

令和元年6月21日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09961

研究課題名(和文) 副腎白質ジストロフィー：ドナー由来ミクログリア様細胞の神経変性抑制メカニズム

研究課題名(英文) Adrenoleukodystrophy: effect of bone marrow transplantation in abcd1-deficient mouse

研究代表者

守田 雅志(MORITA, MASASHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号：20191033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：副腎白質ジストロフィーは極長鎖脂肪酸の異常蓄積及び炎症性脱髄反応を特徴とする神経変性疾患で、発病初期の骨髄移植が神経変性を抑制することが明らかになっている。本研究では骨髄移植キメラマウスを作製し、大脳の生化学的解析及び遺伝子発現解析を行った。その結果、骨髄細胞はマクロファージ様細胞としてレシピエントマウス脳に生着しており、極長鎖脂肪酸含量の低下は認められなかったが、コレステロール代謝関連遺伝子の発現に変動が認められた。これらのことから、骨髄移植ではドナー由来マクロファージ様細胞がグリア細胞のコレステロール代謝異常を改善している可能性が推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

副腎白質ジストロフィーは発病メカニズムが明らかになっていない遺伝性の神経変性疾患で、日本でも毎年新生児約20人程度の割合で患者がいると推定され、治療薬開発は僅々の重要課題である。本研究では、本疾患がペルオキシソーム機能欠損による極長鎖脂肪酸代謝異常とともに、コレステロール代謝異常が発病に関わっている可能性を明らかにした。将来的にはコレステロール代謝異常を標的とした炎症性脱髄を予防するという新しい視点から本疾患の発病抑制薬の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：X-linked adrenoleukodystrophy patients display cerebral inflammatory demyelination. Although very long chain fatty acids (VLCFA) accumulation is thought to be the main culprit underlying the pathogenesis, the mechanisms by which the VLCFA causes demyelinating neurodegeneration have not yet been elucidated. At present, bone marrow transplantation (BMT) is effective in halting disease progression. In our BMT experiments, the VLCFA plasma level significantly decreased and donor-derived bone marrow cells (BMDM) were engrafted in the brain as macrophage-like cells. However, the VLCFA levels in recipient mouse brain was not reduced by BMT. In the recipient mouse brain, some cholesterol metabolism-related genes were changed by BMT. These results suggest that BMDMs may interact with resident glial cells or endothelial cells, and thus may attenuate the cholesterol metabolic abnormality, which in turn suppresses neuroinflammation.

研究分野：生化学、細胞生物学

キーワード：副腎白質ジストロフィー 神経変性疾患 ペルオキシソーム 骨髄移植 ABCタンパク質 ミクログリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

副腎白質ジストロフィーは、男児2万人に一人の割合で起こる遺伝子疾患で、ペルオキシソーム膜 ABCD1 タンパク質をコードする *ABCD1* 遺伝子の変異を原因とする。現在、有効な治療法や治療薬がない難病で早急な対策が求められている。

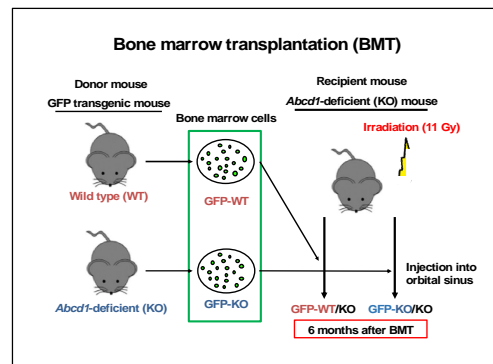
本疾患は脳における炎症を伴う脱髄性疾患で、炭素数 22 以上の極長鎖脂肪酸の蓄積を生化学的特徴としている。本疾患の発病は脳における極長鎖脂肪酸含有脂質の異常蓄積が原因と考えられているが、蓄積量と発病時期及び重症度には相関性がなく、極長鎖脂肪酸の蓄積以外の発病因子の存在が予想されている。実際に、本疾患は小学校低学年で発症して数年で死に至る最も重症度の高い小児大脳型から、末梢系の神経症状のみを呈する副腎脊髄ニューロパチー (AMN) など様々な病型 (小児大脳型、成人大脳型、AMN、アジソン病など) が存在しており、発病には遺伝的要因に加えて環境的要因やエピジェネティックな要因も関与していると考えられ、発症機構は未だ解明されていない。そのため治療薬の開発は進んでおらず、有効な治療薬開発が重要な課題となっている。

2. 研究の目的

副腎白質ジストロフィーは遺伝性の神経変性疾患で、日本でも毎年新生児 20~30 人程度の割合で患者がいると推定され、治療薬開発は僅々の重要課題である。本疾患では発病初期の骨髄移植が神経変性の発症を抑制することが報告されている。しかし、発病前もしくは発病初期でないとは効果はなく、適合するドナーを待つ間に神経症状が進行してしまう例が多い。このため、発病を遅らせる薬 (発病抑制薬) の開発は極めて重要である。本疾患は、ペルオキシソーム膜 ABCD1 タンパク質の機能欠損が原因であることは明らかにされているが、それに伴う極長鎖脂肪酸の異常蓄積と炎症性脱ミエリン化との関連性は解明されていない。本研究では、発病初期の骨髄移植が脱ミエリン化を抑制することに着目し、骨髄移植により脳に生着したドナー由来マクロファージ様細胞の神経変性の抑制機構を解析することにより、脱ミエリン化の発症機構を明らかにすることを目的とした。本研究結果から脱ミエリン化の発症機構の一端が明らかとなり、神経変性抑制薬の開発に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

GFP 発現野生型マウスから調製した骨髄細胞を、放射線照射で骨髄破壊した *Abcd1* 欠損マウスに移植した (GFP-WT/KO)。コントロールとして GFP 発現 *Abcd1* 欠損マウスの骨髄細胞を移植した (GFP-KO/KO)。6~10 ヶ月間飼育した後、血液を採取し、GFP 陽性の末梢血の割合を、FACS を用いて解析した。一方、レシピエントマウス脳におけるドナー由来 GFP 陽性骨髄細胞は免疫組織化学染色によりその分布や性状を解析した。一方、血清、脳、脊髄を調製し、ガスクロマトグラフィーによる極長鎖脂肪酸含量の定量、酵素法によるコレステロール含量の定量、及び real-time PCR による遺伝子発現解析を行った。



4. 研究成果

本研究計画では、骨髄移植による炎症性脱ミエリン化の抑制に着目し、骨髄移植キメラマウスを作製し、レシピエントマウス脳の生化学的解析を行った。

1) 骨髄移植

GFP 発現野生型マウスの骨髄細胞を放射線照射した *Abcd1* 欠損マウスに移植し、レシピエントマウスの末梢血のキメリズムをセルソーターで解析したところ、移植 10 カ月後においても 95% 以上が GFP 陽性のドナー由来細胞に置き換わっており、骨髄細胞が生着していることが確認された。また血清の極長鎖脂肪酸含量は野生型と同程度まで減少していた。このことから、骨髄移植がうまくできていることを確認した。

2) 骨髄細胞の分化・生着

骨髄移植により脳内に侵入したドナー由来 GFP 陽性骨髄細胞は、アストロサイトのマーカーである GFAP やオリゴデンドロサイトのマーカーである *Olig2* の発現は認められず、マクロファージのマーカーである *Iba1* を発現していたことから、マクロファージ様細胞に分化し生着していることが明らかとなった。GFP 陽性のマクロファージ様細胞は脳全体に分布しており、全 *Iba1* 陽性細胞の 40% 程度を占めていた。

3) 極長鎖脂肪酸含量

レシピエントマウス脳の極長鎖脂肪酸含量を測定した結果、骨髄移植による極長鎖脂肪酸含量の低下は認められなかった。この結果から、実際の骨髄移植においても、脳内に生着したドナー由来マクロファージ様細胞が極長鎖脂肪酸代謝異常の改善とは異なる機構により神経変性を抑制している可能性が推察された。

4) 遺伝子発現解析

レシピエントマウス脳の遺伝子発現解析を行った結果、炎症性サイトカイン関連遺伝子など発

病に関与すると予想される遺伝子で発現に違いは認められなかった。一方で、*Soat1*, *Ch25h*, *Scap* などコレステロール代謝関連遺伝子に若干変動が認められた。最近、ペルオキシソームが細胞内コレステロール代謝に関与していることが報告されていることから、骨髄移植ではドナー由来マクロファージ様細胞が脳内のミクログリアやアストロサイトと相互作用し、コレステロール代謝異常を改善している可能性が推察された。

本研究により、骨髄移植による神経変性抑制には脳内に生着した骨髄由来マクロファージ様細胞が関与しており、極長鎖脂肪酸蓄積の抑制とは異なる作用機構が働いていることが明らかとなった。今後、コレステロール代謝異常が炎症を伴う脱ミエリン化と関わっている可能性を検証し、将来的にはミクログリアやアストロサイトのコレステロール代謝を標的とした、炎症性脱髄を予防するという新しい視点から本疾患の発病抑制薬の開発が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- 1) Morita M, Matsumoto S, Sato A, Inoue K, Kostsin DG, Yamazaki K, Kawaguchi K, Shimozawa N, Kemp S, Wanders RJ, Kojima H, Okabe T, Imanaka T. Stability of the ABCD1 protein with a missense mutation: a novel approach to finding therapeutic compounds for X-linked adrenoleukodystrophy. *JIMD Rep.*, 44: 23-31, 2018.
- 2) Hama K, Fujiwara Y, Morita M, Yamazaki F, Nakashima Y, Takei S, Takashima S, Setou M, Shimozawa N, Imanaka T, Yokoyama K. Profiling and imaging of phospholipids in brains of abcd1-deficient mice. *Lipids*, 53: 85-102, 2018.
- 3) Morita M, Honda A, Kobayashi A, Watanabe Y, Watanabe S, Kawaguchi K, Takashima S, Shimozawa N, Imanaka T. Effect of Lorenzo's Oil on hepatic gene expression and the serum fatty acid level in abcd1-deficient mice. *JIMD Rep.*, 38: 67-74, 2017.
- 4) Morita M, Matsumoto S, Okazaki A, Tomita K, Watanabe S, Kawaguchi K, Minato D, Matsuya Y, Shimozawa N, Imanaka T A novel method for determining peroxisomal fatty acid β -oxidation. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 39: 725-731, 2016.
- 5) Kawaguchi K, Morita M. ABC transporter subfamily D: distinct differences in behavior between ABCD1-3 and ABCD4 in subcellular localization, function and human disease. *Biomed Res Int*. 2016, Article ID 6786245.

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) 守田雅志, 大山拓郎, 富田勇, 螺澤太郎, 松本隼, 渡辺志朗, 渡邊康春, 長井良憲, 高津聖志, 山本誠士, 石井陽子, 笹原正清, 今中常雄. 骨髄移植による副腎白質ジストロフィー 発症抑制機構: 移植マウス中枢神経系の生化学的解析. 日本薬学会第 137 年会; 2017 Mar 24-27; 仙台.
- 2) 螺澤太郎, 大山拓郎, 富田勇, 松本隼, 渡辺志朗, 今中常雄, 守田雅志. 副腎白質ジストロフィー: 骨髄移植による神経変性発症抑制. 日本生化学会北陸支部第 35 回大会; 2017 May 3; 金沢.
- 3) 守田雅志, 大山拓郎, 螺澤太郎, 依田大輝, 渡辺志朗, 今中常雄. 副腎白質ジストロフィー: 骨髄移植による神経変性抑制効果の解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会; 2017 Dec 6-9; 神戸.
- 4) 濱弘太郎, 藤原優子, 守田雅志, 今中常雄, 下澤伸行, 横山和明. *Abcd1* ノックアウトマウスの脳のスフィンゴミエリン分子種の解析. 第 58 回日本脂質生化学会; 2016 Jun 9-10; 秋田.
- 5) 守田雅志, 大山拓郎, 富田 勇, 渡邊靖春, 長井良憲, 渡辺志朗, 小林博司, 大橋十也, 高津聖志, 今中常雄. *Abcd1* 欠損マウスへの骨髄移植: レシピエントマウス各組織の生化学的解析. 第 58 回日本先天代謝異常学会総会; 2016 Oct. 27-29; 東京.
- 6) 大山拓郎, 富田 勇, 螺澤太郎, 松本 隼, 守田雅志, 渡辺志朗, 渡邊康春, 長井良憲, 高津聖志, 山本誠士, 石井陽子, 笹原正清, 今中常雄. 骨髄移植による副腎白質ジストロフィー 発症抑制機構の解明: レシピエントマウスの生化学的解析. 日本薬学会北陸支部第 128 回例会; 2016 Nov 27; 金沢.

〔図書〕(計 1 件)

- 1) Imanaka T, Kawaguchi K, Morita M. Photoaffinity Labeling for Structural Probing within Protein. 1st ed. Springer Nature; 2017 Sep. Chapter 10, Function of peroxisome in mammal and analysis of the fatty acid oxidation system by photoaffinity labeling; p. 197-223

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/research/laboratory/cellbiol/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：長井 良憲

ローマ字氏名：(NAGAI, yoshinori)

所属研究機関名：富山県立大学

部局名：工学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 30431761

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。