

機関番号：82611

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21890313

研究課題名（和文） XMEA の治療法開発に向けた分子病態の解明

研究課題名（英文） An analysis of molecular mechanism of XMEA

研究代表者

本田 真也 (Honda Shinya)

独立行政法人 国立精神・神経センター 神経研究所疾病研究第一部 流動研究員

研究者番号：90532672

研究成果の概要：

自己食食空胞性ミオパチーの1種である XMEA は、*VMA21* 遺伝子の変異が有力な原因であると考えられているが、その変異と病態の関連は明らかになっていない。*VMA21* は、細胞内小器官を酸性に保つため重要な V-ATPase という分子が複合体を形成するために重要な分子である。本研究では、XMEA 患者由来細胞及び生検筋を用い解析を行った。その結果、XMEA では、*VMA21* の変異により、V-ATPase の活性低下がおり、細胞内小器官の pH が上昇することで細胞内小胞輸送系が乱れることが病態に関与しているものと考えられた。

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

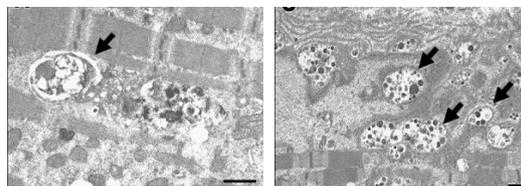
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：筋病理・筋疾患・オートファジー

1. 研究開始当初の背景

我々は筋繊維内に自己食食空胞の蓄積が見られる一群の筋疾患、自己食食空胞性ミオパチー (AVM) に対して様々な研究を行ってきた。その中で、X-linked Myopathy with Excessive Autophagy (XMEA) は他の AVM とは異なる特徴を持つことを報告した。他の AVM において蓄積する自己食食空胞では空胞内に分解前の細胞内小器官、分解された不定形の分解物のどちらかを認める。しかしながら、XMEA においては空胞内に電子密度の高い円い顆粒状の内容物が観察される。またそれら空胞がエキソサイトーシスにより細胞外に放出されているような像も観察された (右図)。



AVM でみられる自己食食空胞の電子顕微鏡像
 右：ダノン病
 左：XMEA
 矢印：自己食食空胞
 XMEA の自己食食空胞では、空胞内に特徴的な顆粒が蓄積している

現在、XMEA の有力な原因遺伝子として、*VMA21* が考えられている。*VMA21* は V-ATPase プロトンポンプの複合体形成に関わる分子であり、V-ATPase は細胞質から H⁺を輸送し細胞内小器官の pH を低く保つ働きを持っている。そのため、XMEA 患者では、*VMA21* の異常により V-ATPase の複合体形成ができず、リソソーム内の pH を低く維持できない状態になっているものと考えられる。リソソームは、細胞内においてもっとも酸性に維持されている小器官である。その内腔では酸性条件下においてたくさんの分解酵素が働き、様々な分子の分解を行っている。

このことから、XMEA の筋繊維内では、オートファジーの経路が進むものの、リソソームとの融合ができない、もしくは融合するものの分解ができないと考えられる。さらに興味深いことに、XMEA 患者筋繊維では、その蓄積した空胞をあたかも、エキソサイトーシスの経路に乗せかえることにより、細胞の外に放出しているのではないかと推測される現象がみられる。

本研究では、AVM の中でも XMEA の分子病態を把握することで、自己食空胞蓄積機構と XMEA の治療法開発に向けた基礎的な情報を解明したいと考えている。

2. 研究の目的

本研究では、XMEA の分子病態解明を目的としている。

(1) XMEA 患者筋細胞におけるリソソームの機能は低下しているか？

(2) オートファジー経路はどこまで機能しているか？

(3) 蓄積した空胞はエキソサイトーシスにより細胞外に放出されているか？

これらを明らかにすることにより XMEA という疾患の全貌が明らかになると考える。

3. 研究の方法

(1) XMEA 患者由来繊維芽細胞におけるリソソーム機能及びオートファジーの解析

① XMEA 患者細胞及び生検筋での *VMA21* の発現解析

XMEA 患者細胞から mRNA を、XMEA 患者細胞及び生検筋からタンパク質を回収し、*VMA21* の発現量を RT-PCR 及びウエスタンブロットにより解析し、コントロールと比較した。

② 酸性オルガネラの pH 測定とリソソーム酵素活性の測定

XMEA 患者細胞を用い、酸性オルガネラの

pH を pH 依存的に蛍光波長の変化する Lysosensor Yellow/Blue を用い解析した。Lysosensor Yellow/Blue は酸性オルガネラで黄色、酸性度の低いオルガネラでは青色の蛍光を発する特徴をもっている。

pH は、培養中の細胞に Lysosensor Yellow/Blue を添加し、蛍光顕微鏡を用い酸性オルガネラにおける青色、黄色の蛍光強度を測定しその比率により測定した。標準曲線は CHO 細胞をバフィロマイシン・モネンシンで処理した後 pH4~7 の条件下で Lysosensor Yellow/Blue を取り込ませ、その蛍光強度の比率により作製した。

リソソームの酵素活性は クレシルバイオレット標識されたカテプシンの基質を細胞に添加し、カテプシンにより切断されたクレシルバイオレットの蛍光強度を FACS により解析を行った。

③ 細胞内在性タンパク質の分解

XMEA 患者細胞での細胞内在性タンパク質の分解を解析するため、RI ラベルアミノ酸を細胞に取り込ませ、飢餓条件によるオートファジー誘導前後の、細胞外に放出された放射性を測定した。

さらにオートファジーによる分解、プロテアソームによる分解を、それぞれの阻害剤である 3-MA、MG132 を用いることで評価した。

④ エンドソーム系細胞内輸送の解析

細胞内小器官の間での小胞輸送は、細胞内小器官の pH 勾配を利用している。そのため、V-ATPase の活性低下は、細胞内の小胞輸送に影響が出る可能性がある。そこで、XMEA 患者細胞を用いて、蛍光ラベルした EGF または Transferrin を投与し、経時を追って細胞を固定し、エンドソームまたはリソソームマーカー抗体 (EEA-1, LAMP2) にて共染色し、EGF および Transferrin の細胞内局在を解析した。

⑤ 電子顕微鏡観察

培養細胞を固定後 EPON 包埋し、電子顕微鏡により細胞内の詳細な観察を行った。

(2) XMEA 患者生検筋での蓄積小胞の解析

① 電子顕微鏡観察

EPON 包埋患者生検筋を用い、XMEA 特有の蓄積顆粒の詳細を観察した。

② 免疫組織染色

XMEA 患者生検筋を用い、リソソーム、エンドソーム、オートファゴソーム、エクソソームの各マーカー蛋白質抗体 (LAMP2, Rab5, Rab7, LC3, CD63) を用いて、免疫組織染色を行った。

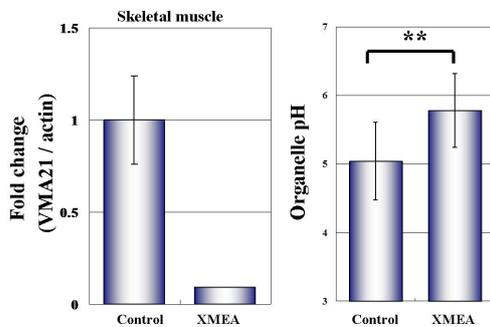
4. 研究成果

XMEA は V-ATPase 複合体形成に関わる *VMA21* の変異が原因であると考えられている (他施設投稿予定)。

本研究で用いた XMEA 患者も、*VMA21* 遺伝子の c.164 -6T>G に変異があることを確認している。このイントロン内変異によりスプライシングに異常が起こり正確な mRNA が転写されないと考えられる。実際、RT-PCR による解析から XMEA 患者細胞では *VMA21* の発現量が減少していることが確認された。同様に、*VMA21* タンパク質の発現量を解析したところ、XMEA 患者生検筋および患者由来細胞において *VMA21* の顕著な発現低下が確認された (下図、左)。

これまでの研究から V-ATPase は、細胞質から H⁺ を輸送し細胞内小器官の pH を低く保つ働きを持っていることが知られている。このことから XMEA 患者では、*VMA21* の発現低下により V-ATPase の複合体形成ができず、細胞内小器官の pH を低く維持できない状態になっているものと考えられる。

そこで、*VMA21* の発現低下が V-ATPase の活性に影響を及ぼすかを測定するために、pH 依存的に蛍光波長の変化する Lysosensor を用い細胞内 pH 及び細胞内小器官の pH を計測した。その結果、XMEA 細胞ではコントロールと比較して細胞内 pH・細胞内小器官 pH 共に優位な上昇が確認された (下図、右)。

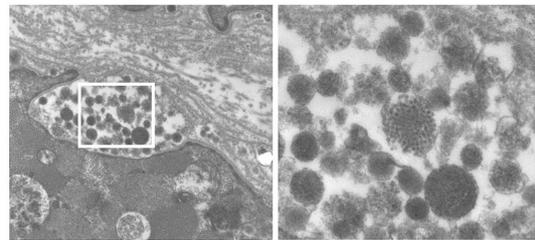


左；ウエスタンブロットによる *VMA21* の発現量
右；Lysosensor による酸性オルガネラの酸性度

これまでの研究において、リソソーム活性及び細胞内小胞輸送系はリソソーム内 pH および小器官間の pH 濃度勾配に依存していることが報告されている。そのため V-ATPase 活性低下による pH の上昇は、リソソーム機能及び小胞輸送系に影響を与えると考えられた。そこで培養細胞を用い、リソソーム酵素活性及び RI ラベルタンパク質のリソソームによる分解活性、および蛍光ラベルした EGF または Transferrin を添加し、エンドサ

イトーシス系の輸送を解析した。その結果、リソソーム機能については、コントロールと XMEA 細胞間に優位な差は確認されなかったが、XMEA 細胞においてエンドサイトーシス経路の遅延が確認された。

また電子顕微鏡観察から、XMEA 細胞において顆粒物の蓄積が観察され、PAS による染色から、その顆粒はグリコーゲンであることが確認された。そこで患者生検筋においても PAS によりグリコーゲンの蓄積を解析したところ、PAS 陽性グリコーゲンの顕著な蓄積が観察された。さらに興味深いことに、電子顕微鏡による観察から XMEA に特有の電子密度の高い顆粒がグリコーゲンの集合体である可能性が示唆された (下図)。

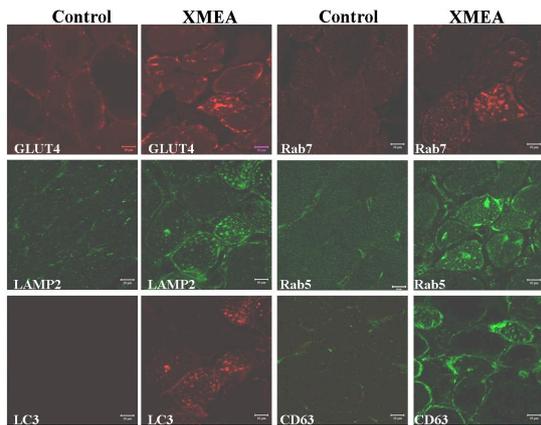


XMEA 患者骨格筋の電子顕微鏡による観察
XMEA 特有の円い蓄積物はグリコーゲン様の顆粒からなる

XMEA 患者骨格筋内にグリコーゲンが蓄積する原因として、グリコーゲンの分解に異常があることとグルコースの取り込みに異常があることの2つのが考えられる。

培養細胞を用いた実験でリソソーム酵素活性に異常が確認されなかったことから、グリコーゲンの分解には異常がないものと考えられた。そこで骨格筋におけるグルコースのトランスポーターである GLUT4 の発現解析を行ったところ、XMEA 筋では、コントロール筋と比較して GLUT4 の発現量が顕著に増加しており、その発現は筋細胞膜および筋細胞内に強く観察された (次ページ図)。

さらに LC3 陽性の自己食空胞や Lamp1 陽性のリソソームだけでなく、細胞内小胞輸送の制御分子であり後期エンドソーム・初期エンドソームのマーカである Rab7・Rab5 も筋繊維内に蓄積していることが確認された。また、エクソソームのマーカである CD63 の発現も XMEA 患者骨格筋において顕著に観察された (次ページ図)。これらの結果から XMEA 患者骨格筋では、小胞輸送系に乱れが生じ、エンドサイトーシスが遅延・エキソサイトーシスが亢進していることが示唆された。



正常骨格筋と XMEA 患者骨格筋における GLUT4 および各種マーカートンパク質の発現

本研究結果から、XMEA では、*VMA21* の変異により V-ATPase の活性低下がおり、細胞内 pH が上昇することで細胞内小胞輸送系が乱れることが病態に関与しているものと考えられた。

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 1 件)

① 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、無

[学会発表] (計 1 件)

① 本田真也 XMEA の分子病態の解析
第 33 回日本分子生物学会 第 83 回日本生化学会 合同大会 2010 年 12 月 9 日 神戸・神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田真也 (Honda Shinya)

独立行政法人 国立精神・神経センター
神経研究所疾病研究第一部 流動研究員
研究者番号：90532672