

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590060

研究課題名（和文）

ペルオキシソーム機能障害と小胞体ストレス -新しい脱ミエリン化の分子機構-

研究課題名（英文）Peroxisomal dysfunction and ER stress -A novel mechanism for the demyelination in central nervous system-

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

研究成果の概要（和文）：

本研究計画では、ペルオキシソーム機能欠損による脱ミエリン化の分子機構を、小胞体ストレスや自然免疫応答に焦点をあて解析した。ペルオキシソーム膜 ABCD1 タンパク質欠損マウス由来の初代培養アストロサイトについて遺伝子発現解析を行った結果、ペルオキシソーム機能欠損により、自然免疫応答に異常が起こっていることが明らかとなった。この自然免疫応答の異常は、炎症を伴う脱ミエリン化など神経変性の原因になっている可能性が推察された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this project was to evaluate the relationship peroxisomal dysfunction and demyelination. In this study, we focused on the ER stress and innate immunity in *ABCD1*-deficient primary astrocytes. Dysfunction of ABCD1, a peroxisomal membrane protein, caused a neurodegenerative disease called adrenoleukodystrophy. We found that treatment of ligands for pattern recognition receptors induced the expression of cytokines and antiviral proteins in *ABCD1*-deficient astrocytes. These results suggest that dysfunction of ABCD1 lead to the disturbance of innate immune response, which result in the demyelination in adrenoleukodystrophy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ペルオキシソーム、ABCD1、小胞体ストレス、自然免疫応答、副腎白質ジストロフィー

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで副腎白質ジストロフィー（ペルオキシソーム膜 ABCD1 の機能欠損）の神経変性疾患と極長鎖脂肪酸代謝

異常との関連性について明らかにしてきた。この疾患は組織における極長鎖脂肪酸の蓄積と大脳における脱ミエリン化を特徴とするが、極長鎖脂肪酸の蓄積量と発病時期・重

症度に相関性はなく、脱ミエリン化の発症メカニズムは未知のままである。

中枢神経系グリア細胞のペルオキシソームはミエリン化された軸索の形成・維持に必須であることが報告され(Kassmann et al. *Nat. Genet.* 2007, Hulshagen et al. *J. Neurosci.* 2008)、グリア細胞におけるペルオキシソーム代謝の重要性が認識されている。肝臓ではペルオキシソーム機能欠損が小胞体ストレスやミトコンドリア障害、さらに炎症反応を引き起こすことが報告されている(Schluter et al. *Hum. Mol. Genet.* 2011)。しかし、ミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトや、炎症反応に関与するアストロサイトのペルオキシソーム機能欠損がどのように神経変性と関連しているか明らかにされていない。本研究課題では中枢神経系グリア細胞のペルオキシソーム機能欠損(ABCD1 欠損)と、小胞体ストレス(ER stress)やミトコンドリア障害、自然免疫応答との関連性について検討を行った。

2. 研究の目的

本研究課題では、ペルオキシソーム機能欠損による脱ミエリン化の分子機構を、小胞体ストレスや自然免疫反応に焦点をあて明らかにすることを目的とする。研究の遂行により脱髄疾患の分子メカニズムの新たな解明に繋がる。さらに小胞体ストレスや自然免疫反応を標的としたペルオキシソーム病(特に副腎白質ジストロフィー)に対する治療薬・発病予防薬の可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1)アストロサイトの初代培養

生後 1~2 日の野生型及び ABCD1 ノックアウトマウス的大脑から混合グリア細胞を調製した。ミクログリアはアストロサイトに比べ、プラスチックシャーレへの接着性が高いことを利用し、混合グリア細胞からミクログリアを除いた。さらに Ara-C (シトシンアラビノース)、及び LME (ロイシンメチルエステル)処理することで、混在するミクログリアの除去を行った。

(2)極長鎖脂肪酸の生化学的解析

極長鎖脂肪酸の β 酸化活性は、 ^{14}C で放射性ラベルしたリグノセリン酸を基質として用い、水溶性画分に回収された放射活性を測定することにより行った。また、極長鎖脂肪酸含量は、抽出した脂肪酸をメチルエステル後、ガスクロマトグラフィーで分析した。

(3)遺伝子発現解析

ABCD1 欠損マウス由来のアストロサイトの遺伝子発現解析は Agilent 社製の Whole Mouse Genome Oligo Microarray (4x44K)を用いて行った。また、それぞれの遺伝子については特異的なプライマーを用いて real-

time PCR 法により解析した。

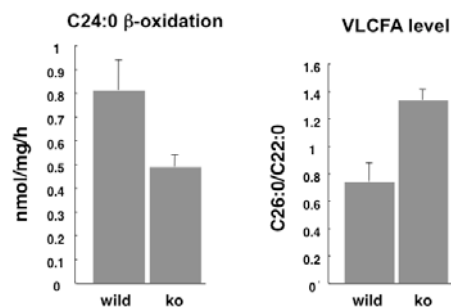
4. 研究成果

(1)アストロサイトの純培養系の確立

アストロサイト初代培養系ではミクログリアの混入が結果に大きく影響する。そこで、分離したアストロサイトに Ara-C、及び LME 処理を行った。その結果、Iba-1 抗体を用いた蛍光抗体法、及びイムノブロッティングにより、ミクログリアの除去を確認した。

(2)極長鎖脂肪酸代謝

ABCD1 欠損アストロサイト(ko)は野生型(wild)に比べて飽和極長鎖脂肪酸 C26:0 の含量が 2 倍程度増加していた。また極長鎖脂肪酸(C24:0)の β 酸化活性が有意(約 50%)に減少していた。従って、アストロサイトでは ABCD1 欠損によりペルオキシソームの極長鎖脂肪酸 β 酸化活性が減少し、極長鎖脂肪酸含量が増加していることが認められた。



(3)DNAマイクロアレイによる発現解析

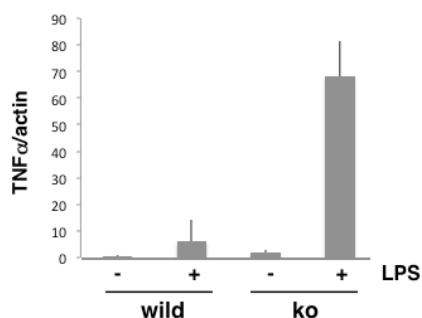
DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った結果、ケモカインレセプターの一つである Darc 遺伝子や細胞接着分子である Cadm3 遺伝子の発現が、ABCD1 欠損アストロサイトで有意に高いことが認められた。一方、成長に関わる Egr2 転写因子の遺伝子発現低下が認められた。しかし、炎症反応、酸化ストレス反応、及び小胞体ストレス反応に関連する多くの遺伝子発現に有意な差は認められなかった。従って、アストロサイトでは ABCD1 欠損により極長鎖脂肪酸代謝異常は認められるものの、小胞体ストレスや炎症反応に違いは認められず、外因性の刺激による感受性や脆弱性に違いがある可能性が示唆された。

(4)各種リガンド処理による遺伝子発現

初代培養アストロサイトについて様々な自然免疫のリガンドに対する炎症性サイトカインや抗ウイルスタンパク質関連遺伝子の発現の違いを解析した。

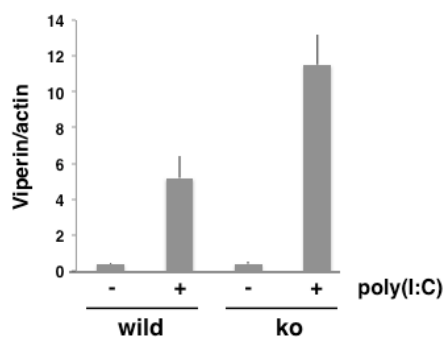
野生型及び ABCD1 欠損アストロサイトに TLR4 のリガンドであるリポ多糖(LPS)を 12 時間処理し、サイトカインやケモカイン、及び小胞体ストレス応答遺伝子の発現を比較

検討した。その結果、炎症性サイトカイン (TNF α , IL-6 など)、ケモカイン (CXCL10, CCL2 など) では、野生型に比べ ABCD1 欠損アストロサイトで発現の増加が認められた。このこ



とから、LPS 刺激に対する炎症反応の応答は ABCD1 機能欠損で増加することが認められた。

次に、TLR3 及び RIG1、MDA5 のリガンドである poly(I:C) の影響を検討した。その結果、poly(I:C) 処理では CXCL10 や viperin などの抗ウイルスタンパク質遺伝子と TLR3 遺伝子の顕著な発現増加がみられたが、ABCD1 欠損と野生型アストロサイトでは、これらの遺伝子発現に大きな差は見られなかった。一方、細胞内に poly(I:C) を導入した実験では、viperin の遺伝子発現が、ABCD1 欠損アストロサイトで有意に高いことが確認された。この処理条件では、MDA5 遺伝子の発現増加が認められたことから、これらの抗ウイルスタンパク質の遺伝子発現の違いは、MDA5 を介した免



疫応答によって引き起こされていることが推察された。この結果から、ABCD1 の機能はウイルス感染に対する免疫応答にも関わっている可能性が示唆された。

(5) 結論と展望

以上のことから、ABCD1 欠損アストロサイトでは、通常の培養条件下では ER ストレス応答や炎症反応に大きな違いは認められないが、様々なパターン認識受容体を介した自然免疫応答に違いがあることが明らかとなった。本研究の成果は、ABCD1 の機能欠損が自然免疫応答を介して神経変性に関与して

いる可能性を検討していく上で、重要と考えられる。

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 5 件)

- 1) Morita M., Kobayashi J., Yamazaki K., Kawaguchi K., Honda A., Sugai K., Shimozawa N., Koide R., and Imanaka T.: A novel double mutation in the *ABCD1* gene in a patient with X-linked adrenoleukodystrophy: Analysis of the stability and function of the mutant ABCD1 protein. *J. Inherit. Metab. Dis. Reports* in press. 査読有り
10.1007/8904_2012_209
- 2) Morita M., Shinbo S., Asahi A., and Imanaka T.: Very long chain fatty acid β -oxidation in astrocytes: Contribution of the ABCD1-dependent and -independent pathways. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 1972-1979, 2012. 査読有り
10.1248/bpb.b12-00411
- 3) Morita M., and Imanaka T.: Peroxisomal ABC transporters: Structure, function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1387-1396, 2012. 査読有り
10.1016/j.bbadis.2012.02.009
- 4) Kouno T., Watanabe N., Sakai N., Nakamura T., Nabeshima Y., Morita M., Mizuguchi M., Aizawa T., Demura M., Imanaka T., Tanaka I, and Kawano K.: The structure of *Physarum polycephalum* hemagglutinin I suggests a minimal carbohydrate recognition domain of legume lectin fold. *J. Mol. Biol.* 405, 4083-4093, 2011. 査読有り
10.1016/j.jmb.2010.11.024
- 5) Morita M., Shimozawa, N., Kashiwayama Y., Suzuki Y., and Imanaka T.: ABC subfamily D proteins and very long chain fatty acid metabolism as novel targets in adrenoleukodystrophy. *Curr. Drug Targets* 12, 694-706, 2011. 査読有り
10.2174/138945011795378577

[学会発表] (計 29 件)

- 1) Kostsin, D. G., Lee, A., Yamazaki, K., Kawaguchi, K., Morita, M., and Imanaka, T.: Establishment of screening system to discover candidates of chemical Chaperone that stabilize mutant ABCD1 responsible for adrenoleukodystrophy. The 4th EMBO Meeting, 2012, 9, 22-25, Nice, France.

- 2) 守田雅志, 山崎こず枝, 小出玲爾, 下澤伸行, 今中常雄: 副腎白質ジストロフィー患者で見出された二カ所にミスセンス変異をもつ新規変異ABCD1 タンパク質の発現解析. 日本薬学会第 132 年会, 2012, 3, 28-31, 札幌.
- 3) 池島俊季, 赤池宗輔, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄: メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いたペルオキシソーム膜ABCタンパク質ABCD1の機能解析. 日本生化学会北陸支部第 30 回大会, 2011, 5, 26, 金沢.
- 4) 山崎こず枝, 守田雅志, 小出玲爾, 下澤伸行, 今中常雄: 副腎白質ジストロフィー患者の新規ABCD1 遺伝子変異 -二カ所にミスセンス変異をもつABCD1 タンパク質の発現解析-. 第 13 回Pharmaco-Hematologyシンポジウム, 2012, 6, 15-16, 東京.
- 5) 池島俊季, 川口甲介, 赤池宗輔, 守田雅志, 今中常雄: メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いたABCタンパク質サブファミリーDの発現系の構築. 第 11 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム, 2011, 9, 15-16, 福岡.
- 6) 池島俊季, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄: ペルオキシソーム膜ABCタンパク質ABCD1Dの構造と機能. 第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2012, 11, 15-16, 京都.
- 7) Morita M., Kostsin D.G., Yamazaki K., Arimura K., Shimozawa N., and Imanaka T.: A screening system to discover chemical compounds that stabilize missense mutant ABCD1 protein. 第 54 回日本先天代謝異常学会総会・第 11 回アジア先天代謝異常症シンポジウム, 2012, 11, 15-18, 岐阜.
- 8) 李朝香, 朝日彰子, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄: ABCタンパク質サブファミリーDの細胞内局在性-ヒトと線虫での共通性-. 日本薬学会北陸支部第 124 回例会, 2012, 11, 18, 富山.
- 9) Morita M., Yamazaki K., Kawaguchi K., Shimozawa N., Koide R., and Imanaka T.: A novel double mutation in *ABCD1* gene in a patient with X-linked adrenoleukodystrophy: Analysis of the stability and function of the mutant ABCD1 protein. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012, 12, 11-14, 福岡.
- 10) Morita M., Kostsin, D. G., Yamazaki K., Shimozawa N., and Imanaka T.: A screening system to discover chemical compounds that stabilize ABCD1 protein with missense mutation. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012, 12, 11-14, 福岡.
- 11) 池島俊季, 川口甲介, 赤池宗輔, 守田雅志, 今中常雄: メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* ペルオキシソーム膜ABCタンパク質ABCD1の発現系構築. 第 85 回日本生化学会大会, 2012, 12, 14-16, 福岡.
- 12) 渡邊雄一, 奥山尚輝, 楠本梨賀, 川口甲介, 守田雅志, 柏山恭範, 今中常雄: グリコソーム形成因子をターゲットとした原虫感染症治療薬開発のためのスクリーニング系の構築. 第 85 回日本生化学会大会, 2012, 12, 14-16, 福岡.
- 13) 西澤千穂, 永井徹, 池田和貴, 守田雅志, 唐沢健, 原田史子, 佐藤典子, 中西広樹, 田口良, 下澤伸行, 今中常雄, 井上圭三, 横山和明: ペルオキシソーム病の繊維芽細胞で検出される極長鎖脂肪酸含有脂質の分子構造決定. 日本薬学会第 131 年会, 2011, 3, 28-31, 静岡.
- 14) 守田雅志, 新保沙織, 今中常雄: ABCD1 欠損マウス脳由来初代培養アストロサイトの極長鎖脂肪酸代謝と遺伝子発現解析. 日本薬学会第 131 年会, 2011, 3, 28-31, 静岡.
- 15) 李朝香, 朝日彰子, 柏山恭範, 守田雅志, 今中常雄: ABC タンパク質サブファミリーD の細胞内局在化機構 -ヒト, 線虫及び粘菌での共通性-. 日本薬学会第 131 年会, 2011, 3, 28-31, 静岡.
- 16) 李朝香, 朝日彰子, 赤池宗輔, 柏山恭範, 守田雅志, 安川洋生, 今中常雄: ABC タンパク質サブファミリーD の細胞内局在化におけるN末端疎水性アミノ酸配列の役割. 日本生化学会北陸支部第 29 回大会, 2011, 5, 28, 金沢.
- 17) 守田雅志: 極長鎖脂肪酸代謝異常と副腎白質ジストロフィー. 第 12 回Pharmaco-Hematologyシンポジウム, 2011, 6, 17-18, 富山.
- 18) 谷口範壮, 新保沙織, 守田雅志, 今中常雄: ABCD1 欠損マウス脳由来初代培養アストロサイトの極長鎖脂肪酸代謝と遺伝子発現解析. 第 12 回Pharmaco-Hematologyシンポジウム, 2011, 6, 17-18, 富山.
- 19) 守田雅志, 新保沙織, 今中常雄: ペルオキシソーム膜ABCタンパク質ABCD1 欠損アストロサイトの遺伝子発現解析. 第 84 回日本生化学会大会, 2011, 9, 21-24, 京都.
- 20) 李朝香, 朝日彰子, 赤池宗輔, 柏山恭範, 守田雅志, 安川洋生, 今中常雄: ABCタンパク質サブファミリーDの細胞内局在化機構-ヒト, 線虫及び粘菌での共通性-. 第 84 回日本生化学会大会, 2011, 9, 21-24, 京都.
- 21) 上杉泰介, 赤池宗輔, 柏山恭範, 守田雅志, 加藤博章, 今中常雄: 小胞体膜上に局在するABCD4 (P70R) の存在様式と機能. 第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2011, 11, 24-25, 岡山.

- 22) 守田雅志, 新保沙織, 浜田知世, 今中常雄: 副腎白質ジストロフィーモデルマウス由来初代培養アストロサイトの極長鎖脂肪酸代謝と遺伝子発現解. 第53回日本先天代謝異常学会総会・第10回アジア先天代謝異常症シンポジウム, 2011, 11, 24-26, 千葉.
- 23) Morita M., Shinbo S., Asahi A., and Imanaka T.: Very long chain fatty acid β -oxidation in astrocytic cells; contribution of ABCD1-dependent and -independent pathways. 第34回日本分子生物学会年会, 2011, 12, 14-16, 横浜.
- 24) 横山和明, 西澤千穂, 池田和貴, 永井徹, 守田雅志, 原田史子, 佐藤典子, 唐沢健, 今中常雄, 下澤伸行, 田口良: ペルオキシソーム病の繊維芽細胞に蓄積する極長鎖脂肪酸含有脂質. 第52回日本脂質生化学会, 2010, 6, 14-15, 渋川.
- 25) 渡辺志朗, 守田雅志, 今中常雄: 野生型およびABCD1欠損マウス脳における極長鎖脂肪酸延長反応と関連タンパク質ELOVL1の発現. 日本薬学会北陸支部第122回例会, 2010, 11, 21, 金沢.
- 26) 新保沙織, 志村裕介, 守田雅志, 今中常雄: マウス脳由来初代培養アストロサイトのペルオキシソーム膜タンパク質ABCD1欠損による代謝変動の解析. 日本薬学会北陸支部第122回例会, 2010, 11, 21, 金沢.
- 27) 新保沙織, 志村祐介, 守田雅志, 渡辺志朗, 今中常雄: ABCD1欠損マウス由来アストロサイトを用いたALD分子病態の検討. 第83回日本生化学会大会・第33回日本分子生物学会年会合同大会, 2010, 12, 7-10, 神戸.
- 28) 李朝香, 朝日彰子, 赤池宗輔, 柏山恭範, 守田雅志, 安川洋生, 今中常雄: ABCタンパク質サブファミリーDの細胞内局在化とN末端アミノ酸配列. 第83回日本生化学会大会・第33回日本分子生物学会年会合同大会, 2010, 12, 7-10, 神戸.
- 29) 西澤千穂, 永井徹, 池田和貴, 守田雅志, 唐沢健, 原田史子, 佐藤典子, 中西広樹, 田口良, 下澤伸行, 今中常雄, 井上圭三, 横山和明: ペルオキシソーム病の繊維芽細胞にみられる極長鎖脂肪酸含有脂質の分子構造決定. 第83回日本生化学会大会・第33回日本分子生物学会年会合同大会, 2010, 12, 7-10, 神戸.

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 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・准教授

研究者番号: 20191033

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし