

令和 3 年 7 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10057

研究課題名(和文) ガングリオシドーシスの中枢神経系における炎症のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on the mechanism of inflammation in the CNS of gangliosidosis

研究代表者

山中 正二 (YAMANAKA, Shoji)

横浜市立大学・附属病院・准教授

研究者番号：80264604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ライソソーム病の一つであるサンドホフ病(以下、SD)は先天的にライソソーム酵素である α -ヘキソサミニダーゼA,Bの欠損により、代謝できない糖脂質が中枢神経系に蓄積し、病態の進行を促すと考えられていた。

しかしながら、我々の研究では、SDの病態の進行は糖脂質の中枢神経系への蓄積が全ての原因ではなく、蓄積物が体内で異物と認識され、自己抗体を産生し、自己免疫疾患を引き起こすこと、及び本研究で見出した蓄積物がToll様受容体(TLR)2,4を介して直接アストロサイト等を刺激し、TNF- α 、IL-1 β が産生することにより、中枢神経系での炎症反応が引き起こされ、病態が進行していることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでサンドホフ病を含むGM2ガングリオシドーシスは先天的にライソソーム酵素の欠損により、その代謝物である糖脂質が中枢神経系に蓄積し、どのようなメカニズムで病態を進行させるかは解明されていなかった。本研究の結果、サンドホフ病ではその病態の進行に蓄積物がアストロサイトを直接刺激し、炎症性サイトカインが産生されることによる中枢神経系での炎症反応が深く関与していること見出された。現在遺伝子の欠損病であるサンドホフ病は、根本的な治療法は無く、症状による対症療法のみとなっているが、本研究の結果により、炎症反応を軽減させる事により、病勢の進行を遅らせ、将来的には治療の開発に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Sandhoff disease (SD), which is one of the lysosomal storage diseases, is a pathological condition in which undegraded glycolipids accumulate in the central nervous system(CNS) due to a congenital deficiency of α -hexosaminidases A and B, which reside in lysosome. As a result of accumulation of the undegraded substances, neuronal disturbance progress.

However, in our study, the progression of SD pathology is not only caused by the accumulation of the glycolipids in the CNS, but also caused by the autoantibody formation because the undegraded substances potentially become autoantigen. In addition, the accumulation found in this study directly stimulates astrocytes via Toll-like receptors (TLRs) 2,4, and TNF- α and IL-1 β are produced in the CNS. It was confirmed that an inflammatory reaction was triggered, and the condition progressed.

研究分野：病態病理

キーワード：ガングリオシドーシス サンドホフ病 ライソソーム病 TLR

1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム病のひとつであるガングリオシドーシスは特定疾患に指定された難病のひとつであり、ライソゾーム酵素やその活性化因子および安定化タンパク質等の遺伝的異常、欠損により基質が分解されずにライソゾーム内に蓄積する疾患群である。ガングリオシドーシスのひとつであるサンドホフ病はライソゾーム酵素である β -ヘキササミニダーゼA,Bの欠損により、その基質であるガングリオシドGM2, 糖脂質GA2などが分解されずにライソゾーム内に蓄積し、重篤な神経症状を含むさまざまな症状を呈して死亡する病気である(Yamanaka S. et al. *Nat Genet.* 11(2):170-6. 1995.)。

ライソゾーム病は分解されない基質のライソゾーム内蓄積が一つの特徴であるが、実際に蓄積がどの程度病態に関与するかは不明である。例えばライソゾーム病の代表であるゴーシェ病では神経細胞に基質の蓄積が殆どないにも関わらず、重篤な神経症状を呈する。また正常マウスの骨髄移植を施したサンドホフ病マウス(SDマウス)は神経での蓄積量には変化がないにも関わらず症状や寿命の改善をみているなど必ずしも蓄積が症状に関与しない可能性がある。

近年、Proia R.L.らはSDマウスの中枢神経系では、マクロファージ遊走性ケモカインMacrophage inflammatory protein 1 alpha (Mip-1a)が産生されており、その結果、末梢から誘導されたマクロファージが、TNF-alphaを産生し、アポトーシスや炎症反応を引き起こす事により病態の進行を促進している事を報告したが、Mip-1aの産生機構については解明されていない。一方、Platt F.M.らは、SDマウスの中枢神経系で、Cyclooxygenase-2 (COX-2)やinducible Nitric oxide synthase (iNOS)が高発現を確認し、インドメタシンなどCOX-2インヒビターを投与することにより、SDマウスの神経症状と寿命が改善したことから、炎症反応が病態の進行を促進していると報告している。これらの報告などでは、SDの病態の進行に炎症反応が非常に深く関与していることが報告されているが、その発症機序については未だ解明されていない。

我々はこれまで、SDでは代謝できない過剰に蓄積した糖脂質GM2, GA2が抗原となり、自己免疫疾患を引き起こしていることを見出した(Yamanaka S. et al. *J Clin Invest.* 113:200-8. 2004.)。この研究の中でSDでは自己抗体が病態の進行に深く関連している事を見出す一方、中枢神経系の炎症反応の原因は、自己抗体による抗原抗体反応以外にも原因があることが示唆された。

SDの中枢神経系では、神経細胞がアポトーシス、若しくはネクローシスを引き起こし、著しく脱落していることが知られている。原因としては、蓄積物が神経細胞に毒性を示していると言う「サイコシン説」、物理的に細胞が破壊される「バルーン説」や細胞が機能不全陥るためと言った諸説が考えられているが、その詳細な原因は解明されていない。

高等動物の生体防御機構として、微生物等の感染初期に迅速に免疫応答を行うシステムとして、自然免疫を有していることが知られており、自己免疫疾患等において、炎症性サイトカインの発現の誘導に関与していることが知られている。自然免疫は、マクロファージなど抗原提示細胞により担われており、この微生物等認識に必須の機能分子がToll様受容体(TLR)と呼ばれる一群の膜タンパク質である。現在、TLRsファミリーは10種類同定されており、その中でもグラム陰性菌に共通して存在するリポ多糖を認識する受容体がTLR4、ペプチドグリカン、脂質ペプチド等を認識するのがTLR2であることが知られている。

カンピロバクター・ジュニジュの感染により引き起こされるギランバレー症候群は、その細菌エンベローブのリポオリゴ糖の構造がガングリオシドの疑似分子となり、抗ガングリオシド自己抗体の産生など種々の免疫応答が引き起こされることが知られている。一方、近年、ギランバレー症候群の発症にはTLR4等が関与していることが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、既に*in vitro*の予備実験の段階であるがSDの蓄積した糖脂質GM2, GA2がTLR2, TLR4を介して、グリア細胞等を刺激し炎症性サイトカインTNF- α やIL-1 β の産生を促していることを見出している。そのため、SD細胞及びSDマウスを用いた*in vitro*, *in vivo*の系を用いてTLR2, TLR4を介した炎症反応のシステムを解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) アストロサイトの分離・培養

マウス新生児から脳を取り出し、ラバーポリスマンで粉碎した後、培養液（マクロファージ用無血清培地に10% PBS, 1% S/P+Aを加えたもの）を培養（37°C, 5% CO₂ インキュベーター）する。2日目に非付着細胞を含む上清を吸引除去し、新しい培地を加える。以後2回/週の割合で培養液を交換し、2週間培養し、アストロサイトを分離する。

(2) 神経細胞の分離・培養

生後1日のマウス新生児から脳を取り出し、住友ベークライト株式会社のNever-Cell Culture System/Dissociation Solutionsを用いて、神経細胞を分離・培養した。

(3) アストロサイトへのガングリオシドの添加とシグナルパスウェイの確認

アストロサイトを培養し、2週間後、アストロサイトに分離し、 1×10^5 cells/wellで12wellプレートにまき、1週間培養後、GM2ガングリオシド、GA2ガングリオシド、トータルガングリオシドを50 μ g/mlでマクロファージ用培地に加え、500 μ l/wellで添加する。12時間後、細胞を回収し、Total RNAを抽出した。RT-PCRでcDNAにし、Real-time PCRで炎症性サイトカインの発現をみた。また、ウェスタンブロッティングを行いTLR4のシグナルパスウェイの下流のシグナルを確認した。

4. 研究成果

SDマウスの中枢神経系炎症メカニズム

これまで我々は神経症状が顕著に現れる14週齢SDマウスの中枢神経系において、病態の進行と共に炎症性サイトカインTNF- α , IL-1 β , COX-2, iNOS, MIP-1 α の発現が確認され、且つ関節炎リウマチなどの自己免疫疾患において病変部分で発現が確認されているB細胞遊走性ケモカインCXCL-13、B細胞の分化やIg抗体の産生に関与しているTNFスーパーファミリーの一つBAFF (B cell activating factor)、の発現していることを見出した(図1)。14週齢SDマウスの主に視床部位ではアポトーシスを引き起こした細胞が見られ、更に同部位ではマイクログリアの活性化、アストロサイトの増殖が見られた(図2, 3)。

また、SDマウスのプライマリーの神経細胞をアポトーシスに誘導し、培養液の糖脂質を薄層クロマトグラフィー法を用いて調べた。その結果、アポトーシスを起こした神経細胞から、細胞外に代謝できないGM2, GA2が細胞外に放出されることが確認できた(図4)。ヒトSDでは、血液中などから代謝できないGM2などが検出されることから、同様の事象はヒトでもマウスでも生体内で起きていることが示唆される。

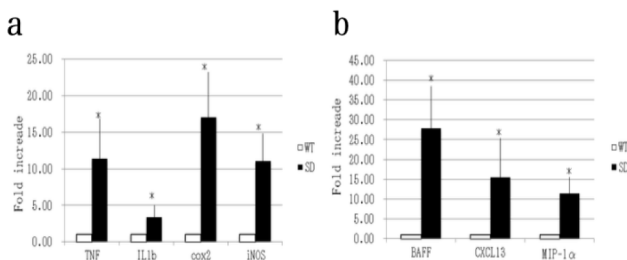


図1 WT, SDマウスの14週齢の脳におけるmRNA

a) TNF- α , IL-1 β , COX2, iNOSの発現量

b) BAFF, CXCL-13, MIP-1 α の発現量

n=5 * $p < 0.05$

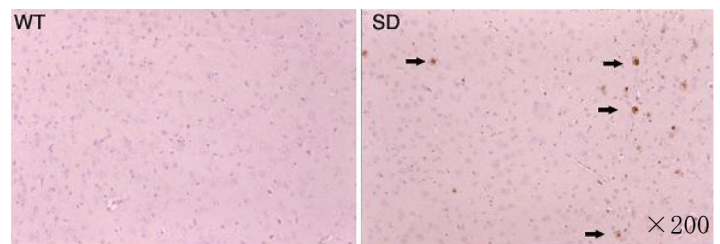


図2 WT, SDマウスの14週齢の視床部位のTUNNEL染色

TUNNEL法によりアポトーシス細胞を検出

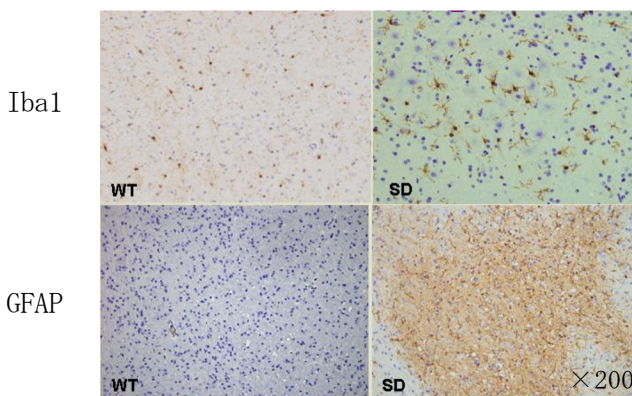


図3 WT, SDマウスの14週齢の視床部位の免疫染色

a) マイクログリアを検出するためIbaI抗体で免疫染色した。

b) アストロサイトを検出するためGFAP抗体で免疫染色した。

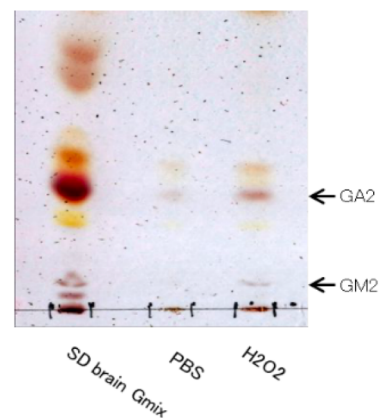


図4 細胞外に放出されたGM2, GA2

薄層クロマトグラフィー法による培養液に流出したGA2, GM2の定性

近年、ガングリオシドがアストロサイトを刺激して、炎症性サイトカインの発現を誘導することが報告されている。これまで我々はSDにおいてもアポトーシスを起こした神経細胞から漏れ出したGM2,GA2が直接アストロサイトを刺激し、炎症反応を誘導していることを調べるた。In vitroでの実験で、プライマリーの培養マイクログリアの培養液にGM2,GA2を添加し、アストロサイトを刺激する事により、炎症性サイトカインの発現を調べた結果、炎症性サイトカインIL1- β 、TNF- α の発現はGM2を添加した群で顕著に増加することを見出した(図5,6)。

本研究では、これらの刺激実験でアストロサイトにおいて、TLR2,4のmRNAの増加、膜状でのTLRの増加を見出し、MAPKカスケードを経由し(図7)、IL1- β 、TNF- α を産生することを確認した。さらに14週齢のSDマウスの中樞神経でもTLR2,4のmRNAの増加が見られた(図8)。

本研究の結果、SDでは、神経細胞がアポトーシスを引き起こすことにより、細胞内に蓄積していたGM2, GA2が細胞外に漏出し、漏出したGM2, GA2がアストロサイトのTLR2, 4を介して刺激されることにより、炎症性サイトカイン、ケモカインを産生することが確認できた。これらのことから、SDにおいて炎症反応を対象にした新たな治療法の開発につながると思われる。

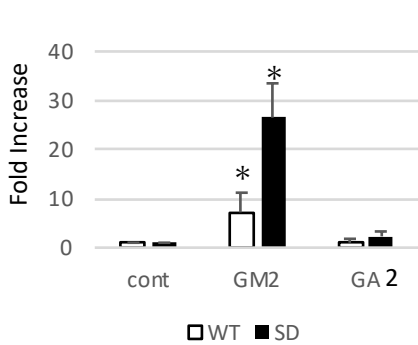


図5 WT, SDマウスのGM2, GA2刺激によるTNF- α の産生
WT, SDマウスのアストロサイトを刺激後TNF- α のmRNA発現量をReal-Time PCRで測定した。
n=8 * $p < 0.05$

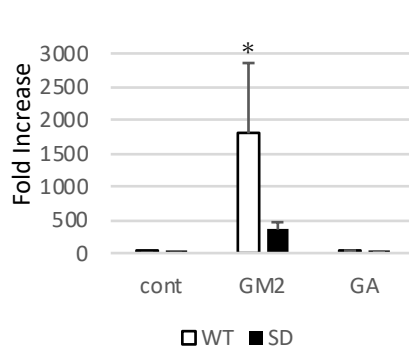


図6 WT, SDマウスのGM2, GA2刺激によるIL-1 β の産生
WT, SDマウスのアストロサイトを刺激後IL-1 β のmRNA発現量をReal-Time PCRで測定した。
n=8 * $p < 0.05$

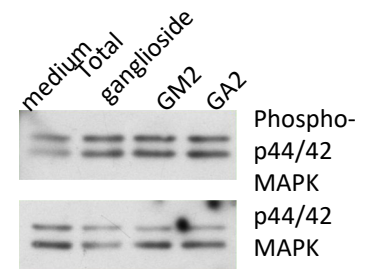


図7 SDマウスのGM2, GA2刺激によるMAPKの活性化
SDマウスのアストロサイトを刺激後p44/42のリン酸化ウエスタンブロットで確認した。

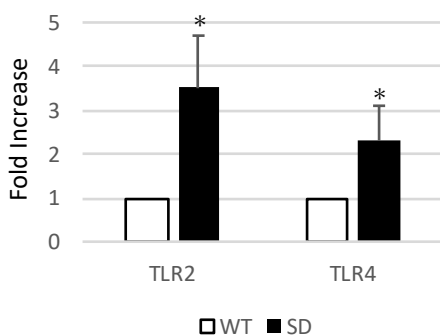


図8 WT, SDマウスの14週齢の脳におけるTLR2, 4の発現量
n=5 * $p < 0.05$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Minamisawa M, Suzumura T, Bose S, Taniyai T, Kawai G, Suzuki K, Yamaguchi A, Yamanaka S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of Yuzu (Citrus junos) Seed Limonoids and Spermine on Intestinal Microbiota and Hypothalamic Tissue in the Sandhoff Disease Mouse Model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Med Sci (Basel).	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medsci9010017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsuchida N, Kunishita Y, Uchiyama Y, Kirino Y, Enaka M, Yamaguchi Y, Taguri M, Yamanaka S, Takase-Minegishi K, Yoshimi R, Fujii S, Nakajima H, Matsumoto N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Pathogenic UBA1 variants associated with VEXAS syndrome in Japanese patients with relapsing polychondritis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Rheum Dis.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2021-220089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imajo K, Tetlow L, Dennis A, Shumbayawonda E, Mouchti S, Kendall TJ, Fryer E, Yamanaka S, Honda Y, Kessoku T, Ogawa Y, Yoneda M, Saito S, Kelly C, Kelly MD, Banerjee R, Nakajima A.	4. 巻 27
2. 論文標題 Quantitative multiparametric magnetic resonance imaging can aid non-alcoholic steatohepatitis diagnosis in a Japanese cohort.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 609-623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v27.i7.609.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miyake Y, Fujii K, Nakamura T, Ikegaya N, Matsushita Y, Gobayashi Y, Iwashita H, Udaka N, Kumagai J, Murata H, Takemoto Y, Yamanaka S, Ichimura K, Tateishi K, Yamamoto T.	4. 巻 80
2. 論文標題 IDH-Mutant Astrocytoma With Chromosome 19q13 Deletion Manifesting as an Oligodendroglioma-Like Morphology.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neuropathol Exp Neurol.	6. 最初と最後の頁 247-253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nlaa161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwai T, Ohashi N, Sugiyama S, Kitajima H, Hirota M, Yamanaka S, Mitsudo K.	4. 巻 37
2. 論文標題 Actinomycotic osteomyelitis with proliferative periostitis arising in the mandibular ramus: an unusual case with spontaneous bone regeneration after coronoidectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Radiol.	6. 最初と最後の頁 137-145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11282-020-00462-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takada K, Aizawa Y, Sano D, Okuda R, Sekine K, Ueno Y, Yamanaka S, Aoyama J, Sato K, Kuwahara T, Hatano T, Takahashi H, Arai Y, Nishimura G, Taniguchi H, Oridate N.	4. 巻 148
2. 論文標題 Establishment of PDX-derived salivary adenoid cystic carcinoma cell lines using organoid culture method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Cancer.	6. 最初と最後の頁 193-202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33315	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto S, Watanabe K, Kobayashi N, Irie K, Yamanaka S, Kaneko T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Pembrolizumab-induced secondary sclerosing cholangitis in a non-small cell lung cancer patient	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respirol Case Rep.	6. 最初と最後の頁 e00560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rcr2.560	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tateishi K, Ikegaya N, Udaka N, Sasame J, Hayashi T, Miyake Y, Okabe T, Minamimoto R, Murata H, Utsunomiya D, Yamanaka S, Yamamoto T	4. 巻 8
2. 論文標題 BRAF V600E mutation mediates FDG-methionine uptake mismatch in polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun.	6. 最初と最後の頁 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-020-01023-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tateishi K, Miyake Y, Kawazu M, Fujii Y, Ryo A, Yamanaka S, Mano H, Cahill DP, Wakimoto H, Chi AS, Batchelor TT, Nagane M, Ichimura K, Yamamoto T et.al.	4. 巻 80
2. 論文標題 A Hyperactive ReIA/p65-Hexokinase 2 Signaling Axis Drives Primary Central Nervous System Lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 5330-5340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejso.2018.10.532	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harada Fumi, Matsuyama Ryusei, Mori Ryutaro, Kumamoto Takafumi, Morioka Daisuke, Taguri Masataka, Yamanaka Shoji, Endo Itaru	4. 巻 45
2. 論文標題 Outcomes of surgery for 2010 WHO classification-based intraductal papillary neoplasm of the bile duct: Case?control study of a single Japanese institution's experience with special attention to mucin expression patterns	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 761-768
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejso.2018.10.532	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Shingo, Hayashi Takuo, Suehara Yoshiyuki, Hamanoue Haruka, Yamanaka Shoji, Ichikawa Yasushi, Higurashi Takuma, Ohashi Kenichi, Yamaguchi Shigeo, Nozaki Yumi, Terao Yasuhisa, Saito Tsuyoshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Multicenter experience with large panel next-generation sequencing in patients with advanced solid cancers in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 174-182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyy173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura T, Fukuoka K, Nakano Y, Yamasaki K, Matsushita Y, Yamashita S, Ikeda J, Udaka N, Tanoshima R, Shiba N, Tateishi K, Yamanaka S, Yamamoto T, Hirato J, Ichimura K.	4. 巻 110
2. 論文標題 Genome-wide DNA Methylation Profiling Shows Molecular Heterogeneity of Anaplastic Pleomorphic Xanthoastrocytoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 828-832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13903.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Yuri, Kubota Kensuke, Takayanagi Takuya, Kurita Yusuke, Ishii Ken, Hasegawa Sho, Iwasaki Akito, Sato Takamitsu, Fujita Yuji, Kato Shingo, Kagawa Koichi, Watanabe Seitaro, Sekino Yusuke, Hosono Kunihiro, Matsuhashi Nobuyuki, Yamanaka Shoji, Iwao Toshiyasu, Yoshida Koji, Nakajima Atsushi	4. 巻 31
2. 論文標題 Clinical features of isolated proximal type immunoglobulin G4 related sclerosing cholangitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	6. 最初と最後の頁 422-430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.13320.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Y, Irisa M, Sano T, Yanagi Y, Furusawa E, Saito T, Yamanaka S, Itoh K, Sakuraba H, Oishi K	4. 巻 29
2. 論文標題 Improvement in dysmyelination by the inhibition of microglial activation in a mouse model of Sandhoff disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroreport	6. 最初と最後の頁 962-967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNR.0000000000001060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Y, Sano T, Irisa M, Kodama T, Saito T, Furusawa E, Kaizu K, Yanagi Y, Tsukimura T, Togawa T, Yamanaka S, K, Sakuraba H, Oishi K.	4. 巻 7
2. 論文標題 FcR γ -dependent immune activation initiates astrogliosis during the asymptomatic phase of Sandhoff disease model mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 40518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep40518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山口 章 (Yamaguchi Akira) (20381585)	横浜市立大学・医学研究科・客員講師 (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------