

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461550

研究課題名(和文) ムコ多糖症III型の自閉傾向・知的退行と脳内慢性炎症の関与についての研究

研究課題名(英文) Study of relationship between autistic/intellectual disorder and neuronal chronic inflammation on mucopolysaccharidosis type III

研究代表者

瀬戸 俊之 (SETO, Toshiyuki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60423878

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)：ムコ多糖症の自閉症様症状や知的障害の発症においては慢性炎症の関与が推測されている。炎症の評価のために患者検体を用いたプテリジンおよびサイトカイン解析ではムコ多糖症患者において炎症の存在が示唆される結果を得た。またムコ多糖症の中樞神経障害を病理学的に検討するために、ムコ多糖症II型モデルマウスを用いた検討を行ったところ、脳の様々な部位において細胞内での空胞化が確認された。またオートファジーの抑制作用のあるクロロキンの投与によってその抑制効果を認めた。ムコ多糖症II型患者におけるMRIを用いた神経放射線学的な経時的検討では、造血幹細胞移植による一定の効果が確認できた。

研究成果の概要(英文)：Neuroglial complications, which are intellectual disability (ID) and autistic disorder, of congenital mucopolysaccharidosis (MPS) are speculated to be related with chronic inflammation in central nervous system. We have studied the pathological mechanism compared with various children with autism and ID. In order to evaluate inflammation on MPS patient we performed analysis of pteridine derivatives and cytokines, it clarified elevated some markers of inflammation. On the other hand, in order to study pathology of MPS brain, we used MPS type II model mice (IDS-KO). It was revealed that there were vacuoles in various type of cells in the brain by electron microscopy and immunostaining related autophagy. It was effective to administrate drug for suppression of autophagy in IDS-KO pathologically. Longitudinal study of MRI on MPS type II, it was shown that hematopoietic stem cell transplantation was effective for brain to some extent.

研究分野：小児科学

キーワード：ムコ多糖症 サイトカイン プテリジン 自閉症 知的障害 遺伝学的未診断 免疫不全 慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

先天性ムコ多糖症 (mucopolysaccharidosis: MPS) はリソゾーム酵素の欠損によって glycosaminoglycan (GAG) が蓄積する先天代謝異常症である。MPS はその欠損酵素によって I 型から VIII 型まで分類されている。近年、欠損酵素を経静脈的に補充することによって全身症状の進行を阻止、もしくは軽減させる酵素補充療法 enzyme replacement therapy (ERT) が薬価収載され広く行われるようになった。ERT が適応である病型であっても補充酵素が血液脳関門を超えて脳内神経細胞に到達する可能性はなく、知能障害などの中枢神経障害に対する効果は期待できない。特に MPS III 型は ERT の適応ではない上に、GAG 蓄積による腹腔内臓器や骨関節症状に乏しく、知能障害や自閉症状が著明である。一方、MPS に関する中枢神経病変の病理学的検討は、その剖検例の乏しさから不明な点が多い。本研究代表者 (瀬戸) が所属していた米国カリフォルニア大学では MPS IIIB 型の GAG 分解障害の原因となる欠損遺伝子 N-acetylglucosaminidase をノックアウトしたモデルマウスを開発し、その病理学的検討を重ねてきた。一方では、炎症性ミクログリアの活性化やサイトカインが関与しているという報告 (Ausseil J et al. Plos one3, 2008) もみられた。これらは MPS の神経障害がヘパラン硫酸などの GAG 蓄積による直接的、物理的な原因で生じるのではなく、オートファジー障害が誘因となり炎症性遺伝子や免疫細胞活性化によって生じた炎症が神経障害に関与している可能性を示唆している。しかしながら、マウス脳とヒト脳では成長速度をはじめ、多くの生理学的、解剖学的差異があり、実際のヒト患者脳内での GAG 蓄積の程度や病理変化については不明な点が多い。分担研究者の田中は永らく MPS の病態と治療に関する研究につとめ、MPS II 型のモデルマウスを用いて MPS の中枢神経内における病態と治療法に関する研究を行ってきた。

脳内の炎症に関して、我々は急性および慢性の脳炎、髄膜炎の病態に関する研究を重ねてきた。特に瀬戸は亜急性硬化性全脳炎に関する病原ウイルスの分子生物学的解析 (Seto-T et al. J Neurovirol. 1999) 中枢神経合併症を生じたノロウイルス腸炎患者における免疫学的解析 (Iritani-N, Seto-T et al. J Med Virol. 2007) など研究報告した。最近では急性炎症であるムンプス髄膜炎重症化因子に関する研究を行っている。これらの中で、各種サイトカイン分析による宿主免疫状態の評価と、我々の施設で迅速に行えるプテリジン分析 (ネオプテリン値) がマクロファージの活性化や髄膜炎の重症度と関連することを発表した (匹田, 瀬戸他. 髄膜炎が疑われたが髄液細胞数増多を認めず髄液中 Neopterin が高値であった一例. 第 17 回日本神経感染症学会. 2012. 匹田, 瀬戸他. ムンプ

ス髄膜炎とその他の無菌性髄膜炎の髄液中および血清中ネオプテリン値の比較検討. 第 54 回日本小児神経学会. 2012. 匹田, 瀬戸他. ムンプス髄膜炎における髄液中ネオプテリン濃度の検討. 第 86 回日本感染症学会. 2012. 他)。このような我々のシステムを用いて実際の MPS 患者の検体を解析することにより、MPS 脳内での慢性炎症の関与を明らかにしていきたいと考えた。

2. 研究の目的

MPS の中枢神経症状の病因として慢性炎症に焦点をあてた研究を計画。自閉傾向や知的退行の顕著な MPS III 型 (サンフィリップ病) において慢性進行性の炎症が神経症状の原因であるという仮説を立て、以下の実験を計画し開始した。

(1) 患者髄液および血液中の各種サイトカイン、プテリジン解析を行い、対照と比較検討することによって患者中枢神経内の炎症を評価する。

(2) MPS III 型および II 型患者の中枢神経障害の病態を理解するため、モデルマウスを用いて GAG の蓄積とオートファジー障害を検討する。さらにオートファジーを調節する薬物を用いて病理学的な影響について評価を行う。

(3) 種々の神経放射線学的画像解析法を用いて中枢神経障害の部位と程度を検討する。

研究遂行において、MPS III 患者の対象数が充足しないため、当院でフォローしている MPS IIIB 型に MPS II 型患者を加えることによって検討数を増やした。さらに研究途中に分担研究者の田中が急逝したため当初の計画より変更を余儀なくされた。

3. 研究の方法

(1) MPS 患者の髄液中および血液中のネオプテリンをはじめとしたプテリジン解析、および Bio-Plex Pro ヒト サイトカイン GI 27-plex キットを用いて各種サイトカイン値について検討を行った。

(2) MPS 患者の中枢神経障害を病理学的に検討するために、MPS II 型のモデルマウスである IDS-KO マウスを用いて、その脳病変を経時的に検討する。さらに蓄積物質の多寡、細胞内での分布について電子顕微鏡ならびにオートファジー関連の各種抗体を用いた免疫染色法で評価する。具体的には p62 抗体、SCMAS 抗体、GM3 抗体、TOM 抗体、LAMP1 抗体、ubiquitin 抗体を用いてオートファジー障害を検討する。またオートファジー阻害物質の一つであるクロロキンを投与することによって、その効果を脳組織学的に検討する。

(3) MPS の自閉症状と比較するため当科でフォロー中の MPS 以外の自閉症/知的障害を有する小児についても、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析により遺伝学的背景を明らかにする。

(4) 核磁気共鳴画像診断法 (MRI) など神経放射線学的解析手法を用いて、脳内灰白質と脳内白質領域における病変の評価を行う。

4. 研究成果

(1) 我々は先天性ムコ多糖症の知能障害と自閉症様症状において、その病態の基礎に慢性炎症があるという仮説をたて平成 26 年度から本研究を開始した。中枢神経内の炎症評価の一環として、平成 27 年度にはウイルス性髄膜炎におけるサイトカイン動態の解析結果を発表し英文誌に掲載されている。この論文では患者の中枢神経症状の重症度分類を考案し、サイトカイン分析結果との関連を解析した。平成 27 年には MPS 研究の主要な研究分担者であった田中が急逝したため研究の進行が一時的に遅滞したが、再び平成 28 年から 29 年度にかけてムコ多糖症および自閉症患者についてさらなる対象を広げ検討を行った。MPS は全病型をあわせても国内での患者が 200 名に満たないため極めて対象者が少ないが、その中でも MPS IIIB 型患者は稀である。したがって IIIB 型に II 型患者も対象に加えて、血清中プテリジンおよびサイトカイン解析や細胞障害マーカーの測定を重ね、データ解析を行なった。MPS IIIB 型患者ならびに MPS II 型の血中プテリジン値の解析を行った。プテリジン誘導体のうちビオプテリンについてはどの症例も異常値は認められなかったが、インターフェロンを介した免疫状態を反映するネオプテリンについては状態が安定している時期の MPS 患者のもので一部に高値が認められた (図 1)。サイトカインプロファイルでは IP-10、FGF-b、RANTES で高い傾向がみられた。これは何らかの炎症の存在を強く示唆するものである。さらに平成 28 - 29 年度には中枢神経内の病態解析にかかせない MPS 患者の髄液採取を施行しえた。現在投稿に向けてデータ分析を行っている。

(2) 最終年度である平成 29 年度にはムコ多糖症 II 型のモデルマウスを用いた病理学的研究を行った。分担研究者であった田中は、理化学研究所の前田、大阪市立大学の瀬戸、澤田とともにライソゾーム病におけるオートファジー機構についてモデルマウスを用いて研究を進めてきた。瀬戸はひきつづき前田とともに、このモデルマウス (IDS-KO) を用いてオートファジー機構の亢進について病理学的検討を行った。田中らの報告では大小の空胞がミクログリアやアストロサイトで認

められオートファジーの亢進が推測されるということであったが (平成 26 年科研費報告書) 今回の研究では脳内血管の pericyte においても空胞が確認された (図 2)。また、蓄積について SCMAS を用いて脳内各所で検討したところ対照と比較して IDS-KO マウスでは随所で SCMAS 染色が陽性であったが、小脳ではプルキンエ細胞で SCMAS 陽性が顕著であった (図 3)。薬物投与による影響の観察では、オートファジーの抑制作用のあるクロロキンの投与を行い、IDS-KO マウスの電子顕微鏡像を検討したところ、非投与群にくらべて神経細胞における空胞像は明らかに減少していた (図 4)。またオートファジーの抑制作用のあるクロロキンの投与によってその抑制効果を認めた。本研究についても現在、投稿準備中である。

(3) 一方、MPS の知的障害や自閉症状の対照となる MPS 以外の小児自閉症については発症の基礎病態についても不明なことが多い。そこで多岐にわたる原因解析のため、平成 28 年度から 29 年度に我々がフォロー中の MPS 以外の自閉症患者における遺伝的背景に焦点をしばり次世代シーケンス解析法を用いた遺伝学的診断を施行、行動評価、てんかんなどの種々の合併症も含めた検討を加えた。これらによって MPS をもたない重度の自閉症や知的障害における遺伝学的背景と病態が明らかになった。

(4) MPS の中枢神経症状に対する治療法ならびに進行阻止、発症予防については多くの研究者が注力している課題である。末梢から投与したタンパク質である酵素製剤が血液脳関門を通過できないことにより ERT の効果が期待できないことは前述した。しかしながら、以前より瀬戸、田中らは造血幹細胞移植が MPS の中枢神経障害、進行の予防に効果があるのではないかという報告を行ってきた (瀬戸ら、第 42 回日本小児神経学会ワークショップ VIII 2000、Seto T *et al.*, Ann Neurol. 50(1):79-92. 2001、瀬戸ら、日本先天代謝異常学会雑誌 8 巻 1 号 31-40 頁 2002)。今回、MPS II 型に対する造血幹細胞移植の効果について、MRI による各部位の詳細な評価を含めた神経放射線学的解析に加えて、生化学的および臨床的な長期経過を検討した。MPS II 型に対する造血幹細胞移植は中枢神経症状に対する改善もしくは進行阻止等の効果が示唆された。

図 1

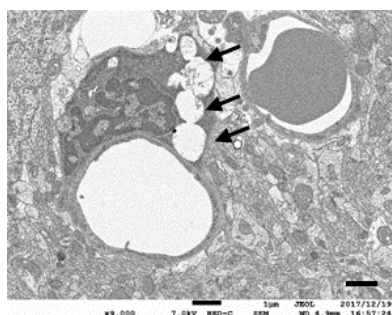
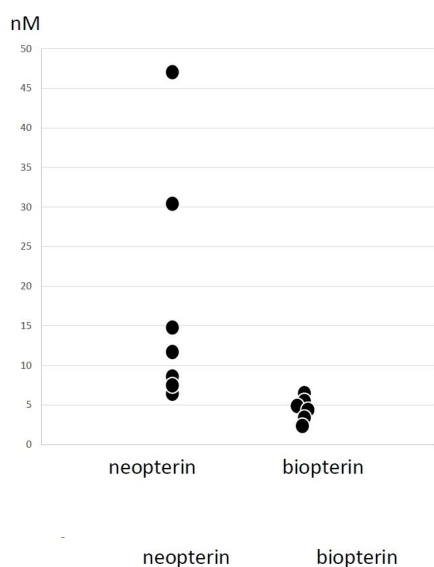


図 3

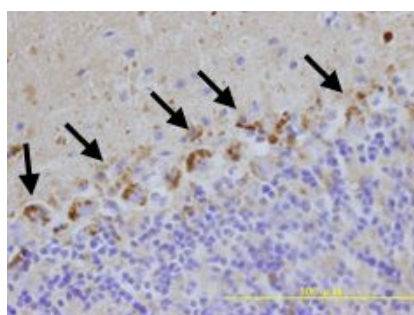
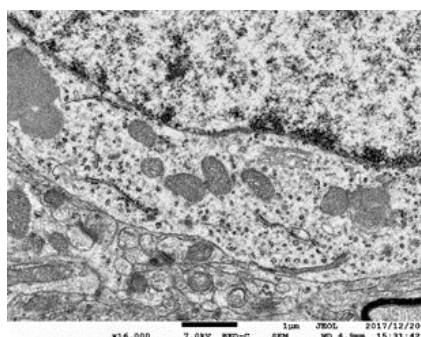


図 4



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)

Yamashita K, Seto T, Fukushima S, Fujita K, Hikita N, Yamamoto T, Shintaku H .
Evaluation of the Relationship between the Serum Immunoglobulin G2 Level and Repeated Infectious Diseases in Children: A Longitudinal Study
Osaka City Med J. (査読有) 2018; 64 (1): (in press)

Kubski F, Yabe H, Suzuki Y, Seto T, Hamazaki T, Mason RW, Xie L, Onsten TGH, Leistner-Segal S, Giugliani R, Dung VC, Ngoc CTB, Yamaguchi S, Montao AM, Orii KE, Fukao T, Shintaku H, Orii T, Tomatsu S.
Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Mucopolysaccharidosis II.
Biol Blood Marrow Transplant. (査読有) 2017; 23:1795-803.
DOI: 10.1016/j.bbmt.2017.06.020.

Seto T, Hamazaki T, Nishigaki S, Kudo S, Shintaku H, Ondo Y, Shimojima K, Yamamoto T.
A novel CASK mutation identified in siblings exhibiting developmental disorders with/without microcephaly.
Intractable Rare Dis Res. (査読有) 2017; 6, 177-82.
DOI: 10.5582/irdr.2017.01031.

Lu Y, Chong PF, Kira R, Seto T, Ondo Y, Shimojima K, Yamamoto T.
Mutations in NSD1 and NFIX in Three Patients with Clinical Features of Sotos Syndrome and Malan Syndrome.
J Pediatr Genet. (査読有) 2017; 6: 63-71.
DOI: 10.1055/s-0037-1603194

Hikita N, Seto T, Yamashita K, Iritani N, Ayata M, Ogura H, Shintaku H.
Relationship between Severity of Aseptic Meningitis and Cerebrospinal Fluid Cytokine Levels.
Osaka City Med J. (査読有) 2015; 61(2):63-71.

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) Fujita K, Yamashita K, Hoshina T, Hikita N, Sakuma S, Shintaku H, Fukai K, Takenouchi T, Uehara T, Kosaki K, Saya H, Seto T.

Genetic analysis of Japanese patients with neurofibromatosis type 1 and the neurological complications.

The American Society of Human Genetics Annual Meeting, October 17-21, 2017 (Orlando, FL, USA)

(2) Kasuga K, Kadono C, Kudou S, Fujita K, Hikita N, Nishigaki S, Seto T, Hamazaki T, Shintaku H.

A novel IDS gene mutation in two Japanese patients with severe mucopolysaccharidosis type II and correlation between developmental outcomes.

The American Society of Human Genetics Annual Meeting, October 17-21, 2017. (Orlando, FL, USA)

(3) Tomatsu S, Kubaski F, Yabe H, Suzuki Y, Seto T, Hamazaki T, Yamaguchi S, Orii KE, Orii T. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with mucopolysaccharidosis II.

The 15th Asian Symposium of Inherited Metabolic Diseases, The 59th Annual meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases, October 12-14, 2017. (Kawagoe, Japan)

(4) Kasuga S, Kadono C, Kudoh S, Terai H, Seto T, Hamazaki T, Shintaku H. Clinical features of mucopolysaccharidosis type VII “Case series in Japan”.

The 15th Asian Symposium of Inherited Metabolic Diseases, The 59th Annual meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases, October 12-14, 2017. (Kawagoe, Japan)

(5) Yamashita K, Yamamoto T, Hoshina T, Sakuma S, Shintaku H, Suzuki T, Tsurusaki Y, Matsumoto N, Seto T.

Genetic Background Identification in Four Children with Intellectual Disability and/or Autism Spectrum Disorder

14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, May 11th, 2017 (Fukuoka, Japan,)

(6) Hikita N, Seto T, Yamashita K, Fujita K, Shintaku H.

The evaluation of severity of aseptic meningitis and the relationship with cerebrospinal cytokines. Pediatric Academic Societies Annual Meeting 2017. 2017. May 6-9. (San Francisco, CA, USA)

(7) Hikita N, Yamashita K, Fujita K, Shintaku H, Seto T. Cerebrospinal fluid neopterin and cytokine analysis in patients with encephalitis or encephalopathy. The 18th Annual Meeting of Infantile Seizure Society International Symposium on Acute Encephalopathy in Infancy

and Its Related Disorders. July 1-3, 2016. (Tokyo, Japan).

(8) Seto T, Yamamoto T, Shintaku H. CASK gene mutation in a family with autism spectrum disorder. The 58th Annual meeting of Japanese society of Child Neurology (English Session), June 3-5, 2016, (Tokyo, Japan).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 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 0 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

該当なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

瀬戸 俊之 (SETO, Toshiyuki)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：60423878

(2) 研究分担者

濱崎 考史 (HAMAZAKI, Takashi)
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40619798

(3) 研究分担者

田中あけみ (TANAKA, Akemi)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：30145776
(2015年急逝のため削除)