

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460389

研究課題名(和文) 中枢神経症状を伴うリソソーム病における神経変性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of neuronal cell death in GM2 gangliosidosis

研究代表者

辻 大輔 (TSUJI, Daisuke)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：00423400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

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Hexの欠損に基づき、GM2ガングリオシドが過剰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リソソーム病である。

本研究では、本疾患における神経細胞死の解明を目指し、患者由来iPS細胞等を用いてシグナル異常の解明を行うことを目的とした。その結果、病態ではPI3K経路の低下により、mTORC1不活性化が起こり、引き続いてオートファジーが亢進していた。また、神経症状を伴うリソソーム病モデルマウス脳でTFEBの活性化が観察された。これらはHexの酵素補充により回復した。以上より、本疾患における細胞死に関わるシグナルの解明が行えた。

研究成果の概要(英文)：GM2 gangliosidosis is a lysosomal  $\alpha$ -hexosaminidase (Hex) deficiency involving excessive accumulation of undegraded substrates, including GM2 ganglioside, and progressive neurodegeneration.

In this study, we generated iPS cell from Tay-Sachs disease (TSD) patient fibroblast, and demonstrated the abnormalities of signaling in TSD neurons. We found differences in PI3K and autophagy signaling in GM2 gangliosidosis model when compared to normal control. In addition, we observed activation of TFEB in lysosomal storage disorders model mice with neuronal manifestations. These results suggest that mTORC1 inactivation and the increase of autophagy were dependent on down-regulation of PI3K signaling.

Furthermore, replacement of Hex rescued abnormal signaling in GM2 gangliosidosis models. These findings may represent a mechanism in linking cell death observed in GM2 gangliosidosis neurons.

研究分野：病態生化学

キーワード：リソソーム オートファジー 糖脂質 リソソーム病 iPS細胞

## 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、その酵素が認識する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。リソソーム病において、中枢神経症状を惹起する疾患は多くの割合を占めており、各リソソーム酵素の欠損に基づく疾患で蓄積している生体内基質が異なっているにも関わらず、多くの疾患で精神運動発達遅滞やてんかんなど良く似た臨床症状を呈することが知られている。このことは、過剰蓄積が起こったリソソームから何らかの異常シグナルが細胞内に伝達され、神経変性を含む脳内環境の破綻が起こり、その結果として神経機能の異常を起していることを示唆している。しかしながら、疾患における神経機能と生体内基質蓄積との関係に関する研究は殆ど行われていないのが現状であり、リソソーム病の神経機能異常メカニズムは不明である。

申請者は、これまで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 GM2 ガングリオシドーシスモデルマウス (Sandhoff 病モデルマウス: SD マウス) を用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 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) 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。また SD マウス脳由来グリア細胞における MIP-1 $\alpha$  の異常発現機構の解明や増殖に関するシグナル伝達機構の研究を行ってきた。これらの研究において、SD マウス由来ミクログリアでの MIP-1 $\alpha$  の異常産生機構、アストロサイトの異常増殖に関するシグナル伝達機構、そして脳内酵素補充により小脳において MIP-1 $\alpha$  の産生抑制と運動改善を明らかにした。また単球系の細胞が脳から分泌された MIP-1 $\alpha$  により誘因され、生体内基質蓄積がその走化性を増大させることを明らかにしている (論文投稿準備中)。これらの成果は、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神経細胞機能の異常を促進し、病態の進行に深く関与していることを示している。

以上のことから、中枢神経症状を惹起するリソソーム病は、神経細胞をはじめとする脳内の細胞への生体内基質過剰蓄積により、神経機能の異常やグリア細胞からのケモカインなどの病態促進因子の放出を伴い、脳内環境の破綻を起しており、これらのメカニズムを解明することはリソソーム病の病態解明及び治療にとって重要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、既に樹立している SD マウス由来グリア細胞株 (アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト前駆細胞) 及び核移植 ES 細胞から分化させた神経細胞を用いて、各細胞間の恒常性維持及び破綻機構を *in vitro* で解明し、さらに *in vivo* での正常酵素の補充による効果を、蛍光プローブを用いてイメージング解析を行い、正常化したグリア - 神経の脳内環境と機能回復との関係を明らかにし、最終的に患者由来 iPS 細胞から分化させた各神経系細胞で再現を試みることを目的とし、下記の実験を行った。

(1) リソソーム病モデルマウス及び脳由来神経系細胞を用いた細胞内異常シグナル鍵因子の特定

(2) 脳内酵素補充による正常化と蛍光イメージングによる神経機能不全と病態との関係を解明

(3) 患者由来 iPS 細胞から分化させた神経系細胞を用いた神経 - グリア間の脳内環境破綻モデルの構築

## 3. 研究の方法

(1) リソソーム病モデルマウス及び脳由来神経系細胞を用いた細胞内異常シグナル鍵因子の特定

神経症状を呈するリソソームのモデルマウス (GM2 ガングリオシドーシス、ムコ多糖症 IIIA 型、多種スルファターゼ欠損症) を用いて、リソソームの生合成のマスター遺伝子である Transcription factor EB (TFEB) の発現・局在について解析を行った。また mTORC1 をはじめとするオートファジーに関連するシグナル伝達経路についても解析を行った。

(2) 脳内酵素補充による正常化と蛍光イメージングによる神経機能不全と病態との関係を解明

GM2 ガングリオシドーシスモデルである Sandhoff 病モデルマウスに対して、改変型 HexB の脳室内酵素補充を行い、蓄積基質の改善と治療効果 (ロータロッドによる運動機能及び寿命) を検討した。また蛍光プローブを用いて酵素の局在解析を行った。

(3) 患者由来 iPS 細胞から分化させた神経系細胞を用いた神経 - グリア間の脳内環境破綻モデルの構築

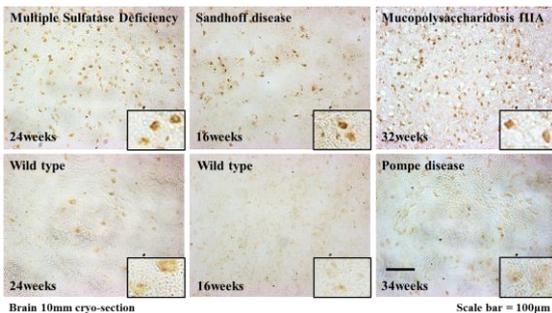
GM2 ガングリオシドーシスである Tay-Sachs 病の患者由来皮膚線維芽細胞に対して、Yamanaka 因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC) をセンダイウィルスベクターにより遺伝子導入し、iPS 細胞の樹立を行った。さらに樹立した iPS 細胞から神経細胞の分化誘導を行い、マイクロアレイ解析を行った後、PI3K シグナル経路について解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) リソソーム病モデルマウス及び脳由来神経系細胞を用いた細胞内異常シグナル鍵因子の特定

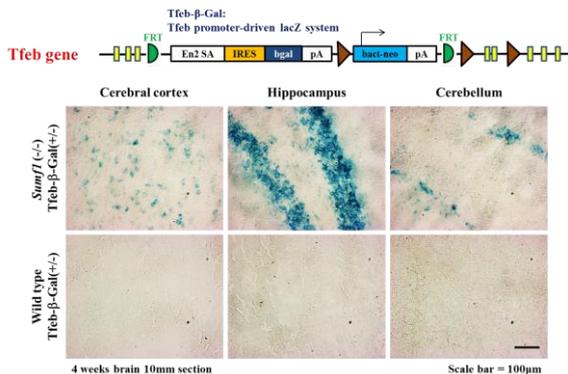
神経変性を引き起こすリソソームのモデルマウス (GM2 ガングリオシドーシス、ムコ多糖症 IIIA 型、多種スルファターゼ欠損症) 及びコントロールのマウス (野生型及び Pompe 病) の脳切片を用い、リソソームの生合成のマスター遺伝子である Transcription factor EB (TFEB) に対する抗体を用いて免疫組織化学を行った結果、野生型及び神経症状が出ない Pompe 病モデルマウスの脳では、Tfeb は細胞質に局在しているのに対し、神経症状を引き起こすリソソーム病モデルマウスの脳では Tfeb は核に局在していることが明らかになった (①)。

##### ① リソソーム病モデルマウスの脳における Tfeb の局在解析



さらに Tfeb の遺伝子発現が亢進しているかを調べるために Tfeb プロモーターの下流に LacZ を連結したトランスジェニックマウスと Sumf1 ノックアウトマウス (多種スルファターゼ欠損症モデル) を交配し、脳切片を用いて X-Gal 染色を行った結果、野生型では観察されない青いシグナルが多種スルファターゼ欠損症モデルマウスの脳全体で観察され、Tfeb の Up-regulation が起こっていることが明らかになった (②)。

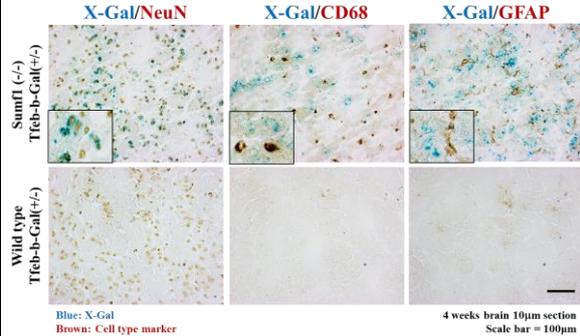
##### ② 多種スルファターゼ欠損症モデルマウスの脳における Tfeb 発現上昇



また Tfeb が発現している細胞を調べるために X-Gal 染色と細胞型マーカーを用いた 2

重染色を行った結果、多種スルファターゼ欠損症モデルマウスの脳において、Tfeb の Up-regulation はニューロン及びミクログリアで起こっていることが明らかになった (③)。

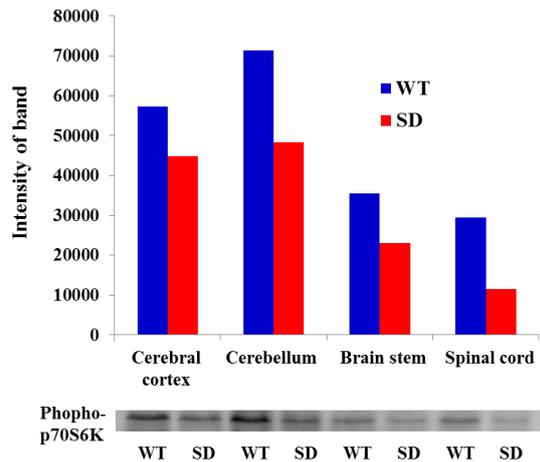
##### ③ Tfeb 発現細胞の特定



以上の結果から、神経症状を呈するリソソーム病の脳において Tfeb が活性化していることが明らかになった。

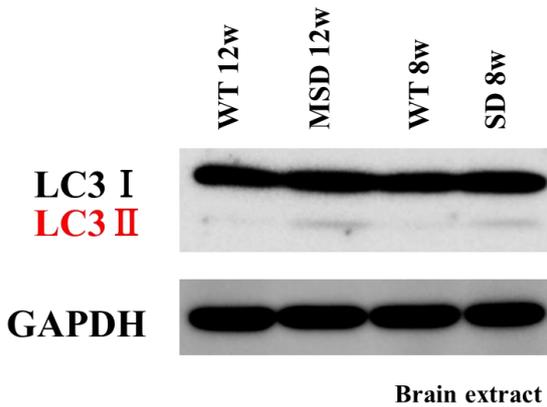
次に Tfeb を活性化するシグナルを特定するために、Tfeb のリン酸化を行っている mTORC1 を調べた。その結果、Sandhoff 病モデルマウスの各脳領域において、mTORC1 の標的である p70S6K のリン酸化が野生型と比較して減少していることが明らかになった (④)。

##### ④ Sandhoff 病モデルマウス脳における mTORC1 活性の低下



mTORC1 の低下により、オートファジーの亢進が起こっていると考えられるため、LC3 の発現解析を行った。その結果、神経症状を呈する Sandhoff 病及び多種スルファターゼ欠損症のモデルマウス脳において、LC3 II のバンドが増大しており、オートファジーの亢進が示唆された (⑤)。

⑤リソソーム病モデルマウス脳におけるオートファジーの亢進

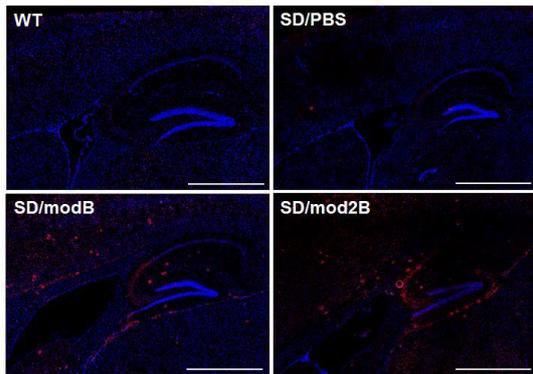


以上の結果より、神経症状を呈するリソソーム病の脳では、mTORC1の活性低下により、Tfebの活性化とオートファジーの亢進が起きていることが明らかになった。

(2) 脳内酵素補充による正常化と蛍光イメージングによる神経機能不全と病態との関係を解明

GM2 ガングリオシドーシスモデルである Sandhoff 病モデルマウスに対して、改変型 HexB の脳室内酵素補充を行い、蛍光プローブを用いて酵素の局在解析を行った。その結果、脳のいたるところで酵素が検出され、低下していた酵素活性が回復した (⑥)。

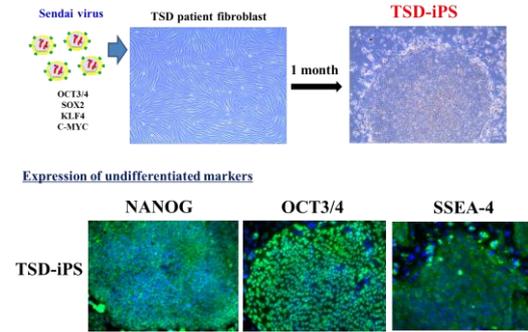
⑥ 蛍光プローブを用いた脳内酵素補充のイメージング



(3) 患者由来 iPS 細胞から分化させた神経系細胞を用いた神経 - グリア間の脳内環境破壊モデルの構築

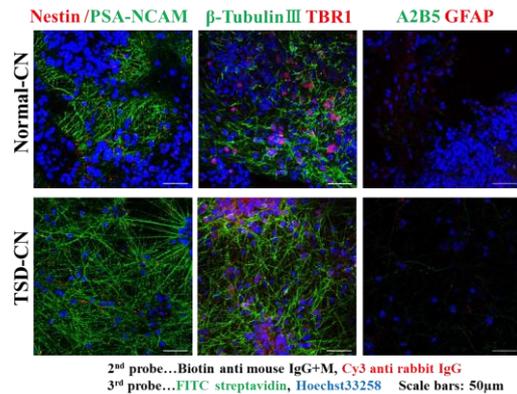
リソソーム病モデルマウスの脳において異常シグナルが存在することが明らかとなったため、神経細胞モデルでシグナル伝達解析を行うために Tay-Sachs 病の患者由来皮膚線維芽細胞に対して、Yamanaka 因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) をセンダイウィルスベクターにより遺伝子導入し、iPS 細胞の樹立した (⑦)。

⑦ Tay-Sachs 病患者由来 iPS 細胞



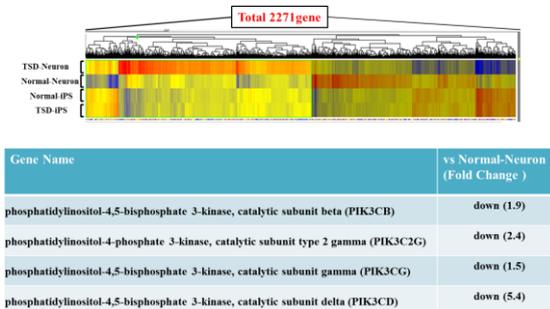
さらに樹立した iPS 細胞に対して神経分化誘導を行い、各神経系マーカーで染色した結果、大脳皮質マーカーである TBR1 陽性の神経細胞が獲得でき、グリア細胞は殆ど存在しなかった (⑧)。

⑧ Tay-Sachs 病患者由来 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞



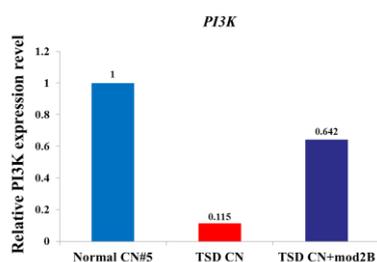
これらの神経細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った結果、PI3K サブユニットの遺伝子発現が Tay-Sachs 病患者由来神経細胞で低下していることが明らかになった (⑨)。

⑨ Tay-Sachs 病患者由来神経細胞におけるマイクロアレイ解析



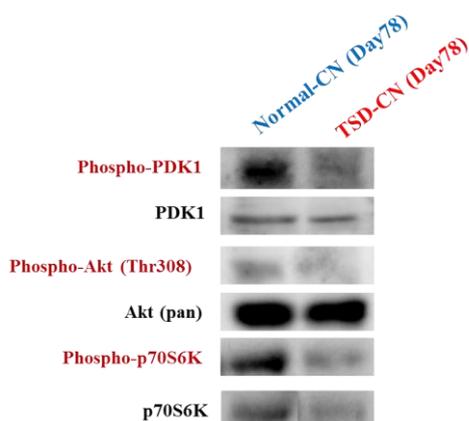
また、Tay-Sachs 病患者由来神経細胞における PI3K 発現の低下は Hex 酵素補充により回復したことから、蓄積生体内基質による異常であることが明らかになった (⑩)。

## ⑩定量的PCRによるPI3K発現解析



最後にウェスタンブロットによりPI3Kシグナル経路を調べた結果、Tay-Sachs病患者由来神経細胞においてリン酸化PDK1、リン酸化AktそしてmTORC1の活性が低下していることが明らかになった(⑩)。

## ⑪Tay-Sachs病患者由来神経細胞におけるPI3Kシグナリング解析



以上の結果より、Tay-Sachs病患者由来神経細胞では、PI3Kの発現低下により、その下流のシグナルに異常があり、結果としてmTORC1の活性低下が起こっていた。このシグナル異常により、オートファジーの活性化が引き起こされ、結果として神経細胞死を起こしていると考えられる。

## 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9件)

- 1) Kitakaze K, Mizutani Y, Sugiyama E, Tasaki C, Tsuji D, Maita N, Hirokawa T, Asanuma D, Kamiya M, Sato K, Setou M, Urano Y, Togawa T, Otaka A, Sakuraba H, Itoh K. :Protease-resistant modified human  $\beta$ -hexosaminidase B as a novel therapeutic enzyme for GM2 gangliosidosis.: *J Clin Invest*, in press (2016) 査読有
- 2) Kawashita E, Tsuji D, Kanno Y, Tsuchida K, Itoh K.: Potentiation of uridine diphosphate-induced production of

macrophage inflammatory protein-1 alpha in microglia derived from Sandhoff disease model mice.: *JIMD Rep*, in press (2016) 査読有

- 3) Rahman MM, Hirokawa T, Tsuji D, Tsukimot J, Hitaoka S, Chuman H, Itoh K. : Novel pH-dependent regulation of human cytosolic sialidase 2 (NEU2) activities by siastatin B and structural prediction of NEU2/siastatin B complex.: *Biochem Biophys Res*, in press (2016) 査読有
- 4) Hanson DJ, Nakamura S, Amachi R, Hiasa M, Oda A, Tsuji D, Itoh K, Harada T, Horikawa K, Teramachi J, Miki H, Matsumoto T, Abe M.: Effective impairment of myeloma cells and their progenitors by blockade of monocarboxylate transportation.: *Oncotarget*, 6, 33568-33586 (2015) 査読有
- 5) Sato K, Kitakaze K, Nakamura T, Naruse N, Aihara K, Shigenaga A, Inokuma T, Tsuji D, Itoh K, Otaka A.: Total chemical synthesis of monoglycosylated GM2 ganglioside activator using a novel cysteine surrogate.: *Chem Comm*, 51, 9946-9948 (2015) 査読有
- 6) Gallat FX, Matsugaki N, Coussens NP, Yagi KJ, Boudes M, Higashi T, Tsuji D, Tatano Y, Suzuki M, Mizohata E, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Park J, Song C, Hatsui T, Yabashi M, Nango E, Itoh K, Coulibaly F, Tobe S, Ramaswamy S, Stay B, Iwata S, Chavas LM.: In vivo crystallography at X-ray free-electron lasers: the next generation of structural biology?: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369, 20130497 (2014) 査読有
- 7) 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. *Angew Chem Int Ed*, 52, 7855-7859 (2013) 査読有
- 8) 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).: *Glycobiology*, 23, 495-504 (2013) 査読有
- 9) Tsuji D. Molecular pathogenesis and therapeutic approach of GM2 gangliosidosis.: *Yakugaku Zasshi*, 133, 269-274 (2013) 査読有

[学会発表] (計13件)

- 1) 辻大輔, 山口 沙恵香, 本窪田 絢加, 水谷 安通, 伊藤 孝司 : GM2 ガングリオシドーシス病患者由来 iPS 細胞を用いた神経系病態モデルの構築及び病態シグナル解析: 日本薬学会第136年会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2016

- 年 3 月 26-29 日.
- 2) 水谷 安通, 辻 大輔, 山口 沙恵香, 本窪田 絢加, SPAMPANATO Carmine, BALLABIO Andrea, 伊藤 孝司: 神経症状を呈するリソソーム病モデルマウスにおけるオートファジーに関連した病態解析: 日本薬学会第 136 年会, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), 2016 年 3 月 26-29 日.
  - 3) 本窪田 絢加, 辻 大輔, 山口 沙恵香, 水谷 安通, 伊藤 孝司: リソソーム病におけるオートリソソームの形成異常: 日本薬学会第 136 年会, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), 2016 年 3 月 26-29 日.
  - 4) 水谷 安通, 辻 大輔, 山口 沙恵香, 伊藤 孝司: リソソーム病モデルマウスにおけるオートファジーシグナル解析: BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市), 2015 年 12 月 1-4 日.
  - 5) 辻 大輔, 本窪田 絢加, 北風 圭介, 山口 沙恵香, 田崎 智佳子, 伊藤 孝司: リソソーム病におけるオートリソソームの形成異常: BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市), 2015 年 12 月 1-4 日.
  - 6) 山口 沙恵香, 辻 大輔, 難波 健多郎, 伊藤 孝司: Tay-Sachs 病患者由来 iPS 細胞を用いた中枢神経モデルの構築及び病態解析: BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市), 2015 年 12 月 1-4 日.
  - 7) 辻 大輔, 水谷 安通, 伊藤 孝司: リソソーム病におけるリソソーム制御因子 TFEB の発現・局在解析: BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市), 2015 年 12 月 1-4 日.
  - 8) Daisuke Tsuji, Spampinato Carmine, Sambri Irene, Fraldi Alessandro, Kohji Itoh and Ballabio Andrea: Analysis of endogenous TFEB expression and distribution in LSD model mice.: Gordon Research Conference, USA, Texas, Galveston, Mar. 15-20 2015.
  - 9) Kitakaze Keisuke, Asanuma Daisuke, Asanuma Daisuke, Kamiya Mako, Daisuke Tsuji, Mariko Ikuo, Urano Yasuteru, Sakuraba Hitoshi and Kohji Itoh: Replacement Effects of Human Modified Lysosomal  $\beta$ -Hexosaminidase B on Tay-Sachs and Sandhoff Disease Models and Imaging with Novel pH-activatable Fluorescent Probes imaging of endocytosed lysosomal enzymes with pH-activatable

fluorescent probe and evaluation of enzyme replacement effects on lysosomal storage diseases.: The 10th Annual World Symposium 2014, San Diego, CA, USA, 11-13 Feb. 2014.

- 10) 北風 圭介, 辻 大輔, 浅沼 大祐, 神谷 真子, 浦野 泰照, 櫻庭 均, 伊藤 孝司: テーサック病の新規治療薬開発を目指した機能改変型ヒト  $\beta$ -ヘキソサミナーゼの精製および評価: 第 55 回日本先天代謝異常学会, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), 2013 年 11 月 27-29 日.
- 11) 北風 圭介, 辻 大輔, 浅沼 大祐, 神谷 真子, 浦野 泰照, 櫻庭 均, 伊藤 孝司: テーサック病の新規治療薬開発を目指した機能改変型ヒト  $\beta$ -ヘキソサミナーゼの精製および評価: 第 86 回日本生化学会大会, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), 2013 年 9 月 11-13 日.
- 12) 山口 沙恵香, 辻 大輔, 難波 健多郎, 今滝 泉, 伊藤 孝司: Tay-Sachs 病患者由来 iPS 細胞を用いた中枢神経モデルの構築: 第 54 回日本生化学会 中国・四国支部例会, 徳島大学大塚講堂 (徳島県・徳島市), 2013 年 5 月 31 日-6 月 1 日.
- 13) Kitakaze Keisuke, Daisuke Tsuji, Asanuma Daisuke, Kamiya Mako, Urano Yasuteru, Sakuraba Hitoshi and Kohji Itoh: Evaluation of enzyme replacement effect and development of purified system to obtain recombinant lysosomal enzyme with M6P-type glycan., Gordon Research Conference 2013 Lysosomal Diseases, Italy, Lucca, 14-19 Apr. 2013.

[その他]

ホームページ等  
徳島大学薬学部・創薬生命工学分野  
<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/btc/>  
徳島大学教育研究者総覧  
<http://pub2.db.tokushima-u.ac.jp/ERD/person/124430/profile-ja.html>

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
辻 大輔 (TSUJI, Daisuke)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教  
研究者番号: 00423400
- (2) 研究分担者  
伊藤 孝司 (ITOH, Kohji)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号: 00184656
- (3) 連携研究者  
浦野 泰照 (URANO, Yasuteru)  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 20292956