

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860037

研究課題名(和文) ncRNA等に着目した神経難病GM2蓄積症 新規発症機構への包括的アプローチ

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of the pathogenic mechanism of GM2 gangliosidosis involving neurological symptoms by focusing on transcriptomes including ncRNA

研究代表者

幾尾 真理子 (IKUO, Mariko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・特任助教

研究者番号：60713401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：GM2蓄積症(HexA酵素を欠損する遺伝性疾患、ex. ザンドホッフ病(SD))では、リソソーム内に基質である糖脂質(GM2等)が蓄積し中枢神経症状を示す。SDマウス脳のアレイ解析を行い発現変動mRNAやmicroRNA等を同定した。SDマウス脳において発現上昇する糖結合性の免疫活性化レクチンXは脳神経細胞プルキンエ細胞に局在した。SDマウスにおけるF4/80高発現型免疫細胞(脳：ミクログリア)の発現上昇臓器である脳・肝臓においてレクチンXの発現も亢進した。改変型HexA酵素をミクログリアに補充するとレクチンXの発現亢進も軽減された。レクチンXは酵素活性と連動する有望なマーカー候補となり得る。

研究成果の概要(英文)：GM2 gangliosidosis (ex. Sandhoff disease (SD)) is caused by genetic mutations in HexA enzyme coding genes. HexA disruption results in lysosomal storage of substrates such as GM2 gangliosides. We performed microarray analysis for SD model mice brain and determined RNA expression profile change. We focused on the up-regulation of A lectin that activates complement pathway. The lectin is localized in Purkinje cells and up-regulated in microglia that belong to F4/80 positive macrophage lineage. The lectin mRNA expression was elaborated in brain and liver of SD mice and not in spleen, kidney nor lung. This pattern was correlated with F4/80 mRNA, but not with CD68, another macrophage marker that also expressed in F4/80 negative macrophage lineage. HexA enzyme replacement for SD microglia cells lowered the lectin mRNA expression. The lectin that expression correlates with HexA expression is a potent biomarker for GM2 gangliosidosis.

研究分野：分子生物学

キーワード：リソソーム病 レクチン ミクログリア

### 1. 研究開始当初の背景

リソソーム(ライソゾーム)病の一種であるザンドホッフ(SD)病及びテイーサックス(TSD)病などの GM2 蓄積症は、β-ヘキソサミニダーゼ A (HexA) を構成する遺伝子の変異に基づく遺伝性疾患である。HexA はリソソーム内において、糖脂質である GM2 の分解を行う。このため GM2 蓄積症ではリソソーム内に基質 GM2 が蓄積し、中枢神経症状を示す。これまでに HexA 酵素の投与や責任遺伝子の導入による治療に関する基礎研究が行われたが、中枢への移行の困難さ、また長期投与に伴う免疫原性の問題が大きな問題となっている。このため発症機構に基づく新規治療法の確立が切望されているが、なぜ GM2 の蓄積が中枢神経症状を導くかは不明である。

所属研究室では以前に、SD モデルマウスの脳におけるケモカイン macrophage inflammatory protein 1a (Mip1a, ccl3)の発現上昇を見出した。また Mip1a の欠損によって GM2 モデルマウスの死亡が遅延することから、GM2 蓄積症の発症における Mip1a の寄与が示唆される。しかしなぜ GM2 の蓄積が Mip1a の発現上昇を導くのか不明である。また Mip1a の欠損マウスが依然として死亡することから、Mip1a 以外の個体死を導く原因があることは明らかである。

### 2. 研究の目的

ザンドホッフ病及びテイーサックス病は、特定疾患として難病指定される遺伝病である。これらはリソソーム酵素 β-ヘキソサミニダーゼ A の活性が低下して、神経系細胞に GM2 ガングリオシド(GM2)が蓄積して中枢神経症状を来す疾患であるが、なぜ GM2 の蓄積が中枢神経症状を導くのか不明である。本研究は GM2 蓄積症における中枢神経障害や個体死等の発症機構の解明をめざす。モデルマウスとその酵素補充治療系および、患者由来 iPS 細胞から分化誘導した培養神経細胞等を用いて、GM2 蓄積症の発症に寄与する因子を網羅的に探索・同定し、発症機構を解明する。本研究成果は新規疾患マーカー及び治療法の開発にも応用可能である。

### 3. 研究の方法

(1) SD モデルマウスの脳から調製した total RNA を用いてマイクロアレイ解析を行い野生型マウスの発現パターンと比較した。  
 (2) SD モデルマウスから確立した培養細胞系に対し、microRNA mimic を導入し細胞の増殖やサイトカイン発現が変動するか検討した。  
 (3) SD モデルマウス臓器から total RNA を抽出し、レクチン X 及びマクロファージマーカー mRNA の発現量について、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法を用いて測定し野生型マウスと比較した。

(4) SD モデルマウスから確立したマイクログリア培養細胞系に対し欠損酵素(改変型酵素 mod2B)を導入した。レクチン X mRNA 発現亢進が mod2B 投与に伴い軽減されるか、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法を用いて測定した。

### 4. 研究成果

(1) SD モデルマウスの脳における、発現変動 RNA の同定

SD モデルマウス脳 total RNA サンプルを用いたマイクロアレイ解析を行い、GM2 の蓄積が見られる 9 日齢、歩行障害の現れる 14 週齢のマウスにおいて 2 倍以上発現が変動する因子を見出した。この結果、Mip1a を含む免疫・炎症関連因子の発現上昇や、シナプス活性制御因子や配列からシナプス活性制御活性を持つと予測される機能未知因子の発現変動、ヒトにおいても保存された機能未知 non-coding RNA の発現変動を観察した。またアルツハイマー病患者脳サンプルのマイクロアレイ解析でも発現の変動が報告されていた因子も存在した(図1)。

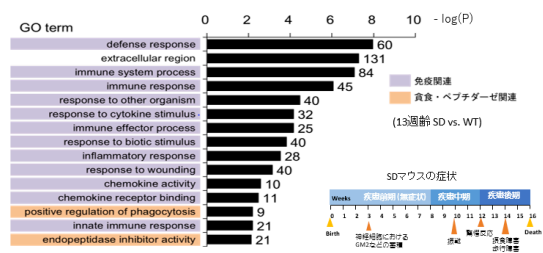


図1 13週齢のSDマウス全脳における網羅的遺伝子発現解析

non-coding RNA の一種である microRNA の発現についてアレイ解析を行ったところ、SD モデルマウスと野生型マウスの脳やモデルマウス由来アストロサイトにおいて、発現量が有意に異なるケモカイン発現制御性の microRNA を見出した。また蓄積物質である糖に結合して免疫を活性化することが知られる補体活性化レクチン X の発現上昇や補体因子の発現上昇を見出した。

これら発現変動因子について、GM2 蓄積症の発症の原因因子・マーカー候補としてさらに検討を続けた。

(2) SD モデルマウス由来アストロサイト・マイクログリアの増殖・サイトカイン発現能に対する microRNA の効果

(1) で見出した microRNA の mimic をアストロサイト及びマイクログリア細胞株に導入したが、増殖能やサイトカインの mRNA 発現量に変化は見られなかった。

以上の結果から microRNA 以外の因子に着目することとした。

(3) 免疫活性化レクチン X の局在解析

GM2 蓄積症において蓄積する糖に結合して免疫を活性化する補体活性化レクチン X 及び補体因子の mRNA 発現が、SD モデルマウス脳において上昇していた。蓄積糖鎖を認識したレクチン X が補体経路を活性化し、糖鎖の蓄積した細胞を異物と誤認識させ、免疫の過剰な活性化が起こる可能性が考えられる。よって以降はレクチン X に着目して研究を行うこととした。SD モデルマウス脳を用いた免疫染色を行ったところ、SD マウス小脳のプルキンエ細胞が染色された。プルキンエ細胞は運動をつかさどる重要な神経細胞であり、GM2 蓄積症において見られる運動障害に関係する可能性がある。遺伝子発現パターンのデータベース Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org/>)においてもレクチン X mRNA のプルキンエ細胞における局在を確認することができた。また SD モデルマウスから樹立した細胞株を用いた発現解析を行ったところ、脳内の免疫細胞であるミクログリア細胞においてレクチン X の mRNA 発現量が増加していることが分かった。

従来のレクチン X 研究から、レクチン X は肝臓の免疫系細胞から産生され、血中に分泌されることがわかっている。脳以外の組織におけるレクチン X の発現について検討したところ、SD モデルマウスの肝臓においてもレクチン X の mRNA 発現上昇が認められた。一方、脾臓、腎臓、肺では有意な変化は観察されなかった。野生型マウスの肝臓におけるレクチン X の産生細胞は F4/80 を高発現する卵黄嚢由来組織マクロファージであるクッパー細胞である。脳内のミクログリアも F4/80 高発現型の卵黄嚢由来細胞である。F4/80 の発現及び F4/80 高・低発現型マクロファージ共に発現するマクロファージマーカー CD68 について、SD マウス各組織（脳・肝・脾・腎・肺）における mRNA 発現を比較した。レクチン X の発現が上昇する脳・肝選択的に F4/80 mRNA の発現が上昇していたのに対し、CD68 の発現は脳・肝に加えて腎・肺においても上昇していた（図 2）。以上の結果から、SD モデルマウスにおいて F4/80 高発現型の卵黄嚢由来マクロファージによるレクチン X 発現が亢進することが示唆される。肝臓以外のレクチン X 産生細胞に関する報告はこれまでなく、脳内ミクログリア細胞によるレクチン X の産生を示した本研究によって、マクロファージの分類とレクチン X の発現の相関を初めて示すことができた。

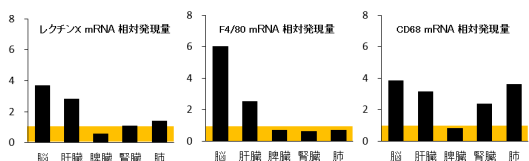


図2 SDモデルマウス臓器におけるレクチンX、F4/80、CD68 mRNA発現量の変動  
レクチンX、F4/80、CD68 mRNAの発現量をリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法を用いて測定した。野生型マウス臓器における発現量を1とした。

#### (4) ミクログリア細胞における欠損酵素とレクチン X 発現の相関

脳内のミクログリア細胞の活性化は、GM2 蓄積症における脳内炎症に強くかかわると考えられている。また (3) においてレクチン X の発現亢進がミクログリア細胞において認められたことから、ミクログリア細胞における欠損酵素とレクチン X 発現の関係について検討した。SD は酵素 HexA の欠損症である。所属研究室では安定性の高い HexA 改変酵素 mod2B を開発し、酵素補充による治療モデルを確立している (Kitakaze K *et al*, *J Clin Invest.* 2016)。ミクログリア培養系に mod2B を添加すると細胞内の HexA 活性が上昇し、糖鎖の蓄積が解消される。このときレクチン X の mRNA 発現を定量すると、mod2B 添加に伴いレクチン X の mRNA 発現が 4 割程度まで減少した（図 3）。以上の結果は、ミクログリア細胞における HexA 発現の減少がレクチン X 発現亢進の原因であることを示唆する。

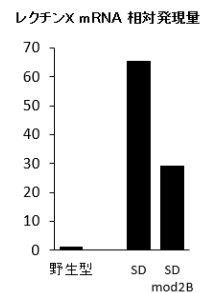


図3 SDモデルマウス脳細胞におけるレクチンX、F4/80、CD68 mRNA発現量の変動  
レクチンX、F4/80、CD68 mRNAの発現量をリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法を用いて測定した。野生型マウス臓器における発現量を1とした。

#### 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1件)

- ① Ling H, Pickard K, Ivan C, Isella C, Ikuo M, Mitter R, Spizzo R, Bullock MD, Braicu C, Pileczki V, Vincent K, Pichler M, Stiegelbauer V, Hoefler G, Almeida MI, Hsiao A, Zhang X, Primrose JN, Packham GK, Liu K, Bojja K, Gafà R, Xiao L, Rossi S, Song JH, Vannini I, Fanini F, Kopetz S, Zweidler-McKay P, Wang X, Ionescu C, Irimie A, Fabbri M, Lanza G, Hamilton SR, Berindan-Neagoe I, Medico E, Mirnezami AH, Calin GA, Nicoloso MS.

The clinical and biological significance of MIR-224 expression in colorectal cancer metastasis.

*Gut.* 2016 Jun;65(6):977-989. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309372. 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 幾尾真理子, 杉崎圭, 伊藤孝司

多発性骨髄腫が分泌する小胞 exosome は、骨芽前駆細胞において骨形成因子 Bone Morphogenetic Protein 2 が誘導する転写因子 Smad による転写活性化を阻害し、骨分化を抑制する  
第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日-27 日、(仙台国際センター／東北大学川内北キャンパス (宮城県・仙台市))

- ② **幾尾真理子**、杉崎圭、伊藤孝司  
多発性骨髄腫による Exosome を介した骨分化抑制機構の発見と解析  
The 8th JARI Annual Meeting/The 3rd JSDV Annual Meeting (日) 第 8 回日本 RNAi 研究会/3 回日本細胞外小胞学会 JSEV、2016 年 8 月 31 日-9 月 2 日 (グランドプリンスホテル広島 (広島県・広島市))
- ③ Kitakaze K, Tasaki C, Mizutani Y, Sugiyama E, **Ikuo M**, Kamiya M, Setou M, Urano Y, Itoh K  
Development of protease-resistant modified human beta-hexosaminidase B and evaluation of intracerebroventricular replacement effects on GM2 gangliosidosis model mice.,  
*The 11th Annual World Symposium 2015*, Orland, Florida, USA, 2015 Feb 9-13
- ④ Ling H, Calin GA, Nicoloso MS, **Ikuo M**  
Biological and clinical significance of miR-224 in colorectal cancer,  
*American Association for Cancer Research 2014 annual meeting*, San Diego, California, USA, 2014 Apr 5-9.
- ⑤ Itou K, Tsuji D, **Ikuo M**, Kitakaze K, Asanuma D, Kamiya M, Urano Y, Sugiyama E, Setou M, Yuzaki M, Sakuraba H  
Molecular therapy, evaluation for neurodegenerative GM2 gangliosidoses,  
*New Frontier of Molecular*

*Neuropathology 2014*, (Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo) 2014 Mar 16-17

[その他]

ホームページ等

研究成果データベース等

- ① researchmap  
[http://researchmap.jp/Mariko\\_Ikuo/](http://researchmap.jp/Mariko_Ikuo/)
- ② ResearchGate  
[https://www.researchgate.net/profile/Mariko\\_Ikuo](https://www.researchgate.net/profile/Mariko_Ikuo)
- ③ LinkedIn  
<https://jp.linkedin.com/in/mariko-ikuo-aa8622b6>
- ④ J-GLOBAL  
<http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201301087893780229>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

幾尾 真理子 (IKUO, Mariko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任助教  
研究者番号 : 60713401