

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15892

研究課題名(和文)「サイコシン仮説」に代わるクラッペ病発症の新規メカニズムの提唱

研究課題名(英文) Proposal of a new mechanism of Krabbe disease to replace the 'psychosine hypothesis'

研究代表者

渡邊 昂 (Watanabe, Takashi)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：60817071

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)：クラッペ病(グロバイド細胞白質ジストロフィー)はガラクトシルセラミド(GalCer)のリゾ体であり細胞毒性の高い脂質であるサイコシンが、オリゴデンドロサイトやシュワン細胞に蓄積し脱髄を引き起こす“サイコシン仮説”によって長い間説明されてきた。我々は、サイコシンはGalCerが酸性セラミダーゼとその活性化タンパク質であるサポシンDによって分解され産生されること、サポシンDを欠損することでサイコシンが蓄積しなくなったクラッペ病モデルマウスにおいても、特に末梢神経の脱髄や神経炎症、寿命が回復しなかった。従って、クラッペ病の悪化にはサイコシンだけでなく別のメカニズムが存在することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クラッペ病はGalCer -ガラクトシダーゼ (GALC)の遺伝的変異による先天性の脱髄疾患であるが、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。本研究において、サイコシンを蓄積しないTwi/Sap-D KOマウスにおいて、特に末梢神経の脱髄病変が改善しなかったことから、クラッペ病の神経病態はサイコシンの蓄積だけでは説明できず、GalCerによるGALC欠損マクロファージ/ミクログリアの活性化に起因する神経炎症が重要な役割を果たしている可能性が示唆される。このように、クラッペ病の病態理解は今後の治療法開発において重要な意義がある。

研究成果の概要(英文)：Krabbe disease, also known as globoid cell leukodystrophy, is caused by the genetic deficiency of lysosomal enzyme galactosylceramide (GalCer) -galactosidase (GALC). The pathogenesis of Krabbe disease has long been explained by the 'psychosine hypothesis', in which death of oligodendrocyte and Schwann cell due to psychosine accumulation causes demyelination and neuroinflammation in both the CNS and PNS. We clarified that psychosine is produced by the deacylated of GalCer by ACDase with the assistance of saposin-D and the despite of little accumulation of psychosine in the mouse model of Krabbe disease, demyelination was not significantly improved especially in the PNS. These findings indicate that the pathophysiology of Krabbe disease cannot be explained by the 'psychosine hypothesis' alone.

研究分野：ライソゾーム病

キーワード：クラッペ病 サイコシン仮説 ガラクトシルセラミド

## 1. 研究開始当初の背景

クラッペ病は、リソソーム酵素であるガラクトシルセラミド (GalCer) -ガラクトシダーゼ (GALC) の遺伝的欠損による遺伝性脱髄疾患である。クラッペ病の神経病態は、GALC の主な基質でミエリンの構成脂質である GalCer の蓄積ではなく、そのリゾ体であるガラクトシルスフィンゴシン(別名 サイコシン)の蓄積によって、オリゴデンドロサイトやシュワン細胞といった髄鞘を形成する細胞の細胞死が惹起されることを原因とする「サイコシン仮説」によって長く説明されてきた。一方、サイコシンの生成経路には、スフィンゴシンにガラクトースが転移する合成説と、GalCer が酸性セラミダーゼによって脱アシル化される分解説の2つが提唱されている。酸性セラミダーゼは主な基質であるセラミドを分解する際に活性化タンパク質としてサポシン D (Sap-D)が必要なことは知られている(図1)。

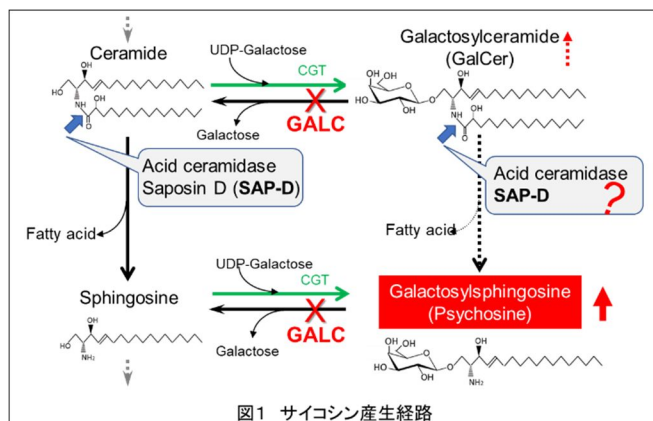


図1 サイコシン産生経路

## 2. 研究の目的

我々は、まず、サイコシンの産生経路を明らかにするために、酸性セラミダーゼと Sap-D の組換えタンパク質を用いてサイコシン生成経路の解明を目指した。次に、クラッペ病モデルマウスと Sap-D 欠損マウスを交配して作製したサイコシンを産生しないクラッペ病モデルマウスを用いて「サイコシン仮説」の検証に取り組んだ。本研究は、クラッペ病の病態メカニズム解明への発展が期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) 酸性セラミダーゼと Sap-D の組換えタンパク質

HEK293T 細胞で発現させた酸性セラミダーゼ(ASAH1)と大腸菌で発現させた Sap-D を組換えタンパク質として用いて、<sup>14</sup>C 標識されたセラミド、グルコシルセラミド (GlcCer)、GalCer を基質として酸性セラミダーゼ活性を測定した。

### (2) サイコシンを蓄積しないクラッペ病モデルマウスの作製

クラッペ病のモデルマウスとして用いられている自然発生の *GALC* 欠損マウス (Twitcher、Twi) と、Sap-D 欠損マウス (Sap-D KO) の交配により、*GALC* と Sap-D の両方が欠損した Sap-D 欠損 Twitcher マウス (Twi/Sap-D KO) を作製した。これらのマウスを用いて、体重や寿命を測定した。また、脳(中枢神経) 坐骨神経(末梢神経)を用いてサイコシンやセラミド量、酵素活性、病理組織学的解析、遺伝子発現を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 組換えタンパク質を用いた酸性セラミダーゼ活性測定

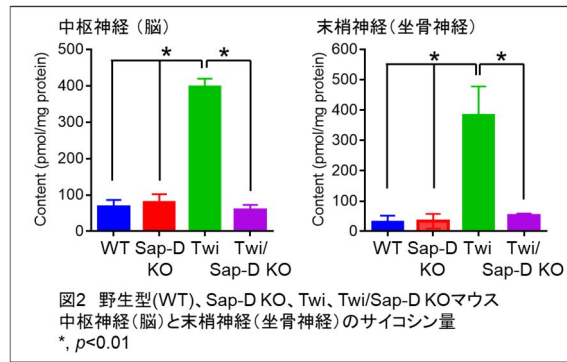
界面活性剤存在下で組換え酸性セラミダーゼは、GlcCer ( $0.403 \pm 0.045$  nmol/min/mg protein) と GalCer ( $0.240 \pm 0.050$  nmol/min/mg protein) を分解した。しかし、セラミド( $653 \pm 68$  nmol/min/mg protein)の 1000 分の 1 程度の分解活性であった。また、界面活性剤非存在下で Sap-D は酸性セラミダーゼ活性を有意に増加させた。

### (2) Twi/Sap-D KO の酸性セラミダーゼ活性測定

野生型、Sap-D KO、Twi、Twi/Sap-D KO マウス脳ホモジネートを用いて <sup>14</sup>C ラベルされたセラミドを基質として酸性セラミダーゼ活性を測定した結果、Sap-D KO マウス( $14.6 \pm 0.3$  pmol/min/mg protein)と Twi/Sap-D KO マウス( $16.7 \pm 0.1$  pmol/min/mg protein)は、野生型マウス( $81.1 \pm 6.4$  pmol/min/mg protein)や Twi マウス( $89.8 \pm 8.0$  pmol/min/mg protein)と比べて有意に活性が低下していた。

### (3) Twi/Sap-D KO のサイコシン定量

HPLC を用いて脳と坐骨神経のサイコシンを定量した結果、Twi マウスのサイコシンは有意に蓄積していたが、Twi/Sap-D KO マウスでは、野生型マウスとほぼ同程度まで減少した(図2)。従って、サイコシン産生に Sap-D が必要であることを明らかにした。また、サイコシンが蓄積しないクラッペ病モデルマウス (Twi/Sap-D KO) を作製できた。



#### (4) Twi/Sap-D KO の体重および生存曲線

野生型、Sap-D KO、Twi、Twi/Sap-D KO マウスの生存曲線を作製した。その結果、Twi マウスの寿命の中央値は 44 日であったが、Twi/Sap-D KO マウスの寿命の中央値は 33 日であり、Twi マウスよりも短命であった。生後 35 日の Twi/Sap-D KO マウスの体重 (male:  $9.85 \pm 1.69$  g, female:  $8.44 \pm 2.15$  g) は、Twi マウス (male:  $10.35 \pm 1.65$  g, female:  $9.53 \pm 1.64$  g) と同程度に減少していた。野生型マウス (male:  $19.23 \pm 1.90$  g, female:  $15.98 \pm 1.41$  g) と Sap-D KO マウス (male:  $20.07 \pm 1.37$  g, female:  $17.00 \pm 1.29$  g) の間に差はなかった。

#### (5) Twi/Sap-D KO の病理組織学的解析

中枢神経及び末梢神経の脱髄を LFB-PAS 染色で比較した結果、Twi/Sap-D KO の末梢神経における脱髄は Twi と同程度であり、サイコシンの蓄積がないにも関わらず脱髄の回復は見られなかった。一方、Twi/Sap-D KO の中枢神経における脱髄はやや回復していた。末梢神経の透過型電子顕微鏡観察の結果、Twi/Sap-D KO は Twi と同等で、その脱髄領域にミエリン様構造物や針様封入体を含む多核化マクロファージ/ミクログリア (グロバイド細胞) が浸潤していた。

#### (6) Twi/Sap-D KO の神経炎症

Twi マウスと Twi/Sap-D KO マウスの神経炎症を比較するために、ミクログリアを抗 Iba1 抗体で、アストロサイトを抗 GFAP 抗体で染色した。その結果、脱髄が軽減していた Twi/Sap-D KO マウスの小脳白質では Twi に比べてミクログリアとアストロサイトの染色性が軽減していた。一方の末梢神経では、ミクログリア・マクロファージはわずかに減少していた。

#### (7) Twi/Sap-D KO の骨髄由来マクロファージ

野生型、Sap-D KO、Twi および Twi/Sap-D KO マウスの骨髄から誘導した骨髄由来マクロファージに C12-GalCer を添加した結果、Twi/Sap-D KO マウスは野生型マウスよりも多核化した、TNF- $\alpha$  を産生が増加した。

以上のように、クラッペ病の神経病態はサイコシンの蓄積だけでは説明できず、GalCer による GALC 欠損マクロファージ/ミクログリアの活性化を原因とする神経炎症が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Inamura Naoko, Go Shinji, Watanabe Takashi, Takase Hiroshi, Takakura Nobuyuki, Nakayama Atsuo, Takebayashi Hirohide, Matsuda Junko, Enokido Yasushi	4. 巻 31
2. 論文標題 Reduction in miR 219 expression underlies cellular pathogenesis of oligodendrocytes in a mouse model of Krabbe disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Pathology	6. 最初と最後の頁 e12951
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bpa.12951	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 Tsuboi Kazuhito, Tai Tatsuya, Yamashita Ryouhei, Ali Hanif, Watanabe Takashi, Uyama Toru, Okamoto Yoko, Kitakaze Keisuke, Takenouchi Yasuhiro, Go Shinji, Rahman Iffat Ara Sonia, Houchi Hitoshi, Tanaka Tamotsu, Okamoto Yasuo, Tokumura Akira, Matsuda Junko, Ueda Natsuo	4. 巻 1866
2. 論文標題 Involvement of acid ceramidase in the degradation of bioactive N-acylethanolamines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 158972 ~ 158972
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbaliip.2021.158972	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 Watanabe Takashi, Suzuki Akemi, Ohira Shin, Go Shinji, Ishizuka Yuta, Moriya Takuya, Miyaji Yoshiyuki, Nakatsuka Tota, Hirata Keita, Nagai Atsushi, Matsuda Junko	4. 巻 63
2. 論文標題 The Urinary Bladder is Rich in Glycosphingolipids Composed of Phytoceramides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 100303 ~ 100303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jlr.2022.100303	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 Takashi Watanabe, Kazuhito Tsuboi, Nobuaki Matsuda, Yuta Ishizuka, Shinji Go, Etsuko Watanabe, Ayaka Ono, Yasuo Okamoto, Junko Matsuda	4. 巻 in press
2. 論文標題 Genetic ablation of Saposin-D in Krabbe disease eliminates psychosine accumulation but does not significantly improve demyelination	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	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） なし	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takashi Watanabe, Shinji Go, Yuta Ishizuka, Kazuhito Tsuboi, Ayaka Ono, Junko Matsuda
2. 発表標題 Pathophysiological analysis of Saposin D-deficient Twitcher mice
3. 学会等名 第63回日本先天代謝異常学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊 昂, 郷 慎司, 石塚佑太, 坪井一人, 小野綾可, 松田純子
2. 発表標題 クラッペ病の神経病態は「サイコシン仮説」だけでは説明できない
3. 学会等名 第62回 日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 昂, 郷 慎司, 坪井一人, 小野綾可, 松田純子
2. 発表標題 Krabbe病の病態は「サイコシン仮説」のみでは説明できない
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会 学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 昂, 坪井一人, 石塚佑太, 小野綾可, 郷 慎司, 松田純子
2. 発表標題 クラッペ病の神経病態はサイコシンの蓄積だけでは説明できない
3. 学会等名 第26回日本ライソゾーム研究会
4. 発表年 2021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
---------	---------