

# Clomiphenе enhances autophagic flux via inhibition of mTORC1 signaling

|       |  |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: English<br>出版者:<br>公開日: 2017-03-20<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 平野, 一興<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="https://jair.repo.nii.ac.jp/records/2001973">https://jair.repo.nii.ac.jp/records/2001973</a>  |

|       |  |    |      |
|-------|--|----|------|
| 順天堂大学 | 博士 (医学)  | 氏名 | 平野一興 |
| 論文題目  | Clomiphene enhances autophagic flux via inhibition of mTORC1 signaling<br>(クロミフェンは mTORC1 経路抑制によりオートファジーを誘導する) |    |      |

(論文内容の要約) (1000 字~1500 字)

#### 【目的】

パーキンソン病 (以下 PD) の治療法は対症療法に留まり、高齢化により患者数の増大する PD の根本的治療が希求されている。近年、蛋白質分解システム“オートファジー”の生物学的意義・機序が徐々に解明され、感染症、炎症、加齢、がん、PD との関連が認識されている。特に細胞内凝集体を伴う神経変性疾患 (PD、ハンチントン病等) に関しては、モデル細胞や動物においてオートファジー促進作用を持つ薬物の有効性が報告され、オートファジーを標的とした新規創薬が期待されている。今回我々は 796 種の既存薬ライブラリーをスクリーニングすることにより、オートファジー関連化合物を探索し、その分子薬理作用解明を試みた。

#### 【方法】

GFP-LC3 安定発現 HeLa 細胞に既存薬(10 $\mu$ M)を添加し、24 時間後に蛍光顕微鏡を用いて GFP ドット陽性 (5 ドット/細胞以上) の細胞数を計測した。GFP 陽性 HeLa 細胞 100 個のうち、GFP dot 陽性細胞が 30 個以上のものを 1 次ヒットとし、LC3-II/actin 比 (ウェスタンブロット法)、リソソーム水解酵素阻害薬との共処理による LC3-II/actin 比変化を評価し、オートファジー誘導効果を示したものをヒットとした。各ヒットにつきオートファジー誘導の分子薬理作用を検討した。

#### 【結果】

HeLa 細胞および SH-SY5Y 細胞に clomiphene を投与することにより LC3/actin 比は濃度・時間依存的に増加し、細胞毒性を示さない濃度(10  $\mu$ M)において十分なオートファジー誘導活性を示した。またリソソーム水解酵素阻害剤(10  $\mu$ g/ml E64d + 10  $\mu$ g/ml pepstatin A)との共処理により LC3/actin 比がさらに増加すること、免疫染色法において clomiphene 投与群で内在性 LC3 陽性顆粒と LAMP2 陽性顆粒の共局在が増加することから、clomiphene はオートファジー促進作用を有することが確認された。さらにハンチントン病モデル細胞(GFP でタグした CAG 異常伸長 huntingtin を一過性強制発現した細胞)において、clomiphene 処理により GFP 陽性凝集体クリアランスが上昇した。分子薬理作用としては clomiphene 処理により mTORC1 下流の p70S6K, S6 リン酸化が抑制され、mTORC1 上流の Akt リン酸化に影響なく、ERK1/2 リン酸化は軽度亢進するも ERK1/2 リン酸化阻害剤 U0126 との共処理で LC3/actin 比は変化しないことから、mTORC1 への直接的阻害作用によるものと結論した。

#### 【考察】

本スクリーニングよりオートファジー誘導又は阻害剤を 1 次ヒットとし、その中から autophagic flux アッセイを追加することにより新規オートファジー促進薬として clomiphene を同定し、さらに mTORC1 抑制を介した分子薬理作用によることを明らかにした。

オートファジー促進剤は新規 PD 治療薬として期待されており、米国ではドラッグリポジショニングの例として L 型 Ca チャネル阻害剤である isradipine がオートファジーを標的とした PD 治療薬として臨床試験第 3 相が実施中である。clomiphene は脳血液関門を通過するとされ、細胞死を誘導しない濃度においてオートファジー活性を有することから、PD 新規治療薬として *in vivo* での前臨床試験を行う意義があると考えられる。