

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05088

研究課題名（和文）リソソーム蓄積病とオートファジー病の病態の包括的理解と治療法の開発

研究課題名（英文）Understanding the common pathomechanisms underlying lysosomal and autophagic diseases

研究代表者

大友 孝信 (Otomo, Takanobu)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：20742589

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内のリソソーム分解系の障害によりリソソーム病が生じるが、リソソーム酵素活性の低下だけでなく細胞内輸送の障害によっても類似した疾患が生じることが分かった。我々はセルラインにおいて遺伝子編集技術を用いてリソソームや細胞内輸送に関連する様々な遺伝子をノックアウトした細胞を作製し解析を行なった。リソソーム酵素欠損の一部においてのみ顕著にオートファジーが障害されており、活性化刺激に対する反応性から、オートファジー障害のメカニズムは一様ではないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により遺伝性希少疾患であるリソソーム病の疾患メカニズムの一端が明らかになり、今後のリソソームおよびリソソーム病研究を進展させるための細胞実験系や測定系が構築できたのは意義深い。また、リソソーム病に対する疾患特異的な治療法ではなく、共通の病態メカニズムを持つリソソーム病に対して疾患横断的に改善効果を与える手がかりとなる成果が得られ、今後本研究を進展させることで難病の治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Lysosomal disease is caused by impairment of lysosomal degradation system, but similar diseases are caused not only by reduction of lysosomal enzyme activity but also intracellular transport. We edited genes related to lysosomal functions or intracellular trafficking to prepare knock-out cell lines of these genes, and investigated cellular phenotypes. Our results showed that autophagy was significantly impaired only in a part of the lysosomal enzyme deficiency, and suggested that the mechanism of autophagy disorder among them was not uniform.

研究分野：小児科学

キーワード：リソソーム オートファジー 細胞内輸送

## 1. 研究開始当初の背景

リソソームはプロテアーゼ、グリコシダーゼ、リパーゼ、ヌクレアーゼ、ホスファターゼなどのリソソーム酵素を内部に含む酸性の細胞内小器官であり、内因性（オートファジー）や外因性（エンドサイトーシス）に運ばれてきた基質を分解している。リソソームの働きは細胞内のメタボリズムだけでなく、アポトーシス、細胞内シグナル伝達、免疫、老化など様々な細胞機能に関わっている。リソソーム酵素の遺伝的な欠損は、基質のリソソーム内蓄積を引き起こし、様々なリソソーム蓄積症（Lysosomal Storage Diseases: LSD）を引き起こすが、現在までに約 50 種類の遺伝性の LSD が報告されている（例：ムコ多糖症、スフィンゴリピドーシス、白質ジストロフィー、神経セロイドリポフスチン症などで、実際はこれらの中でも細分類される）。これらの疾患はそれぞれ数万～数十万出生に 1 人ほどの発生頻度の希少疾患で、多くは小児期に発症し、いまだに根本的な治療法が存在せず予後不良であるものが多い。

LSD では欠損する酵素の種類により蓄積する基質の種類は疾患ごとに様々であるが、蓄積がどのように病態（例えば神経細胞死など）を引き起こしているのかはまだ不明の点が多い。最近我々は LSD のひとつであるムコ多糖症と臨床症状が酷似する全く新しい疾患をエクソーム解析で発見した。この病気はリソソーム酵素が正常であるにも関わらずムコ多糖が多量に蓄積していた。原因遺伝子は細胞内輸送に関わる分子をコードしており、オートファジーやエンドサイトーシスに関わる分子であった。そこで我々は、LSD はリソソーム酵素の欠損によるものだけでなく、細胞内外の基質や小胞体からの酵素の運搬も含め、リソソームを中心とする細胞内分解系の一部の破綻により引き起こされる様々な細胞障害であると捉える必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、リソソーム酵素の遺伝子変異による酵素活性の欠損で引き起こされる conventional な LSD と、リソソーム酵素以外の分子の遺伝子変異で引き起こされる LSD 類似疾患を含めて網羅的に比較解析し、これらの各疾患間の共通点や相違点を細胞実験レベルで明らかにすることを目的とする。また、障害された細胞の機能を回復する方法について、疾患横断的に検討することで共通の治療法を見つけ出すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

まず、リソソーム関連遺伝子ノックアウトセルラインを作製する。ゲノム編集技術（CRISPR/Cas9）で、LSD の原因遺伝子として報告されているリソソーム酵素遺伝子、我々が見つけた新規疾患の原因遺伝子（オートファジーやエンドサイトーシスに関わる遺伝子）、その他 LSD の原因とは報告されていないがリソソーム機能に関わる分子（リソソーム酵素のレセプター、リソソーム膜蛋白など）を単独または組み合わせて HeLa 細胞のゲノム上でつぶしていく。同じセルラインをベースとする事で細胞間の比較が容易となる。次に、リソソーム機能低下や細胞内の膜輸送の障害から生じる共通の病態をあぶりだす。上で作製したノックアウトセルラインを用い、細胞内輸送、形態学的な表現型、細胞内蓄積物質について網羅的に解析していく。さらに、得られた細胞表現型を回復させる手法につき疾患横断的に検討する。

## 4. 研究成果

### (1) ノックアウトセルラインの作製

リソソーム機能に関連すると考えられる遺伝子群を CRISPR/Cas9 でノックアウトした。設計したガイド RNA の場所付近で遺伝子変異はランダムに生じるが、一つの遺伝子に関して複数の変異を持つクローンを樹立し、クローン間における表現型の共通性を確認した。全部で 40 種類程度の遺伝子ノックアウトセルライン約 300 クローンを樹立し、以降の実験に速やかに用いることが出来る体制を整えた。

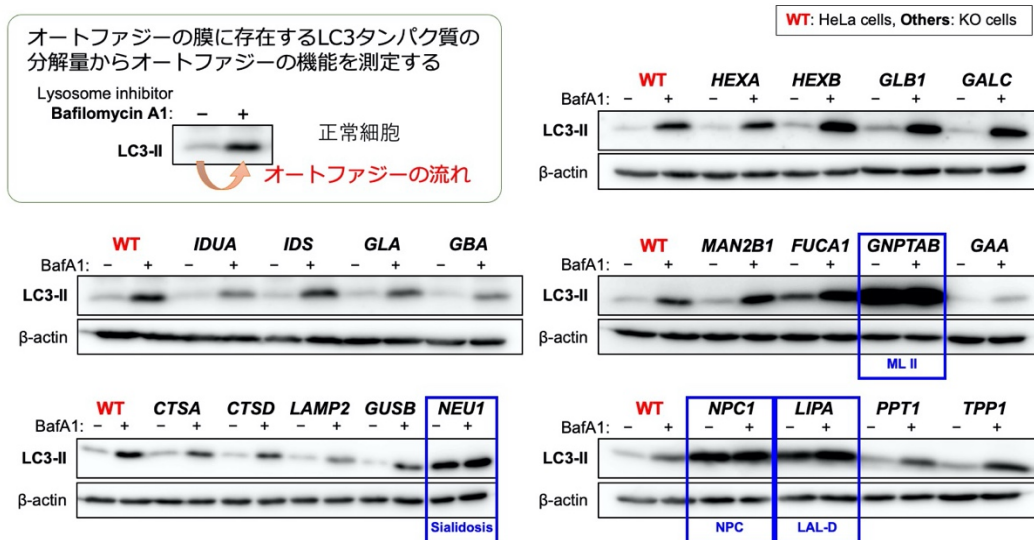
Gene list of our established knock-out cells (lysosomal storage disorders)

Lysosomal enzyme		Trafficking	Lysosomal membrane	Autophagy
IDUA MPS I	FUCA1 $\alpha$ -Fucosidosis	GNPTAB ML II	LAMP1	ATG2A/B
IDS MPS II	MAN2B1 $\alpha$ -Mannosidosis	GNPTG ML III	LAMP2 Danon	ATG3
GUSB MPSVII	CTSA Galactosialidosis	NAGPA	SCARB2	ATG7
GBA Gaucher	CTSB	M6PR	NPC1 NPC	ATG9L1
GLA Fabry	CTSD CLN10	IGF2R	MCOLN1 ML IV	ATG13
GAA Pompe	CTSS	MRC1		ATG14L
HEXA Tay-Sachs	CTSZ	SORT1		ATG16L1
HEXB Sandhoff	PPT1 CLN1	VPS33A MPS-PS	Others	FIP200
GLB1 GM1/MPSIVB	TPP1 CLN2	STX17	TFEB	VPS34
ARSB MPS VI	LIPA LAL-D		PSAP	RBCN
GALC Krabbe	NEU1 Sialidosis			EPG5
ASAH1 Farber				

### (2) オートファジーの解析

上記で作製したリソソーム関連遺伝子ノックアウトセルラインに関して、同一の手法で網羅的にオートファジーの機能解析を行った。手法としては、リソソーム阻害剤を用いて一定時間リソソームにおける分解を停止することによるオートファジー関連基質の蓄積を評価する、ガ

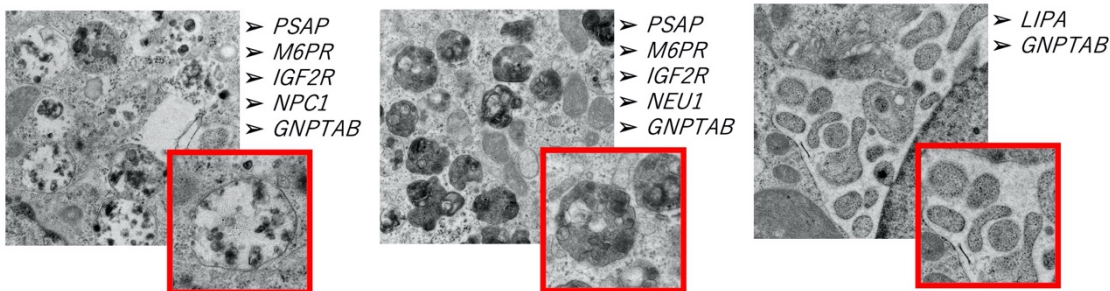
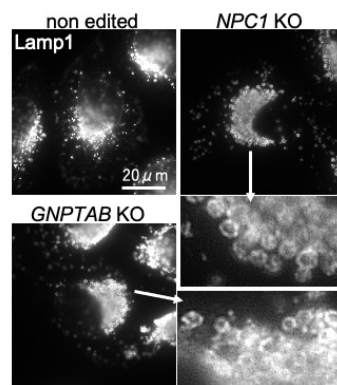
イドラインに基づいたオートファジーフラックスの評価方法を用いた。LSD においては疾患ごとに患者細胞やモデルマウスを用いたオートファジーの解析（オートファジーの障害）の報告が存在するが、阻害剤を用いたフラックスの評価を行っている報告は非常に少なく、また各報告により評価手技も異なっているためそれらを比較することは困難であった。我々はその問題を解決するために共通の背景を持つ細胞で共通の手技で評価した。その結果、既報とは異なり一部のノックアウト細胞（下図、青で囲んだもの）においてのみ明らかにオートファジーが障害されていることが分かった。これは我々の手法を用いることで始めてあぶり出された所見である。異常を示した疾患（原因遺伝子）の特徴はコレステロールの代謝に関係していたことから、さらに研究を進め、細胞培養液中へのコレステロール負荷や、コレステロール輸送異常を惹起する薬剤を用いてコレステロールを細胞に蓄積させた結果、同様にオートファジーの機能が障害されることを確認した。また一方でサイクロデキストリンを用いてコレステロールを減少させるとオートファジーが回復することも確認した。以上の結果から、コレステロールの蓄積がオートファジーに大きく影響を及ぼしている可能性が考えられた。



### (3) 形態学的解析

ノックアウトセルラインに形態学的な評価を加えた。高感度で高解像度の蛍光顕微鏡システムを構築し、ノックアウト細胞を免疫染色で評価した。LSD の一つであるムコリピドーシス患者細胞で見られる様な膨大化したリソソームの所見が、同様にノックアウトセルラインでもリング状に観察されるなど、顕微鏡の性能を生かした観察が可能となった。また既報の LSD 患者細胞の表現型と原因遺伝子をノックアウトしたセルラインで共通の表現型が観察できたことで、ノックアウト細胞による実験系の有用性が確認された。

電子顕微鏡による観察では、いくつかのノックアウト細胞は異常なリソソームと思われる構造を示し、これはリソソーム機能不全による蓄積物質であることが示唆された。蓄積物質の姿は様々な形態を示しており、今後詳細な蓄積物質の同定と定量が必要であると考えられた。また、異常なリソソーム構造を示した細胞は上記オートファジー機能が障害されていた細胞に特徴的に認められる傾向があり、ここでも蓄積物質と細胞機能の間に関連がある可能性が示唆された。



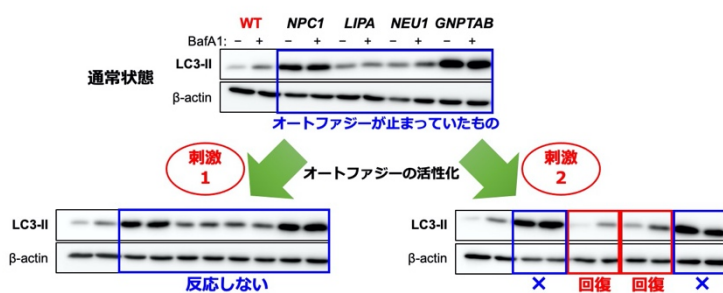
### (4) 蓄積物質の解析

上に示した様に、オートファジーの評価と形態学的な解析から蓄積物質の詳細な同定と定

量が必要と考えられ、コレステロールなどの脂質の関与が示唆されていることから、HeLa 細胞をベースとしたノックアウトセルラインで蓄積脂質の変化が捉えられるかを検討した。各種のノックアウトセルラインを薄層クロマトグラフィー (TLC) で評価したところ、スフィンゴ脂質の蓄積の変化を捉えることが出来た。この結果をもとに、LSD で蓄積する脂質を、質量分析機を用いて網羅的に測定する系 (リポドミクス) を立ち上げ、GM1、GM2、GM3、GA1、GA2、GA3、Gb1、Gb2、Gb3、Gb4、GalCer、Sulfatide、Sphingomyelin、Ceramide、Sphingosine などに加え、毒性が高いと考えられているそれらのリゾ体を含め、全 21 クラスに対し、結合している脂肪酸側鎖や骨格の炭素数違いも含めておよそ 300 分子種を一斉分析できる系を独自に構築した。これらの脂質は GM1-gangliosidosis、Tay-Sachs、Sandhoff、Fabry、Gaucher、Krabbe、Metachromatic leukodystrophy、Niemann-Pick A/B、Farber などの LSD で蓄積する基質をカバーしており、将来の解析研究に有用である。

(5) 疾患横断的な細胞機能回復の試み

LSD の治療に関しては、欠損酵素を補充する考え方が主流であるが、我々は病態ごとに共通の治療法を探っている。そこで、ノックアウトセルラインの解析で明らかになった表現型であるオートファジーに注目し機能回復を試みた。オートファジーが障害されていた 4 種類の細胞においてオートファジーの活性化に対する反応を確認した。4 種類の細胞はある刺激 (刺激 1) に対しては全く回復を示さなかったのに関わらず、別の刺激 (刺激 2) に対しては 4 種類のうち 2 種類は回復し、2 種類は無反応であった。このことから、病態に基づく治療法の可能性が示されたのみならず、LSD の一部でオートファジーが障害されているメカニズムは複数あることが示唆されたことは学術的にも興味深い。今後詳細なメカニズムを追求していく必要がある。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ikari Sumiko, Lu Shiou-Ling, Hao Feike, Imai Kenta, Araki Yasuhiro, Yamamoto Yo-hei, Tsai Chao-Yuan, Nishiyama Yumi, Shitan Nobukazu, Yoshimori Tamotsu, Otomo Takanobu, Noda Takeshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Starvation-induced autophagy via calcium-dependent TFEB dephosphorylation is suppressed by Shigyakusan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0230156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1371/journal.pone.0230156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Vasilev Filipp, Sukhomyasova Aitalina, Otomo Takanobu	4. 巻 21
2. 論文標題 Mucopolysaccharidosis-Plus Syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 421 ~ 421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3390/ijms21020421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kato Kohji, Oka Yasuyoshi, Muramatsu Hideki, Vasilev Filipp F, Otomo Takanobu, Oishi Hisashi, Kawano Yoshihiko, Kidokoro Hiroyuki, Nakazawa Yuka, Ogi Tomoo, Takahashi Yoshiyuki, Saitoh Shinji	4. 巻 57
2. 論文標題 Biallelic VPS35L pathogenic variants cause 3C/Ritscher-Schinzel-like syndrome through dysfunction of retriever complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 245 ~ 253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1136/jmedgenet-2019-106213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Itoh Kie, Adachi Yoshihiro, Yamada Tatsuya, Suzuki Takamichi L., Otomo Takanobu, McBride Heidi M., Yoshimori Tamotsu, Iijima Miho, Sesaki Hiromi	4. 巻 293
2. 論文標題 A brain-enriched Drp1 isoform associates with lysosomes, late endosomes, and the plasma membrane	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11809 ~ 11822
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1074/jbc.RA117.001253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Irahara-Miyana Kaori, Otomo Takanobu, Kondo Hidehito, Hossain Mohammad Arif, Ozono Keiichi, Sakai Norio	4. 巻 63
2. 論文標題 Unfolded protein response is activated in Krabbe disease in a manner dependent on the mutation type	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 699 ~ 706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s10038-018-0445-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大友孝信、川上由貴子、Filipp Vasilev、松田純子
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いた、ライソゾーム病の包括的理解への挑戦
3. 学会等名 第60回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Vasilev F., Kawakami Y., Gurinova E., Sukhomyasova A., Maksimova N., Matsuda J., Otomo T.
2. 発表標題 Mucopolysaccharidosis-plus syndrome: report of two new cases
3. 学会等名 第60回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Otomo T, Kawakami Y, Vasilev F, Matsuda J
2. 発表標題 Understanding pathomechanisms of lysosomal storage disorders with cellular models using genome-editing technology
3. 学会等名 41st, annual meeting of Society for Inherited Metabolic Disorders (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Vasilev F, Kawakami Y, Otomo T
2. 発表標題 INVESTIGATION OF THE PROTEIN STABILITY OF VPS33A, A RESPONSIBLE MOLECULE FOR MPSPS
3. 学会等名 日本ライソゾーム病研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上 由貴子、Filipp Vasilev、大友 孝信
2. 発表標題 ライソゾーム関連遺伝子ノックアウト細胞における形態学的考察
3. 学会等名 日本ライソゾーム病研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究代表者は本研究期間中に川崎医科大学 病態代謝学 特任准教授から、川崎医科大学 分子遺伝医学 主任教授へ異動した。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	川上 由貴子  (Kawakami Yukiko)	川崎医科大学・医学部  (35303)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	バシリエフ フィリップ  (Vasilev Filipp)	川崎医科大学・医学部・外国人特別研究員  (35303)	