

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790734
 研究課題名 (和文) GM2 ガングリオシドーシスにおける自己抗体を介した炎症反応機構解明と治療法の開発
 研究課題名 (英文) Autoantibody dependent inflammatory response is a new therapeutic target for the GM2 gangliosidoses
 研究代表者
 山口 章 (YAMAGUCHI AKIRA)
 横浜市立大学・大学院医学研究科・客員研究員
 研究者番号：20381585

研究成果の概要：

これまで GM2 ガングリオシドーシスにおける中枢神経系での炎症は糖脂質の蓄積でおきると考えられていたが、本研究により、脳に侵入した自己抗体が関与することが示唆された。この結果から免疫反応を抑える治療法が有効であると考えられたため、疾患モデルマウスにステロイド投与による治療を試みた。しかし、検討した条件では炎症や病態の改善はみられなかった。今後、投与量、回数などのさらなる至適化が必要だと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

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：ライソゾーム、自己抗体、炎症反応、サンドホフ、ガングリオシド

1. 研究開始当初の背景

(1) Sandhoff 病(SD)はライソゾームに局在するヘキソサミニダーゼの β 鎖遺伝子 (*HEXB*) の遺伝的欠損により、基質である GM2 を主体とする糖脂質、オリゴ糖などが神経細胞等のライソゾームに蓄積するライソゾーム病の一つである。ライソゾーム病の病態生理については不明な点も多く、神経系の異常をきたす型では有効な治療法もない。ライソゾーム病は分解されない基質のライソゾーム内蓄積が一つの特徴であるが、実際に蓄積がどの程度病態に関与するかは不明である。たとえばライソゾーム病の代表である Gaucher 病では神経細胞に基質の蓄積がほとん

どないにもかかわらず、重篤な神経症状を呈する。また正常マウスの骨髄移植を施した SD 病マウスは神経での蓄積量には変化がないにもかかわらず症状や寿命の改善を見ているなど必ずしも蓄積が症状に関与しない可能性がある。

(2) 近年 SD では蓄積によって引き起こされると覆われる中枢神経系での炎症反応、また、蓄積物に対する自己抗体の産生などが報告されている。これらの因子は、ノックアウトマウス等の実験から、病気の進行に深く関わっていることが報告されている。たとえば、Proia RL.らは、SD マウスの中枢神経系では、TNF- α の産生により炎症反応が引き起こされており、正常マウスの骨髄

移植により、蓄積物の減少は認められないのにもかかわらず、TNF- α の産生量は減少し、寿命が改善することを報告した。さらに、SD マウスでは、MIP-1 α が産生されており、その結果、末梢から誘導されマクロファージが、TNF- α を産生し、アポトーシスや炎症反応を引き起こしていることを報告している。Platt FM.らは、SDマウスの中樞神経系では、COX-2 や iNOS が発現しており、これらが神経での炎症反応を引き起こしていることを報告している。さらに、インドメタシンなど COX-2 インヒビターを投与することにより、SDマウスの寿命が約 20%改善したことから、炎症反応が病気の進行を促進していることを報告している。現在までに私は、SD では、蓄積物に対する自己抗体が産生されていることを証明し、これらの自己抗体の影響を軽減する Fc γ 鎖遺伝子ノックアウトマウスと SD マウスのダブルノックアウトマウス (FcDKO マウス)を作成し、顕著な神経症状の改善と延命を確認できた。

(2)Wada らは、SD の脳の遺伝子発現を網羅的に解析した結果、ケモカイン CXCL13 が高発現していることを報告している。ケモカイン CXCL13 は B 細胞、CD4T 細胞をリクルートする遊走性ケモカインとして知られている。近年、重症筋無力症、多発性硬化症、リウマチなどの自己免疫疾患において、炎症部位に CXCL13 の発現が認められ、炎症部位に B 細胞、CD4T 細胞をリクルートしていると考えられている。特に多発性硬化症やそのモデルマウスである EAE マウスでは、グリア細胞から分泌されており、分泌部位の周辺には T 細胞の浸潤が認められる。一方、EAE CXCL13 ノックアウトマウスの場合、EAE CXCL13+/+マウスに比べて、神経症状の発症が顕著に遅滞したことが報告され、自己免疫性の神経変性疾患においても、CXCL13 は重要な役割を担っていることが示唆されている。SD マウスにおいても、脳での CXCL13 の高発現が報告されており、神経症状依存的に発現量が増加していくことが報告されているが、その生物学的意味や役割についてはわかっていない。これらのことから、SD では、蓄積を起因と思われる免疫反応が起きており、この免疫反応が SD における病態の促進に関係していると思われる。

2. 研究の目的

ライゾーム蓄積症の一つであるサンドホフ病 (SD)では、神経細胞内に GM2 や GA2 が蓄積することにより、中枢神経系での炎症反応が発症すると考えられてきた。しかし、最近の知見から、蓄積物が減少しなくても炎症反応を抑制できることから、SD の中枢神経系での炎症反応は、蓄積以外の他の因子によって引き起こされていることが示唆された。現在まで、我々は、SD 及びサンドホフ病モデルマウスでは、酵素欠損により基質を排除できず、その結果、基質に対する自己抗体が産生され、自己抗体が神経症状に深く関与していることを見いだした。本研究では、SD

マウスの Fc gamma 鎖遺伝子をノックアウトしたダブルノックアウトマウスにおいて、GM2,GA2 の蓄積量は減少していないのにも関わらず、SD マウスの炎症マーカーである TNF- α やケモカインなどの発現量が低下していることから、自己抗体と炎症反応の関係の解明と、その炎症反応のコアとなる分子をターゲットにした抗体治療の確立を行いたい。

3. 研究の方法

(1)形態を主体とした検索

15 週齢の WT マウス、SD マウス、FcDKO マウスよりそれぞれ脳のパラフィン切片を作成した。抗 Iba-1 抗体でマイクログリアを染色した。また、抗 IgG 抗体で自己抗体の沈着を検出した。

(2)タンパク質マイクロアレイによる自己抗体を介した発現サイトカインの網羅的解析

自己抗体を介して起きる炎症性サイトカイン、ケモカインの産生を網羅的に解析するため、15 週 WT マウス、SD マウス、FcDKO マウスよりそれぞれタンパク質を抽出し、Raybiotech Quantibody® Mouse Cytokine Array1 にてサイトカインの定量を行った。

(3)炎症性サイトカイン、ケモカインの定量

WT マウス、SD マウス、FcDKO マウスより経時的に TotalRNA を抽出し、cDNA を合成後、Real-timePCR 法を用いて炎症性サイトカイン、ケモカインの定量を行った。

(4)ステロイド投与による治療

免疫抑制等幅広い効果のあるステロイド剤投与により SD マウスの炎症反応が減少するかどうかおよび病態が改善するかどうかを解析するため、プレドニゾン 10mg/kg を 3 日間連続して投与することを 1クールとするステロイドパルス療法を炎症性サイトカインの発現が顕著に上昇する前の 12 週齢より開始し、15 週齢まで毎週行った。その間、神経症状をロタロッドテストにより毎週解析した。15 週齢の段階で解剖し、形態学的解析および、炎症反応関連遺伝子の発現を定量的 PCR 法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1)炎症反応に自己抗体が関与しているかどうかを、SD のモデルマウス (SD マウス)と、抗体を認識する受容体を欠損させた SD マウス (Fc γ 鎖遺伝子ノックアウト SD マウス:FcDKO マウス)を用いて検討した。

①中枢神経系における炎症関連遺伝子の発現をタンパク質アレイまたは Real-time PCR 法を用いて解析したところ、TNF- α 、CXCL-13 が末期 15 週齢の SD マウスでは同週齢の WT マウスよりそれぞれ 10 倍程度高発現していたが、同週齢の FcDKO マウスでは SD マウスより低値を示した。一方、マクロファージ/マイクログリアマーカー MAC1 や遊走性ケモカイン Mip-1 α の発現量に有意差は認められなかった (Fig1)。

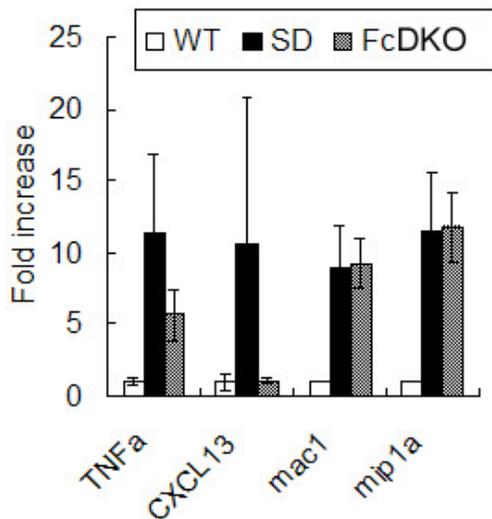


Fig1. 15 週齢の脳における mRNA 発現量

② SD マウスは、8 週齢頃より蓄積が有意に認められ、10 週齢頃より緩やかな神経症状を呈する。その後、自己抗体が産生され始める 13 週齢より急激に神経症状が重篤になり、15 週齢までに死亡する。①で高発現の見られた遺伝子の発現を経時的に定量した結果、SD マウスにおいて 13 週以降に TNF- α 、CXCL-13 の発現上昇が見られた(Fig2)。

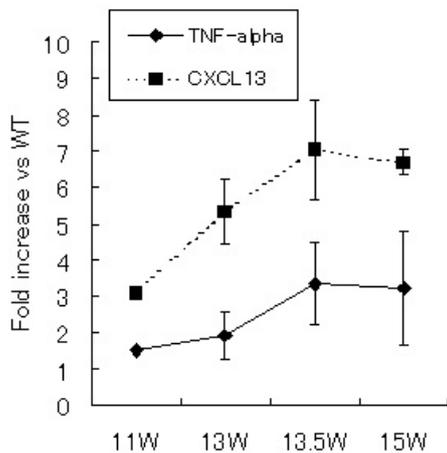


Fig.2 SD マウス脳における経時的発現量

③15 週齢の SD マウスの脳では主に視床と橋において増加したマイクログリアが炎症反応を引き起こしているが、炎症反応の起因は明らかではなかった。我々は 15 週齢の SD マウスにおいて神経細胞への抗体の沈着を見出した。また、15 週齢 FcDKO マウスでは抗体の沈着およびマイクログリアの浸潤に明確な違いは認められなかった(Fig3)。

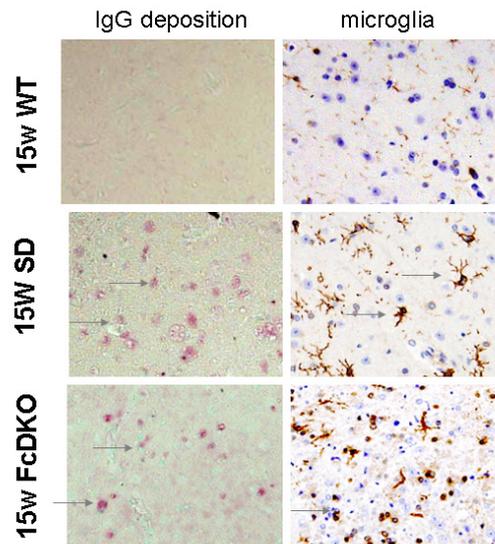


Fig.3 視床における IgG の沈着とマイクログリア

④以上の結果から、SD におけるマイクログリアの引き起こす炎症反応は、自己抗体を介した反応であることが示唆された。これまで、炎症反応は蓄積に依存すると予想されてきたが、今回我々の研究により炎症反応に自己抗体の関与が示唆されたことで、治療の新しい標的として免疫反応を抑えるような治療法が有効である可能性が考えられた。

(2)現在、さまざまな炎症を伴う自己免疫性神経疾患(多発性硬化症、ギラン・バレー症候群、重症筋無力症等)に対してステロイド治療が行われている。そこで、SD マウスにステロイドを投与することで炎症反応が減少するかどうかおよび病態が改善するかどうかを解析した。神経症状をロタロッドテストにより毎週解析した結果、13 週齢において改善が見られたが、14 週齢以降はステロイド投与群、生理食塩水投与コントロール群ともにロッド上の歩行が不能となった。SD マウスの末期である 15 週齢の段階で脳を組織学的に解析した結果、腫大化したマクロファージの減少傾向が見られた。SD において腫大化したマクロファージは炎症性サイトカインを産生すると考えられていることから、炎症性サイトカインの発現が抑制されているかどうかを検討したが、SD の炎症反応マーカーである TNF- α 、CXCL-13、MIP-1 α の発現に有意差はなかった。今回のステロイド投与実験における症状の改善度は、FcDKO マウスの改善度よりも低かった。今後、投与量、回数などのさらなる至適化が必要だと考えられた。

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 1 件)

Suzuki K, Iseki E, Togo T, Yamaguchi A, Katsuse O, Katsuyama K, Kanzaki S, Shiozaki K, Kawanishi C, Yamashita S, Tanaka Y, Yamanaka S, Hirayasu Y. Neuronal and glial accumulation of alpha- and beta-synucleins in human lipidoses. *Acta Neuropathol.* **114**(5):481-489, 2007

[学会発表](計 4 件)

幸光 範子、神崎 誠一、山口 章、鈴木 京子、青木 一郎、大和 修、山中 正二. 猫GM2 ガングリオシドーシスの中枢神経系の病理学的解析, 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 (横浜), 2007.12.

鈴木 京子、山口 章、都甲 崇、神崎 誠一、山中 正二、平安 良雄. GM2 ガングリオシド蓄積症(Sandhoff病)モデルマウスにおける α -シヌクレインの病態関与の研究, 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 (横浜), 2007.12.

幸光 範子, 神崎 誠一, 山口 章, 山中 正二, 青木一郎: サンドホフ病モデルマウスを用いた網羅的サイトカインの解析. 第 97 回日本病理学会総会(金沢), 2008.5.

鈴木 京子、都甲 崇、山口 章、神崎 誠一、幸光 範子、勝頼 大海、内門 大丈、青木 一郎、山中 正二、平安 良雄: Sandhoff病モデルマウス脳におけるオートファージの検討. 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(神戸), 2008.12.

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 章(YAMAGUCHI AKIRA)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号:20381585

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし