

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6月10日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790318

研究課題名（和文） リソソーム病における造血系細胞の脳内浸潤機構の解明と治療への応用

研究課題名（英文） Analysis of brain infiltrating monocyteic cell 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、 β -ヘキソサミニダーゼの欠損により、生体内基質が過剰蓄積して発症するリソソーム病である。本研究では、疾患モデルマウスにおいて、脳内へ浸潤する細胞の同定及びシグナル伝達異常に関して研究を行った。その結果、モデルマウス由来単球系細胞は、生体内基質の蓄積により PI3K が活性化され、脳から分泌されるケモカイン MIP-1 α により浸潤を起こすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

GM2 gangliosidosis is a lysosomal beta-hexosaminidase (Hex) deficiency involving excessive accumulation of undegraded substrates, including GM2 ganglioside (GM2), and progressive neurodegeneration. In this study, we isolated monocyte cell line from the bone marrow of Sandhoff disease model mice, and demonstrated the abnormalities of signal transduction in monocyte cell lines. We found remarkable differences in the cell migration for MIP-1 α of SD monocyte (MSD) when compared to cells isolated from wild type (WT) mice, with activation of MSD. In addition, we observed increased Cofilin phosphorylation in MSD cells. Moreover, PI3K activity was increased about 5times in MSD compare with that of WT. These results suggest that the up-regulation of PI3K of MSD was dependent upon accumulation of natural substrates, including GM2. These findings may represent a mechanism in linking infiltrating cells into brain observed in GM2 gangliosidosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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、リソソーム病、ケモカイン、脳内浸潤

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまでリソソーム性糖鎖分解酵素の欠損症（リソソーム病）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。特に中枢神経症状を惹起する代表的なリソソーム病である Sandhoff 病モデルマウス（SD マウス）においてケモカインの発現変動を解析し、脳において Macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) が特異的に増大し、ミクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞が活性化していることを明らかにした。MIP-1 α をはじめとするケモカインは、走化性を有する一群のサイトカインであり、炎症や病原体感染時に産生され、炎症部位に白血球などの浸潤を惹起する機能を持つ。近年、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患において様々なケモカインがグリア細胞から分泌され、病態の進行に重要な役割を演じていることが報告されており、SD マウスの脳内においても、活性化マクロファージの脳内移行に深く関与していると考えられている。

また申請者は平成 19 年度から若手研究(B)で、SD マウス脳由来グリア細胞における MIP-1 α の異常発現機構の解明や増殖に関与するシグナル伝達機構の研究を行ってきた（課題名「グライコーム異常によるグリア細胞の活性化機構」、課題番号 19760236、平成 19-21 年度）。この研究課題において、SD マウス由来ミクログリアでの MIP-1 α の異常産生機構、アストロサイトの異常増殖に関与するシグナル伝達機構、そして脳内酵素補充による MIP-1 α の産生抑制を明らかにした。これらの研究成果は、SD マウス脳内において生体内基質蓄積により、グリア細胞が活性化することで病態の進行に深く関与していることを示している。

しかしながら、グリア細胞が活性化することでケモカインの産生が亢進し、その結果として脳内のミクログリア・活性化マクロファージが増大して神経炎症の憎悪因子として働くことが明らかになっているものの、なぜ単球・マクロファージが脳内に浸潤するのかについては依然として不明である。特に浸潤する細胞側の研究は殆ど研究が行われていないのが現状である。また SD マウスに対する骨髄移植により、寿命が大きく増大することが報告されており、これは脳での異常を骨髄由来の血球系細胞が感知し、脳内まで到達することが考えられる。骨髄移植は他の中枢神経症状を惹起するリソソーム病モデルでも治療効果を示すことが明らかとなっており、脳内での生体内基質蓄積による異常なシグナルと、それに応答して脳内浸潤を起こす細胞やそのメカニズムを明らかにすることは、リソソーム病の病態の理解と治療法確立

において重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では中枢神経症状を呈するリソソーム病である Sandhoff 病のモデルマウス(SD マウス)を対象とし、脳内に浸潤する細胞の特定とそのメカニズムを明らかにすることを目的として、下記の実験を行った。

(1) SD 及び正常マウス由来骨髄・末梢血細胞の性質決定及び脳内浸潤細胞の特定

(2) SD マウス由来骨髄における異常メカニズムの解明

3. 研究の方法

(1) SD 及び正常マウス由来骨髄・末梢血細胞の性質決定及び脳内浸潤細胞の特定

SD マウスの脳組織において免疫組織化学によりどの細胞集団が浸潤しているかを明らかにした。さらに SD マウス及び野生型(wild-type: WT) マウスから骨髄・末梢血細胞を採取し、細胞型マーカーにより細胞集団の割合解析や糖脂質などの生体内基質蓄積解析を行い、病態における造血系の細胞集団の脳内浸潤と蓄積基質との関係を明らかにした。

(2) SD マウス由来骨髄における異常メカニズムの解明

抗体やシグナル伝達阻害剤を利用して、SD マウス由来単球細胞株において細胞活性化に関わるシグナル系を明らかにした。

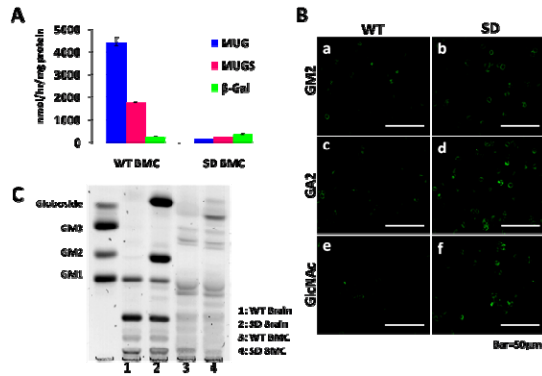
4. 研究成果

(1) SD 及び正常マウス由来骨髄・末梢血細胞の性質決定

生後 16 週齢の SD 及び WT マウスの大腿骨から、骨髄細胞 (Bone marrow cell ; BMC) を単離し、性質決定を行った。人工基質を用いた β -Hex の酵素活性を測定した結果、SD BMC では MUG、MUGS 共に顕著な活性の低下を示し、野生型 (WT BMC) に対する残存率はそれぞれ 3.42 % (MUG)、13.79 % (MUGS) であった。なお、対照酵素である β -Gal 分解活性は、WT BMC と比較して顕著な差はみられなかった (次項①A)。次に β -Hex の生体内基質である GM2、GA2 そして末端 GlcNAc 含有糖鎖を認識するモノクローナル抗体を用いて間接蛍光抗体法により蓄積基質の解析を行った。その結果、GM2 免疫反応性は、WT と SD 共に観察され、その強度に大差はなかった。一方、GA2 及び末端 GlcNAc 含有糖鎖に関しては SD において強い免疫反応性が観察された (次項①B)。さらに、蓄積している糖脂質を調べる目的で各細胞から糖脂質を抽出し、TLC により糖脂質の蓄積を解析した。その結果、GA2 及びグロボシドが SD BMC では蓄積し

ていることが明らかになった（下図①C）。

これらの結果から、SD BMC では WT と比較して顕著な酵素活性の低下及びそれに伴う生体内基質の蓄積が起こっており、特に GA2 やグロボシドなどの糖脂質及び末端 GlcNAc 含有糖鎖が蓄積していることが示された。

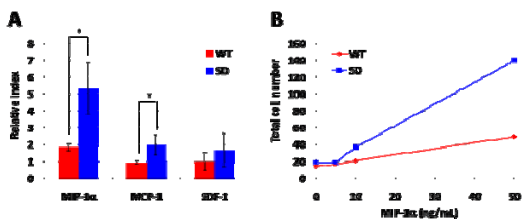


①WT 及び SD BMC の酵素活性測定及び蓄積基質解析

(2) WT 及び SD BMC のケモカインに対する応答性

次に、BMC におけるケモカインの応答性を検討するために、各ケモカインを用いた Migration assay を行った。その結果、WT BMC はどのケモカインにおいてもほとんど遊走されなかったのに対し、SD BMC では MIP-1 α において顕著な遊走活性を示し、強い応答性があることが明らかとなった（②A）。SD マウスの脳内では MIP-1 α の発現誘導が報告されており、末梢の骨髄由来細胞が脳内で分泌された MIP-1 α に応答して脳内に移行している可能性が示唆された。

さらに、WT 及び SD BMC における MIP-1 α 応答性の濃度依存性を検討した結果、各 BMC は共に濃度依存的に MIP-1 α 反応性が增大し、MIP-1 α 濃度が 50ng/mL において SD BMC は WT の約 2 倍の遊走活性があり、SD BMC は高い MIP-1 α 応答性を示し、濃度依存的に増大することが明らかとなった（②B）。



②ケモカインによる WT 及び SD BMC の誘走

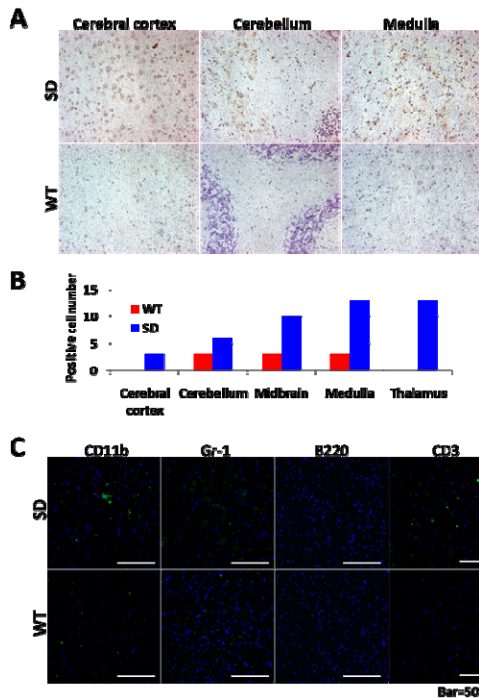
(3) SD マウスの脳における末梢の骨髄由来

細胞の浸潤

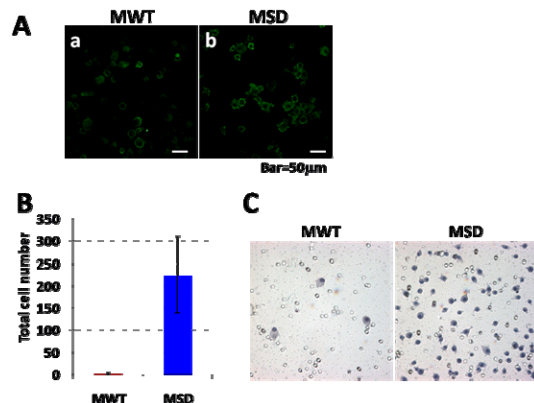
MIP-1 α は炎症性ケモカインであり、白血球を炎症局所に誘引する作用を持つことが知られている。さらに、多くの神経変性疾患において発現誘導が起こっていることが明らかとなっており、SD マウス脳内でも同様に増大していることが報告されている。そのため、SD マウスから脳を摘出した後、切片を作製し、白血球共通抗原である抗 CD45 抗体を用いて免疫組織染色を行った。③A に示すように、SD の脳では WT では観察されない CD45 免疫反応性が脳の大部分の領域で観察された（③B）。また、陽性細胞の形態は小さく、丸い形態を示し、突起状の細胞も観察された（Fig3-4A）。これらの結果は、SD の脳内において末梢の骨髄由来細胞が脳内に移行している可能性を示唆している。さらに、各細胞表面抗原に対する抗体を用いて、どの細胞集団が脳内に存在しているか検討するために、脳切片を作製して免疫組織化学を行った。その結果、SD マウスの脳において単球・マクロファージ（CD11b）及び T リンパ球（CD3）が観察された（③C）。単球・マクロファージは中脳、視床、延髄で陽性を示し、特に延髄において強い免疫反応性が得られた。一方、T リンパ球は脳全体で観察されたが、各領域において陽性細胞数は少なかった。なお B リンパ球（B220）及び顆粒球（Gr-1）はほとんど陰性であった。これは末梢由来の単球・マクロファージ及び T リンパ球が脳内へ移行した可能性を示唆しており、特に単球・マクロファージの脳内浸潤が顕著であることが明らかになった。

(4) SD マウス骨髄由来単球細胞の単離

次に MIP-1 α による CD11b 陽性細胞の遊走能を観察するために、WT 及び SD BMC からこれらの細胞を単離・株化し、Migration assay を行った。まず間接蛍光抗体法により単離した細胞集団が CD11b 陽性細胞であるかどうかを確認した（④A）。次に Migration assay を行った結果、SD BMC 由来細胞（MSD）では顕著な遊走活性の増大が示された（④B, C）。この結果と Fig3-2B の結果とを比較すると、単球・マクロファージの集団が全骨髄よりも明らかに MIP-1 α 応答性が強いことが明らかとなった。このことから、SD マウス脳内において発現誘導されている MIP-1 α により、他の造血系細胞と比較して単球・マクロファージが末梢血から脳実質内に誘引・浸潤している可能性が示唆された。



③WT 及び SD マウス脳における免疫組織染色



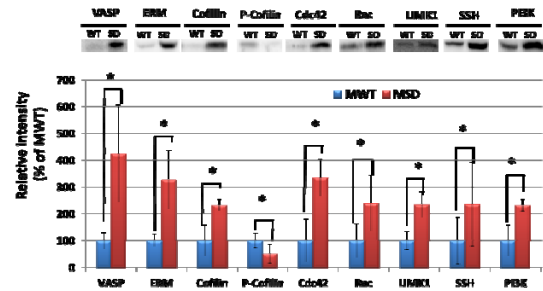
④WT 及び SD マウス脳における免疫組織染色

(5) SD マウス骨髄由来単球細胞のシグナル伝達解析

最後に MSD のシグナルに関して、細胞運動に関与するアクチン関連タンパクの変動について調べた。その結果、⑤に示すようにリン酸化 Cofilin のみ MSD で減少しており、その他は増大していた。特にこれらの上流である PI3K の活性を測定した結果、約 5 倍増大していた (data not shown)。さらに酵素補充により生体内基質蓄積を解消した結果、PI3K の活性化は顕著に抑えられ、WT と同等のレベルとなった (data not shown)。

以上の結果から、D マウス由来単球系細胞は、生体内基質の蓄積により、PI3K が活性化され、アクチンの重合及び脱重合が盛んとなり、その結果として脳から分泌されるケモカイン MIP-1 α に誘因されて浸潤を起こすこと

が示唆された。



⑤アクチン関連タンパクの発現変動

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

下記に主な論文を示す

- ① Sato K, Shigenaga A, Kitakaze K, Sakamoto K, **Tsuji D**, Itoh K, Otaka A.: Chemical Synthesis of Biologically Active Monoglycosylated GM2-activator Protein Analog Using N-Sulfanylethylanilide Peptide.: (2013) in press, *Angew Chem Int Ed*, 査読有
- ② **Tsuji D**.: Molecular pathogenesis and therapeutic approach of GM2 gangliosidosis.: (2013) *Yakugaku Zasshi*, 査読有, 269-274, doi 無, 133
- ③ Rahman MM, Kitao S, **Tsuji D**, Suzuki K, Matsuoka K, Matsuzawa F, Aikawa S, Itoh K.: Inhibitory effects and specificity of synthetic sialyl dendrimers toward recombinant human cytosolic sialidase 2 (NEU2).: (2013) *Glycobiology*, 495-504, 査読有, doi: 10.1093/glycob/cws221., 23
- ④ Ikegame A, Ozaki S, **Tsuji D**, Harada T, Fujii S, Nakamura S, Miki H, Nakano A, Kagawa K, Takeuchi K, Abe M, Watanabe K, Hiasa M, Kimura N, Kikuchi Y, Sakamoto A, Habu K, Endo M, Itoh K, Yamada-Okabe H, Matsumoto T.: Small molecule antibody targeting HLA class I inhibits myeloma cancer stem cells by repressing pluripotency-associated transcription factors.: (2012) *Leukemia*, 2124-2134, 査読有, doi: 10.1038/leu.2012.78., 26
- ⑤ **Tsuji D**, Akeboshi H, Matsuoka K, Yasuoka H, Miyasaki E, Kasahara Y, Kawashima I, Chiba Y, Jigami Y, Taki T, Sakuraba H, Itoh K. Highly phosphomannosylated enzyme replacement therapy for GM2 gangliosidosis.: (2011) *Ann Neurol*, 691-701, 査読有, doi: 10.1002/ana.22262., 69
- ⑥ Matsuoka K, Tamura T, **Tsuji D**, Dohzono

Y, Ohno K, Sakuraba H, Itoh K.:
Therapeutic Potential of
Intracerebroventricular Replacement
of Modified Human beta-Hexosaminidase
B for GM2 Gangliosidosis.: (2011) *Mol
Ther.*, 1017-1024, 査読有, doi:
10.1038/mt.2010.113., 19

- ⑦ Kawashita E, **Tsuji D**, Toyoshima M,
Kanno Y, Matsuno H, Itoh K.: 7)
Prostaglandin E2 reverses aberrant
production of an inflammatory
chemokine by microglia from Sandhoff
disease model mice through the cAMP-PKA
pathway.: (2011) PLoS ONE, 査読有,
e16269, doi:
10.1371/journal.pone.0016269., 6

[学会発表] (計 37 件)

下記に主な論文を示す

- ① **辻大輔**, 難波 建多郎, 石丸 直澄, 櫻
庭 均, 伊藤 孝司: Tay-Sachs 病患者由
来 iPS 細胞の樹立と分化神経系細胞に対す
る酵素補充効果の検討: 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 年 11 月 16
日, じゅうろくプラザ (岐阜市)
- ② **辻大輔**, 難波 建多郎, 北風 圭介, 浅
沼 大祐, 神谷 真子, 浦野 泰照, 伊藤
孝司新規人工蛍光基質を用いた活性染色
によるリソソーム酵素の脳内補充効果の
*in vivo*イメージング: 第 31 回日本糖質学
会, 2012 年 9 月 17 日, 鹿児島市民文化ホ
ール (鹿児島市)
- ③ **辻大輔**, 難波 建多郎, 南條 遥, 伊藤
孝司: リソソーム病に対する *ex vivo* 遺伝
子治療法の開発, 第 53 回日本生化学会 中
国・四国支部例会, 2012 年 5 月 18 日, 岡
山大学 創立五十周年会館 (岡山市)
- ④ **辻大輔**, 難波 建多郎, 浅沼 大祐, 神
谷 真子, 浦野 泰照, 伊藤 孝司: GM2 ガ
ングリオシドーシスに対する間葉系幹細胞
を用いた *ex vivo* 遺伝子治療法によるクロ
スコレクション効果の検討, 日本薬学会
第 132 年会, 2012 年 3 月 30 日, 北海道大
学札幌キャンパス体育館 (札幌市)
- ⑤ **辻大輔**: 中枢神経症状を伴う先天性代
謝異常症における病態解析および治療法
開発, 第 50 回日本薬学会・日本薬剤師
会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術
大会, 2011 年 11 月 11 日, サンポートホ
ール高松 (高松市)
- ⑥ **辻大輔**, 小川 隆, 豊島 優裕, 伊藤 孝
司: GM2 ガングリオシドーシス脳内におけ
るミクログリア及び浸潤単球系細胞の性
質解析, 第 84 回日本生化学会大会, 2011
年 9 月 24 日, 国立京都国際会館 (京都市)
- ⑦ **Daisuke Tsuji**, Masahiro Toyoshima and

Kohji Itoh: Protein kinaseC regulate
morphology of microglia derived from
Sandhoff disease model mice, 21st
International Symposium on
Glycoconjugates, 21 Aug. 2011, Vienna,
Austria

- ⑧ **辻大輔**, 難波 建多郎, 南條 遥, 伊藤
孝司: MSCs を用いた GM2 ガングリオシドー
シスに対する *ex vivo* 遺伝子治療法の開発,
第 30 回日本糖質学会年会, 2011 年 7 月 12
日, ハイブ長岡 (長岡市)
- ⑨ **辻大輔**, 豊島 優裕, 伊藤 孝司: GM2 ガ
ングリオシドーシスモデル由来ミクログ
リアにおける形態制御機構の解明, 第 52
回日本生化学会 中国・四国支部例会, 2011
年 5 月 14 日, 広島大学霞キャンパス広仁
会館 (広島市)
- ⑩ **辻大輔**, 難波 建多郎, 浦上 裕行, 辻
耕平, 重永 章, 大高 章, 柏田 良樹, 高
石 喜久, 伊藤 孝司: ヒト iPS 細胞に対す
る神経分化誘導能を持つ新規化合物の探
索, 日本薬学会 第 131 年会, 2011 年 3
月 29 日, ツインメッセ静岡 (静岡市)
- ⑪ **辻大輔**, 難波 建多郎, 浦上 裕行, 重
永 章, 大高 章, 柏田 良樹, 高石 喜久,
伊藤 孝司: 未分化細胞に対する神経分化
誘導作用を持つ化合物の探索と構造活性
相関, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83
回日本生化学会大会 合同大会, 2010 年 12
月 10 日, 神戸国際展示場 (神戸市)
- ⑫ **Daisuke Tsuji**, T Koyama, Yoshiki
Kashiwada, Yoshihisa Takaishi and Kohji
Itoh: Lycorine induces differentiation
from embryonic stem cells into
PSA-NCAM-positive cells, ICS2010, 2010
年 8 月 2 日, 幕張メッセ (千葉県)
- ⑬ **Daisuke Tsuji**, Masahiro Toyoshima and
Kohji Itoh: Abnormal functions of
hematopoietic cells in Sandhoff disease
model mice, The 28th NAITO CONFERENCE ON
Glycan Expression and Regulation, 2010
年 7 月 28 日, 湘南国際村センター (神奈
川県)

[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): (2010) 生物薬科学実験講座,
219-234

[その他]

ホームページ等

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/lab/btc/>

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

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし