

学位授与番号：甲 941 号

氏 名：西山由梨佳

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 25 年 5 月 8 日

学位論文名：

ポソホ°病患者細胞におけるオートファジー誘導機構に関する研究

主論文名：

**Akt inactivation induces endoplasmic reticulum stress-independent autophagy in fibroblasts from patients with Pompe disease.**

（ポソホ°病患者由来線維芽細胞における小胞体ストレス非依存的オートファジーは Akt の不活性化が誘導している）

学位審査委員長：桑野和善教授

学位審査委員：岡部正隆教授、丸毛啓史教授

# 学位論文要旨

西山 由梨佳

指導教授名 井田 博幸

**Akt inactivation induces endoplasmic reticulum stress-independent autophagy in fibroblasts from patients with Pompe disease**

(ポンペ病患者由来線維芽細胞における小胞体ストレス非依存的オートファジーは Akt の不活性化が誘導している)

Mol Genet Metab. 2012 Nov;107(3):490-5.

ポンペ病（糖原病 II 型）は、酸性  $\alpha$  グルコシダーゼ（GAA）欠損によって引き起こされる常染色体劣性遺伝性疾患である。近年、本疾患では骨格筋や線維芽細胞においてオートファジーの異常が報告され、オートファゴソームの顕著な蓄積が酵素補充療法への治療抵抗性に関与することが明らかにされている。これまでに我々は、ポンペ病患者由来線維芽細胞において変異 GAA が引き起こす小胞体ストレスがオートファジーの亢進に関与することを見出し報告した。しかし、小胞体ストレスの生じていない患者細胞におけるオートファジーの誘導機構については、未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、グリコーゲン代謝ならびにオートファジーの制御を担う Akt シグナル経路に着目し、ポンペ病患者細胞における小胞体ストレス非依存的なオートファジーへの同経路の関与について解析を行った。

本研究で用いた患者細胞における小胞体ストレスの有無を評価するために、マーカー分子であるリン酸化 PERK について解析した結果、いずれの患者細胞でも同タンパク質は検出されなかった。一方、患者細胞のオートファジーの状態について電子顕微鏡やウェスタンブロット法を用いて解析したところ、マーカー分子である LC3-II の顕著な増加およびオートファゴソーム様構造物の蓄積が認められ、小胞体ストレス非依存的なオートファジーの亢進が確認された。続いて、これらの細胞におけるリン酸化 Akt や mTOR の活性を反映するリン酸化 p70 S6 キナーゼの状態について解析した。その結果、リン酸化 Akt、リン酸化 p70 S6 キナーゼともに減少が認められ、患者細胞における Akt/mTOR 経路の不活性化が明らかとなった。そこで、Akt 経路の活性化剤であるインスリンを患者細胞に投与したところ、リン酸化 Akt とリン酸化 p70 S6 キナーゼの増加と共に LC3-II の減少が認められた。さらに、Akt 阻害剤を同時に処理することにより、インスリンによる Akt や p70 S6 キナーゼの活性化作用が抑制され、オートファジーの抑制効果も消失した。さらに、Akt の活性化による酵素補充療法への影響を解析するため、インスリンと rhGAA を患者細胞に投与したところ、ライゾゾームのマーカー分子である LAMP2 と共局在する GAA が増加し、細胞内における成熟型 GAA の割合も増加することが判明した。以上の結果より、ポンペ病患者細胞におけるオートファジーの亢進は Akt の不活性化により生じていることが明らかとなった。インスリン投与により rhGAA の細胞内動態の改善が認められたことから、インスリンは酵素補充療法の効果改善薬として有用かもしれない。

## 論文審査の結果の要旨

平成 25 年 4 月 23 日に、丸毛啓史教授、岡部正隆教授と共に審査いたしました西山由梨佳氏の学位論文審査についてご報告申し上げます。

同氏の学位論文(Thesis)は「ポンペ病患者細胞におけるオートファジー誘導機構に関する研究」であり、Molecular Genetics and Metabolism (impact factor 3.08)に 2012 年に掲載された論文であります。ポンペ病は酸性 $\alpha$ グルコシダーゼ、以下 GAA と略します、の欠損によって引き起こされる常染色体劣性遺伝性疾患であります。近年本疾患では、骨格筋や線維芽細胞においてオートファジーの異常が報告され、オートファゴゾームの顕著な蓄積が酵素補充療法に対する治療抵抗性に関与することが明らかにされております(オートファジーとは、細胞質や小器官を二重膜で取り囲み、リソソームと結合し内容物を分解する機構であり生体の恒常性維持機構の一つである)。これまでに西山らはポンペ病患者由来線維芽細胞において変異 GAA が引き起こす小胞体ストレスがオートファジーの亢進に関与することを報告しております。しかし、小胞体ストレスの生じていない患者細胞におけるオートファジー誘導機序については明らかでなく、西山らは、グリコーゲン代謝とオートファジー制御を担う Akt シグナル経路に着目し、ポンペ病における役割について検討しております。

方法は、小胞体ストレスのない患者細胞を用いて、オートファジーの状態を電子顕微鏡やウェスタンブロットを用いて評価し、オートファジーのマーカー分子である LC3-II の顕著な増加及びオートファゴゾーム様構造物の蓄積が認められたため、オートファジーの亢進と判断しております。また、これらの細胞における Akt/mTOR 経路が不活化していることを確認しております。これらの細胞に、Akt 経路を活性化させるインスリンを投与するとオートファジーは抑制されます。さらに、酵素補充療法に抵抗性である患者細胞に、rhGAA のみでなく、Akt を活性化させるインスリンを同時に投与すると、細胞内における成熟型 GAA は増加しております。以上の結果から、西山らは、ポンペ病患者におけるオートファジー亢進は Akt の不活化によって生じていると結論し、さらに、Akt を活性化するインスリンを投与することによって、rhGAA のオートファゴゾームへの取り込みを抑制し、リソソームへの取り込みの改善が認められることは、酵素補充療法の効果を改善することが期待できると結論しております。

これに対して、審査委員より、ポンペ病は本来筋細胞病変であるが、線維芽細胞を使用したのはなぜか、心筋では酵素補充療法が有用であるのに対して骨格筋では有効でないのはなぜか、オートファゴゾームの蓄積が心筋には認められないのはなぜか、オートファゴゾームが蓄積しているのは、オートファジーは誘導されているもののリソソームの異常のために分解が完了していないためではないか、Akt の活性が低下している機序は何か、など多くの質問がなされましたが、西山氏は十分な知識をもとに的確に解答されました。審査委員で討議致しました結果、ポンペ病の病態および酵素補充療法に対する抵抗性の機序の解明において貴重な報告であると評価し、本論文を学位論文として価値があるものと判断いたしました。