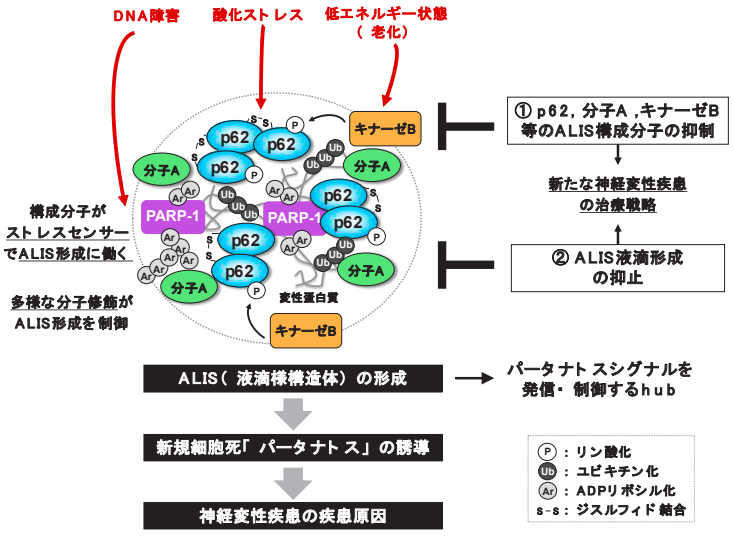
| 42　新規細胞死パータナトスの制御による神経変性疾患治療 | 松沢　厚 |
|---|---|

【目的】神経変性疾患などの病因として近年注目される「パータナトス」は、酸化ストレスやDNA障害、老化で誘導される。パータナトスは多様機能酵素PARP-1による翻訳後修飾体ポリADPリボース（PAR）の合成がトリガーとなり誘導されるため、PARP-1が神経変性疾患の治療標的と考えられるが、DNA修復・複製に不可欠であり、その阻害で重篤な副作用が生じることから、それ以外にパータナトスを抑制できる、適切な治療標的の発見が、神経変性疾患の治療戦略開発に重要である。しかし、その誘導メカニズムは良く分かっていない。最近我々は、パータナトス誘導に“ALIS”（aggresome-like induced structures）という液滴様の新たな構造体が重要であることを見出した。本研究では、ALIS形成に関わる構成分子の作用機序、およびALISによるパータナトス誘導メカニズムを解明し、パータナトスの抑制による、神経変性疾患の画期的な治療戦略の鍵となる新たな創薬ターゲットの発見を目的とする（図）。

【方法】1. ALISによるパータナトス誘導メカニズムの解析：ALISの液滴形成の定量系を確立して、ALIS形成とパータナトス誘導に必須の分子群についてALIS形成に対する機能を詳細に解析し、パータナトス抑制の標的分子としての可能性を検討した。2. 神経変性疾患の原因であるパータナトスを抑制する標的としてのALISの妥当性の検証：パータナトス誘導に必須であるALISの形成が神経変性疾患の神経細胞死に重要であるかを確認するため、ALIS形成を阻害することによって神経細胞死が抑制されるか否か検証を行った。3. 神経変性疾患の治療戦略の鍵となる創薬化合物の開発：神経変性疾患の治療戦略としてパータナトス抑制を可能とする創薬化合物の開発にも着手した。4. パータナトスと他の疾患との関連性の追求：パータナトスと他の疾患との関連性も明確にし、パータナトス抑制剤の重要性を追求した。

【結果】1. ALIS構成分子が多様なストレスを感知してALIS形成を誘導する仕組みの解明は重要である。我々は、DNA障害のセンサー分子PARP-1に加えて、酸化ストレスとエネルギー代謝低下（老化）のセンサー分子として、多機能分子p62と低エネルギー感受性キナーゼBを同定し、酸化ストレスによるp62同士のシステイン残基のジスルフィド化がALIS形成とパータナトス誘導に不可欠であること、またp62の類似分子Aがp62分解を抑制できることなど、ALIS形成の詳細なメカニズムを明らかにした。2. 神経変性疾患で起こる神経細胞死が、ALIS形成を阻害することによって抑制されることが明らかとなり、ALIS形成自体の制御やALIS形成に関わる分子が、神経変性疾患の治療標的として重要であることが実証できた。3. 我々が独自に同定した幾つかのALIS形成阻害剤、および超硫黄分子がパータナトスを強く抑制することを見出し、神経変性疾患の治療戦略としてのALIS制御の重要性を確認した。4. パータナトス形成に関わるALISなどの液滴様構造体が、神経変性疾患以外に、癌などの多様な疾患の制御にも関わることを実証した。

新規細胞死パータナトス抑制による神経変性疾患の治療戦略



# 42. 新規細胞死パータナトスの制御による神経変性疾患治療

松沢　厚

東北大学 大学院薬学研究科 衛生化学分野

Key words：細胞死，液滴，パータナトス，神経変性疾患，ALIS

## 緒　言

近年、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患における神経細胞死は、既存のアポトーシスではなく、新たなプログラム細胞死として見出された「パータナトス」によって誘導され、病態の根本的な原因である可能性が報告されるようになってきた。パータナトスは、酸化ストレスやDNA障害、老化（エネルギー代謝低下）などによって誘導される。パータナトスは多様な機能を持つ酵素PARP-1による翻訳後修飾体であるポリADPリボース（PAR）の合成がトリガーとなり、最終的に、それにリクルートされたDNA切断酵素MIFによるDNA断片化で完了する。パータナトス（parthanatos）の名前は、このPARに由来する。実際、PARP-1やMIFの欠損や阻害によって、パータナトスおよび神経変性が抑制されるという結果が最近幾つか報告されている。しかし、PARP-1やMIFはDNA修復・複製に不可欠であり、これらの阻害で重篤な副作用が生じるため、これら以外にパータナトスを抑制できる適切な治療標的の発見が、神経変性疾患の治療戦略開発に重要と考えられる。にもかかわらず、パータナトス自体の誘導メカニズムについては、新たに発見された細胞死であるため、まだ良く分かっていないのが現状である。

最近我々は、パータナトスの誘導に“ALIS”（aggresome-like induced structures）という液滴様の新たな構造体が重要であることを見出した［1］。液滴は液-液相分離（LLPS）によって形成され、生体での効率的な生化学的反応の場として、近年注目されているが、ALISは、まさにパータナトスの誘導シグナルを発信し、制御する場即ちパータナトスシグナルのハブ（hub）として中心的役割を果たすことが、我々の研究から明らかとなってきた。そこで本研究では、我々が独自に見出した、このALISによるパータナトス誘導メカニズムを解明し、パータナトスの抑制による、神経変性疾患の画期的な治療戦略の鍵となる新たな創薬ターゲットの発見を目的とする。ALIS形成に関わる構成分子を同定し、その作用機序を解明することで、パータナトス抑制機構を明らかにして、オリジナルな新規創薬標的を発見し、既存とは異なる新しい視点から、画期的な神経変性疾患の治療戦略開発の実現を目標とする。

## 方　法

### 1. ALISによるパータナトス誘導メカニズムの解析

我々はこれまで独自に、ALIS形成とパータナトス誘導に必須の分子として、多機能分子p62、その類似分子Aやp62を基質とするキナーゼ分子Bを同定していた。これらがALIS形成にどのように寄与しているか、その機能を詳細に解析した。解明すべき具体的なポイントは、p62がパータナトス抑制の標的分子であることを実証することである。酸化ストレスによって、p62同士のシステイン残基のジスルフィド化が生じるが、このp62のジスルフィド化が、ALIS形成に促進的に働くか検討した。また、老化に伴うような低エネルギー状態を感知する低エネルギー感受性キナーゼ（キナーゼBとする）によるp62のリン酸化や、あるいはp62の類似分子Aがパータナトス抑制の標的分子であることを、それぞれの欠損細胞および変異体再構成細胞などを用いて検討を行った。また、ALISの液滴形成を定量する測定系を確立する必要があり、細胞内のALISの蛍光顕微鏡画像を用いて、その形状から流動性（円形度）を計測する方法についても検討した。

**2. 神経変性疾患の原因であるパータナトスを抑制する標的としての ALIS の妥当性の検証**

最近、パータナトスが神経変性疾患での神経細胞死の原因であることを示す幾つかの論文が報告されている。従って実際に、パータナトス誘導に必須である ALIS の形成が、神経変性疾患の神経細胞死に重要であるかを確認するため、ALIS 形成を阻害することによって神経細胞死が抑制されるか否か検証を行った。

**3. 神経変性疾患の治療戦略の鍵となる創薬化合物の開発**

本研究では、神経変性疾患の治療戦略の鍵となるパータナトス抑制を可能とする創薬化合物の開発にも着手した。多くの標的の中で、特に ALIS の液滴構造を崩壊させる薬剤の候補を幾つか同定しており、これを基に創薬開発の足掛りとした。

**4. パータナトスと他の疾患との関連性の追求**

パータナトスは神経変性のみでなく、多様な疾患、例えば癌の発症や制御にも関わる。本研究では、パータナトスと他の疾患との関連性も明確にし、パータナトスを抑制する薬剤の開発の重要性を追求していくことも目標とした。

## 結果および考察

**1. ALIS 形成を起点としたパータナトス誘導メカニズムの解明**

パータナトス抑制による、神経変性疾患の治療戦略の新規ターゲットを見出すためには、ALIS によるパータナトス誘導機序の解明が重要であり、そのためには ALIS 形成に関わる構成分子を同定し、その構成分子の機能の解明が鍵となる。我々は、パータナトス誘導に不可欠な構成分子を特定するため、パータナトスを誘導するストレス刺激に注目し、そのストレスを感知するセンサー分子に注目して解析を行った。DNA 障害のセンサー分子は、パータナトスシグナルのトリガーとなる PAR を合成する PARP-1 であり、実際、PARP-1 欠損でパータナトスが起きなくなることは既に報告されている。しかし、酸化ストレスやエネルギー代謝低下（老化）のセンサー分子は不明であった。酸化ストレスによって変性したタンパク質はユビキチン化され、同時に凝集する。ALIS には、このユビキチン化変性タンパク質が凝集するが、ここにユビキチン化タンパク質を認識する多機能分子 p62 も刺激に伴って集合し、ALIS 形成を促進することが分かった。実際、p62 欠損細胞では ALIS が形成されず、パータナトスが抑制された。さらに、p62 分子内のシステイン残基が酸化ストレスの直接のセンサーであり、p62 同士のシステイン残基のジスルフィド化が ALIS 形成とそれに続くパータナトス誘導に必須であることも見出した。即ち、p62 は酸化ストレスセンサー分子で、酸化ストレス依存的なパータナトス誘導のトリガーであることが分かった。一方、p62 はリン酸化によってユビキチンとの結合を増強させ、ALIS 形成も促進する。老化に伴うような低エネルギー状態は、低エネルギー感受性のキナーゼ B を活性化するが、我々はキナーゼ B 欠損細胞でも ALIS 形成とパータナトスが抑制されることを観察した。さらに加えて、p62 の類似分子 A が ALIS の構成因子であり、p62 のオートファジー分解を抑制できることが分かった。実は分子 A は、PARP-1 によって合成される PAR との結合が可能な特徴的なドメインを分子内に持っている。PAR 自体はその物性により、液滴構造体を安定化する可能性が指摘されているが、それだけでなく、分子 A が PAR を介して ALIS 構造体に入り込み、液滴の安定性を高め、p62 をオートファジー分解から回避させている可能性が考えられた。ALIS 構成因子である PARP-1 自体は DNA 修復機能があるため、直接のパータナトス阻害標的にはできない。本研究では ALIS 形成に関わる p62 とその類似分子 A、およびキナーゼ B をパータナトス阻害標的として新たに見出し、その機能を解明した。

**2. ALIS 形成の阻害によって神経変性疾患の原因であるパータナトスを抑制できる**

上記の ALIS 構成因子をそれぞれ欠損させた際に、ALIS の形成が阻害され、実際にパータナトス誘導が抑制できることが判明した。アミロイドβ刺激による神経細胞死のように、神経変性疾患で起こる神経細胞死についても、ALIS 形成を阻害することによって、その神経細胞死が抑制されることが明らかとなった［2］。従って、神経変性疾患における神経細胞死の抑制には、ALIS 形成自体の制御や ALIS 形成に関わる分子を標的とすることの妥当性が検証できた。

### 3. 神経変性疾患の治療戦略のための創薬化合物の同定と検証

我々は、ALIS 形成自体の阻害剤を、既存の抗菌薬や抗癌剤を用いたスクリーニングにより幾つか同定した。ALIS 形成阻害剤は、ALIS 形成ならびにパータナトス誘導を抑制することが判明した（図 1）。また、パータナトスの感受性が ALIS 液滴様凝集体の凝集度（固さ）によって決まることも見出し、ALIS 形成阻害だけでなく ALIS の凝集度を低下させる（図 2）、即ち流動性を上げること（図 3）がパータナトス抑制に繋がることを明らかにした。

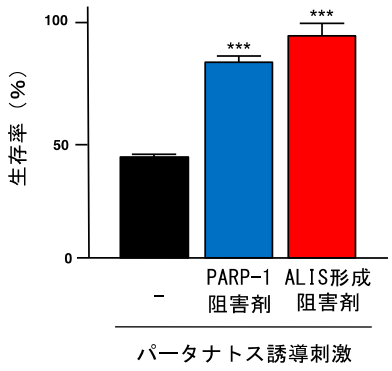



図 1. ALIS 液滴様凝集体の形成阻害剤によるパータナトス抑制
ALIS 凝集体の形成阻害剤は、パータナトスを抑制した。PARP-1 阻害剤は、パータナトス抑制のポジティブコントロールとして用いた。Student's t test による統計処理（***p＜0.001）。

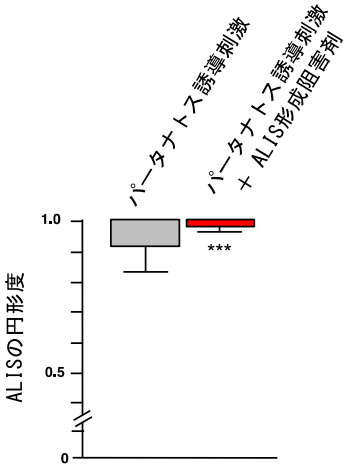



図 2. ALIS 液滴様凝集体の形成阻害剤による ALIS の円形度（流動性）の上昇
ALIS 凝集体の形成阻害剤は、ALIS の円形度を高め、流動性を上げた。ALIS の液滴形成を定量する測定系として、細胞内の ALIS の蛍光顕微鏡画像を用いて、その形状から円形度（流動性）を計測した。細胞はヒト線維肉腫由来細胞株 HT1080 を用いた。Student's t test による統計処理（***$p$＜0.001）。

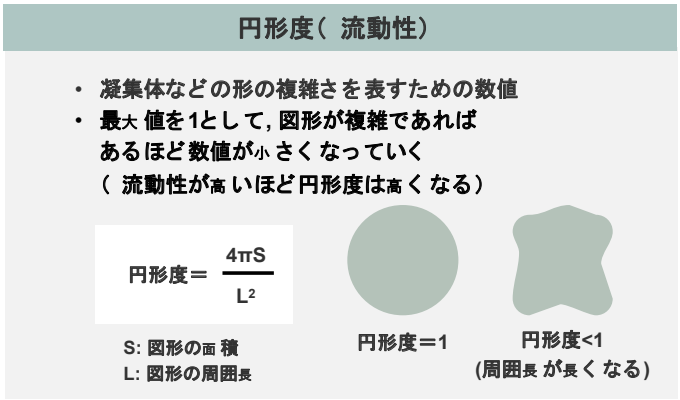



図 3. 円形度（流動性）とその算出方法についての説明

超硫黄分子がパータナトスの強力な抑制剤となることも見出した。具体的には、超硫黄分子が HSP90（HSF1 の抑制因子）のシステイン残基の修飾を介してストレス応答転写因子 HSF1 を活性化し、多様なシャペロン分子を誘導することで、タンパク質凝集体の分解が促進され、パータナトスが抑制されることが判明した［3］。

以上の知見は、パータナトス誘導のメカニズム解明に寄与すると共に、神経変性疾患の治療戦略としての ALIS 制御の重要性を示している。

### 4. パータナトスと癌との関連

パータナトスは、神経変性疾患以外にも、多様な疾患、例えば癌の制御にも関わる。本研究では、p62 とその類似分子 A により形成される液滴中に、癌細胞の転移促進分子 Rac1 とその分解酵素 cIAP1 が包含されていること、また、その液滴の中で、cIAP1 による Rac1 の分解が誘導されていることを見出した［4］。上記の液滴と ALIS との関連性やパータナトスとの関係を現在検証中であり、液滴と多様な細胞死ならびにその関連疾患についてが、追求すべき今後の発展的課題である［5～7］。

## 謝　辞

本研究を纏めるにあたり、東北大学大学院薬学研究科衛生化学分野の皆様に、心より深謝致します。

## 文　献

1） Noguchi T, Suzuki M, Mutoh N, Hirata Y, Tsuchida M, Miyagawa S, Hwang GW, Aoki J, Matsuzawa A. Nuclear-accumulated SQSTM1/p62-based ALIS act as microdomains sensing cellular stresses and triggering oxidative stress-induced parthanatos. Cell Death Dis. 2018 Dec 13;9(12):1193. PMID: 30546061 DOI: 10.1038/s41419-018-1245-y

2） Hamano S, Noguchi T, Asai Y, Ito R, Komatsu R, Sato T, Inoue A, Maruyama T, Kudo TA, Hirata Y, Shindo S, Uchida Y, Hwang GW, Matsuzawa A. Aggregability of the SQSTM1/p62-based aggresome-like induced structures determines the sensitivity to parthanatos. Cell Death Discov. 2024 Feb 12;10(1):74. PMID: 38346947 DOI: 10.1038/s41420-024-01838-2

3） Yamada Y, Noguchi T, Suzuki M, Yamada M, Hirata Y, Matsuzawa A. Reactive sulfur species disaggregate the SQSTM1/p62-based aggresome-like induced structures via the HSP70 induction and prevent parthanatos. J Biol Chem. 2023 Jun;299(6):104710. Epub 2023 Apr 13. PMID: 37060999 DOI: 10.1016/j.jbc.2023.104710

4) Noguchi T, Sekiguchi Y, Shimada T, Suzuki W, Yokosawa T, Itoh T, Yamada M, Suzuki M, Kurokawa R, Hirata Y, Matsuzawa A. LLPS of SQSTM1/p62 and NBR1 as outcomes of lysosomal stress response limits cancer cell metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2023 Oct 24;120(43):e2311282120. Epub 2023 Oct 17. PMID: 37847732 DOI: 10.1073/pnas.2311282120.

5) Hirata Y, Cai R, Volchuk A, Steinberg BE, Saito Y, Matsuzawa A, Grinstein S, Freeman SA. Lipid peroxidation increases membrane tension, Piezo1 gating, and cation permeability to execute ferroptosis. Curr Biol. 2023 Apr 10;33(7):1282-1294.e5. Epub 2023 Mar 9. PMID: 36898371 DOI: 10.1016/j.cub.2023.02.060

6) Hirata Y, Kashiwabara N, Nada Y, Inoue A, Sato E, Noguchi T, Matsuzawa A. A comprehensive toxicological analysis of trans-fatty acids (TFAs) reveals a pro-apoptotic action specific to industrial TFAs counteracted by polyunsaturated FAs. Sci Rep. 2023 Apr 11;13(1):5883. PMID: 37041254 DOI: 10.1038/s41598-023-32083-9

7) Hirata Y, Ferreri C, Yamada Y, Inoue A, Sansone A, Vetica F, Suzuki W, Takano S, Noguchi T, Matsuzawa A, Chatgilialoglu C. Geometrical isomerization of arachidonic acid during lipid peroxidation interferes with ferroptosis. Free Radic Biol Med. 2023 Aug 1;204:374-384. Epub 2023 May 29. PMID: 37257700 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.05.026