

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790236

研究課題名 (和文) グライコーム異常によるグリア細胞の活性化機構

研究課題名 (英文) Analysis of activated glial cells by glycome abnormality in lysosomal disease

研究代表者

辻 大輔 (TSUJI DAISUKE)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：00423400

研究成果の概要 (和文)：

GM2 ガングリオシドーシスは、リソソーム酵素である  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ (Hex) の欠損に基づき、糖脂質である GM2 ガングリオシド (GM2) が過剰に蓄積して発症する常染色体劣性遺伝病であり、中枢神経症状を伴う代表的なリソソーム病である。本研究では GM2 ガングリオシドーシスの発症メカニズムの解明を目指し、SD マウス由来グリア細胞株 (ミクログリア、アストロサイト) を用いて、蓄積している生体基質の解明と生体内基質蓄積による細胞内シグナル異常の解明、そしてサイトカイン・ケモカイン産生メカニズムの解明を明らかにすることを目的とした。その結果、SD マウス由来アストロサイトでは、ERK の活性化が起こり、細胞増殖が異常になっていることが明らかとなった。またミクログリアでは生体内基質蓄積により、Akt 及び PKC の活性化が起こり、ケモカインである MIP-1 $\alpha$  が産生増大していることが明らかとなった。これらは、SD マウスの脳における病態を反映しており、生体内基質蓄積によるグリア細胞の活性化機構を解明することができた。

研究成果の概要 (英文)：

Sandhoff disease (SD) is a lysosomal  $\beta$ -hexosaminidase (Hex) deficiency involving excessive accumulation of undegraded substrates, including terminal GlcNAc-oligosaccharides and GM2 ganglioside, and progressive neurodegeneration. In this study, we isolated astrocytes and microglia from the neonatal brain of Sandhoff disease model mice, and demonstrated the abnormalities of SD-glial cells. We found remarkable differences in the cell proliferation of SD astrocyte (ASD) when compared to cells isolated from wild type mice, with a faster growth rate of ASD cells. In addition, we observed increased ERK phosphorylation in ASD cells, but Akt phosphorylation was decreased. These results indicated that the up-regulation of ERK phosphorylation and the increase in proliferation of ASD astrocytes were dependent upon GM2/GA2 accumulation. Furthermore, inhibitors for PKC and Akt reduced the production of MIP-1 $\alpha$  by SD-Microglia. These findings may represent a mechanism in linking activation of glial cells observed in Sandhoff disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,200,000	600,000	3,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：先天性代謝異常症、糖脂質、グリア細胞、アストロサイト、ミクログリア、リソソーム病、神経変性疾患

### 1. 研究開始当初の背景

リソソーム病はリソソームに存在する糖質加水分解酵素の欠損により、その生体内基質が過剰に蓄積して全身性に臓器障害を伴う先天性の代謝異常症である。現在約 40 種類の疾患が存在し、その発生頻度は 1 万に 1 人と考えられており、さらに有効な治療法が殆ど存在しないため、我が国においても特定疾患（難病）指定されている。申請者は、これまでリソソーム性糖鎖分解酵素の欠損症の発症機構の解明とその治療法開発のための基礎研究に従事してきた。

GM2 ガングリオシドーシスはリソソーム酵素である  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ（Hex）の欠損に基づき、糖脂質である GM2 ガングリオシド（GM2）が過剰に蓄積して発症する常染色体劣性遺伝病であり、中枢神経症状を伴う代表的なリソソーム病である。この疾患には Hex の  $\alpha$  鎖が欠損する Tay-Sachs 病、 $\beta$  鎖が欠損する Sandhoff 病、GM2 活性化タンパクが欠損する GM2 活性化タンパク欠損症が存在する。1995 年に Sandhoff 病のモデルマウス（SD マウス）が作製され、神経細胞の脱落など極めてヒトと類似した病態を示すことが明らかとなっており、GM2 ガングリオシドーシスの病態解析・治療モデルとして利用されている。しかしながら蓄積している生体内基質と臨床症状との関係は依然として不明の点が多く、さらに主に蓄積している生体内基質は同定されているものの、微量に存在する基質については詳細な解析は殆ど行われていないのが現状である。

近年、ミクログリアをはじめとするグリア細胞の活性化は Sandhoff 病の病態に深く関わると考えられ、病態解明及び治療の標的として注目されている。最近、申請者は SD マウスの発症に炎症反応が関わっており、グリア細胞であるミクログリア・アストロサイトが選択的に炎症性ケモカインである MIP-1 $\alpha$  を産生することを明らかにするとともに、蓄積している生体内基質が脳構成細胞の種類によって生体内基質が異なっていることを明らかにした（Tsuiji D *et al.* *J Neurochem.* 92 1497-507. 2005；研究業績 No.7）。このように中枢神経系を構成している細胞毎で蓄積している生体内基質が異なり、さらにそれぞれの細胞で応答があることは大変興味深い。また SD マウス及び正常

マウスの脳由来ミクログリアの初代培養細胞（Tsuiji D *et al.* *J Neurochem.* 94 1631-8. 2005；研究業績 No.6）或いはアストロサイト初代培養細胞から各細胞株の樹立に成功し、病態モデルとして利用できることを明らかにしている（論文投稿準備中）。現在のところ、これらの細胞株については他のリソソーム病モデルを含めても、世界的に見ても申請者のみが単離に成功している。このため、各グリア細胞株における蓄積糖脂質、オリゴ糖、糖タンパクを解析（グライコム解析）することで、活性化に関わる新しい分子メカニズムが解明できることが期待される。

以上のような背景から中枢神経系に障害が現れるリソソーム病における生体内蓄積基質とグリア細胞の活性化との関係の解明は治療法開発にとって重要であると考え、本研究構想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では GM2 ガングリオシドーシスの発症メカニズムの解明を目的とし、SD マウス由来グリア細胞株（ミクログリア、アストロサイト）を用いて、研究期間内に以下の項目を明らかにした。

(1) SD マウスと野生型マウス由来各細胞株での比較解析による蓄積・変動する糖質の同定

(2) グリア細胞（ミクログリア及びアストロサイト）活性化に関わる細胞内シグナル系の特定

### 3. 研究の方法

(1) SD マウスと野生型マウス由来各細胞株での比較解析による蓄積・変動する糖質の同定

SD マウス由来各グリア細胞株（ミクログリア及びアストロサイト）において糖脂質及びオリゴ糖（薄層クロマトグラフィー及び質量分析）を野生型マウス由来細胞株と比較解析を行い、蓄積或いは変動している糖質を同定する。

(2) グリア細胞活性化に関わる細胞内シグナル系の特定

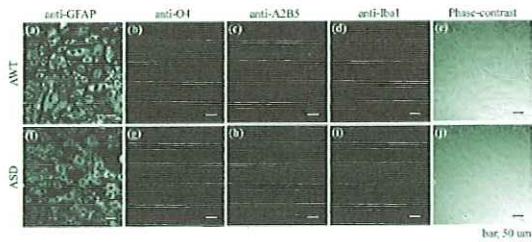
シグナル異常を起こしているカスケード

の阻害剤を利用して、SD マウス由来グリア細胞株におけるケモカインの発現上昇が抑えられるか検討してグリア細胞活性化に関わるシグナル系を明らかにする。

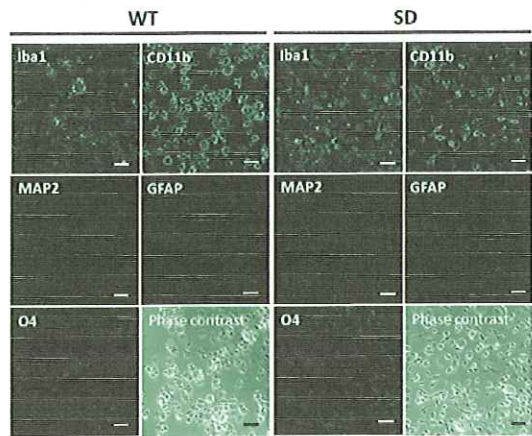
#### 4. 研究成果

##### (1) SD 及び野生型マウス由来グリア細胞株の樹立

生後 1 日の SD 及び野生型 (WT) マウスの脳からグリア混合培養を行い、細胞の接着性を利用して、GFAP 陽性アストロサイト (①) 及び Iba1/CD11b 陽性ミクログリア (②) を単離した。



① SD 及び WT 新生児脳由来アストロサイト: GFAP; アストロサイトマーカー、O4; オリゴデンドロサイトマーカー、A2B5; O2A 前駆細胞マーカー、Iba1; ミクログリアマーカー

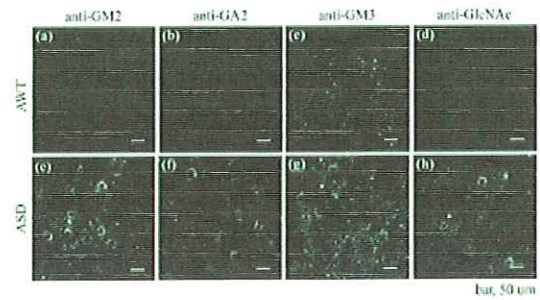


② SD 及び WT 新生児脳由来ミクログリア: Iba1 及び CD11b; ミクログリアマーカー、GFAP; アストロサイトマーカー、O4; オリゴデンドロサイトマーカー、MAP2; 神経細胞マーカー

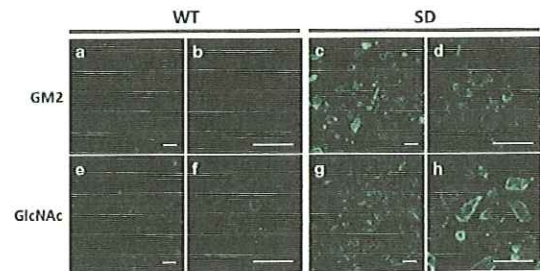
##### (2) SD マウス由来グリア細胞株における複合糖質蓄積

単離した各グリア細胞株において、生体内基質に対するモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法を行った。その結果、SD 由来アストロサイトでは野生型では観察されない GM2 及び GA2、そして末端 GlcNAc 含有糖鎖が観察された (③)。またミクログリアでは、GM2 及び末端 GlcNAc 含有糖鎖

のリソソームにおける過剰蓄積が観察された (④)。



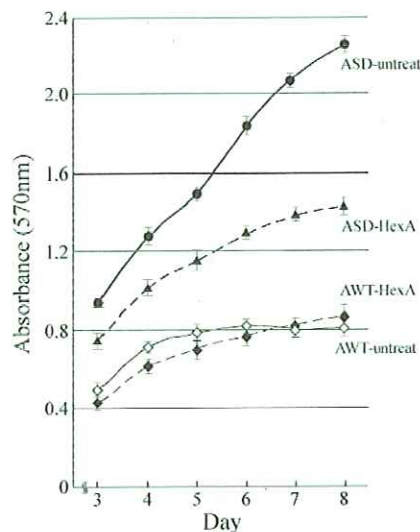
##### ③ SD 由来アストロサイト細胞株における生体内基質蓄積



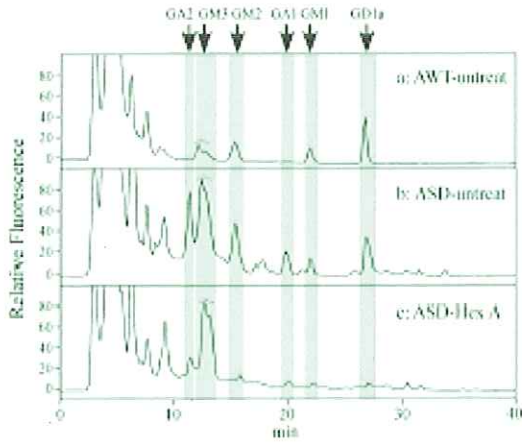
##### ④ SD 由来ミクログリア細胞株における生体内基質蓄積

##### (3) SD 及び WT マウス由来アストロサイトにおける細胞増殖

SD 及び WT マウス由来アストロサイトにおいて、それぞれ細胞増殖曲線を描くと SD アストロサイトにおいて顕著な細胞増殖が起こっていることが明らかになった (⑤)。さらに SD アストロサイトに対して HexA を補充すると、蓄積していた GM2 及び GA2 が減少し (⑥)、明らかに細胞増殖が抑制された (⑤)。このことから SD アストロサイトは生体内基質の蓄積により、異常な細胞増殖を示すことが明らかとなった。



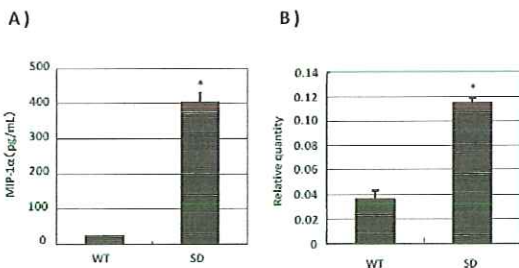
⑤ SD 及び WT 由来アストロサイトにおける細胞増殖曲線：XTT アッセイにより測定。ASD-untreat；未処理 SD 由来アストロサイト、ASD-HexA；HexA 処理 SD 由来アストロサイト、AWT-untreat；未処理 WT 由来アストロサイト、AWT-HexA；HexA 処理 WT 由来アストロサイト



⑥ SD 及び WT 由来アストロサイトにおける糖脂質解析：HPLC により測定。ASD-untreat；未処理 SD 由来アストロサイト、ASD-HexA；HexA 処理 SD 由来アストロサイト、AWT-untreat；未処理 WT 由来アストロサイト

(4) SD 及び WT マウス由来ミクログリアにおける MIP-1 $\alpha$  発現

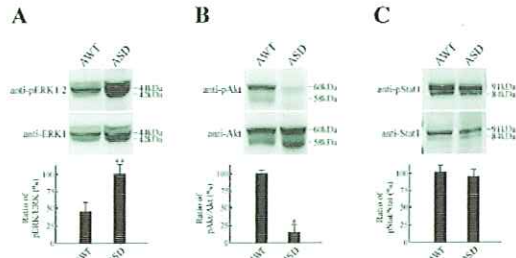
単離したミクログリアにおいて、ケモカインである MIP-1 $\alpha$  の分泌 (⑦A) 及び mRNA 発現 ((⑦B) を解析した。その結果、SD 由来ミクログリアにおいて顕著に MIP-1 $\alpha$  分泌が亢進しており、さらに mRNA において発現が増大していることが明らかになった。このことから、SD ミクログリアでは、MIP-1 $\alpha$  mRNA 発現の誘導が起こっており、その結果として細胞外への分泌が高まっており、これは SD マウスの脳における現象と一致していた。



⑦ SD 及び WT 由来ミクログリアにおける MIP-1 $\alpha$  の細胞外分泌 (A) 及び mRNA 発現 (B)：A；MIP-1 $\alpha$  の ELISA kit (R&D 社) により測定。B；Real-time PCR (BIO-RAD 社) により測定。

(5) SD 及び WT マウス由来アストロサイトにおけるシグナル伝達機構解析

SD アストロサイトにおける細胞の異常増殖に関与するシグナル伝達機構を解明するためにリン酸化抗体を用いた Immunoblotting を行った。その結果、ERK の活性化及び Akt の抑制が起こっていることが明らかとなった (⑧)。



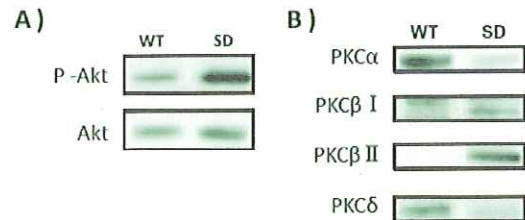
⑧ SD アストロサイトにおけるシグナル伝達機構解析：A；ERK、B；Akt、C；Stat

(6) SD アストロサイトにおける HexA の補充による基質蓄積の解消とシグナル伝達機構への影響

さらに SD アストロサイトにおける ERK 及び Akt の異常が生体内基質蓄積によるものであるかを調べるために、HexA を補充することで基質蓄積を解消させた後にそれぞれの抗体を用いて Immunoblotting をおこなった (⑨)。その結果、HexA の補充により明らかに ERK 活性化の減少及び Akt 抑制の解除が起こっていた。この結果は、リソソームにおける GM2 や GA2 などの生体内基質蓄積が、ERK 及び Akt のような細胞増殖に関わるシグナルの異常を引き起こし、その結果として細胞増殖の亢進が起こっていたことを示唆していた。

(7) SD ミクログリアでのシグナル解析

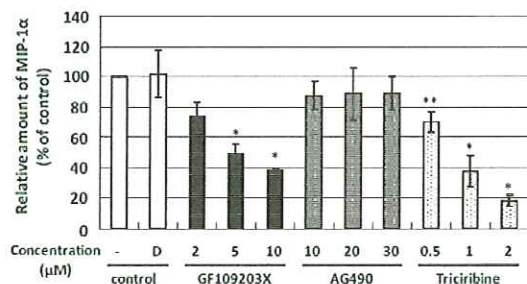
さらに SD ミクログリアにおいて変動しているシグナル伝達経路が存在するかを調べるためにリン酸化抗体を用いた Immunoblotting を行った。その結果、Akt のリン酸化が SD ミクログリアにおいて亢進しており、さらに PKC の  $\beta$  I 及び II が顕著に増大していることが明らかになった (⑩)。これらの結果から、Akt 及び PKC が生体内基質蓄積により活性化していることが示唆された。



⑨ SD アストロサイトにおけるシグナル伝達機構解析：A；Akt、B；PKC isozyme

(8) シグナル伝達阻害剤を用いた SD ミクログリアにおける MIP-1 $\alpha$  分泌の抑制

SD ミクログリアにおいて増大している MIP-1 $\alpha$  がどのシグナル伝達経路の活性化により起こっているかを調べるために、各経路の阻害剤を処理した後に、ELISA により MIP-1 $\alpha$  分泌量を測定した (⑩)。その結果、PKC 阻害剤である GF109203X 及び Akt 阻害剤である Triciribine では、濃度依存的に MIP-1 $\alpha$  分泌を抑制した。一方、JAK2 阻害剤である AG490 は抑制を示さなかった。このことから、PKC 及び Akt を介したシグナル伝達の異常が SD ミクログリアにおける MIP-1 $\alpha$  分泌亢進に寄与していることが示唆された。



⑩ 阻害剤処理後の SD ミクログリアにおける MIP-1 $\alpha$  分泌

以上の結果から、SD マウス由来アストロサイトでは、ERK の活性化が起こり、細胞増殖が異常になっていることが明らかとなった。またミクログリアでは生体内基質蓄積により、Akt 及び PKC の活性化が起こり、ケモカインである MIP-1 $\alpha$  が産生増大していることが明らかとなった。これらは、SD マウスの脳における病態を反映しており、生体内基質蓄積によるグリア細胞の活性化機構を解明することができ、中枢神経系に障害が現れるリソソーム病における生体内蓄積基質とグリア細胞の活性化との関係の解明することができた。

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 14 件)

- ① Matsuoka K, Tsuji D, Aikawa S, Matsuzawa F, Sakuraba H, Itoh K.: Induction of an N-glycan sequon into *HEXA* enhances human b-hexosaminidase cellular uptake in a model of Sandhoff disease.: *Molecular therapy*, In press 査読有
- ② Miyosh K, Tsuji D, Kudo K, Satomura K, Muto T, Itoh K, Noma T.: Generation of human induced pluripotent stem cells from oral mucosa: *J Biosci Bioeng*, In press 査読有

有

- ③ Kawashima N, Tsuji D, Okuda T, Itoh K, Nakayama K.: Mechanism of abnormal growth in astrocytes derived from a mouse model of GM2 gangliosidosis.: *J Neurochem*, **111** (4), 1031-41, (2009) 査読有
- ④ Kawashita E, Tsuji D, Kawashima N, Nakayama K, Matsuno H, Itoh K.: Abnormal production of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  by microglial cell lines derived from neonatal brains of Sandhoff disease model mice.: *J Neurochem*, **109** (5), 1215-24, (2009) 査読有
- ⑤ Akeboshi H, Kasahara Y, Tsuji D, Itoh K, Sakuraba H, Chiba Y, Jigami Y.: Production of human b-hexosaminidase A with highly phosphorylated N-glycans by the overexpression of the *Ogataea minuta MNN4* gene.: *Glycobiology*, **19** (9), 1002-9, (2009) 査読有
- ⑥ Yoshida T, Kadota Y, Hitaoka S, Kori E, Horikawa Y, Taguchi M, Tsuji D, Hirokawa T, Chuman H, Itoh K.: Expression and molecular dynamics studies on effect of amino acid substitutions at Arg344 in human cathepsin A on the protein local conformation.: *Biochim Biophys Acta*, **1794** (11), 1693-9 (2009) 査読有
- ⑦ 伊藤孝司, 辻 大輔: GM2 ガングリオシド蓄積症モデルマウス脳内への組換え酵素補充効果と蓄積糖脂質の変動: *生体の科学*, **60**, 234-239 (2009) 査読無
- ⑧ Tatano Y, Fujinawa R, Kozutsumi Y, Takahashi T, Tsuji D, Takeuchi N, Tsuta K, Takada G, Sakuraba H, Itoh K.: Tropoelastin regulates chemokine expression in fibroblasts in Costello syndrome.: *Biochem Biophys Res Commun*, **372** (4), 681-7, (2008) 査読有
- ⑨ Yoshimizu M, Tajima Y, Matsuzawa F, Aikawa S, Iwamoto K, Kobayashi T, Edmunds T, Fujishima K, Tsuji D, Itoh K, Ikekita M, Kawashima I, Sugawara K, Ohyanagi N, Suzuki T, Togawa T, Ohno K, Sakuraba H.: Binding parameters and thermodynamics of the interaction of imino sugars with a recombinant human acid  $\alpha$ -glucosidase (alglucosidase alfa): insight into the complex formation mechanism.: *Clin Chim Acta*, **391** (1-2), 68-73, (2008) 査読有
- ⑩ Shigenaga A, Tsuji D, Nishioka N, Tsuda S, Itoh K, Otaka A.: Development of stimulus-responsive amino acid with peptide bond-cleavage ability and its application to a nucleocytoplasmic shuttle peptide.: *Peptide Science 2007*, 97-98, (2008) 査読無
- ⑪ Shigenaga A, Tsuji D, Nishioka N, Tsuda S, Itoh K, Otaka A.: Synthesis of a stimulus-

responsive processing device and its application to a nucleocytoplasmic shuttle Peptide.: *Chembiochem*, 8 (16), 1929-31, (2007) 査読有

- ⑫ Akeboshi H, Chiba Y, Kasahara Y, Takashiba M, Takaoka Y, Ohsawa M, Tajima Y, Kawashima I, Tsuji D, Itoh K, Sakuraba H, Jigami Y.: Production of recombinant b-hexosaminidase A, a potential enzyme for replacement therapy for Tay-Sachs and Sandhoff diseases, in the methylotrophic yeast *Ogataea minuta*.: *Appl Environ Microbiol*, 73 (15), 4805-12, (2007) 査読有
- ⑬ Tsuji D, Higashine Y, Matsuoka K, Sakuraba H, Itoh K.: Therapeutic evaluation of GM2 gangliosidoses by ELISA using anti-GM2 ganglioside antibodies.: *Clin Chim Acta*, 378 (1-2), 38-41, (2007) 査読有
- ⑭ 辻 大輔, 伊藤 孝司: リソソーム病の分子病理と治療ターゲット: *生化学*, 79, 678-682, (2007) 査読無

[学会発表] (計9件)

- ① 豊島 優裕, 辻 大輔, 伊藤 孝司: Sandhoff 病モデルマウス由来 Microglia 細胞株の形態を制御するシグナリング解析: 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 24 日
- ② 川島 永子, 辻 大輔, 奥田 徹哉, 伊藤 孝司, 仲山 賢一: GM2 ガングリオシドーシス由来アストロサイトの異常増殖メカニズムの解明: 第 29 回日本糖質学会年会, 2009 年 9 月 11 日
- ③ 辻 大輔, 豊島 優裕, 南條 遥, 伊藤 孝司: GM2 ガングリオシドーシスモデルマウスにおける骨髄由来細胞のケモカインシステムを介した脳内浸潤: 第 29 回日本糖質学会年会, 2009 年 9 月 10 日
- ④ 吉田 有花, 辻 大輔, 豊島 優裕, 伊藤 孝司: ケモカインリガンド・レセプターシステムを介した病態マウス由来骨髄細胞の脳内移行に関する基礎研究: 第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 2008 年 12 月 11 日
- ⑤ 辻 大輔, 宮崎 絵梨, 松岡 和彦, 明星 裕美, 笠原 由子, 千葉 靖典, 地神 芳文, 川島 育夫, 櫻庭 均, 伊藤 孝司: Sandhoff 病モデルマウスに対するメタノール資化性酵母由来ヒト  $\beta$ -ヘキシサミニダーゼの脳内補充効果: 第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 2008 年 12 月 11 日
- ⑥ 川島 永子, 辻 大輔, 伊藤 孝司, 仲山 賢一: GM2 ガングリオシドーシス由来アストロサイトの異常増殖メカニズムの解明: 第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 2008 年 12

月 10 日

- ⑦ 辻 大輔, 安岡 寛子, 松岡 和彦, 宮崎 絵梨, 廣瀬 由記子, 明星 裕美, 笠原 由子, 千葉 靖典, 地神 芳文, 二木 史朗, 櫻庭 均, 伊藤 孝司: GM2 ガングリオシドーシスモデルマウスに対する組換えヒト  $\beta$ -ヘキシサミニダーゼの脳内補充効果: 第 50 回日本脂質生化学会, 2008 年 6 月 5 日
- ⑧ 河下 映里, 辻 大輔, 川島 永子, 仲山 賢一, 伊藤 孝司: Sandhoff 病モデルマウス由来ミクログリアにおける MIP-1  $\alpha$  生産誘導メカニズムの解析: 第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 2007 年 12 月 15 日
- ⑨ 川島 永子, 辻 大輔, 伊藤 孝司, 仲山 賢一: GM2 ガングリオシドーシス由来アストロサイトの異常増殖メカニズムの解明: 第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 2007 年 12 月 15 日

[図書] (計1件)

- ① 辻 大輔, 伊藤 孝司  
細胞の構造とオルガネラ: 第3章-4  
リソソーム蓄積症 (リソソーム病)  
生物薬科学実験講座, pp 219-234 (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 神経幹細胞及び/又は神経系前駆細胞への選択的分化誘導剤  
発明者: 伊藤 孝司, 辻 大輔, 高石 喜久, 柏田 良樹  
権利者: 国立大学法人徳島大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2009-262542  
出願年月日: 2009 年 11 月 18 日  
国内外の別: 国内

名称: ヒト  $\beta$ -ヘキシサミニダーゼ B の基質特異性を変換した新規高機能酵素  
発明者: 櫻庭 均, 伊藤 孝司, 辻 大輔  
権利者: 学校法人明治薬科大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2009-109563  
出願年月日: 2009 年 1 月 19 日  
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻 大輔 (TSUJI DAISUKE)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号: 00423400