

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2016

課題番号：15H05673

研究課題名(和文) リソソーム蓄積病の病態に關与するリソファジーのメカニズム

研究課題名(英文) Pathophysiology of lysosomal storage disease and lysophagy

研究代表者

大友 孝信 (Otomo, Takanobu)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20742589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：リソソーム蓄積病の病態解明を行った。細胞内コレステロールの蓄積とリソソーム膜の脆弱性の関連、リソソーム膜の損傷をオートファジーで認識するリソファジーの分子機構の研究を行い、ユビキチンリガーゼの候補分子を同定した。オートファジーに關連する分子EPG5 (Vici症候群の原因遺伝子)の作用点を明らかにし、報告した。エンドソームやオートファゴソームがリソソームと融合する時に働く分子であるVPS33Aの変異による新しいリソソーム蓄積病様疾患 (Mucopolysaccharidosis Plus Syndrome, OMIM #617303) をエクソーム解析で同定し、その病態の一端を解明した。

研究成果の概要(英文)：(i) Intracellular accumulation of cholesterol that is often observed in lysosomal storage diseases affects lysosomal membrane permeability. We identified a candidate molecule which works for ubiquitin ligase in the autophagic process following lysosomal membrane rupture. (ii) We analyzed skin fibroblasts from patients of Vici syndrome, which is caused by mutations of EPG5 gene, and elucidated that EPG5 functions for the fusion step between autophagosome and lysosome. (iii) Using whole exome sequencing, we established a novel syndrome which is caused by mutations of VPS33A gene (Mucopolysaccharidosis Plus Syndrome, OMIM #617303), and reported a part of pathophysiology of this new disease. Altogether we proved that not only undegraded substrates of lysosomal enzymes but also membrane lipid contents and intracellular vesicular trafficking are complicatedly implicated in the pathophysiology of lysosomal storage diseases.

研究分野：小児科学

キーワード：リソソーム蓄積病 オートファジー EPG5 VPS33A

1. 研究開始当初の背景

リソソーム (Lysosome) は全ての真核細胞の細胞質に存在する細胞内小器官で、内部はプロトンポンプの働きで酸性に保たれており、50種類以上のリソソーム酵素の働きで細胞内の様々な基質を分解する。リソソーム酵素に変異がある場合、もしくはリソソーム酵素の細胞内輸送が障害された場合に、未分解の基質がリソソーム内部に蓄積し、リソソーム蓄積病 (Lysosomal Storage Disease; LSD) が引き起こされる。現在一部の LSD に対してリソソーム酵素の点滴補充療法が行われているが、コストや臓器特異性などの点でまだ問題は多く、LSD のさらなる病態解明とそれに基づいた新たな治療戦略が求められている。

2. 研究の目的

リソソーム膜は、シリカや尿酸などの結晶、細菌毒素、コレステロール、薬剤などの様々な要因で損傷する事が分かっており、我々の研究室では損傷したリソソームが選択的にオートファジーで隔離される現象“リソファジー”を報告し、さらに腎臓において尿酸結晶によって損傷したリソソームがオートファジーの働きで隔離・排除される事で腎症の悪化を防いでいる事も明らかにした (Maejima I, et al. *EMBO J* 2013)。一方で LSD では疾患ごとに様々な種類の基質がリソソームに蓄積しているため、LSD の細胞においてもリソソームの膜損傷が起こっているか、起こりやすい状態になっているに違いない。そこで、LSD の病態解明、特にリソソーム膜の脆弱性やそれに引き続いて起こるリソファジーの関与を明らかにする事を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

リソソーム機能は酵素活性を 4MU 人工基質で測定する生化学的な方法や、LysoTracker を用いた酸性度の評価、リソソーム内の基質の免疫染色や ELISA による定量で評価した。リソソームを人工的に損傷させる手法としては既出の論文でも用いられた LLOMe を細胞に投与する方法や、ビーズを取り込ませる方法を用い、細胞内小器官の膜の破れは細胞質内のガラクトース結合性のレクチンである Galectin3 を蛍光染色する事で膜損傷部位への集積を検知した。また、リソソームのマーカーである Lamp1、Lamp2、Lamp3、CtsD などと、オートファゴソームのマーカーである LC3 の細胞内局在を蛍光免疫染色で観察し、オートファジーのプロセス (オートファゴソームの形成、リソソームとの融合、オートリソソーム内での分解) を評価した。オ

ートファゴソームとリソソームの融合に関しては我々が開発した RFP-GFP-LC3 (tandem fluorescent LC3, tfLC3) を用い、LC3 とリソソームのマーカーである Lamp1 との共局在などを評価した。エンドサイトーシスによる取り込みや分解能は EGF レセプターの分解速度、DQ-BSA の分解などを使って評価した。これらの生化学的、形態学的方法に加え、siRNA を用いたノックダウンや、ゲノム編集技術を用い、CRISPR/Cas9 で特定の遺伝子のノックアウト細胞を作製し、表現型の評価を行った。

4. 研究成果

(1) リソファジーに関与するユビキチンリガーゼの同定

リソソームが損傷した時に、その周辺でユビキチン化が起こり、オートファジーにより認識され処理されるという事は報告されているが、損傷膜の何がユビキチン化されるのか、ユビキチンリガーゼは何であるかは明らかでなかった。我々はこれまでの研究からある分子に注目し、それがリソソーム膜損傷時に惹起されるリソファジーのユビキチンリガーゼの候補である事を突き止めた。その分子は損傷リソソームにリクルートされる分子の網羅的質量分析においても同定され、現在詳細なメカニズムを詰め、論文の投稿準備を進めているところである (unpublished)。

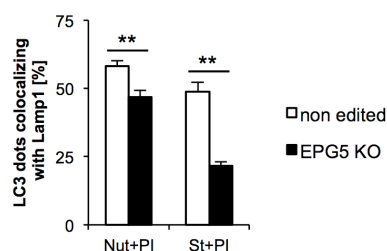
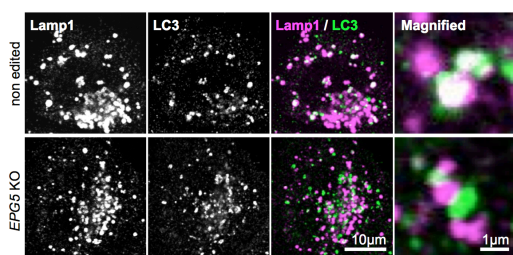
(2) コレステロールのリソソーム膜の安定性への関与

様々なリソソーム内基質蓄積が LSD の病態、特にリソソームの膜の脆弱性に関与している可能性に関して検討した。これまで LSD 細胞を取り扱い、細胞の生存率の経験などからコレステロールに着目し、細胞内コレステロールを増減させたときのリソソーム膜の安定性を評価した。U18666A などで細胞内にコレステロールを蓄積させた状態ではビーズを用いてリソソームを損傷させた時、損傷率が上昇した。すなわちコレステロールの蓄積がリソソーム膜の脆弱性に関与している可能性があった。また、コレステロールが蓄積している LSD 細胞に対してサイクロデキストリンなどでコレステロールを減らす処置を行うとリソソーム膜の破れが減少した。それは治療の可能性を示唆するものである。またコレステロールがオートファジーに与える影響に関しても興味深いデータが出ており、解析を続けて行く (unpublished、学会発表①)。

(3) Vici 症候群におけるオートファジー障害のメカニズム

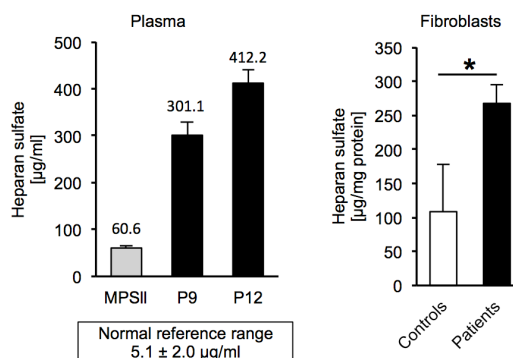
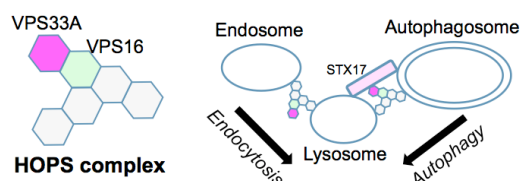
線虫においてオートファジーに関連する遺伝子として同定された *EPG5* はヒトにおいて Vici 症候群の原因遺伝子である事が報告された。Vici 症候群は脳梁欠損を特徴とす

る神経系の発生異常と、多臓器にわたる様々な症状を呈する小児期発症の疾患である。EPG5 がオートファジーのどの過程にどう関与するのかについては様々な報告があり、詳細なメカニズムは不明であった。我々は名古屋市立大学（小児科）との共同研究で、エクソーム解析にて EPG5 遺伝子変異が同定された Vici 症候群の患者皮膚線維芽細胞を解析する機会を得た。患者細胞に加え、HeLa 細胞において siRNA によるノックダウンと、CRISPR/Cas9 を用いたノックアウトを行い、EPG5 がオートファゴソームとリソソームの融合過程に働いている事を明らかにした（成果⑤）。



(4) 新規 LSD 様疾患 (Mucopolysaccharidosis plus syndrome, MPSPS) の発見と病態の解析
我々は LSD のひとつであるムコ多糖症（もしくはムコリポドーシス）と非常に類似する症状を示すが重症で、リソソーム酵素の欠損を認めず、確定診断がつかなかった症例を経験した。エクソーム解析を行い、VPS33A 遺伝子の変異を同定した。VPS33A はオートファジーやエンドサイトーシスに参与する HOPS 複合体の構成分子である。本疾患では未知のメカニズムでリソソームの over acidification が引き起こされ、リソソームにおけるムコ多糖の分解能が低下する事でムコ多糖症と似た病態が生じている事が推測された。また、VPS33A 分子の中のそれぞれのドメインがエンドソームとリソソーム間、およびオートファゴソームとリソソーム間の融合を担っているが、本疾患で認められた遺伝子変異はそれらとは別のドメインの変異であり、オートファジーやエンドサイトーシスの機能には明らかな異常を認めなかった。従って今後ドメインに特異的な機能の解明を進め、本疾患のさらなる病態解析を行う。本疾患はトルコからも同様の症例報告があり (Dursun A, et al. *Clin Dysmorphol.* 2017)、

新しい疾患として登録された (MPSPS ; OMIM #617303) (成果④)。



これらの研究成果から、LSD の病態形成にはリソソーム酵素欠損から生じる未分解基質の蓄積のみならず、細胞内小胞輸送、膜脂質の構成など様々な要素が密接に関わっている事が明らかになった。

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 5 件)

- Hasegawa J, Iwamoto R, Otomo T, Nezu A, Hamasaki M, Yoshimori T. Autophagosome-lysosome fusion in neurons requires INPP5E, a protein associated with Joubert syndrome. *EMBO J.* 2016 Sep 1;35(17):1853-1867. doi: 10.15252/embj.201593148. 査読あり
- Klionsky DJ, et al. Otomo T. (2467 人中 1573 番目: アルファベット順) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016;12(1):1-222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356. 査読あり
- Sakai N, Otomo T. Challenge of phenotype estimation for optimal treatment of Krabbe disease. *J Neurosci Res.* 2016 Nov;94(11):1025-30. doi: 10.1002/jnr.23914. 査読あり
- Kondo H, Maksimova N, Otomo T (correspond), Kato H, Imai A, Asano Y, Kobayashi K, Nojima S, Nakaya A, Hamada Y, Irahara K, Gurinova E, Sukhomyasova A, Nogovicina A, Savvina M, Yoshimori T,

Ozono K, Sakai N. Mutation in VPS33A affects metabolism of glycosaminoglycans: a new type of mucopolysaccharidosis with severe systemic symptoms. *Hum Mol Genet.* 2017 Jan 1;26(1):173-183. doi: 10.1093/hmg/ddw377. 査読あり

- ⑤ Hori I, Otomo T (co-first), Nakashima M, Miya F, Negishi Y, Shiraishi H, Nonoda Y, Magara S, Tohyama J, Okamoto N, Kumagai T, Shimoda K, Yukitake Y, Kajikawa D, Morio T, Hattori A, Nakagawa M, Ando N, Nishino I, Kato M, Tsunoda T, Saito H, Kanemura Y, Yamasaki M, Kosaki K, Matsumoto N, Yoshimori T, Saitoh S. Defects in autophagosome-lysosome fusion underlie Vici syndrome, a neurodevelopmental disorder with multisystem involvement. *Sci Rep.* 2017 in press 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

- ① 大友孝信、吉森保、コレステロールがライソゾーム膜の安定性に与える影響、日本ライソゾーム病研究会、東京慈恵医科大学講堂 (東京), 2016. 9. 30-10. 1

[図書] (計 2 件)

- ① Otomo T, Yoshimori T. Lysophagy: a method for monitoring lysosomal rupture followed by autophagy dependent recovery. *Methods in Molecular Biology.* 2017, DOI: 10.1007/978-1-4939-6934-0_8, in press
- ② 大友孝信、ムコリピドーシス II 型・III 型、小児内科 小児疾患診療のための病態生理 3、48 (増刊号)、2016 年 11 月

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大友 孝信 (Otomo Takanobu)

日本学術振興会・特別研究員 PD

→ 大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教 (常勤)

→ 川崎医科大学・医学部・特任准教授

* 研究期間中に異動した

研究者番号 : 20742589

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者