

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390299

研究課題名 (和文) 細胞膜異常とオートファジーに注目したライソゾーム病の中枢神経変性メカニズムの解明

研究課題名 (英文) The mechanism of the central nervous system degeneration on lysosomal storage diseases: abnormality of cell membrane and autophagy

研究代表者

難波 栄二 (NANBA EIJI)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・教授

研究者番号：40237631

研究成果の概要：

GM1-ガングリオシドーシスはライソゾーム酵素 $\beta$ -ガラクトシダーゼの遺伝的欠損によりおこるライソゾーム病で、小児期に進行性の中枢神経症状を発症する疾患である。本研究で、患者培養細胞およびモデルマウスを用いた解析により、神経細胞膜シグナル (神経栄養因子受容体シグナル) 異常とオートファジー機能異常を明らかにし、神経変性との関連性を明らかにした。これらの成果は、本疾患の発症メカニズムのみならず分子標的治療に向けた新たな視点となる。

交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2006 年度 | 5,200,000  | 1,560,000 | 6,760,000  |
| 2007 年度 | 4,900,000  | 1,470,000 | 6,370,000  |
| 2008 年度 | 4,900,000  | 1,470,000 | 6,370,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 15,000,000 | 4,500,000 | 19,500,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児神経学、脂質、糖鎖、シグナル伝達、神経変性、オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

先天代謝異常症であるライソゾーム病の多くの原因は解明されてきており、酵素補充療法や骨髄移植療法が臨床応用され、遺伝子治療の研究も進められている。しかし、これらの方法は中枢神経障害には効果が少なく、新しい治療法の開発が重要な課題となっている。GM1-ガングリオシドーシスは、進行性の中枢神経障害を呈する疾患であり、ライソゾーム内の酵素の1つである $\beta$ -ガラクトシダーゼが欠損するために発症する。この、 $\beta$ -ガラクトシダーゼは糖脂質の末端 $\beta$ -ガラクトース結合を加水分解する酵素で、欠損すること

により GM1-ガングリオシドなどの糖脂質をはじめ糖蛋白、オリゴ糖などが細胞内に蓄積する。本疾患に関しては、酵素や遺伝子異常の研究が行われてきたが、その治療は困難であった。このような状況に対して、我々はこれまでに本疾患の脳障害に対する新しい治療法であるケミカルシャペロン法の開発研究を行ってきた (科学研究費補助金基盤研究 (B) 「先天代謝異常症の中枢神経障害に対する新しい治療法の開発と臨床応用の研究」平成 13 年度～平成 15 年度)。これらの研究により、疾患細胞やモデルマウスの脳病変に対し、我々の開発したこのケミカルシャペロン

法が有効であることを示してきた。しかし、本疾患の中樞神経障害のメカニズムは未だ不明な部分が多く、このメカニズムを詳細に検討することにより、新たな治療法などの開発を行うことが重要であった。近年、ライソゾーム病に関してはオートファジーの異常に注目が集まっていた。

## 2. 研究の目的

ガングリオシドは神経組織に特に豊富に分布しており、ライソゾーム内の蓄積が他の脂質代謝や細胞内輸送、またはシグナル伝達系に影響を引き起こす可能性が示唆されている。また、GM1-ガングリオシドはコレステロールやスフィンゴミエリンなどとともに関与し、神経細胞膜脂質ラフトに豊富に存在し、神経細胞の維持、分化などさまざまなシグナル伝達経路に重要な機能を持っている事が知られている。一方、オートファジーは細胞の重要な分解系であり、細胞質の一部を取り込み、ライソゾームと融合することによって、取り込んだ内容をライソゾーム内の加水分解酵素で分解する機構である。このように、ライソゾーム機能が重要なオートファジーはライソゾーム病とどのような関係があるかが注目される。そこで、本研究では GM1-ガングリオシドーシスの神経変性の分子メカニズムを解明することを目的とし、神経細胞膜機能異常とオートファジー機能異常に注目し、神経細胞傷害に関連するシグナル伝達異常の解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経栄養因子受容体シグナル解析

GM1-ガングリオシドーシスノックアウトマウスならびに対象マウスの新生児の小脳顆粒細胞ならびに大脳アルトサイトを分離し、初代神経細胞として培養を行い、実験材料として用いた。神経栄養因子受容体 Trk の解析には、抗 TrkA、抗 TrkB、抗リン酸化 Trk、抗リン酸化チロシン、抗 PLC $\gamma$ 、抗リン酸化 PLC $\gamma$ 抗体を用い、小胞体ストレスの解析には抗 Bip/GRP-78 抗体を用い、オートファジー解析には抗 LC3、抗 Beclin-1 抗体を用い、それぞれウェスタンブロット法、免疫沈降法および免疫蛍光染色により解析を行った。

し、恒常的なオートファゴソーム形成の亢進 (Beclin-1 の発現上昇) およびミトコンドリアシトクロム c 酸化酵素活性の低下を引き起こしていることが明らかになった。

また、モデルマウ

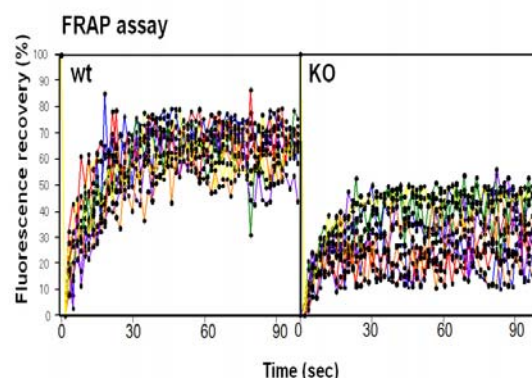
### (2) オートファジー解析

生後 4 日齢のマウス大脳組織よりアストロサイトを分離し、初代神経細胞として培養を

行いオートファジー解析に用いた。免疫蛍光染色にはマウス脳凍結切片を用いた。オートファジー形成に関しては抗 LC3、抗 Beclin-1 抗体を用い、Akt-mTOR シグナル経路に関しては抗 Akt、Erk、mTOR、S6 抗体およびリン酸化抗体などを用いて、ウェスタンブロット法により蛋白の定量を行った。ミトコンドリア機能は Cytochrome C oxidase 活性測定および、MitoTracker-JC-1 を用いて解析を行った。

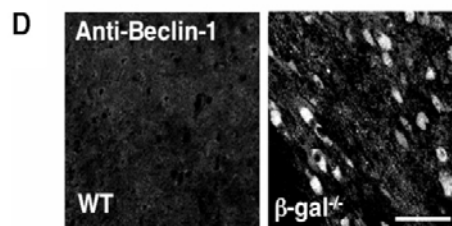
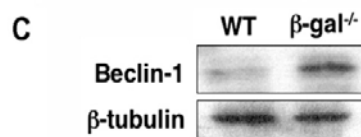
## 4. 研究成果

(1) GM1-ガングリオシドーシスモデルマウス脳由来初代培養神経細胞で、細胞膜の GM1 は不均一な分布を示し、その膜の流動性が低下している知見を得た。

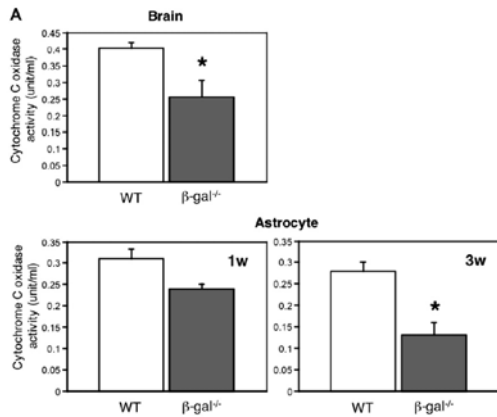


脂質ラフトに蓄積した GM1 は神経栄養因子受容体 Trk と相互作用し、Trk のリン酸化および下流シグナルの過剰な活性化を引き起こしていた。脳組織染色の結果、リン酸化 Trk は GM1 蓄積神経細胞内でエンドソーム分画に蓄積し、ユビキチン化されていた。

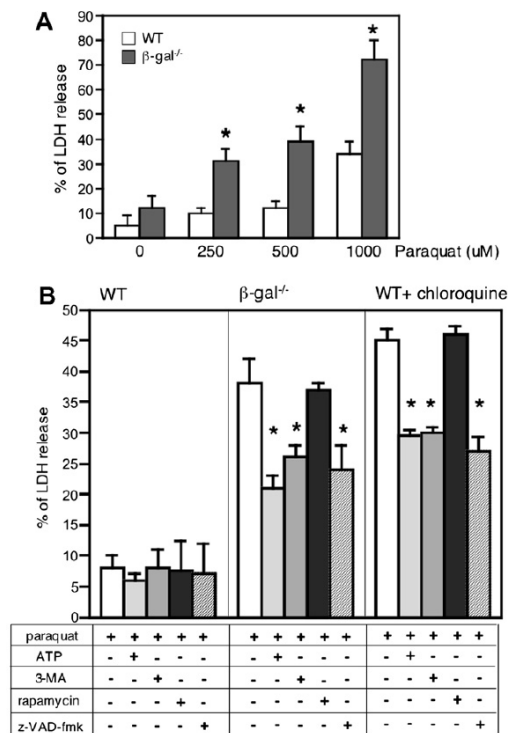
(2) モデルマウス脳において GM1 の蓄積がライソゾームとオートファゴソームとの融合異常を引き起こし、恒常的なオートファゴソーム形成の亢進 (Beclin-1 の発現上昇) が認められた。



そして、ミトコンドリアシトクロム c 酸化酵素活性の低下を引き起こしていることが明らかになった。



また、モデルマウス大脳由来培養アストロサイトはミトコンドリアの形態異常、酸化ストレス誘導剤に対する高感受性を示し、オートファジー抑制剤または ATP 添加により抑制された。



今回の知見は、オートファジー機能異常から起こるミトコンドリア機能不全が神経細胞障害を引き起こすことを示すものである。さらに、他のライソゾーム病であるニーマン・ピック病 C 型とムコリピドーシス II/III 型細胞でも同様のオートファジー異常を見出した

まとめと今後の展開

今回の研究で、GM1-ガングリオシドーシ

スをはじめライソゾーム病の病態には、オートファジーの異常が重要であることが明らかになった。今後は、マイロアレイ解析による網羅的な発現解析などの手法も取り入れ、さらに詳細なシグナル伝達系の検討を行い、オートファジーによる神経細胞障害の機序を明らかにし、その機序に対する新たな治療法の開発を行ってゆく予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件) (すべて査読有)

1) Sawada T, Tanaka A, Higaki K, Takamura A, Nanba E, Seto T, Maeda M, Yamaguchi E, Matsuda J, Yamano T, Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis. *Brain Dev.* 2008, Dec 30. [Epub ahead of print].

2) Bahrudin U, Morisaki H, Morisaki T, Ninomiya H, Higaki K, Nanba E, Igawa O, Takashima S, Mizuta E, Miake J, Yamamoto Y, Shirayoshi Y, Kitakaze M, Carrier L, Hisatome I, Ubiquitin-protease system impairment caused by a missense cardiac myosin-binding protein C mutation and associated with cardiac dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Mol. Biol.* 2008, 384, 896-907.

3) Suzuki C, Watanabe M, Tomiyama M, Sugimoto K, Nanba E, Jackson M, Kimura T, Seino Y, Wakasaya Y, Kawarabayashi T, Miki Y, Yamamoto-Watanabe Y, Shoji M, A novel mutation in the arylsulfatase A gene associated with adult-onset metachromatic leukodystrophy without clinical evidence of neuropathy. *Eur. Neurol.* 2008, 60, 310-311.

4) Gucev ZS, Tasic V, Jancevska A, Zafirovski G, Kremensky I, Sinigerska I, Nanba E, Higaki K, Gucev F, Suzuki Y, Novel beta-galactosidase gene mutation p.W273R in a woman with mucopolysaccharidosis type IVB (Morquio B) and lack of response to in vitro chaperone treatment of her skin fibroblasts. *Am. J. Med. Genet.* 2008, 146A, 1736-1740.

5) Matsumoto M, Gondo K, Kukita J, Higaki K, Paraguisson RC, Nanba E, A case of galactosialidosis with a homozygous Q49R point mutation. *Brain Dev.* 2008, 30, 595-598.

6) Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E, Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine GM1-gangliosidosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008, 367, 616-622.

7) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Ohkubo M, Watanabe H, Iwasaki H, Matsuda J, Noguchi Y, Takimoto K, Itoh M, Tabe M, Iida M, Kubo T, Ogawa S, Nanba E, Higaki K, Ohno K, Brady RO, Chemical chaperone therapy: clinical effect in murine GM1-gangliosidosis. Ann. Neurol. 2007, 62, 671-675.

8) Floricel F, Higaki K, Maki H, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K, Antisense suppression of TSC1 gene product, hamartin, enhances neurite outgrowth in NGF-treated PC12h cells. Brain Dev. 2007, 29, 502-509.

9) Yasui S, Tsuzaki K, Ninomiya H, Floricel F, Asano Y, Maki H, Takamura A, Nanba E, Higaki K, Ohno K, The TSC1 gene product hamartin interacts with NADE. Mol. Cell. Neurosci. 35, 100-108.

10) Paraguisson RC, Higaki K, Yamamoto K, Matsumoto H, Sasaki T, Kato N, Nanba E, Enhanced autophagic cell death in expanded polyhistidine variants of HOXA1 reduces PBX1-coupled transcription activity and inhibits neuronal differentiation. J. Neurosci. Res. 2007, 85, 479-487.

11) Iwasaki H, Watanabe H, Iida M, Ogawa S, Tabe M, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y, Fibroblast screening for chemical chaperone therapy in beta-galactosidosis. Brain Dev. 2006, 28, 482-486.

[学会発表] (計 21 件)

1) 難波栄二、檜垣克美 : GM1-ガングリオシドーシスとオートファジー機能異常. 第 50 回日本小児神経学総会、東京、2008. 5. 28-31

2) 難波栄二、檜垣克美、足立香織、李林静、飯田真巳、松田潤一郎、鈴木義之 : ヒト・ $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異とケミカルシャペロン療法. 第 53 回日本人類遺伝学会、横浜、2008. 9. 27-30

3) 難波栄二 : ライソゾーム病の中樞神経症状の治療. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会、米子、2008. 11. 6-8

4) 李林静、檜垣克美、高村歩美、飯田真巳、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二 :  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスにおける神経細胞膜機能異常と Trk シグナルの亢進. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会、米子、2008. 11. 6-8

5) 檜垣克美、高村歩美、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二 :  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスモデルマウスにおけるオートファジーの異常. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会、米子、2008. 11. 6-8

6) 池端宏記、檜垣克美、李林静、飯田真巳、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二 :  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異とケミカルシャペロン療法. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会、米子、2008. 11. 6-8

7) 檜垣克美、李林静、高村歩美、鈴木義之、難波栄二 : ライソゾーム病神経変性とオートファジーの異常. 第 13 回日本ライソゾーム病研究会、東京、2008. 11. 24-25

8) 難波栄二、檜垣克美 : DNA マイクロアレイを用いた  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシス神経変性機構の解明. 第 49 回日本小児神経学総会、大阪、2007. 7. 5-7

9) 澤田智、田中あけみ、瀬戸俊之、松田潤一郎、難波栄二、山野恒一 : ライソゾーム病の脳内病変に対する細胞治療. 第 49 回日本小児神経学総会、大阪、2007. 7. 5-7

10) 高村歩美、檜垣克美、松田潤一郎、飯田真巳、鈴木義之、難波栄二 :  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ欠損症の神経変性における Trk 受容体の機能異常. 第 30 回神経科学大会、横浜、2007. 9. 10-12

11) 檜垣克美、高村歩美、梶卷賢哉、飯田真巳、鈴木義之、難波栄二 :  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスに対するケミカルシャペロン療法のマウスモデル細胞を用いた解析. 第 49 回日本先天代謝異常学会総会、山形 2007. 11. 15-17

12) 澤田智、田中あけみ、瀬戸俊之、前田光代、高村歩美、檜垣克美、難波栄二、松田潤一郎、山口悦子、山野恒一 : 細胞移植によるライソゾーム病脳病変の長期治療の可能性についての検討. 第 49 回日本先天代謝異常学会総会、山形 2007. 11. 15-17

13) 一ノ宮悟史、黒澤美枝子、飯田真巳、檜垣克美、鈴木義之 :  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシ

スモデルマウスに対するケミカルシャペロン療法  
の臨床効果. 第 49 回日本先天代謝異常  
学会総会、山形 2007. 11. 15-17

14) Higaki K, Takamura A, Suzuki Y, Nanba E: Lysosomal storage and enhanced signaling of Trk receptors in the neurons of  $G_{M1}$ -gangliosidosis mouse brain. International Symposium of Lysosomal Storage Diseases. Tokyo, 2007. 12. 1

15) 高村歩美、檜垣克美、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二:  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシス神経変性におけるTrk受容体の機能異常. 第 29 回日本神経科学大会、京都、2006. 7. 19-21

16) Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E. Impairment of Trk signaling in  $G_{M1}$ -gangliosidosis mice brains. The 10<sup>th</sup> International Congress of Inborn Errors of Metabolism, (ICIM), Chiba, Japan, 2006. 9. 12-17

17) Higaki K, Takamura A, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Iwasaki H, Suzuki Y, Nanba E. Analysis of the effect of chemical chaperone on human mutant  $\alpha$ -galactosidase expressing mouse cells. The 10<sup>th</sup> International Congress of Inborn Errors of Metabolism, (ICIM), Chiba, Japan, 2006. 9. 12-17

18) Sawada T, Tanaka A, Seto T, Maeda M, Jikihara I, Yamaguchi E, Matsuda J, Nanba E, Yamano T. Cell therapy for the brain involvement in lysosomal storage disease. The 10<sup>th</sup> International Congress of Inborn Errors of Metabolism, (ICIM), Chiba, Japan, 2006. 9. 12-17

19) 檜垣克美、高村歩美、山本浩一、飯田真巳、小川誠一郎、岩崎浩之、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二:  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ欠損症遺伝子変異とケミカルシャペロン療法  
の検討. 第 51 回日本人類遺伝学会大会、米子、2006. 10. 17-20

20) 澤田智、田中あけみ、前田光代、直原育久代、瀬戸俊之、松田潤一郎、國枝孝典、高野薫、難波栄二、檜垣克美、高村歩美、山口悦子、山野恒一: ライソゾーム病の脳病変に対する細胞治療. 第 51 回日本人類遺伝学会大会、米子、2006. 10. 17-20

21) 野中和香子、檜垣克美、高村歩美、飯田真巳、小川誠一郎、岩崎浩之、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二:  $G_{M1}$ -ガングリオシドー

シスに対するケミカルシャペロン療法の分子解析. 第 12 回日本ライソゾーム病研究会、東京、2006. 11. 24-25

〔図書〕 (計 3 件)

1) Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Higaki K, Oshima A,  $\alpha$ -Galactosidase deficiency ( $\alpha$ -galactosidosis)  $\alpha$ -Galactosidosis and Morquio B disease. Valle D, Beudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SF, Ballabio A (eds): The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. MacGraw-Hill, New York, Chap 151, pp1-101, 2008

2) 檜垣克美, 難波栄二: アストロサイトのオートファジーとmTOR. 生体の科学 59: 522-527, 2008

3) 難波栄二, 檜垣克美, Udin Bahrudin: 遺伝子診断の実際. 小児科診断 69: 1621-1626, 2006

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)  
該当なし

○取得状況 (計 0 件)  
該当なし

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

難波 栄二 (NANBA EIJI)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・教授  
研究者番号: 40237631

### (2) 研究分担者

檜垣 克美 (HIGAKI KATUMI)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・准教授

研究者番号: 90294321

### (3) 連携研究者

なし