

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13201
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K08271
研究課題名(和文) 副腎白質ジストロフィーはコレステロール代謝障害による自然免疫応答の異常が原因か？

研究課題名(英文) Impairment of cholesterol homeostasis cause a dysregulation of innate immune response, which might contribute to the pathogenesis of X-linked adrenoleukodystrophy

研究代表者
守田 雅志 (MORITA, MASASHI)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・准教授

研究者番号：20191033
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：副腎白質ジストロフィーはペルオキシソーム膜ABCD1の機能欠損を原因とする炎症性の脱髄疾患である。骨髄移植キメラマウスの実験から、本疾患の脳での炎症反応はコレステロール代謝異常が関与している可能性が推測された。本研究では、ABCD1欠損HeLa細胞、Abcd1欠損マウス由来ミクログリア、アストロサイト及びCD4陽性T細胞を用いた解析から、ABCD1欠損による細胞内コレステロール代謝障害が免疫応答の異常にも関与している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本疾患は男児2万人に一人の割合で起こるX連鎖劣性遺伝子疾患で、ABCD1遺伝子の変異により起こる難治性の炎症性脱髄疾患である。本疾患では発症機序が未解明のため、治療薬の開発が進んでいないのが現状である。本研究では、ABCD1タンパク質の機能を解析し、コレステロール代謝障害という新たな視点から発症機序の解明を行った。この結果は、コレステロール代謝を標的とした本疾患の発症抑制薬開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：X-linked adrenoleukodystrophy is a rare genetic disorder caused by a mutation of ABCD1 gene which encode ABCD1 protein, a peroxisomal membrane protein. Dysfunction of ABCD1 cause abnormal accumulation of very long chain fatty acids in body fluids, especially in brain, which results in the inflammatory demyelination. However, VLCFA level is not related to the disease severity. The present studies show that impairment of cholesterol metabolisms was detected in ABCD1-deficient cells, which were associated with the enhancement of pro-inflammatory responses. These results suggest that disruption of cholesterol homeostasis due to the dysfunction of ABCD1 may contribute to pathogenesis of X-linked adrenoleukodystrophy.

研究分野：生化学

キーワード：副腎白質ジストロフィー ABCタンパク質 ペルオキシソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

副腎白質ジストロフィー(ALD)は、男児約2万人に一人の割合で起こる遺伝病で、ペルオキシソーム膜 ABCD1 タンパク質の機能欠損を原因とする神経変性(炎症性脱髄)疾患である。ABCD1 タンパク質は極長鎖脂肪酸 CoA をペルオキシソーム内へ輸送するトランスポーターで、その機能欠損によりペルオキシソームでの極長鎖脂肪酸 酸化活性が減少し、各組織に極長鎖脂肪酸含有脂質分子の異常蓄積が認められる。中枢神経系における極長鎖脂肪酸含有脂質分子の蓄積はミトコンドリアの機能障害や小胞体ストレスを誘導し、最終的に炎症を伴う脱髄反応を引き起こすと考えられているが、蓄積量と発症時期や重症度には相関性がなく、発症機構は依然不明である。本疾患は有効な治療法がない指定難病で、治療薬(発症抑制薬)の開発は喫緊の重要課題である。

2. 研究の目的

本研究計画では、副腎白質ジストロフィーの発症機構を解明し、将来的な発症抑制薬の開発に繋げることを最終的な目標とした。これまでの *Abcd1* 欠損マウスを用いた骨髄移植実験の解析から、本疾患の脳での炎症反応は極長鎖脂肪酸の蓄積だけではなく、コレステロール代謝異常も関与している可能性が示唆された。本研究では、脳グリア細胞やリンパ球のコレステロール代謝と免疫応答に着目し、発病の直接の原因は ABCD1 タンパク質機能欠損による極長鎖脂肪酸の蓄積ではなく、細胞内コレステロール代謝障害を介した免疫応答の異常であることを実証することを目的とした。

3. 研究の方法

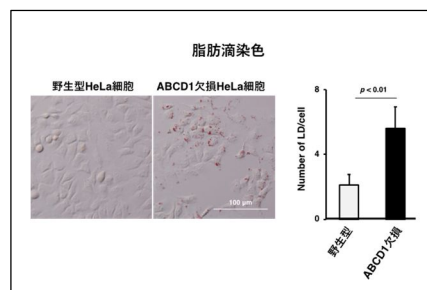
ALD モデル (*Abcd1* 欠損) マウス脳からアストロサイトやミクログリアを分離・培養した。アストロサイトはミクログリアの混入を排除するため不死化アストロサイトを調製し使用した。また脾臓から CD4 陽性 T 細胞を調製した。初代培養ミクログリアにインフラマソーム活性化試薬を処理し、IL-1 産生量及び活性化型 caspase-1 の発現量を ELISA 法やイムノブロット法により定量した。また *Abcd1* 欠損アストロサイトにリポ多糖(LPS)を処理し、培養液中のサイトカイン量を ELISA 法により測定した。一方、*Abcd1* 欠損マウス脾臓から調製したナイーブ CD4 陽性 T 細胞を各エフェクター細胞に分化誘導した後、培地中に分泌されるサイトカイン量を測定した。遺伝子の発現は real-time PCR 法により行なった。

ALD モデル細胞として、HeLa 細胞の ABCD1 遺伝子を Crisper-Cas9 システムで欠損させた ABCD1 欠損 HeLa 細胞を作製した。野生型及び ABCD1 欠損 HeLa 細胞において極長鎖脂肪酸含量、トリアシルグリセロール含量、コレステロールエステル含量をガスクロマトグラフィー及び酵素法により測定した。脂肪滴の形成は細胞をオイルレッド O もしくは LipiDye II を用いて染色し、ImageJ により解析を行なった。

4. 研究成果

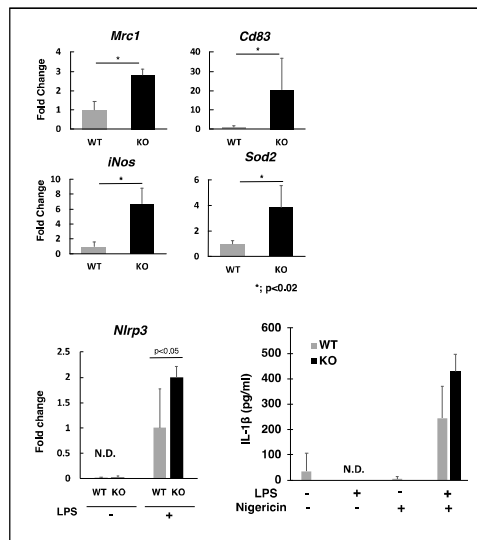
本研究では本疾患の原因タンパク質 ABCD1 の機能欠損によるコレステロール代謝障害と免疫応答の異常との関連性について調べるため、ABCD1 欠損 HeLa 細胞、*Abcd1* 欠損マウス由来ミクログリア、アストロサイト、CD4 陽性 T 細胞を調製して解析を行なった。いずれの細胞においても、ABCD1 機能欠損の生化学的特徴である極長鎖脂肪酸含量が野生型に比べ増加していることを確認した。

- 1) ABCD1 欠損 HeLa 細胞では野生型と比べ、脂肪滴の蓄積(右図)とコレステロールエステル量の増加が認められた。ABCD1 欠損 HeLa 細胞ではコレステロールエステル生合成酵素 SOAT1 の発現が増加しており、SOAT1 の特異的阻害剤である K604 処理により脂肪滴とコレステロールエステル量が共に有意に減少した。従って、ABCD1 欠損細胞では、コレステロールエステルの生合成が亢進し、増加したコレステロールエステルが脂肪滴として蓄積していると推察された。この結果から、ABCD1 機能欠損が細胞内コレステロール代謝障害を引き起こしていることを明らかにした。

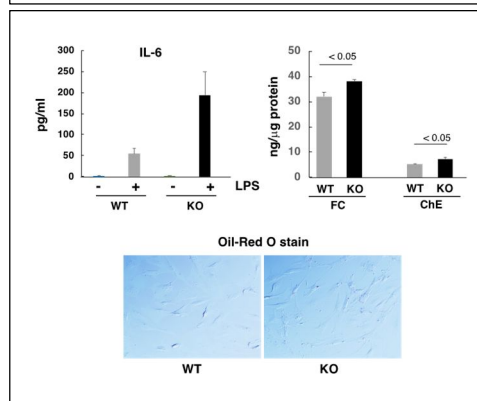


- 2) *Abcd1* 欠損ミクログリア(KO)は野生型(WT)と比べ、*Mrc1* や *Cd83* のようなミクログリアの活性化を示す遺伝子発現が高いことが認められた。一方、*iNos* や *Sod2* といった酸化ストレスに関連する遺伝子も *Abcd1* 欠損ミクログリアで高い値を示した(右図)。このことから *Abcd1* 欠損ミクログリアは活性化された状態であり、活性酸素の産生などが起こっている可能性が示唆された。一方、リポ多糖(LPS)処理により、*NLRP3* インフラマソーム遺伝子の発現は *Abcd1*

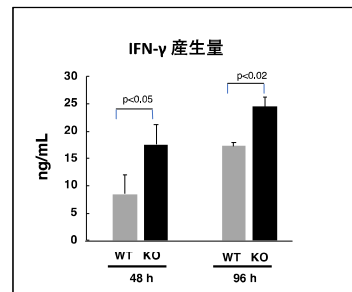
欠損ミクログリアで増加が認められた(右図)。ミクログリアが産生する IL-1 は、アストロサイトの血液脳関門の保護作用を低下させることが報告されており、本疾患の発症に關与する炎症性サイトカインと考えられる。NLRP3 インフラマソームはこの IL-1 の産生を制御していることから NLRP3 の活性化について調べた。リポ多糖(LPS)とニゲリシン処理を行い、NLRP3 インフラマソームを活性化した後、培地中に分泌される IL-1 量を測定した。その結果、野生型(WT)に比べ Abcd1 欠損ミクログリア(KO)で高い傾向が認められた(右図)。従って Abcd1 欠損ミクログリアは野生型に比べ NLRP3 インフラマソームが活性化されやすい状態であると推察された。また、Abcd1 欠損ミクログリアでは野生型に比べ、IL-4 刺激による M2 型への分極化の割合が減少していることを明らかにした。



一方、不死化 Abcd1 欠損アストロサイトにリポ多糖(LPS)を処理した後、培地中に分泌されるサイトカイン量を測定した。その結果、IL-1 の産生は認められなかったが、野生型(WT)に比べ Abcd1 欠損(KO)アストロサイトで炎症性サイトカイン(IL-6)を多く産生することを明らかにした(右図)。また Abcd1 欠損アストロサイトでは、野生型に比べ遊離コレステロール(FC)、コレステロールエステル(ChE)量、及び脂肪滴(Oil-Red O 染色)の増加が認められた。以上のことから、これらのグリア細胞では極長鎖脂肪酸含量の増加だけでなく、コレステロール代謝異常も本疾患の発症に關与している可能性が示唆された。



- 3) Abcd1 欠損マウス脾臓から分離した CD4 陽性 T 細胞を CD3 及び CD28 抗体により活性化し、48 及び 96 時間後に細胞外に分泌される IFN- γ 量を測定した。その結果、Abcd1 欠損 CD4 陽性 T 細胞(KO)で野生型(WT)に比べ IFN- γ の産生量が高かった(右図)。さらにナイーブ CD4 陽性 T 細胞を IL-12 存在下で Th1 細胞に分化誘導したところ、野生型に比べ炎症性サイトカイン(IFN- γ)の産生量が高く、抗炎症性サイトカイン(IL-10)は反対に低い値を示した。さらに Abcd1 欠損 Th1 細胞では転写因子 LXR が活性化されていることが確認された。一方、IFN γ 遺伝子に抑制的に働き、IL10 遺伝子に促進的に働く転写因子 Blimp-1 をコードする Prdm1 遺伝子の発現減少が認められた。また LXR の内因性リガンドである 25-ヒドロキシコレステロールの生合成酵素をコードする Ch25h 遺伝子の発現増加が認められた。以上のことから Abcd1 欠損 Th1 エフェクター細胞では、Ch25h の発現増加により産生されたオキシステロールが LXR を活性化していると考えられた。この活性化された LXR が転写因子 Blimp-1 に抑制的に働くことにより、Th1 型応答を亢進させていると推察された。一方、活性化した Abcd1 欠損 CD4 陽性 T 細胞で認められる IFN- γ の増加と IL-10 の低下は、コレステロール生合成阻害剤ロバスタチン処理で回復した。このことから、Abcd1 欠損 CD4 陽性 T 細胞ではコレステロール代謝障害が Th1 応答の亢進に關与している可能性が示唆された。



以上の結果より、本疾患の発症に關与することが予想されるミクログリア、アストロサイト、CD4 陽性 T 細胞において、ABCD1 機能欠損によるコレステロール代謝障害が、免疫応答の異常を引き起こし、発症や進行に關与している可能性が示唆された。ABCD1 機能欠損によるコレステロール代謝障害、及び各細胞のコレステロール代謝障害による免疫応答異常の機序については今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morita Masashi, Toida Ai, Horiuchi Yuki, Watanabe Shiro, Sasahara Masakiyo, Kawaguchi Kosuke, So Takanori, Imanaka Tsuneo	4. 巻 7
2. 論文標題 Generation of an immortalized astrocytic cell line from Abcd1-deficient H-2KbtsA58 mice to facilitate the study of the role of astrocytes in X-linked adrenoleukodystrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e06228-e06228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2021.e06228	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morita M, Kaizawa T, Yoda T, Oyama T, Asakura R, Matsumoto S, Nagai Y, Watanabe Y, Watanabe S, Kobayashi H, Kawaguchi K, Yamamoto S, Shimozawa N, So T, Imanaka T.	4. 巻 44
2. 論文標題 Bone marrow transplantation into Abcd1-deficient mice: Distribution of donor derived-cells and biological characterization of the brain of the recipient mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Inherit Metab Dis	6. 最初と最後の頁 718-727
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jimd.12346.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi K, Mukai E, Watanabe S, Yamashita A, Morita M, So T, Imanaka T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Acyl-CoA thioesterase activity of peroxisomal ABC protein ABCD1 is required for the transport of very long-chain acyl-CoA into peroxisomes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 2192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81949-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 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.	4. 巻 44
2. 論文標題 Stability of the ABCD1 Protein with a Missense Mutation: A Novel Approach to Finding Therapeutic Compounds for X-Linked Adrenoleukodystrophy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JIMD Rep.	6. 最初と最後の頁 23-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/8904_2018_118.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 守田雅志、浅倉礼奈、土手陽世、渡辺志朗、川口甲介、宗 孝紀
2. 発表標題 ペルオキシソーム膜ABCD1タンパク質の脂肪滴形成への関与
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 守田雅志、大石真結、前田澗那、河原永悟、宗孝紀
2. 発表標題 副腎白質ジストロフィーにおけるAbcd1欠損CD4陽性T細胞の役割
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Reina Maeda, Masashi Morita, Takanori So
2. 発表標題 Abcd1-deficient CD4+ T cells display enhanced Th1-type responses
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 守田雅志、浅倉礼奈、土手陽世、山田祥大朗、川口甲介、宗 孝紀
2. 発表標題 ペルオキシソーム膜ABCD1欠損HeLa細胞におけるコレステロールエステルの増加
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅倉礼奈、土手陽世、山田祥大朗、守田雅志、渡辺志朗、川口甲介、宗 孝紀
2. 発表標題 ペルオキシソーム膜ABCD1機能欠損による細胞内コレステロール代謝異常
3. 学会等名 第39回生化学会北陸支部
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 守田雅志
2. 発表標題 ABCトランスポーターD1の機能異常とALDの分子病態
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（シンポジウム）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮澤美優，富田勇，山田祥太郎，守田雅志，宗孝紀
2. 発表標題 ペルオキシソーム欠損による細胞内コレステロール代謝異常
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 依田大輝，螺澤太郎，大石真結，守田雅志，宗孝紀
2. 発表標題 副腎白質ジストロフィーの発病メカニズム解明：abcd1欠損ミクログリアにおける自然免疫応答の亢進
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 依田大輝, 螺澤太郎, 守田雅志, 宗孝紀
2. 発表標題 副腎白質ジストロフィーの発症機構: Abcd1 欠損ミクログリアの免疫応答の異常
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石真結, 河原永悟, 守田雅志, 宗孝紀
2. 発表標題 副腎白質ジストロフィー (ALD): 発症におけるCD4陽性T細胞の関与
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oishi M, Kawahara E, Morita M, So T
2. 発表標題 T helper cell differentiation in the absence of abcd1: Identification of a possible connection between CD4+ T cell and adrenoleukodystrophy
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Morita M	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature Singapore Pte Ltd.	5. 総ページ数 279
3. 書名 Peroxisomes: Biogenesis, Function, and Role in Human Disease: Therapeutic Strategies for X-Linked Adrenoleukodystrophy, a Representative Peroxisomal Disorder	

1. 著者名 Morita M, Imanaka T	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature Singapore Pte Ltd.	5. 総ページ数 279
3. 書名 Peroxisomes: Biogenesis, Function, and Role in Human Disease:The Function of the Peroxisome	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	宗 孝紀 (So Takanori) (60294964)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授 (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------