した。

【方法】オートファジー活性を定量する tfLC3 法を用いて、Hela 細胞を全 145 種の漢方処方で処理をした。そのなかで著明なオートファジー抑制活性を示したものに注目して、その作用機序を探求した。様々なオートファジー実行分子への影響を調べた。オートファジー制御機構であるmTORC1 の活性制御への影響を解析した。基質の一つ TFEB への影響の機構として、細胞内カルシウム動態およびカルシニューリンの影響を解析した。

【結果】スクリーニングの結果、TJ-35 四逆散がオートファジー抑制活性を示すことが明らかとなった。TJ-35 はオートファゴソーム形成を抑制した。mTORC1 の基質のうち、特に TFEB の脱リン酸化を抑制した。TFEB はカルシニューリンにより脱リン酸化された。飢餓環境下に小胞体からカルシウムが流出することを見出し、TJ-35 はその流出を阻害することで、TFEB の脱リン酸化を阻害し、オートファジーを阻害することが判明した。

Ikari, S., S.-L. Lu, F. Hao, K. Imai, Y. Araki, Y.-H. Yamamoto, C.-Y. Tsai, Y. Nishiyama, N. Shitan, T. Yoshimori, T. Otomo, and T. Noda. 2020. Starvation-induced autophagy via calcium-dependent TFEB dephosphorylation is suppressed by Shigyakusan. *PLoS ONE*. 15:e0230156–22. doi:10.1371/journal.pone.0230156.

全漢方処方のオートファジー活性への影響



11. 漢方薬によるオートファジー抑止を通じた薬効の研究

野田　健司

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔科学フロンティアセンター 先端生物教室

Key words：オートファジー，四逆散，カルシウム，TFEB

緒　言

オートファジーは真核生物における細胞内の自己分解機構である。細胞が栄養飢餓などに曝されると、新規の膜構造体オートファゴソームが形成され、周辺の細胞質基質や、ミトコンドリアなどのオルガネラを包み込み、プロテアーゼなどの加水分解酵素を内包するオルガネラであるリソソームと融合することにより、包み込んだ標的を分解する。我々は出芽酵母において、その分子機構を長年解析してきたが、その機構は真核生物に広く保存されており、ヒトやマウスをはじめとする哺乳類でも、オートファジーの研究が近年盛んに行われ、その結果オートファジーは様々な疾病や生理現象に深く関わることが明らかにされてきた［1］。例えばオートファジーを脳において抑制すると、タンパク質凝集体が蓄積しアルツハイマー様の症状をきたし、肝臓でのオートファジーの抑制は、肝がんの増殖を促進する。またオートファジーの抑制が急性膵炎を抑制することも報告されている。このような観点から、オートファジー活性を薬剤などにより人為的に制御することが様々な企業や研究所などにより目指されているが、まだ理想的な薬剤の登場には至っていない。

漢方薬は中医学を起源とし、日本の文化などに適応しながら受容されてきた生薬の組み合わせの体系である。その薬効をもとに古来より伝達されてきたが、その作用機序に対する理解は未だ十分とは言えない。ツムラより販売されている医療用漢方 145 種類のうち、その薬効がオートファジー活性の調節を介在しているものがある可能性を検討するため、本研究を開始した。

方法および結果

1.　全漢方処方のオートファジー活性に対する影響のスクリーニング

GFP と RFP の両方をオートファゴソーム膜に局在する LC3 に結合させ、HeLa 細胞に発現させた（図 1A）。オートファジーが進行すると LC3 はリソソームにとりこまれ、GFP のシグナルはその酸性環境下に減弱するが、RFP は酸性に耐性を示すため減弱しない［2］。すなわち RFP と GFP のシグナル強度の比率がオートファジーの進行度を反映することになる。全漢方 145 処方の抽出液で HeLa 細胞を処理し、横川 CQ1 自動コンフォーカル顕微鏡を用い、GFP および RFP 由来の蛍光強度を計測した。そのなかで、既知のオートファジー阻害剤である Bafilomycin A1 と同様に GFP/RFP の比が上昇した TJ-35（四逆散）に注目した（図 1B）。

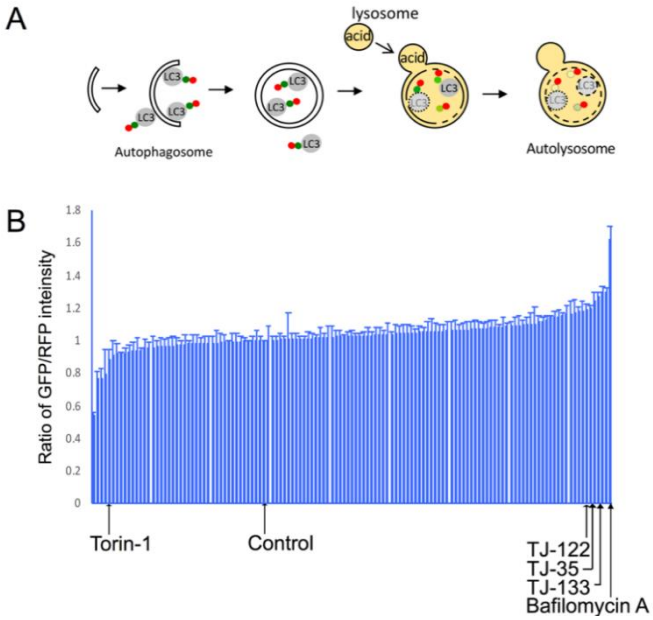


図 1. 全漢方のオートファジー活性への影響

A）スクリーニング法の概念図

B）全漢方の GFP/RFP シグナル強度への影響

2. TJ-35 はオートファゴソーム形成を抑制する

Hela 細胞を飢餓培地に移すとオートファゴソームが形成されるが、それは LC3 の蛍光抗体法による観察で、多くの輝点として観察される。しかしながら TJ-35 で処理するとそれらの輝点の形成が抑制された（図 2A)。またオートファジー誘導時に LC3 はリソソーム内で分解されるが、TJ-35 処理するとその分解が抑制された（図 2B)。これらのことから TJ-35 はオートファジーの誘導を抑制することが明らかになった。さらにオートファゴソームのみに局在する Atg5 と WIPI1 と ULK1 を GFP でタギングし、飢餓時で観察したところ、TJ-35 処理によりこれらが形成する輝点の出現が抑制された。これらのことから TJ-35 はオートファゴソームの形成を抑制することが明らかになった。

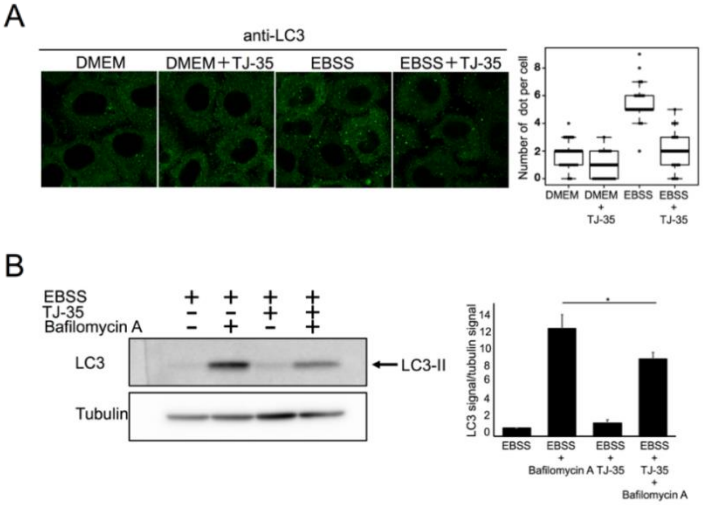


図 2. TJ-35 はオートファジーを抑制する

A）Hela 細胞を富栄養培地および飢餓培地で培養し、TJ-35 処理し抗 LC3 抗体で免疫染色した。

スケールバー：10μm

B）Hela 細胞を飢餓培地で培養し TJ-35 および Bafilomycin 処理で LC3 の分解を観察した。

*は T-test で $p < 0.05$

3. TJ-35 は TFEB の脱リン酸化および核移行を抑制する

mTORC1 は栄養状態に応じて細胞成長やオートファジーを制御するマスター制御因子であるプロテインキナーゼであり、飢餓時に不活化する。mTORC1 の様々な基質への TJ-35 の影響を調べたところ、S6k および 4EBP-1 の飢餓に応じた脱リン酸化には影響が見られなかった。しかしながら、TFEB および ULK1 の脱リン酸化が著明に減弱していた。ULK1 はオートファジーに必須なプロテインキナーゼであり、TFEB はオートファジーに関わる因子の転写を担う転写因子である。TFEB は飢餓時に脱リン酸化されることで、細胞質から核へ移行する。しかしながら TJ-35 処理により、この核移行が抑制され、その下流の遺伝子の転写が抑制された。mTORC1 は富栄養時に TFEB や ULK1 と物理的相互作用をするが、飢餓環境下に解離することが報告されている。Proximity ligation assay によりこれらに対する TJ-35 の効果を調べたところ、TJ-35 がこれらの解離を抑制することが明らかになった。これらのことから TJ-35 はmTORC1 の基質のうちオートファジーに関与する ULK1 および TFEB の脱リン酸化を抑制することが明らかになった（図 3)。

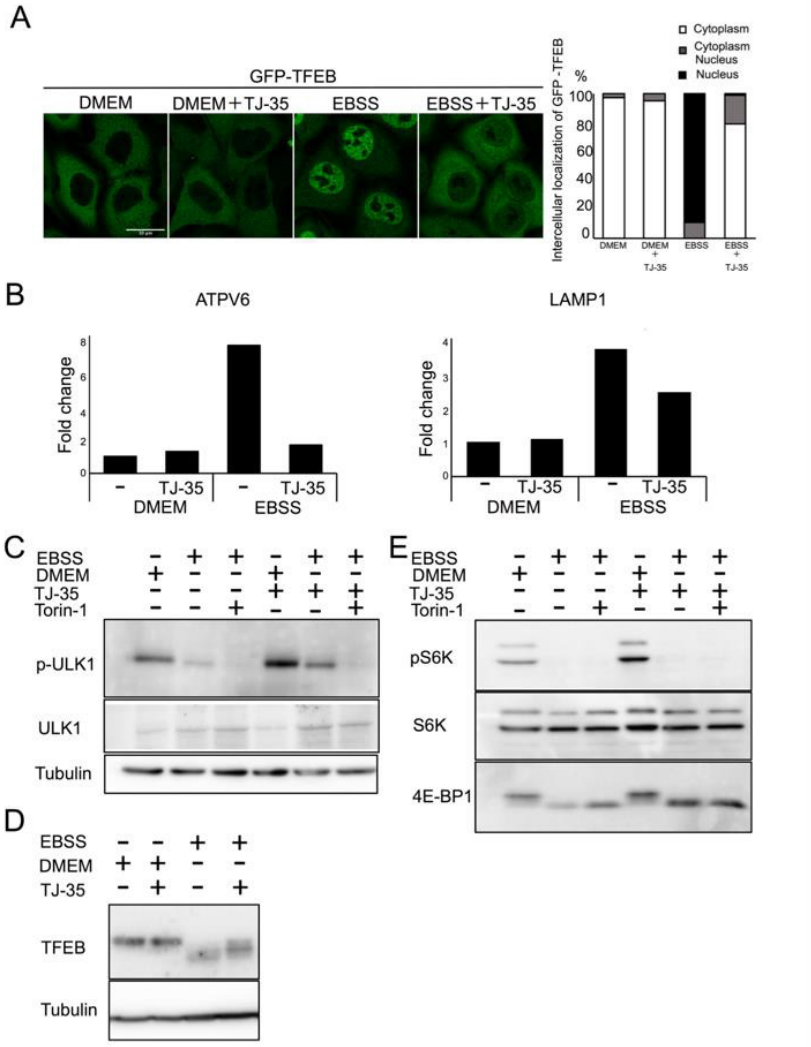


図 3. TJ-35 は mTORC1 基質のうちオートファジー関連の脱リン酸化を抑制する

A) GFP-TFEB を発現した Hela 細胞を富栄養培地および飢餓培地で培養し、TJ-35 処理した。スケールバー：10μm。

B) Hela 細胞を富栄養および飢餓培地で培養し TJ-35 処理で TFEB の下流因子の転写を定量した。

C, D, E) Hela 細胞を富栄養および飢餓培地で培養し TJ-35 処理で mTORC1 の基質のリン酸化をウエスタンブロットで解析した。

4. TJ-35 は飢餓による小胞体からのカルシウム流出を抑制し、カルシニューリンによる TFEB 脱リン酸化を抑制する

飢餓環境下における細胞質のカルシウム動態の変化を複数の独立したアッセイで調べたところ、飢餓下に細胞質のカルシウム濃度が著明に上昇する現象が見いだされた。小胞体の IP3 レセプターの阻害剤処理をすることで、その上昇が見られなくなったことから、それは小胞体内のカルシウムが動員されていることが明らかになった。TJ-35 処理によりそのカルシウムの上昇が抑制された。またカルシウム依存性のプロテインホスファターゼであるカルシニューリン依存に TFEB が脱リン酸化されることも明らかになった。これらのことから、小胞体からのカルシウムの流出を抑制することで、TFEB の脱リン酸化が阻害されることが明らかになった。

考　察

今回、漢方全処方を網羅的にスクリーニングし、四逆散 TJ-35 がオートファジーを抑制する効果があることを見出し、その分子機構を明らかにした。四逆散は十二指腸炎や膵炎などの炎症を沈静化させる作用がある。実際オートファジーを抑制することで急性膵炎を沈静化させるということが報告されており［3］、今回見出した四逆散のオートファジー抑制作用が、そこに関与する可能性は大変興味深い。またオートファジーの阻害薬であるクロロキンが、ガンの進展を抑制することが明らかになっており、現在米国で複数の臨床試験が進行しているが、同時にクロロキンの副作用も問題視されている。安全なオートファジー阻害剤が求められているが、今回、四逆散がオートファジー阻害作用があることが明らかにされたことにより、今後そのような利用法の検討が進められることであろう。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院歯学研究科口腔科学フロンティアセンターの碇純子博士、荒木保弘助教、Lu Shiou-Ling 博士、Hao Feike 博士、山本洋平助教,大阪大学免疫学フロンティアセンターの Chao-Yuan Tsai 博士、神戸薬科大学医薬細胞生物学研究室の士反伸和教授、神戸薬科大学薬用植物園の西山由美講師、大阪大学大学院生命機能研究科細胞内膜動態研究室の吉森保教授、今井健太博士、川崎医科大学分子遺伝医学教室の大友孝信教授である。漢方薬の試料については、株式会社ツムラ様に多大なご支援を賜りました。

文　献

1） Morishita H, Mizushima N. Diverse Cellular Roles of Autophagy. Annu Rev Cell Dev Biol. 2019 Oct 6;35:453–75. PMID 31283377 DOI10.1146/annurev-cellbio-100818-12530

2） Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. Autophagy. 2007 Sep;3(5):452–60. PMID 17534139 DOI 10.4161/auto.4451

3） Hashimoto D, Ohmuraya M, Hirota M, Yamamoto A, Suyama K, Ida S, et al. Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells. J Cell Biol. 2008 Jun 30;181(7):1065–72. PMID 17534139 DOI 10.1083/jcb.200712156