

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590244

研究課題名(和文)オートファジーにおけるリソソーム膜タンパク質LAMP-2の役割

研究課題名(英文)Role of lysosome-associated membrane protein LAMP-2 in autophagy

研究代表者

古田 晶子(Furuta, Akiko)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤助教

研究者番号：50229118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：LAMP-2遺伝子変異であるダノン病は、精神発達遅滞をきたすにもかかわらず神経病理学的所見は明らかでない。本研究では、LAMP-2ノックアウトマウスを用いて中枢神経系を中心にLAMP-2の機能を解明することを目的とした。ノックアウトマウスの脳では心臓や肝臓と異なり、オートファジー空胞はほとんど認められず、神経系細胞への凝集物蓄積が見られ、リソソーム蓄積病の所見であった。ノックアウトマウス脳ではカルシウム関連シグナルの発現が変化しており、新生児脳低酸素虚血と中大脳脈梗塞モデルを作製し野生型と比較すると明らかに強い変化が認められ、LAMP-2が病巣修復機序に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Lysosome-associated membrane protein-2 (LAMP-2) is the gene responsible for Danon disease. To elucidate the function of LAMP-2, we have investigated the histopathological changes in LAMP-2-deficient mice. Although a large amount of autophagic vacuoles in parenchymal cells of the visceral organs, these findings were rarely detected in the brain tissue. By ultrastructural studies, various-shaped accumulations were found in the neuronal cells of LAMP-2-deficient brains. These pathological features indicate lysosomal storage disease. We also examined the brain lesions from the neonatal hypoxia ischemia and MCA occlusion in the LAMP-2-deficient mice. Pathological examination revealed that extensive tissue damage with altered calcium-related signaling was found in the models of the LAMP-2-deficient mice. Thus, LAMP-2 in the CNS has a possible role in degradation of the various macromolecules in lysosomes and an additional function concerning tissue repair during the pathological processes.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：解剖学一般・細胞機能形態学

キーワード：リソソーム オートファジー ダノン病 リソソーム蓄積病 肥大型心筋症 LAMP-2 膜タンパク質  
シャペロン介在性オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

リソソーム膜タンパク質である lysosome-associated membrane protein-2(LAMP-2)は当初リソソーム膜を構成する単なる構造タンパク質と考えられていたが、近年、選択的オートファジーに関連する重要な機能分子である可能性が示唆されている。特にサブタイプのひとつである LAMP-2A は、シャペロン介在性オートファジー (chaperone-mediated autophagy: CMA) の受容体として同定され、種々の病態における役割が注目されている。CMA は、特定のアミノ酸配列 KFERQ 様モチーフを持つ基質タンパク質がシャペロン (hsc70) により認識され、LAMP-2A を介して選択的にリソソームに取り込まれるという新たなタンパク質分解経路であり、その基質として神経変性疾患の主要な異常タンパク質の凝集に関与する  $\alpha$ -シヌクレインが含まれ、Cuervo らにより CMA 低下による異常タンパク質凝集と神経細胞死の関係が示唆されている (Cuervo AM et al. Science 305:1292:2004)。さらに、最近 LAMP-2C は、核酸 (RNA, DNA) を特異的にリソソームに取り込み分解する経路に関わることが明らかになった (Fujiwara Y et al. Autophagy 9: 403:2013)。

一方、LAMP-2 遺伝子変異が原因であるダノン病は、最初の症例報告では “Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase” という題で記載された (Danon et al. Neurology 31:51:1981)。肥大型心筋症、自己貪食性ミオパチー、精神発達遅滞が主徴である。その後、原因遺伝子が LAMP-2 であると同定され (Nishino I et al. Nature 406:906:2000)、LAMP-2 ノックアウトマウスでは肝、膵、脾、腎、筋に多数のオートファジー空胞が認められることが相次いで報告された (Tanaka Y et al. Nature 406:902:2000)。ノックアウトマウスの所見からリソソームとオートファゴゾームの融合不全によるマクロオートファジーの異常が疑われた。LAMP-2 遺伝子は X 染色体上にあり、ダノン病は臨床的には X-linked myopathy を呈する稀な遺伝性筋疾患として認識されている。ダノン病における肥大型心筋症は突然死や心不全をきたすため、諸外国では心臓移植の対象となる。ダノン病の社会的な認知度は低いいため、原因不明の若年性心筋症や突然死症例の中には確定診断されていないダノン病が含まれている可能性が高く、遺伝子診断のシステム構築が急務であると考えられている。また、ダノン病の中樞神経系に関しては、精神発達遅滞をきたすにもかかわらず、精神神経症状に対応する神経病理学的所見の記載はなく、CMA との関係も解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

LAMP-2 に関する一連の研究は主に培養細胞レベルで行われており、実際のヒトの病態においてどのような役割があるのか明らかにされていない。我々はダノン病のヒト剖検症例を詳細に検討し、臓器により病変の程度や病態が異なることを報告した。すなわち、著明な肥大型心筋症、肝結節性病変 (限局性結節性過形成) とともに、心筋細胞や肝細胞ではオートファジー空胞と考えられる LC3 陽性顆粒が細胞質内に多数みられたが、中枢神経系では LC3 陽性顆粒は殆ど認められず、大型神経細胞の細胞質にリソソーム蓄積像を示唆する所見が認められた。またリポフスチンやアミロイド小体が目立ち、年齢に比して老化が進んでいる所見がみられた。本研究では、ヒト剖検症例の検討をもとに、LAMP-2 ノックアウトマウスを用いてマクロオートファジーおよび CMA における LAMP-2 の機能を検討し、LAMP-2 欠損に伴う病態を明らかにして、ダノン病の発症機序解明に寄与することを目的とした。

## 3. 研究の方法

LAMP-2 ノックアウトマウスは Saftig 博士から供与を受け、C57BL/6J マウスによりバッククロスを行って実験に用いた。このマウスは LAMP-2A, 2B, 2C とともに欠失しており、ダノン病のモデルマウスとして妥当であると考えられた。

同腹の LAMP-2 ノックアウトマウスと野生型マウスを用いて免疫組織化学染色 (LAMP-2、LAMP-1、rab7、MAP2、GFAP、Iba1、CNPase、cathepsin D、ubiquitin、GM130、LC3、 $\alpha$ -synuclein、Mac-2、SMI31、synaptophysin、4HNE)、ウェスタンブロッティング (LAMP-1、 $\alpha$ -actin、LC3、 $\alpha$ -synuclein)、FITC-レクチン染色 (concanavalin A、succinyl-concanavalin A、wheat germ agglutinin、lens culinaris agglutinin、Psathyrella velutina lectin、Phaseolus vulgaris erythrolectin、Vicia villosa lectin、Galanthus nivalis lectin、Bauhinia purpurea lectin)、電顕 (8w、34w 脳、肝臓) によりノックアウトマウスの変化を検討した。蛍光染色は Olympus FluoView、FV1000 で観察した。

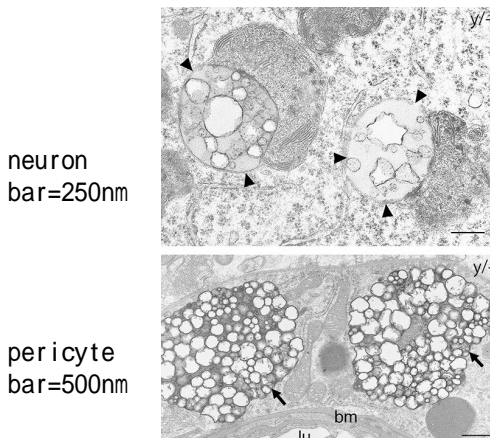
また、病的状態における LAMP-2 の役割を調べるため、LAMP-2 ノックアウトマウスと野生型マウスに中大脳動脈閉塞及び新生仔低酸素脳虚血モデルを作製し、形態学的変化を検討した。

さらに、2次元電気泳動で LAMP-2 ノックアウトマウス脳において発現が変化しているタンパク質をプロテオーム解析し、ダノン病の病態に結びつくタンパク質を検討した。

#### 4. 研究成果

LAMP-2 特異的な抗体を用いて細胞内局在を免疫組織化学染色で検討した結果、LAMP-2 陽性構造物の 89.3%は LAMP-1 陽性、10.7%は rab7 陽性であり、LAMP-2 は主にリソソームに局在し、一部後期エンドゾームに局在していることが判明した。中枢神経系における細胞局在を MAP2、GFAP、Iba1、CNPase との二重染色で検討したところ、LAMP-2 は大型神経細胞に高発現したが、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドログリアにも局在が見られ、種々の細胞にユビキタスに存在すると考えられた。

LAMP-2 ノックアウトマウス脳では LAMP-1 と cathepsin D のタンパク質量が増加していた。免疫染色で、ノックアウトマウスの神経細胞は、LAMP-1 と cathepsin D 陽性顆粒が野生型に比べて大きく、リソソームに変化があると考えられた。大脳皮質や海馬の神経細胞にはリポフスチンが増加し、全体的に反応性アストロサイトが認められた。電顕では、海馬の神経細胞、血管周囲マクロファージ及びアストロサイトのリソソーム内に蓄積物質がみられ、リソソーム蓄積病の表現型を呈していた。蓄積物の形態は多彩で、単一のリソソーム酵素欠損による変化ではなく、リソソームにおいて分解機能が低下し種々の基質が蓄積した可能性が示唆された。肝臓ではリソソーム内にグリコーゲンの蓄積が認められ、ダノンの最初の報告のごとく“Lysosomal glycogen storage disease”様であった。これらの所見は、我々がヒトのダノン病で報告した病理所見と一致していた。



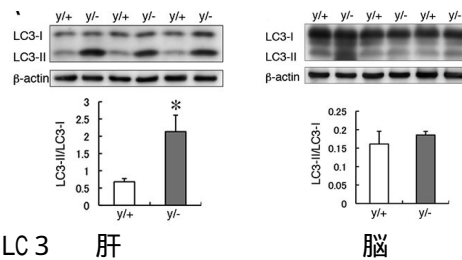
細胞内蓄積物質 33 週  
LAMP-2 ノックアウトマウス 脳

細胞内蓄積物質の性質を検討するためユビキチン染色を行ったところ、大脳皮質と海馬の大型神経細胞内にユビキチン陽性凝集物が認められた。またレクチン染色では D-mannose 及び D-glucose と相互作用がある concanavalin A が海馬の大型神経細胞内に顆粒状に染色された。

LAMP-2 ノックアウトマウス脳の神経細胞内では、リソソームだけではなくゴルジ体の

変化も認められた。ノックアウトマウスの神経細胞では GM130 が高発現し、電顕にて扁平囊の腫大や円状配列が認められ、ゴルジ体ストレスの存在が窺われた。

オートファジー空胞は肝臓や心筋に認められたが、中枢神経系では黒質の一部の軸索を除いて殆ど観察されなかった。ウェスタンブロッティングでノックアウトマウスの肝臓は LC3-II が増加し、マクロオートファジーが亢進していると考えられたが、脳では LC3-II の増加は認められなかった。



CMA の基質である シヌクレインと GAPDH タンパク質をウェスタンブロッティングで、ノックアウトマウスの脳組織と野生型マウスで差はなかった。これは、in vivo ではユビキチン プロテアソーム系やマクロオートファジー等の他の分解系が代償的に作動する、あるいは LAMP-2A 以外に CMA のレセプターが存在する可能性が考えられた。

黒質網様部の一部に認められた シヌクレイン陽性円形構造物は LC3 陽性で SMI31 と synaptophysin が陽性であったため、軸索であると考えられた。一部は Mac2 陽性であり活性化ミクログリアに取り込まれた変性軸索であると思われた。電顕では腫大した軸索中にオートファジー空胞の集積が見られた。脂質酸化を表す 4HNE が陽性だったため、同部に酸化ストレスが存在すると考えられた。近年、リソソーム蓄積病と黒質に病変があるパーキンソン病の関係が報告されているため、今回認められた黒質網様部 シヌクレイン陽性腫大軸索は必ずしも LAMP-2A が欠損して CMA が起こらないため シヌクレインが蓄積した結果ではない可能性があると考えられた。

以上の結果をまとめると、(1) 剖検症例の所見との検討から LAMP-2 ノックアウトマウスはダノン病のモデルマウスとして適当であると考えられ、(2) ノックアウトマウスでは多様なリソソーム蓄積病の所見が認められ、(2)心臓や肝臓などの内臓器と異なり、中枢神経系ではマクロオートファジーの亢進を示唆するオートファジー空胞は黒質以外はほとんどみられず、(3) 黒質に酸化ストレスを伴った軸索変化が認められ、(4) CMA を積極的に示唆する CMA 基質の蓄積はみられなかった。

次に病態時の LAMP-2 の機能を調べるため、成体 LAMP-2 ノックアウトマウスに左中大脳

動脈梗塞を施行すると、野生型に比べて著しく生存率が低く（施行5日目で野生型86%生存、LAMP-2ノックアウトマウス14%生存）脳梗塞急性期に劇的な変化があると考えられた。生後7日目に虚血低酸素暴露を行った新生児低酸素脳虚血モデルにおいてもノックアウトマウスの脳病変は6時間後でMAP2染色性が著しく低下し、野生型と比較して強い虚血性変化を呈していた。これらの結果は、LAMP-2が病態時では病巣修復に関与することが示唆された。

マウス脳組織を用いて2次元電気泳動でプロテオーム解析を行い、野生型とLAMP-2欠損マウスの脳組織で変化するタンパク質を検討したところ、分子シャペロン、ユビキチン関連タンパク質、シナプス局在タンパク質、免疫系、成長因子の変化が認められた。その中で、カルシウム関連シグナルに関する複数の分子が含まれていた。本研究をとおして得られた結果をさらに発展させるために、今後はLAMP-2の機能とシグナル伝達について研究を進めたいと考えている。

#### 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5件) 査読あり

1. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, Furuta A, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Wada K, Kabuta T. *Autophagy*. 2013;9:1167-71. doi: 10.4161/auto.24880.
2. Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Yoshimura A, Tamai Y, Wada K, Kabuta T. *Autophagy*. 2013;9:403-9. doi: 10.4161/auto.23002.
3. Lysosomal storage and advanced senescence in the brain of LAMP-2-deficient Danon disease. Furuta A, Wakabayashi K, Haratake J, Kikuchi H, Kabuta T, Mori F, Tokonami F, Katsumi Y, Tanioka F, Uchiyama Y, Nishino I, Wada K. *Acta Neuropathol*. 2013;125:459-61. doi:10.1007/s00401-012-1075-4.
4. Biogenesis and proteolytic processing of lysosomal DNase II. Ohkouchi S, Shibata M, Sasaki M, Koike M, Safig P, Peters C, Nagata S, Uchiyama Y. *PLoS One*. 2013; 8:e59148. doi:10.1371/journal.pone.0059148.
5. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons.

Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R. *FEBS Lett*. 2013;587: 1316-25. doi: 10.1016/j.febslet.2013.02.046.

〔学会発表〕(計5件)

1. Differential protein expression reflects impairment of tissue restoration in the brain of LAMP-2-deficient mice. Furuta A, Uchiyama Y. 第119回日本解剖学会総会 栃木県 自治医科大学キャンパス 2014年3月29日. 3P041
2. ダノン病とLAMP-2欠損マウスの中樞神経系病変の検討. 古田晶子、内山安男. 第7回オートファジー研究会. ヤマハリゾートつま恋 静岡県掛川市、2013年12月20日
3. リソソーム膜タンパク質 LAMP-2 の中樞神経系における役割. 古田晶子、内山安男. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、甲府、2012年3月28日
4. Impairment of lysosomal degradation in the CNS of LAMP-2-deficient mice. Furuta A, Kabuta T, Wada K, Uchiyama Y. *Keystone Symposia (B4): Autophagy, Inflammation and Immunity*. Fairmont The Queen Elizabeth, Montreal, Canada, 2013年2月18日
5. Property of lysosomal storage disease in the CNS of lysosome-associated membrane protein-2 deficient mice Furuta A, Wada K, Uchiyama Y. *Neuroscience 2011*, Washington DC, USA, 2011年11月14日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

古田晶子 (FURUTA, Akiko)  
順天堂大学・医学部・非常勤助教  
研究者番号: 50229118

##### (2) 研究分担者

小池正人 (KOIKE, Masato)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号: 80347210

佐々木光穂 (SASAKI, Mitsuho)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号: 20432536

砂堀毅彦 (SUNABORI, Takehiko)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号: 00407115

##### (3) 連携研究者 なし