

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 31日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791005

研究課題名（和文） 血中難溶性ユビキチン化タンパク質の測定によるポンペ病骨格筋病変評価法の開発

研究課題名（英文） Analysis of autophagic dysfunction in skeletal muscles from Pompe disease mice by using blood ubiquitin-protein conjugates

研究代表者

嶋田 洋太（SHIMADA YOHTA）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：20560824

研究成果の概要（和文）：本研究は、血中の難溶性ユビキチン化タンパク質を利用することで、ポンペ病骨格筋内で生じるオートファジーの異常を評価する方法の開発を目的とする。ポンペ病マウスを対象に解析した結果、（1）月齢依存的に血漿中で 58 kDa ユビキチン化タンパク質が顕著に増加することを見出した。（2）骨格筋でも同様のタンパク質の増加が認められ蓄積するオートファゴソームと共局在していることを見出した。（3）血漿中 58 kDa タンパク質の測定により病理染色よりも高感度に骨格筋のオートファジーの異常を検出し得る可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to evaluate the autophagic dysfunction in skeletal muscle from Pompe disease mice by using blood ubiquitin-protein conjugates. (1) We found that the levels of 58 kDa ubiquitin-protein conjugates in plasma from Pompe disease mice were increased prior to pathological accumulation of autophagosomes in skeletal muscles. (2) We found that levels of 58 kDa proteins were increased in skeletal muscles as well as plasma from Pompe disease mice, and these proteins were localized to autophagosomes accumulated in skeletal muscle fibers from Pompe disease mice. (3) These findings suggested that analysis of 58 kDa ubiquitin-protein conjugates in plasma may be able to detect the autophagic dysfunction in skeletal muscles and be more sensitive than immunohistochemical analysis of skeletal muscles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：遺伝・先天異常学

1. 研究開始当初の背景

ポンペ病は、酸性 α グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子の欠損により生じるライソゾーム病であり、心肥大や筋力低下といった筋病変を主症状とする。本邦では 2007 年より、欠損酵素を体外から補充する酵素補充療法が開始され、生命予後や心筋病変の改善が報告されていた。その一方で、骨格筋については抵抗性が存在することが明らかとなり、その要因の一つとしてオートファゴソームの蓄積が関与することが報告された。さらに、オートファジーの不全が骨格筋病態の中核を担うとも考えられ始め、患者病状や治療抵抗性を判断する上で骨格筋におけるオートファゴソームの蓄積評価は重要な項目として注目されていた。しかし、骨格筋におけるオートファゴソームの状態は、生検筋の病理学的解析でしか評価することができないため、日常的な解析対象とはされていなかった。このような状況から、研究代表者は、骨格筋内のオートファゴソーム蓄積をより低侵襲に解析する方法を開発することを目標とし、オートファジーと難溶性ユビキチン化タンパク質の関係性に注目することで、血中の同タンパク質が骨格筋内のオートファゴソームの蓄積を反映するバイオマーカーになるとの仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

ポンペ病モデルマウスの血中難溶性ユビキチン化タンパク質と骨格筋内オートファゴソームの蓄積との関連性について明らかにし、同タンパク質の測定により骨格筋におけるオートファゴソームの蓄積状態を評価する方法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋におけるオートファゴソーム蓄積の特徴付け

生後 1, 2, 4, 6 ヶ月齢のポンペ病モデルマウスより大腿四頭筋を採取し、抗 LC3 抗体を用いた免疫組織化学染色により解析した。

(2) 血中および骨格筋における難溶性ユビキチン化タンパク質の特徴付け

生後 6 ヶ月齢のポンペ病モデルマウスの大腿四頭筋ならびに血液を採取した。その後、これらを 2% SDS を用いて抽出し、抗ポリユビキチン鎖抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。さらに、抗ポリユビキチン鎖抗体を利用した ELISA により上述試料を測定した。また、ポリユビキチン鎖の特徴付けについては、K63 ポリユビキチン鎖特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により行った。

(3) 骨格筋における K63 ユビキチン化タンパク質とオートファゴソームとの局在解析

生後 1, 2, 4, 6 ヶ月齢のポンペ病モデルマウスより大腿四頭筋を採取し、抗 K63 ポリユビキチン鎖抗体ならびに抗 LC3 抗体を用いた免疫組織化学染色により解析した。

(4) 血中 58 kDa タンパク質の経時的変化の解析

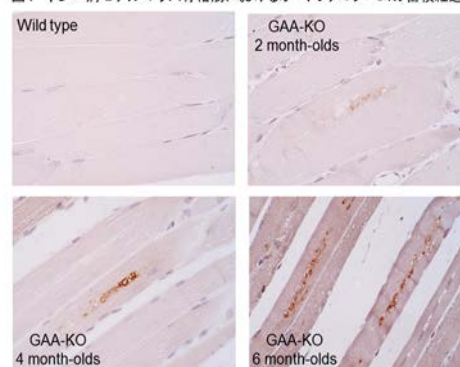
生後 1, 2, 4, 6 ヶ月齢のポンペ病モデルマウスの血液から血漿を調製した。これらの血漿を 2% SDS を用いて抽出し、抗ポリユビキチン鎖抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。また、生後 1, 3, 5 ヶ月齢のポンペ病モデルマウスに組換えヒト GAA を 1 ヶ月間投与した後に、各マウスより採血を行い、上記と同様の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 骨格筋におけるオートファゴソーム蓄積の特徴付け

我々の飼育しているポンペ病モデルマウスの大腿四頭筋におけるオートファゴソームの蓄積経過を解析した結果、2 ヶ月齢から抗 LC3 抗体陽性の筋線維が認められ始め、月齢の進行と共にオートファゴソームの蓄積が増加することが判明した (図 1)。

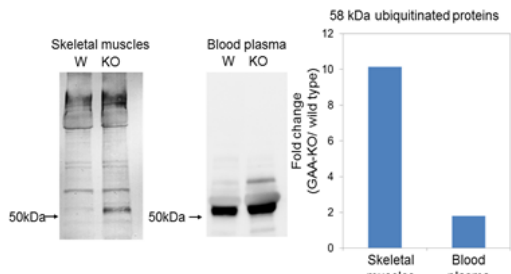
図 1 ポンペ病モデルマウス骨格筋におけるオートファゴソームの蓄積経過



(2) 血中および骨格筋中難溶性ユビキチン化タンパク質の特徴付け

最もオートファゴソームの蓄積が認められた 6 ヶ月齢ポンペ病マウスの大腿四頭筋ならびに血漿におけるユビキチン化タンパク質について解析したところ、両組織ともに 58 kDa に検出されるユビキチン化タンパク質の顕著な増加が認められ、大腿四頭筋では約 10 倍、血漿では約 2 倍に増加していた (図 2)。

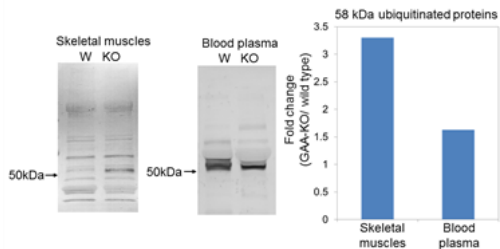
図2 ポンペ病マウス骨格筋および血漿におけるユビキチン化タンパク質の性状解析



一方、ELISA による血漿中の総ユビキチン化タンパク質の定量でも僅かな増加は確認されたが、58 kDa タンパク質の定量ほどの顕著な差は認められなかった。この結果は、ポンペ病マウス血漿内で複数の分子種が変動している可能性を示唆する。

続いて、58 kDa タンパク質の特徴付けを行うために、ポンペ病マウスの骨格筋ならびに血漿について K63 ポリユビキチン鎖特異的抗体を用いて解析を行った。その結果、両組織ともに 58 kDa タンパク質のみが顕著に増加しており、同タンパク質が K63 ポリユビキチン鎖を有することが判明した (図3)。

図3 ポンペ病マウス骨格筋および血漿におけるK63ポリユビキチン化タンパク質の性状解析

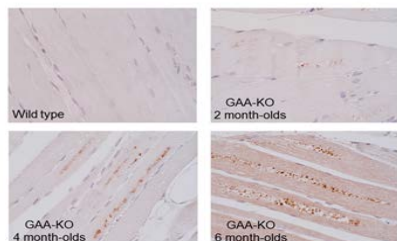


K63 ポリユビキチン鎖は、オートファジー依存的なタンパク分解に関与することが報告されていることから、58 kDa タンパク質の増加とオートファゴソームの蓄積との関連性が予想された。

(3) 骨格筋における K63 ユビキチン化タンパク質とオートファゴソームとの局在解析

58 kDa タンパク質の増加とオートファゴソーム蓄積との関連性を調べるために、大腿四頭筋におけるそれらの局在解析を行った。その結果、生後2ヶ月齢より抗 K63 ポリユビキチン鎖抗体陽性筋線維が認められ、月齢の進行と共に K63 ポリユビキチン鎖含有タンパク質は増加した (図4)。

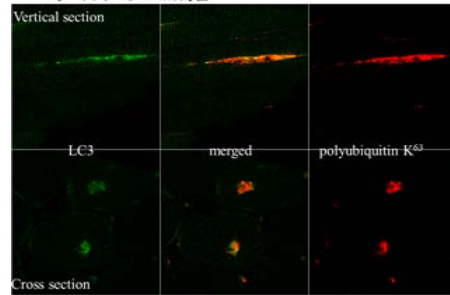
図4 ポンペ病マウス骨格筋におけるK63ポリユビキチン化タンパク質の局在



さらに、抗 K63 ポリユビキチン鎖抗体と抗 LC3 抗体を用いた免疫二重染色を行った結果、大腿四頭筋において K63 ポリユビキチン鎖含有タンパク質とオートファゴソームが共局在

することが判明した (図5)。

図5 ポンペ病マウス骨格筋におけるK63ポリユビキチン化タンパク質とオートファゴソームの局在

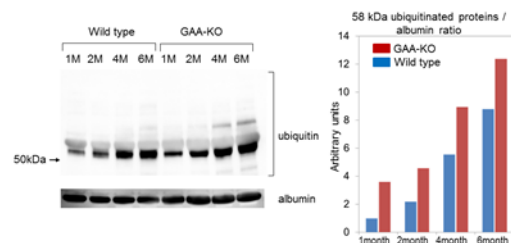


これらの結果は、58 kDa タンパク質の増加がオートファゴソームの蓄積と連動することを示唆する。

(4) 血中における 58 kDa タンパク質の経時的变化の解析

ポンペ病モデルマウス血漿中の 58 kDa タンパク質の経時的变化を解析した結果、生後1ヶ月齢の段階ですでに顕著な増加が認められ、その量は経時的に増加していくことが判明した (図6)。その一方で、欠損酵素の投与を行っても骨格筋中オートファゴソームの蓄積ならびに血漿 58 kDa タンパク質量の大きな変化は認められなかった。

図6 ポンペ病マウス血漿における58 kDaポリユビキチン化タンパク質の経時的变化



以上の結果は、血漿 58 kDa タンパク質が骨格筋中オートファゴソームの蓄積を反映していることを示唆する。免疫組織化学染色では2ヶ月齢以降でオートファゴソームの蓄積が顕在化するが、LC3-II の増加といった生化学的な変化自体は1ヶ月齢の段階ですでに大腿四頭筋内で生じていることを研究代表者は確認しており、58 kDa タンパク質の増加はその現象とも一致する。従って、血漿中の 58 kDa タンパク質を特異的に測定することで、生検筋の免疫組織化学染色よりも高感度に骨格筋内のオートファゴソームの蓄積を検出できる可能性が考えられる。今後は、58 kDa タンパク質のさらなる分子的特徴付けを行い、特異的な測定系の構築を行う予定である。

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)

〔学会発表〕(計2件)

① 嶋田洋太、福田隆浩、西山由梨佳、小林

博司、衛藤義勝、井田博幸、大橋十也、ポンペ病骨格筋におけるオートファジー異常検出のための血中バイオマーカーとしてのユビキチン化タンパク質の特徴付け、第16回日本ライソゾーム病研究会、2011年9月29日、東京

② Shimada Y, Fukuda T, Nishiyama Y, Kobayashi H, Eto, Y, Ida H, Ohashi T, Characterization of ubiquitin-protein conjugates as a blood biomarker for detection of autophagic buildup in Pompe disease mouse, Annual Symposium of Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, August 31, 2011, Geneva, Switzerland

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 洋太 (SHIMADA YOHTA)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：20560824