

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390250

研究課題名(和文) オートファジー関連筋疾患の病態解明と治療法開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathomechanism of and development of therapy of autophagy-related muscle disorders

研究代表者

西野 一三 (NISHINO ICHIZO)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第一部・部長

研究者番号：00332388

研究成果の概要(和文)：オートファジー関連筋疾患の病態解明と治療法開発のため、ダノン病のモデルマウスである Lamp-2 遺伝子欠損マウスを用いて、骨格筋・心筋の表現型を生理学的または病理学的に特徴付け、ホモログ分子である Lamp-1 を外来性に発現させることでの表現型の回復を解析した。Lamp-2 遺伝子欠損マウスに Lamp-1 を過剰に発現するマウスを掛け合わせることで、心症状が改善した。Lamp-2 遺伝子欠損細胞ではマクロオートファジーによる分解が顕著に低下しており、この低下は Lamp-1 過剰発現により改善された。Lamp-1 の過剰発現はオートファゴソームとリソソームの融合を改善することにより、Lamp-2 欠損による細胞機能障害を改善しようと考えられた。以上から、Lamp-1 の発現誘導は、ダノン病の治療候補として有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathomechanism of and to develop the therapy of autophagy-related muscle disorders, we physiologically and pathologically characterized the phenotypes of skeletal and cardiac muscles from Lamp-2 knock-out mice, a model mouse for Danon disease, and analyzed the recovery of phenotype by exogenous expression of the Lamp-2 homolog, Lamp-1. By cross-mating with Lamp-1 overexpressing mouse, cardiac functions was recovered in Lamp-2 knock-out mice. In Lamp-2 deficient cells, degradation by macroautophagy was remarkably decreased. This decrease was corrected by Lamp-1 overexpression. Most likely, Lamp-1 overexpression improves the fusion between autophagosomes and lysosomes, and ameliorates the cell dysfunction caused by Lamp-2 deficiency. Overall, induction of Lamp-1 expression may be a good candidate for the development of therapy for Danon disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学, 筋疾患, オートファジー

1. 研究開始当初の背景

正常骨格筋では、一見オートファジーは目立たないことから、長らく骨格筋におけるオートファジーやライソゾームの役割は大きくないと考えられていた。しかし、近年、各種遺伝性筋疾患の臨床・病理・分子遺伝学的特徴が明らかになるにつれ、オートファジーの亢進を特徴とする一群の筋疾患があることが認識されるようになってきた。我々は、これらの筋疾患をその病理学的な特徴から「自己食空胞性ミオパチー (autophagic vacuolar myopathy: AVM)」と呼ぶことを提唱し、その呼称は世界的に受け入れられつつある。我々は、これまでに、AVMの代表的疾患であるダンオン病がライソゾーム膜蛋白質LAMP-2の原発性欠損症であることを世界で初めて明らかにし (Nishino I et al. Nature 2000)、更に類似の病態を示す複数の筋疾患を同定してきた (Neurology 2001, 2003, 2005)。しかしながら、AVMにおけるオートファジーの意義とその詳細は依然として不明であり、オートファジーが、生体防御的に働いているのか、あるいは病態悪化要因であるのかさえ不明である。また、当然のことながら根本的治療法はない。

2. 研究の目的

オートファジー関連筋疾患の代表的疾患でありライソゾーム膜タンパク質 LAMP-2 欠損により発症する Danon 病のモデルマウス Lamp-2 遺伝子欠損マウスを用いて、AVM 筋のオートファジー機能の評価、自己食空胞形成過程の解析、Lamp-1 の過剰発現による Lamp-2 欠損骨格筋の機能回復を評価することを目指した。その結果として、Danon 病の病態の詳細を明らかにすると、Lamp-1 過剰発現による Danon 病の治療法を開発することを目指した。

3. 研究の方法

(1) Lamp-2 遺伝子欠損マウスの骨格筋・心筋の表現型を生理学的または病理学的特徴付けを行った。
(2) Lamp-2 遺伝子欠損マウスとライソゾームマーカーLC3をGFPラベルしたTgマウスと掛け合わせた Lamp-2 遺伝子欠損マウス/LC3GFPマウスから骨格筋初代培養を調製し、*in vitro*での分解活性、LC3GFPの観察、電子顕微鏡観察を行い、どちらの経路に異常があるのかを調べる。さらに、アデノウイルスベクターを用いて Lamp-2A または Lamp-2B を選択的に発現させ、分解活性や表現型の回復を調べる。
(3) Lamp-2 遺伝子欠損マウスにホモログ分子である Lamp1 を過剰に発現するマウス (Lamp-1 Tg) を掛け合わせることで、Lamp-2

欠損において観察された表現型を外来性の Lamp-1 の発現によって改善しうるかを調べるべく、Lamp-2 遺伝子欠損、Lamp-2 遺伝子欠損/Lamp-1Tg マウスから初代培養細胞を単離し、ライソゾームの機能解析を行った。

(4) Lamp-2 遺伝子欠損/Lamp1 Tg マウスの運動機能評価、心機能評価、及び病理学的解析を行い、Lamp-2 遺伝子欠損の表現型を Lamp-1 の過剰発現が改善しうるかを検討した。

4. 研究成果

(1) Lamp-2 遺伝子欠損マウスは 50 週齢以降に、運動能力の著明な低下を示し、骨格筋は収縮力の低下と筋萎縮 (特に筋線維萎縮) を示した。また、心臓はサイズが増大し、筋線維自体の肥大化と大規模な線維化も起こっていた。また、抗体マーカーによる病理学的解析では骨格筋・心筋はともに自己食空胞の蓄積を示した。電子顕微鏡下での骨格筋での自己食空胞の観察では、筋線維内に大きな領域を占める、多数の自己食空胞の集積構造が観察されたが、その周りに分布する個々の空胞には、むしろインタクトな粗面小胞体や輸送小胞様の構造の他、電子密度の高い顆粒状の物質が蓄積していた。Lamp-2 遺伝子欠損マウスは遺伝学的には Danon 病のモデルであるが、今回、実際にモデルマウスにおいて骨格筋と心筋の症状をはっきりと特徴づけたことは、治療実験に向けて、測定すべき視点が準備できたといえる。また、電子顕微鏡で観察された空胞内の未消化オルガネラ構造の蓄積は、Lamp-2 遺伝子欠損細胞でのライソゾーム内 pH の上昇やライソゾーム酵素の輸送異常と考え合わせ、Lamp-2 欠損におけるライソゾーム機能 (分解反応) の異常を示唆するものと考えられる、しかしながら、加齢に伴う変化であることをも考え合わせると、単に Lamp-2 欠損から生じることだけでなく、他の因子を関係していると考えられる。これらのことは、Danon 病の病態を考える上で意義深いと思われた。

(2) 初代培養細胞を用いた解析では、Lamp-2 KO 細胞でマクロオートファジーの誘導に伴い酸性小胞が著明に蓄積していくこと、誘導停止後の酸性小胞のクリアランスが低下していること、また、長寿命タンパク質の分解 (活性) が低下していることが観察された。

(3) 以上の変化は、Lamp-2 遺伝子欠損/Lamp-1Tg マウス細胞では、これらはすべて改善された。この結果は、Lamp-1 を外来性に発現させる治療法が有効である可能性を示すとともに、いまだその機能が十分に解明されていない Lamp-1 のマクロオートファジーへの関与を示唆するものと考えられた。また、初代培養細胞を用いたタンパク質分解活性をマクロオートファジー及びプロテアソ

ームの阻害剤を用いて解析したところ、Lamp-2 遺伝子欠損細胞ではマクロオートファジーによる分解が顕著に低下していることが確認され、その低下はLamp-1 過剰発現により改善されることを明らかにした。

(4) さらに、マウスを用いた解析では、50 週齢以降の Lamp-2 遺伝子欠損マウスでみられた骨格筋収縮力の低下及び、心筋線維の肥大化と大規模な fibrosis が、Lamp-2 遺伝子欠損/Lamp-1Tg マウスでは改善されていることを明らかにした。しかしながら、マウスの運動能力と骨格筋線維の萎縮、及び病理変化に改善は認められなかった。ダノン病は心臓の機能障害により死に至るため、心筋に改善が見られたことは、治療法開発に向けてこの方法の有効性を示唆している。

免疫組織染色では、Lamp-2 遺伝子欠損マウスでは、リソソームと共局在しているオートファゴソームの割合が少ないのに対し、Lamp-1 の過剰発現によりその割合が増加し、オートファゴソーム陽性の筋線維数も減少していることが観察された。電子顕微鏡による観察においても、Lamp-2 遺伝子欠損マウスでは、多くのオートファゴソーム様の小胞が観察されたが、Lamp-1 過剰発現によりその数は減少していた。これらの結果から、Lamp-1 の過剰発現はオートファゴソームとリソソームの融合を改善することにより、Lamp-2 欠損による細胞機能障害を改善しうると考えられた。以上から、Lamp-1 の発現誘導は、ダノン病の治療候補として有用であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Liang WC, Nishino I: Lipid Storage Myopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11: 97-103, Feb, 2011. 査読無.
2. Yamazaki Y, Kamei Y, Sugita S, Akaike F, Kanai S, Miura S, Hirata Y, Troen BR, Kitamura T, Nishino I, Suganami T, Ezaki O, Ogawa Y: The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in skeletal muscle. *Biochem J* 427: 171-178, Apr, 2010. 査読有.
3. 西野一三: 自己貧食空胞性ミオパチーの病態解明と治療法開発. *臨床神経*. 50: 1-6, 2010. 査読無.
4. 本田真也, 西野一三: 筋疾患とオートファジー. *BIO Clinica*. 25: 42-46, 2010. 査読無.
5. Ramachandran N, Munteanu I, Wang P, Aubourg P, Rilstone JJ, Israelian N, Naranian T, Paroutis P, Guo R, Ren ZP, Nishino I, Chabrol B, Pellissier JF, Minetti C, Udd B, Fardeau M, Taylor CS, Mahuran DJ, Kissel JT, Kalimo H, Levy N, Manolson MF, Ackerley CA, Minassian BA: VMA21 deficiency causes an autophagic myopathy by compromising V-ATPase activity and lysosomal acidification. *Cell*. 137: 235-246, 2009. 査読有.
6. Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy*. 5: 795-804, 2009. 査読有.
7. Tominaga, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Miki T, Nishino I: Congenital myotonic dystrophy can show congenital fiber type disproportion pathology. *Acta Neuropathol*. 119: 481-486, 2009. 査読有.
8. 杉江和馬, 埜中征哉, 西野一三: Danon 病患者 17 家系 51 例における心筋障害の臨床的特徴. *心臓*. 41: 413-418, 2009. 査読無.
9. 門間一成, 西野一三: Pompe 病. *Clinical Neuroscience* 27: 370-371, 2009. 査読無.
10. Malicdan MCV, Noguchi S, Nishino I: Chapter 19 Monitoring Autophagy in Muscle Diseases. *Methods Enzymol*. 453C: 379-396, 2009. 査読無.
11. Yamashita S, Nishino I, Nonaka I, Goto Y: Genotype and phenotype analyses in 136 patients with single large-scale mitochondrial DNA deletions. *J Hum Genet* 53: 598-606, 2008. 査読有.
12. Kawahara G, Ogawa M, Okada M, Malicdan MCV, Goto Y, Hayashi YK, Noguchi S, Nishino I: Diminished binding of mutated collagen VI to the extracellular matrix surrounding myocytes. *Muscle Nerve* 38: 1192-1195, 2008. 査読有.
13. 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの治療法開発. *医学のあゆみ* 226: 436-440, 2008. 査読無.
14. 門間一成, 西野一三: 酵素欠損筋疾患の新しい治療. *メディカルバイオ* 5: 38-43, 2008. 査読無.
15. 門間一成, 梁 文貞, 西野一三: 脂質代謝異常によるミオパチー. *医学のあゆみ* 226: 422-427, 2008. 査読無.

[学会発表] (計 24 件)

1. Nishino I: Sialic Acid Treatment of Distal Myopathy with Rimmed Vacuoles (DMRV). The 9th Annual Asian and Oceanian Myology Center (AOMC) Scientific Meeting, Seoul, Korea, 3.26, 2010
2. Nishino I: Recent advance in congenital muscular dystrophy. The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research & 51st Annual Meeting of Taiwan Pediatric Association, Taipei, Taiwan, 4.17, 2010.
3. Honda S, Noguchi S, Malicdan MCV, Hayashi YK, Saftig P, Nishino I: Lamp-1 overexpression rescues cardiomyopathy in Lamp-2 deficient cells by correcting cellular lysosomal function. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.
4. Ikeda C, Honda R, Komaki H, Sasaki M, Munteanu I, Ramachandran N, Minassian BA, Tsuburaya R, Hayashi YK, Nishino I: Congenital form of X-linked myopathy with excessive autophagy associated with VMA21 mutation. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.
5. Kurashige T, Takahashi T, Kondo K, Nakamura T, Yamawaki T, Tsuburaya R, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I, Matsumoto M: A case of X-linked myopathy with excessive autophagy: the first case in Japan. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.
6. Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Miki T, Nishino I: Genetic, clinical, and pathological features of congenital fiber type disproportion in Japan. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.
7. Toussaint A, Maurer M, Cowling BS, Hnia K, Mohr M, Oldfors A, Schwab Y, Yis U, Maisonobe T, Stojkovic T, Laugel V, Echaniz-Laguna A, Blot S, Mandel JL, Tiret L, Nishino I, Laporte J: Amphiphysin 2 (BIN1) and triad defects in several forms of centronuclear myopathies. 15th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Kumamoto, Japan, 10.13, 2010.
8. 本田真也, 野口 悟, Malicdan MCV, 林由起子, Saftig P, 西野一三: LAMP1 過剰発見によるダノン病治療への試み. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.12, 2009
9. 西野一三, Malicdan MCV, 野口 悟: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの治療法開発. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.10, 2009
10. 桒中 征哉: Approach to distal myopathies (遠位型ミオパチーへのアプローチ). アジア・オセアニア筋学センター(AOMC)第8回年次総会, インド(ムンバイ), 5.23, 2009
11. Honda S, Noguchi S, Malicdan MCV, Hayashi YK, Saftig P, Nishino I: Lamp1 overexpression may rescue cardiomyopathy in Lamp2 deficient mice. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.11, 2009
12. Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Congenital myotonic dystrophy in patients diagnosed as congenital fiber type disproportion. 14th International Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.11, 2009
13. Malicdan MCV, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Sialic acid metabolites preclude the development of myopathic phenotype in the DMRV/hIBM mouse model. Congress of the World Muscle Society (WMS), Geneva, Switzerland, 9.9, 2009
14. Nishino I: Alpha-dystroglycanopathies in Japan. International Workshop on Muscular Dystrophies, Charlotte, 5.15, 2008
15. Nishino I: RYR1-related core and non-core myopathies. Myology 2008, Marseille, 5.29, 2008
16. Nishino I: Ullrich congenital muscular dystrophy due to sarcolemma specific collagen VI deficiency. International Workshop for Congenital Muscular Dystrophy, Iowa City, 7.17, 2008
17. Nishino I: Fukuyama congenital muscular dystrophy. International Workshop for Congenital Muscular Dystrophy, Iowa City, 7.17, 2008
18. Nishino I: Marinesco-Sjogren syndrome is the third most common congenital

- muscular dystrophy in Japan. International Workshop for Congenital Muscular Dystrophy, Iowa City, 7.18, 2008
19. Liang WC, Ohkuma A, Hayashi YK, Lopez LC, Hirano M, Nonaka I, Noguchi S, Jong YJ, Nishino I: Novel ETFDH mutations and normal CoQ10 level in Taiwanese patients with multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 9.30, 2008
 20. Nishino I, Oya Y, Monma K, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Cytoplasmic body with acid phosphatase activity-Hallmark of adult-onset Pompe disease on muscle pathology. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 10.1, 2008
 21. Monma K, Noguchi S, Hayashi YK: Clinicopathological characteristics of the Becker muscle dystrophy with rimmed vacuole. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 10.1, 2008
 22. Fujimura C, Noguchi S, Minami N, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: Congenital myotonic dystrophy and myotubular myopathy may be differentiated by type 2C fibers and peripheral halos. Congress of the World Muscle Society (WMS), Newcastle Upon Tyne, United Kingdom, 10.1, 2008
 23. 門間一成, 野口 悟, 林由起子, 南成祐, 元吉和夫, 鎌倉恵子, 埜中征哉, 西野一三: Becker型筋ジストロフィーにおける縁取り空胞の出現に関する臨床病理学的検討. 第49回日本神経学会総会, 横浜, 5.16, 2008
 24. Liang WC, Ohkuma A, Goto K, Hayashi YK, Jong YJ, Nishino I: Mutation analysis and response to riboflavin therapy in Taiwanese MADD patients. 第50回日本小児神経学会総会, 東京, 5.29, 2008

[図書] (計1件)

1. Astejada M, Malicdan MCV, Nishino I: Muscular Dystrophies. International Encyclopedia Of Public Health, 1st ed. (edited by Quah S, Heggenhougen K) Elsevier, Amsterdam, Netherlands. 4: pp486-496, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西野 一三 (NISHINO ICHIZO)
独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第一部・部長
研究者番号: 00332388

(2) 研究分担者

野口 悟 (NOGUCHI SATORU)
独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第一部・室長
研究者番号: 00370982

(3) 連携研究者

林 由起子 (HAYASHI YUKIKO)
独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第一部・室長
研究者番号: 50238135

埜中 征哉 (NONAKA IKUYA)
独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・病院・名誉院長
研究者番号: 80040210

(4) 研究協力者

本田 真也 (HONDA SHINYA)
独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第一部・流動研究員
(H22・H21・H20 研究協力)

富永 佳代 (TOMINAGA KAYO)
独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第一部・研究生
(H21 研究協力)

門間 一成 (MONMA KAZUNARI)
独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第一部・研究生
(H20 研究協力)

清野 (藤村) 智恵子 (KIYONO (FUJIMURA) CHIEKO)
国立精神・神経センター・武蔵病院(現・独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・病院)・レジデント
(H20 研究協力)