

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06914

研究課題名（和文）ザンドホッフ病におけるアストロサイトを標的とした新規治療薬の創出

研究課題名（英文）Creation of Novel Therapeutics Targeting Astrocytes in Sandhoff's Disease

研究代表者

小川 泰弘（Ogawa, Yasuhiro）

明治薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00531948

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、脳炎症動物モデルとしてザンドホッフ病モデルマウスを解析した。また、培養アストロサイトに対して炎症性サイトカイン（IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$ ）を添加し様々なタンパク質の発現や薬物のスクリーニングの解析を行った。

炎症性サイトカインによって培養アストロサイトを刺激すると、活性化アストロサイトに発現するマーカータンパク質に加え、新規に発現変化するタンパク質を同定した。その変化は、ザンドホッフ病モデルマウスにおいても同様であった。次にアストロサイトの炎症性サイトカインによる活性化制御を解析する目的でNF- $\kappa$ Bの活性化の増減を指標に薬物のスクリーニングを行った。その結果、各種候補分子が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳炎症において、アストロサイトの活性化を含むグリオシスは、新規の治療標的になりうることを示されてきた。本研究で標的としているザンドホッフ病は希少疾患であり、ヒトでの研究成果は極めて乏しい。そのため、ヒトでの疾患を良く反映し脳全体にグリオシスを示すザンドホッフ病モデルマウスや、培養アストロサイトを利用し解析した。本研究成果において、活性化アストロサイトで増加する新規のタンパク質を同定し、さらにグリアを作用標的とした候補分子を得たことは、脳炎症を伴う神経系疾患の治療標的創出の一助となりうる。

研究成果の概要（英文）：In this study, Sandhoff disease model mice were investigated as an animal model of encephalitis. In addition, inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ ) were added to cultured astrocytes to analyze expression of various proteins and drug screening.

When cultured astrocytes were stimulated by inflammatory cytokines, we identified novel proteins that were altered in addition to marker proteins expressed in activated astrocytes. The changes were similar in a mouse model of Sandhoff's disease. Next, to analyze the regulation of astrocyte activation by inflammatory cytokines, I screened for drugs using the increase or decrease of NF- $\kappa$ B signal as an indicator. As a result, various candidate molecules were obtained.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ザンドホッフ病 活性化アストロサイト 脳炎症 リソソーム病

## 1. 研究開始当初の背景

ザンドホッフ病 (SD) は、*hexosaminidase B (HEXB)* 遺伝子の変異により、酵素活性が欠損する結果、その基質である GM2 等の ganglioside が神経系に蓄積し、神経変性を起こす先天性脂質代謝異常による神経系疾患である。その症状は、精神発達遅延や退行、認知障害、運動失調、痙攣などを示す。治療方法は確立しておらず、対症療法が行われている。

SD モデルマウスである *Hexb* 欠損マウス (*Hexb*K0) は、中枢神経系の各部位に GM2 ganglioside の蓄積が起こる結果、生後 10~12 週齢頃から運動失調を発症し、16~18 週齢頃に死亡する。申請者が無症状期での異常を検討したところ、4 週齢の *Hexb*K0 マウスにおいて既にミクログリアの活性化とアストログリオシスが増加していること、早期からの免疫抑制剤の投与が、活性化ミクログリア / アストログリオシスに対して抑制効果があり、運動機能不全の改善にも効果があることを示した。さらに 3~4 週齢の *Hexb*K0 マウスにおいて、ミエリン低形成がおこっていることを発見し、免疫系の抑制によりミエリン低形成が改善されることを示した。しかしながら、*Hexb*K0 マウスにおいて、4 週齢の早期からグリオシスが観察されているにもかかわらず運動機能不全などの機能障害が現れるのが 10 週齢以降であることから、この時期に大きな変化があると予想された。そこで、アストロサイトの活性化を詳細に解析した所、10 週齢の発症初期に、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一つであるアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体が、大脳皮質及び海馬で活性化アストロサイト特異的に高発現してくることを発見した。さらに、A<sub>2A</sub> 受容体遮断薬であるイストラディフェリンを *Hexb*K0 マウスに投与し解析した結果、炎症性サイトカインやケモカインなどの発現増強が減少すること、活性化ミクログリアの数が減少すること、また、運動機能不全の改善にも効果があることを明らかにした。これにより、活性化アストロサイトに発現するタンパク質は、脳機能を改善することができる治療標的となりうると思われる。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、*Hexb*K0 マウス脳や培養アストロサイトの刺激を用いて活性化アストロサイトの機能の解明を行うことを目的とした。ザンドホッフ病研究において、発症期での対症療法や酵素補充療法、遺伝子治療が着目されている。申請者は、この疾患に対して、生後の発達時期から見られるグリア細胞の初期~長期に渡る脳炎症の抑制が、治療標的になることを独自に報告してきた。しかしながら、脳炎症時のアストロサイトの機能的変化は未だ不明であり、アストロサイトの活性化制御は、脳炎症時における重篤化の阻止や遅延に効果があると期待される。そのため、本研究課題では、「正常状態のアストロサイト、発症期の GFAP 強陽性アストロサイトでの受容体やイオンチャネルなどのタンパク質の発現変化とそれらの脳への影響」を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

15 週齢ザンドホッフ病モデルマウス (*Hexb*K0 マウス) とコントロールマウス (*Hexb*K0 マウス) の大脳皮質より total RNA を調整し定量 PCR 法により各種発現上昇する遺伝子を解析した。また同様のマウスを用いて灌流固定後、脳を取り出して凍結組織切片を作成し、免疫組織染色法により発現変化するタンパク質を解析した。

生後 0~1 日齢の正常マウス (C57BL/6) も大脳皮質を摘出し、培養アストロサイトを調整した。これに対して炎症性サイトカイン (IL-1、TNF-) を添加 / 非添加し 2 日間培養を続けることにより活性化アストロサイト群とコントロール群を調整した。それぞれの状態の培養アストロサイトにおいて total RNA とタンパク質を調整し、total RNA に関しては定量 PCR 法によりタンパク質に関しては質量分析法により発現変化する候補分子を解析した。

IL-1 シグナル伝達経路を可視化し、これを指標に薬物 (Tocriscreen; 1280 種の薬物) のスクリーニングをする目的で、NF- $\kappa$ B シグナル応答配列に GFP を導入したアデノウイルスを構築した。これを上述の培養アストロサイトに添加し遺伝子導入を行った。これに対して各薬物を 10  $\mu$ M 添加し、続いて炎症性サイトカイン (IL-1、TNF-) を添加し培養を 2 日間行った。その後、In Cell analyzer 2200 を用いて GFP の蛍光強度と DAPI 染色による核を画像データを取得し、薬物による NF- $\kappa$ B シグナルによる炎症応答の増減と核による生存への影響を解析した。

## 4. 研究成果

- (1) 15 週齢ザンドホッフ病モデルマウスにおいてアストロサイトの活性化状態を検討する目的で定量 PCR 法により解析したところ、活性化アストロサイトマーカー (stemp4、Serpig1、PTX3、Ilgp1 など) の発現上昇が示された。そのため、確かにザンドホッフ病モデルにおいてアストロサイトは活性化状態にあることを確認した。
- (2) 培養条件下で活性化アストロサイトを誘導する目的で、初代培養アストロサイトに対して、炎症性サイトカイン刺激を行い定量 PCR 法によりその活性化状態を解析したところ、活性化アストロサイトマーカーの発現上昇 (stemp4、ptx3、serpig1 など) が示された。また、IL1 の下流のシグナル分子である MYD88-K0 マウス由来培養アストロサイトにお

る炎症性サイトカインによる活性化において、これらの発現上昇は抑制された。そのため、培養アストロサイトにおける炎症性サイトカイン刺激でも確かに活性化状態を誘導できることを確認した。

- (3) 新規標的候補分子を解析する目的で、(2)のアストロサイトの活性化条件下とコントロール群とのタンパク質の発現変化を質量分析法により解析した。その結果、発現上昇してくる候補分子となる各種タンパク質(C3、galectin9、VCAM-1、IFITM3、MYDGF、ICAM1、MANF、CD14、ABCF1など)を得た。
- (4) 新規標的候補分子が培養アストロサイトにおいて炎症性サイトカイン刺激により誘導させるかを定量PCR法により解析したところ、各種タンパク質(galectin9、VCAM-1、IFITM3、MYDGF、ICAM1、MANF、CD14、ABCF1など)の発現上昇の確認が示された。
- (5) これらの候補分子がザンドホッフ病モデルマウスにおいて発現上昇するのかを解析する目的で、定量PCR法により解析したところ、15週齢マウスにおいて上記の各種タンパク質の発現上昇が確認された。さらに免疫組織染色法により確認したところ、GFAP強陽性アストロサイトと候補分子であるIFITM3の共局在が確認された。ザンドホッフ病モデルマウスにおいて、IFITM3が活性化アストロサイトでの機能分子であることが示唆された。
- (6) 上述のようにIL-1による主要なシグナル伝達経路にMyd88-NF $\kappa$ B経路がある。そこで、この経路を可視化しスクリーニングする目的でNF $\kappa$ Bシグナル応答配列にGFPを導入したアデノウイルスを構築した。これにより培養アストロサイトに遺伝子導入を行うことで、サイトカイン刺激によるGFPの発現強度の増強を確認したところ、炎症性サイトカイン刺激に対してGFPの発現増強が確認された。
- (7) 上述(6)において薬物(Tocriscreen; 1280種の薬物)のハイスループットスクリーニングを行う目的で、GFPの蛍光強度をIn Cell analyzer 2200で解析する方法を構築した。これを利用し、炎症性サイトカイン刺激によるGFPシグナルの増加が各薬物の添加によって増強または抑制するかを解析した。その結果、増強しているものに、(S)-(-)-HA-966(線条体におけるドーパミン作動性メカニズム阻害)、1-Acetyl-4-methylpiperazine hydrochloride(ニコチン受容体アゴニスト)、(RS)-Atenolol(アドレナリン受容体遮断薬)、DPCPX(アデノシンA1受容体アンタゴニスト)、Cinanserin hydrochloride(5-HT2受容体アンタゴニスト)などが、減少してくるものにGBR 13069 dihydrochloride及びGBR 12909 dihydrochloride(ドーパミン取り込み阻害剤)、Benzoquinonium dibromide(ニコチン受容体アンタゴニスト)などが候補分子として確認された。

以上の結果より、ザンドホッフ病モデルマウスでの活性化アストロサイトや炎症性サイトカイン刺激による培養アストロサイトの活性化において、IFITM3は活性化状態にあるアストロサイトに対してなんらかの機能を有しており、これが新規標的分子となりうる可能性が示唆された。また、同様にニコチン性アセチルコリン受容体やドーパミントランスポーターがアストロサイトの活性化状態を制御していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogawa Yasuhiro, Sakuraba Hitoshi, Oishi Kazuhiko	4. 巻 156
2. 論文標題 Glial cells and pharmacological targets in Sandhoff disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 235 ~ 238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.21026	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川泰弘
2. 発表標題 1. ザンドホッフ病モデルマウスでのアストロサイトに発現するA2A受容体の抑制はミクログリアの活性化を抑制する
3. 学会等名 NEURO2019（第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学学会大会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川泰弘
2. 発表標題 Sandhoff病の病態とグリア細胞、その創薬薬理
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------