

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461295

研究課題名(和文) 認知症性神経疾患に於ける脂質ラフト異常の実態解明とその新規是正法の開発

研究課題名(英文) Membrane rafts impairments in neurological disorders showing dementia

## 研究代表者

武藤 多津郎 (MUTOH, Tatsuro)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：60190857

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)：AD患者脳では糖脂質に量的・質的異常がある事が知られている。本研究では、糖脂質が局在する細胞膜ラフトに注目し、その質的・量的異常の検出とRaftsが担う細胞内情報シグナリングに及ぼす影響を、PC12 cells やSH-SY5Y cellsの培養系や病理学的に診断確定したAD患者剖検脳を用いて詳細に調べた。本研究の遂行中に神経系全体が障害されてくる脳脊髄根末梢神経炎(EMRN)患者髄液・血清中にラクトシルセラミド(LacCer)等の中性糖脂質に対する抗体を初めて発見した。AD患者試料中でも抗体が存在するか否かの検討を血清・脳脊髄液などを用いて始め興味ある事実を見出した。(論文投稿中)

研究成果の概要(英文)：Previous studies have shown that patients with Alzheimer's disease (AD) exhibit abnormal brain glycolipid compositions and quantities. In this study, we focused on the integrity and function of the membrane rafts of neuronal cells expressing mutated presenilin-1. We also performed lipid analyses of human brains of AD patients and found decreased amount of neutral glycolipids and gangliosides in the patients compared with those of control subjects. Furthermore, we reconstituted glycolipid abnormality found in patients' brain by use of the specific inhibitors for synthesizing or catabolizing enzymes and/or exogenous addition of glycolipids in culture medium of PC12 cells. During the course of the study, we found novel antibodies against neutral glycolipids. By use of these new autoantibodies against neutral lipids, we examined the specific roles of neutral glycolipids on the function of the rafts in neuronal cells.

研究分野：神経内科学

キーワード：アルツハイマー病 認知症 糖脂質 神経細胞死 細胞膜ラフト 細胞内情報伝達 中性糖脂質 ガン  
グリオシド

## 1. 研究開始当初の背景

これまで AD 患者脳では糖脂質やリン脂質の steady-state level に対照脳と比し、差異を認めたとする多数の報告がなされてきたが、その病因論的意義やラフトそのものの機能に関しては、全くの不明であった。細胞膜ラフトは、AD の病態を考えるうえで極めて重要な膜構造物であり、異常なアミロイド蛋白生成には必須の構造物としてよく知られている。さらに、AD に留まらず CJD での異常プリオン蛋白のコンバージョンもこの膜ラフトで起こることが知られており、このラフト構造の調節・制御をもたらず薬剤の発見はこれら悲劇的疾患の新たな治療法となる可能性が高い。事実、AD 患者で、スタチンを服用している患者では AD 発症率が低下することが報告されている。

一方で、このラフトには細胞間コミュニケーションを司る種々の重要なシグナル伝達分子が局在しており、ラフト構造が破壊されればこれらシグナル伝達分子の機能異常を惹起させてしまう危険性も包含していると言わざるを得ない。元来、細胞膜上に存在するラフトは、決して均一なものではなく、それらを構成する糖脂質や膜蛋白などに不均一性があり、そのサイズも多種多様である。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が先の報告において家族性 AD の原因遺伝子である変異プレセニン 1 (PS1) を発現する SH-SY5Y 神経芽細胞腫を作成して変異 PS1 の脂質に及ぼす影響を明らかにしている (FASEB J, 2012)、この系で観察される膜ラフトの特徴を characterize する検討を行った。さらに、この系を PC12 細胞の培養系で種々の糖脂質合成酵素阻害薬や糖脂質を培養系に添加することにより再現し、神経栄養因子受容体機能におよぼす影響を探索した。

一方、孤発性 AD 患者 5 例の脳から全脂質

を抽出し、中性画分と酸性画分に分け、中性糖脂質、酸性糖脂質のガングリオシド、リン脂質、コレステロールなどのパターンを明らかにし、上記細胞系からのデータとの異同を調べた。

## 3. 研究の方法

本プロジェクトでは、こうした糖脂質が局在する形質細胞膜上の細胞膜ラフトに注目し、その質的・量的異常の検出と同構造物が担う細胞内情報伝達機能に及ぼす影響を、神経系培養細胞である pheochromocytoma PC12 cells や SH-SY5Y neuroblastoma cells の培養系や病理学的に診断確定した AD 患者剖検脳を用いて詳細に調べた。

剖検脳での異常及び変異 PS1 を発現する SH-SY5Y の系での異常を PC12Cells の培養で再現し、ラフト機能に及ぼす影響を調べた。免疫沈降法用い中性糖脂質合成酵素蛋白量を Western blot 法で比較した。

## 4. 研究成果

本研究の遂行中に中枢及び末梢の神経系全体が障害されてくる脳脊髄根末梢神経炎 (EMRN) 患者髄液・血清中にラクトシルセラミド (LacCer) やグルコシルセラミド (GlcCer) などの中性糖脂質に対する抗体を世界で初めて発見した。この抗中性糖脂質抗体は、急性の認知症を呈し末梢神経系も障害されてくる EMRN の鋭敏な disease marker になる事を報告した (Shima S et al. Neurology 2014)。

こうした研究の展開もあり、AD 患者試料中でもこうした抗中性糖脂質抗体が存在するか否かの検討を血清・脳脊髄液などを用いて始めている。さらに、脂質ラフトを上記抗体で染色し、対照のそれと明確に異なる染色パターンを呈する事を見出した。(論文投稿中)

一方、患者脳脊髄液、血清などを用いこれら患者試料中の中性・酸性糖脂質を同定定量

できるような実験系の構築に努めた。この研究遂行のため、AT&Tの瀧孝雄先生のグループと共同で微量測定系の開発にも取り組みを開始する予定である。薄層クロマトグラフィ(TLC)を用いる我々が開発に挑む方法は今後MS/MSと連携して微量同定・定量を可能にする新規方法として是非成功させたいと思っている。

開発成功の暁には、患者試料でも検討予定で、ADの糖鎖生物学的異常の実態の解明と新たな治療法開発のヒントを得ることが可能となると思われる。

### 急性の認知症を示す EMRN の発見：

本研究の経過中に、相次いで中枢神経系と末梢神経系が侵されて急性の認知症を呈する複数患者を発見した。我々は、患者たちが示す脳脊髄液所見から免疫反応が絡んだ病態を想定し、種々の免疫療法を行った結果全例で病態は回復し、神経症状も回復させることに成功した。

そこで、これら患者には、何らかの自己抗体が存在するのではないかとの仮説の元、ラット脳ホモジェネートを抗原としてウエスタンブロット(WB)を行ったが、患者特有のバンドは検出できなかった。次に、糖脂質特に中性糖脂質に対する抗体活性を

Far Eastern blot法で検索したところ、全例に抗中性糖脂質抗体を検出するのに成功した。

この抗体は、患者の急性期には明瞭に検出されたが、回復期には検出されず病勢に相関することが明らかになった。これらの事実は、本抗体はEMRNの良いdisease markerとなると考えられた。

本抗体は、神経細胞に於けるこれら中性糖脂質の生物学的役割を解明するための良いツールとなると期待される。

### 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12件)

Mizuma A, Yamashita T, Kono S, Nakayama T, Baba Y, Ito S, Asakura K, Niimi Y, Asahi T, Kanemaru K, Mutoh T, Kuroda S, Kinouchi H, Abe K. Phase II trial of intravenous low-dose granulocyte colony-stimulating factor in acute ischemic stroke. **J Stroke Cerebrovasc Dis** (in press), 査読有, DOI:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.01.022

Fukui T, Ueda A, Murate KI, Hikichi C, Ito S, Asakura K, Mutoh T. Depressive state as an initial symptom for subdural abscess. **Neurol Clin Neurosci** 4: 31-33, 2016, 査読有, DOI:10.1111/ncn3.12029

Takeuchi Y, Ochiai J, Ueda M, Mabuchi C, Shima S, Mutoh T. A case of limbic encephalitis with anti-neutral glycosphingolipid antibodies. **Neurol Clin Neurosci** 4: 70-72, 2016, 査読有, DOI:10.1111/ncn3.12037

Kitaguchi N, Hasegawa M, Ito S, Kwaguchi K, Nakai S, Suzuki N, Shimano Y, Ishida O, Kushimoto H, Kata M, Koide S, Kanayama K, Kato T, Ito K, Mutoh T, Sugiyama S, Yuzawa Y. A prospective study on blood Abeta levels and the cognitive function of patients with hemodialysis: a potential therapeutic strategy for Alzheimer's disease. **J Neural Transm** 122: 1593-1607, 2015, 査読有, DOI:10.1007/s00702-015-1431-3

Nakamura K, Sugaya K, Nakata Y, Shima

S, Mutoh T, Nakano I. Hypertrophic pathymeningitis and encephalilitis in a patient with relapsing polychondritis. **Neurol Clin Neurosci** 3: 42-43, 2015, 査読有,  
DOI:10.1111/ncn3.130

Mizutani Y, Ito S, Murate K, Hirota S, Fukui T, Hikichi C, Ishikawa T, Shima S, Ueda A, Kizawa M, Asakura K, Mutoh T. Retrospective analysis of Parkinsonian patients exhibiting normal123I-MIBG cardiac uptake. **J Neurol Sci** 359: 236-40, 2015, 査読有,  
DOI10.1016/j.jns.2015.10.059

Fukui T, Asakura K, Hikichi C, Ishikawa T, Murai R, Hirota S, Murate KI, Kizawa M, Ueda A, Ito S, Mutoh T. Histone deacetylase inhibitor attenuates neurotoxicity of cloiquinol in PC12 cells. **Toxicology** 331: 112-118, 2015, 査読有,  
DOI:10.1016/j.tox.2015.01.013

Asakura K, Ueda A, Mutoh T. Lipid rafts and their possible involvements in neuroimmunological disorders: New reseach arena. **Front Biosci (Landmark Ed)** 20:303-313, 2015, 査読有

Fukuda Y, Fukui T, Hikichi C, Ishikawa T, Murate K, Adachi T, Imai H, Fukuhara K, Ueda A, Kaplan AP, Mutoh T. Neurotrophin promote NGF signaling through interaction of GM1 ganglioside with Trk neurotrophin receptor in PC12 cells. **Brain Res** 1596:13-21,2015, 査読有  
DOI:10.1016/j.brainres. 2014.11.041

Hirota S, Ito S, Fukui T, Murate K, Shima S,

Kizawa M, Ueda A, Asakura K, Mutoh T. Voriconazole-responsive disseminated nodular lesions on spinal MRI. **Int Med** 54: 2015-2018, 2015, 査読有,  
DOI:10.2169/internalmedicine.54.3148

Asakura K, Ueda A, Shima S, Ishikawa T, Hikichi C, Hirota S, Fukui T, Ito S, Mutoh T. Targeting of aquaporin 4 into lipid rafts and its biological significance. **Brain Res** 1583:237-244, 2014, 査読有,  
DOI:10.1016/j.brainres.2014.08.014

Shima S, Kawamura N, Ishikawa T, Masuda H, Iwahara C, Niimi Y, Ueda A, Iwabuchi K, Mutoh T. Anti-neutral glycolipids antibodies in encephalomyeloradiculoneuropathy. **Neurology** 82:114-118, 2014, 査読有,  
DOI:10.1212/WNL.0000000000000015

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者 武藤 多津郎  
(MUTOH, Tatsuro)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
研究者番号：60190857