

機関番号：15101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790728

研究課題名 (和文) マイクロアレイ解析を用いたライソゾーム病神経変成に対する新規分子標的療法の開発

研究課題名 (英文) Microarray analysis and development of a novel molecular targeted therapy for neurodegenerative lysosomal storage diseases.

研究代表者

檜垣 克美 (HIGAKI KATSUMI)

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

研究成果の概要 (和文)：遺伝性ライソゾーム病である GM1-ガングリオシドーシスモデルマウス脳組織を用いたマイクロアレイ解析を行い、正常マウス脳に比べ、脳病変に伴い発現の変動が見られた遺伝子群の同定を行った。結果、蛋白質分解系や炎症系などの遺伝子機能パスウェイと病態との関連性が示された。また、これらの分子は将来的な分子標的療法の開発へ繋がるもの考えた。

研究成果の概要 (英文)：GM1-gangliosidosis is a lysosomal lipid storage disorders. Microarray analysis using the brain of model mice revealed that expression levels of gene related to the intracellular protein degradation and inflammation was changed when compared to the normal mice. These data would be beneficial for the future development of a novel molecular targeted therapy for the brain pathology of this disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ライソゾーム病、小児神経疾患、脂質代謝異常、シグナル伝達、マイクロアレイ、疾患モデルマウス、治療法開発

## 1. 研究開始当初の背景

先天性代謝異常症であるライソゾーム病は、細胞内ライソゾーム加水分解酵素の遺伝的欠損による疾患群の総称で、多くは小児期に重篤な神経症状を主症状とし発症する、神経難病である。この疾患に対する治療法として、酵素補充療法や骨髄・造血幹細胞移植などが臨床応用されているが、中枢神経系への

効果は認められない。また、遺伝子治療や細胞治療は未だ研究の段階である。変異酵素に対する低分子基質競合阻害剤を用いるシャペロン療法は、脳病変に対する有効な治療療法として、開発が進められている。一方で、多くのライソゾーム病の脳病変の分子病態は不明な部分が多く残されていた。

## 2. 研究の目的

ライソゾーム病の一つ、GM1-ガングリオシドーシスは、ライソゾーム加水分解酵素β-ガラクトシダーゼをコードする **GLB1** 遺伝子異常により発症する劣性遺伝病である。本研究課題では、GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスおよび培養神経細胞モデルを用い、蓄積基質 GM1-ガングリオシドの神経細胞ライソゾーム内への蓄積から、神経細胞機能障害に至る分子機構について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) マイクロアレイ発現解析

生後3ヶ月齢（神経症状発症前段階）と生後10ヶ月齢（神経症状発症後段階）の正常、β-ガラクトシダーゼ遺伝子欠損ノックアウトマウス、およびシャペロン化合物を投与した R201C マウス脳組織から mRNA を抽出し、マイクロアレイ解析（Illumina）を行った。

### (2) クラスタ解析、パスウェイ解析

マイクロアレイ発現解析データを、GeneSpring ソフトウェアを用い、クラスタ解析を行った。また、遺伝子発現に変動が見られた遺伝子群については、インジェヌイティパスウェイ解析ソフトウェアを用い、解析を行った。

### (3) 蛋白質発現解析

モデルマウス脳組織ライセートを用いたウェスタンブロット法と脳組織標本の免疫染色により、蛋白質の発現定量解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) マイクロアレイ解析

まず、正常マウス脳にくらべβ-ガラクトシダーゼ遺伝子欠損ノックアウトマウスおよび R201C マウス脳において発現が上昇または下降した遺伝子群を抽出した。その中から、シャペロン化合物 NOEV 投与 R により発現が正常化した遺伝子群を抽出した(図1左)。

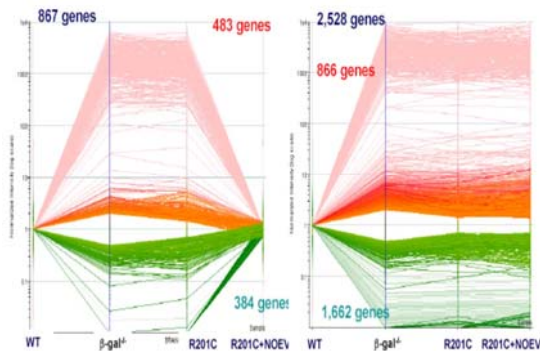


図1. 遺伝子発現の変動

一方、疾患マウス脳で発現が変動し、NOEV に

より正常化しなかった遺伝子群の抽出もおこなった(図1右)。

次に、それぞれの遺伝子群に関し、クラスタ解析を行い、NOEVにより正常化した遺伝子群で8クラスタ、NOEVにより正常化しなかった遺伝子群で17のクラスタを同定した(図2)。

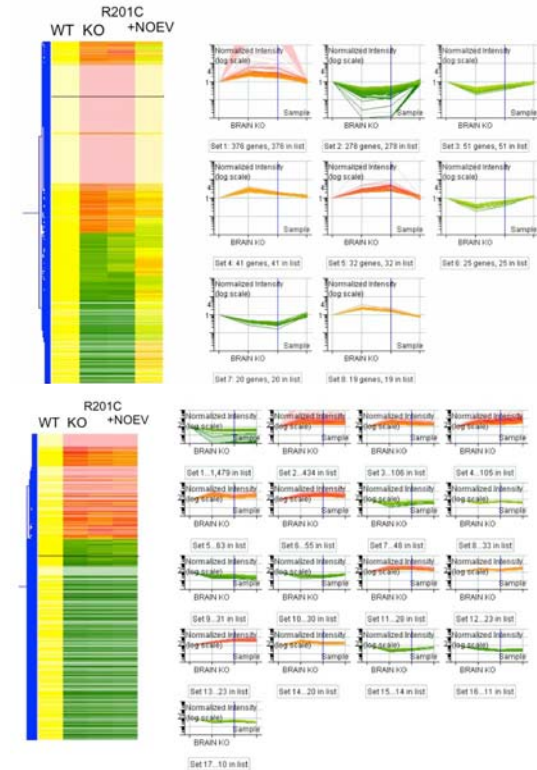


図2. クラスタ解析

次に GO 解析を行い、シグナル伝達、細胞接着、発達・組織形成、細胞増殖、細胞死、細胞間伝達および細胞内輸送に属する遺伝子に分類した。また、遺伝子機能パスウェイ解析により、ERK/MAPK、Wnt シグナル、アポトーシスなどの機能パスウェイの関連を土同定した。

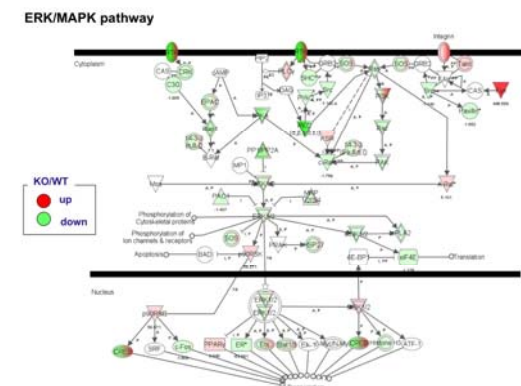


図3. 遺伝子パスウェイ解析

## (2) 蛋白質発現解析

マイクロアレイ発現解析および遺伝子機能パスクエ解析により得られた結果のうち、Trk シグナル伝達、蛋白質分解系と炎症反応に関連する蛋白質の GM1-ガングリオシドーシスマウスの脳における発現を解析した。神経栄養因子受容体蛋白質 Trk は神経細胞膜脂質ラフとでガングリオシド GM1 と相互作用し、神経細胞の分化、生存に必須のシグナル伝達に関連しているが、疾患モデルマウス脳神経細胞内エンドソームにリン酸化 Trk 蛋白質の蓄積を認めた (Takamura et al., 2011)。また、この Trk は高度にユビキチン化されており、ユビキチン化関連蛋白質 p62 と共免沈した。一方、Trk シグナルは Akt/MAPK とクロストークしており、Trk の蓄積は、マイクロアレイ解析で同定された Akt/MAPK シグナルとの関連性を強く示唆した。さらに、モデルマウス脳組織を用いた免疫染色の結果、基質 GM1 の蓄積した神経細胞内に有意なユビキチン化蛋白質の蓄積を認めた。同様に解析により、小胞体ストレス関連蛋白質と炎症関連の蛋白質の発現の亢進も認めた (未発表)。

GM1-ガングリオシドーシスでは、基質 GM1 の神経細胞内の蓄積から神経細胞障害に至る過程において、二次的な異常が細胞障害に深く関わっている可能性が考えられる。本研究で行ったマイクロアレイ発現解析では、疾患マウス脳組織を用いた網羅的な遺伝子発現変動を解析することで、その課題の一端を明らかにすることを目的とした。今後はこれらの個々の発現異常に対し、siRNA や低分子化合物などを用い発現を正常化することの病態に対する影響を調べることで、将来的な分子標的療法に発展するものと考えている。

## 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 7 件) (すべて査読有)

- 1) Luan Z, Higaki K, Aquilar-Moncayo M, Li L, Ninomiya H, Nanba E, Ohno K, García-Moreno MI, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y 1 : A fluorescent sp2-iminosugar with pharmacological chaperone activity for Gaucher disease: Synthesis and intracellular distribution studies. *ChemBioChem*, 11, 2453-2463, 2010
- 2) Li L, Higaki K, Ninomiya H, Luan Z, Iida M, Ogawa S, Suzuki Y, Ohno K, Nanba E. :

Chemical chaperone therapy: Luciferase assay for screening of  $\beta$ -galactosidase mutations. *Mol Genet Metab*, 101, 354-369, 2010

- 3) Luan Z, Higaki K, Aquilar-Moncayo M, Ninomiya H, Ohno K, García-Moreno MI, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y Chaperone activity of bicyclic nojirimycin analogues for Gaucher mutations in comparison with N-(n-nonyl)Deoxynojirimycin. *ChemBioChem* 10, 2789-2792, 2009
- 4) Otomo T, Higaki K, Nanba E, Ozono K, Sakai N : Inhibition of autophagosome formation restores mitochondrial function in mucopolipidosis II and III skin fibroblasts. *Mol Genet Metab*, 98, 393-399, 2009
- 5) 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*, 31, 717-724, 2009
- 6) Gucev ZS, Tasic V, Jancevska A, Zafrovski G, Kremensky I, Sinergiska I, Nanba E, Higaki K, Suzuki Y 1 : 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 A* 146A : 1736-1740, 2008
- 7) Matsumoto N, Gondo K, Kukita J, Higaki K, Paraguison RC, Nanba E : A case of galactosialidosis with a homozygous Q49R point mutation. *Brain Dev* 30 : 595-598, 2008

[学会発表] (計 19 件)

- 1) Higaki K, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy for beta-galactosidase deficiency. Gordon Research Conference, Galveston, TX, USA, 2011. 1. 23-28
- 2) 檜垣克美、栞卓、李林静、難波栄二、大野

- 耕策, Carmen Ortiz Mellet, José M. García Fernández, 鈴木義之: ゴーシェ病に対する蛍光標識薬理的シャペロンの効果に関する検討. 第 15 回日本ライソゾーム病シンポジウム, 東京, 2010. 12. 10-11
- 3) 高井知子, 檜垣克美, 李林静, 榊原康文, 鈴木義之, 難波栄二: ヒト変異 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するシャペロン効果. 第 83 回 日本生化学会大会, 神戸, 2010. 12. 7-10
- 4) 高井知子, 檜垣克美, 李林静, 飯田真己, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二: ベータガラクトシダーゼに対するシャペロン活性測定のための新規細胞系の構築. 第 52 回 日本先天代謝異常学会総会, 大阪, 2010.10. 21-23
- 5) 難波栄二, 檜垣克美: GM1-ガングリオシドース脳神経細胞内のユビキチン化蛋白質の蓄積. 第 52 回 日本小児神経学会総会, 福岡, 2010. 5. 20-22
- 6) 池端宏記, 檜垣克美, 李林静, 飯田真己, 鈴木義之, 難波栄二, GM1-ガングリオシドースに対するケミカルシャペロン療法, 第 51 回 日本先天代謝異常学会総会, 東京, 2009. 11. 5-7
- 7) 池端宏記, 檜垣克美, 難波栄二, NPC1 遺伝子欠損 CHO 細胞における脂質代謝異常, 第 82 回 日本生化学会大会, 神戸, 2009. 10. 21-24
- 8) 高井知子, 檜垣克美, 高村歩美, 松田潤一郎, 鈴木義之, 難波栄二, GM1-ガングリオシドースとオートファジー異常, 第 82 回 日本生化学会大会, 神戸, 2009. 10. 21-24
- 9) Li L, Higaki K, Matsuda J, Iida M, Suzuki Y, Nanba E: Screening for chemical chaperone therapy in beta-galactosidosis. 第 3 回国際ライソゾーム病シンポジウム, 第 14 回日本ライソゾーム病シンポジウム, 名古屋, 2009. 9. 26-27
- 10) Higaki K, Takamura A, Li L, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E: Cellular dysfunction in murine GM1-gangliosidosis. 第 3 回国際ライソゾーム病シンポジウム, 第 14 回日本ライソゾーム病シンポジウム, 名古屋, 2009. 9. 26-27
- 11) Higaki K, Nanba E, Suzuki Y: Screening of chemical chaperone effect for GM1-gangliosidosis. 11<sup>th</sup> ICIEM, San Diego, CA, 2009. 8. 29 – 9. .3
- 12) Li L, Higaki K, Adachi K, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Iwasaki H, Suzuki Y, Nanba E. Screening of chemical chaperone effect for human mutant beta-galactosidase. 第 9 回アジア・オセアニア小児神経学会, 2009. 6. 10-13
- 13) 難波栄二, 檜垣克美, 鈴木義之: GM1-ガングリオシドースに対するケミカルシャペロン療法: 88 種類のミスセンス変異に対する NOEV の効果. 第 51 回 日本小児神経学会総会, 米子, 2009.5
- 14) 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
- 15) 池端宏記, 檜垣克美, 李林静, 飯田真己, 松田潤一郎, 鈴木義之, 難波栄二: b-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
- 16) 檜垣克美, 高村歩美, 松田潤一郎, 鈴木義之, 難波栄二: GM1-ガングリオシドー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
- 17) 李林静, 檜垣克美, 高村歩美, 飯田真己, 松田潤一郎, 鈴木義之, 難波栄二: GM1-ガングリオシドー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
- 18) 難波栄二, 檜垣克美, 足立香織, 李林静, 飯田真己, 松田潤一郎, 鈴木義之: ヒト $\beta$ -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
- 19) 難波栄二, 檜垣克美: GM1-ガングリオシドー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

〔図書〕（計2件）

- 1) 檜垣克美、難波栄二，ガングリオシド蓄積症とシグナル伝達. 生体の科学（医学書院） 60巻3号 p.219-216. 2009
- 2) 檜垣克美、難波栄二，アストロサイトのオートファジー生体の科学（医学書院） 59巻6号 p.522-527. 2008. 6.

〔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

檜垣 克美 (HIGAKI KATSUMI)

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし