

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590468

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 mechanisms of inflammation in the central nervous system 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) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ライソゾーム病の一つであるサンドホフ病(SD)は、 β -ヘキソサミニダーゼの異常により、その基質である糖脂質が蓄積する難病である。我々はアポトーシスを引き起こした神経細胞からGM2、GA2が遊離し、アストロサイトを活性化することで炎症反応が引き起こされる予想した。SDマウスより調製した神経細胞にアポトーシスを誘導すると、GM2、GA2が培養液中に遊離することが確認された。一方、遊離したGM2、GA2は、TLR2およびTLR4を介して、炎症性分子を産生することが明らかとなった。これらのことから、代謝されないGM2、GA2がアストロサイトを活性化し、炎症反応を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sandhoff disease is a lysosomal storage disorder characterized by the absence of β -hexosaminidase and storage of GM2 ganglioside and related glycolipid. Recently we and others have reported several immunological abnormalities in the CNS.

However, little is known about the mechanism underlying the action of accumulated Gmix as a leading cause for pathological inflammatory responses in the brain. Here we reported that autoantibodies and released-Gmix from apoptotic neuronal cells mediate the nervous inflammation in microglia and astrocytes. The Gmix storage of neuronal cells in SD mice can lead to the release of Gmix from apoptotic neuronal cells into the extracellular space. The exposure to Gmix can induce the production of TNF- α , IL-6 and MIP-1 α via the Toll-like receptor 4 in the SD mice microglia and astrocytes. Taken together, these results suggest that autoantibodies and released-Gmix may provide to cause nervous inflammatory condition in the brain of SD mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：GM2ガングリオシドーシス サンドホフ病 Toll like receptor 炎症

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 -ヘキソサミニダーゼ 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。

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-1) 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- α 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-1 の産生機構については解明されていない。一方、Platt FM. 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、炎症反応が病気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。

我々は現在までに、SD の中枢神経系での炎症反応の起因を解明する研究の中で、代謝出来ないガングリオシド GM2, 糖脂質 GA2 に対して、自己抗体を産生し、これら自己抗体がギランバレー症候群などの神経症状を伴う自己免疫疾患同様に、病態の進行に深く関与していることを見出した (Yamauchi et al. *J. Clin. Invest.* 113:200-8. 2004.)。

更に、Kwang SK らは In vitro の実験系において、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) が、ガングリオシドでマイクログリアを刺激すると、JAK-STAT のシグナル伝達系を介して分泌され、マクロ

ファージの膜表面に存在している、BAFF レセプターを介して、炎症性サイトカイン IL-6, TNF- α , IL-10 の発現を促すことが報告された。SD の中枢神経系では、自己抗体が存在し、先天的にガングリオシドを代謝できないこと、及び炎症性サイトカイン IL-6, TNF- α , IL-10 が発現している (unpublished date)。

これらのことから、SD の中枢神経系での炎症反応には、ガングリオシドと BAFF シグナルが関係していることが強く示唆できる。Proia RL らは、SD の患者、及び SD マウスの中枢神経系を用い、遺伝子発現の網羅的解析を行った結果、B 細胞誘走性ケモカイン CXCL-13 が高発現していることを見だし、Platt FM らは、SD マウスの中枢神経系において、リンパ球が浸潤していることを報告している。

これらの報告から、SD の中枢神経系では、自己抗体及び細胞外に放出された代謝できないガングリオシドが個々に、若しくは協調して炎症反応を引き起こしていることが示唆される。

現在までに SD を含むガングリオシド・糖脂質が神経細胞に蓄積するガングリオシドーシスでは、バルーン説に代表される様な蓄積物が細胞内に蓄積することにより、中枢神経系における炎症反応や病態の進行が引き起こされると考えられてきた。しかし、近年の報告では、蓄積したガングリオシド・糖脂質が原因と言うよりも、むしろ、細胞外に放出され代謝されないガングリオシド・糖脂質が炎症反応や病態の進行に深く関与していることが示唆される。

本研究では、SD マウスを用いて、細胞外に放出されたガングリオシド・糖脂質に着目し、ガングリオシドーシスでの炎症反応の起因のメカニズムを解明することを目的としている。これら炎症反応の起因のメカニズムを解明することにより、現在、SD やその他のガングリオシドーシスの治療法として用いられている、酵素補充療法などよりも、より負担の軽い新たな治療法の開発に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

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、中枢神経系に先天的に代謝できないガングリオシドが蓄積することにより、炎症反応等の種々の障害を引き起こされ、病態が進行すると考えられてきた。一方、近年の研究で、この病態の進行は中枢神経系へのガングリオシドの蓄積以外の要因により、炎症反応等が引き起こされることが示唆されている。

本研究では、サンドホフ病マウスを用い、中枢神経系に進入した自己抗体、及び細胞外に放出された代謝できないガングリオシドが炎症反応を引き起こしていることと推測し、これらを中心に、ガングリオシドーシスの炎症反

応発症メカニズムを解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 15 週齢の SD マウスの中枢神経系、及び遊離したガングリオシドで刺激したマイクログリア等での炎症関連因子の発現量を定量的 PCR で確認した。

(2) 細胞死を起こした細胞から、蓄積したガングリオシドが漏出することを証明するため、SD マウスの神経細胞を培養した培養液中に H2O2 を添加し、その上精を薄層クロマトグラフィーで展開し、確認した。

(3) アポトーシス細胞の特定は TUNNEL 法にて解析した。

(4) SD マウスの脳から蓄積したガングリオシドを薄層クロマトグラフィーで分離、精製し、それぞれのガングリオシドで神経細胞を刺激した。

(5) TRL4 の定量はフローサイトメトリー (FACS) 法にて解析した。

4. 研究成果

(1) SD マウス、Hexb-/-FcR -/-マウスの炎症関連遺伝子の発現

14 週令の SD マウスの中枢神経系における炎症反応に関連する因子を確認するために、脳の組織よりメッセンジャーRNA を抽出し、cDNA を作製し、定量的-PCR を用いて炎症性サイトカイン、ケモカインの発現を調べた。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 の発現が確認され(図 1a)、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)、の発現を確認した(図 1b)。

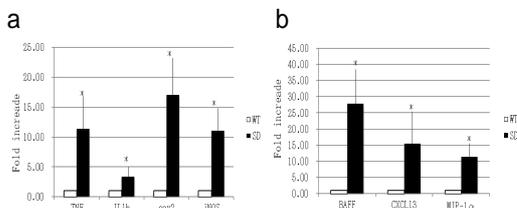


図 1 WT,SD マウスの 14 週齢の脳における mRNA

- a) TNF- α , IL-1 β , COX2, iNOS の発現量
b) BAFF, CXCL-13, MIP-1 の発現量

一方、SD マウスの FcR 遺伝子を欠損することにより自己抗体産生能力を低減させた Hexb-/-, FcR -/-マウスでは、TNF- α の発現量の低減が同週齢の SD マウスと比較して低減していることが確認できたが、

MIP-1 α の発現量においては、有意な差が得られなかった(図 2)。

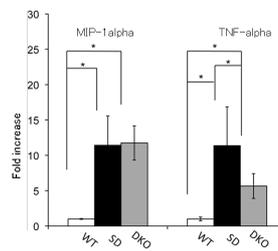


図 2 WT,SD,FcDKO マウスにおける MIP-1 α , TNF- α の発現量

(2) 細胞内蓄積物の細胞外への放出

近年、酵素等の異常により、細胞内基質が代謝できない場合、その細胞がアポトーシスを起こすと代謝できない基質が細胞外に放出されることが知られている。SD マウスではアポトーシスによる神経細胞死が起こっており(図 3 a)、細胞がアポトーシスを起こす際に、細胞内リソソームに蓄積した GM2,GA2 が外に漏れ出すかどうかを調べた。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 3 b)。

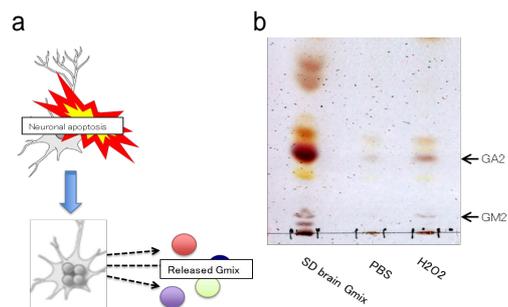


図 3 細胞外に放出された GA2,GM2

- a) アポトーシスによる糖脂質の細胞外放出時のイメージ
b) 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

(3) ガングリオシドの刺激によるグリア細胞の活性化

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。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めに、プライマリーの培養マイクログリアに GM2,GA2 を添加し、定量的 PCR を用いて炎症性サイトカインの発現を調べた。その結果、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上昇した。また、炎症性

サイトカインを誘導するとされているケモカインである CXCL13、MIP-1 の発現も GM2 を添加した群で顕著に上昇していたが BAFF の発現は見出すことが出来なかった(図 4)。一方、GA2 を添加したアストロサイトでは、GM2 で刺激した際に発現されたサイトカイン、ケモカインの発現が確認されなかった。

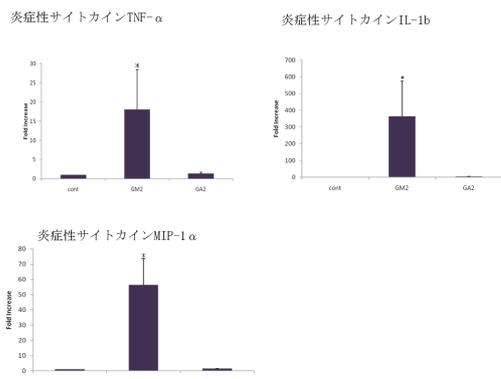


図 4 GA2,GM2 刺激による炎症性サイトカインの発現量

(4) ガングリオシドの刺激によるグリア細胞の活性化メカニズム

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、そのエピトープがガングリオシドの疑似分子となり、抗ガングリオシド抗体が産生されて引き起こされることが知られている。一方、近年細菌のエピトープの糖脂質などを認識する抗原提示細胞などのレセプターとして、Toll-like-receptor (TLR)2,4 が知られている。我々は、細胞外に放出された GM2, GA2 が細胞外リガンドとなり、アストロサイト細胞表面の TLR に認識され、TLR パスウェイにシグナルが入ることにより、細胞内の様々な因子を活性化し炎症性サイトカインを誘導していることを考えた。これを調べるために TLR2, TLR4 の発現を定量的-PCR で調べた。その結果、SD マウスで TLR2, TLR4 の発現量が共に、GM2 を添加した群で顕著に上昇した(図 5)。

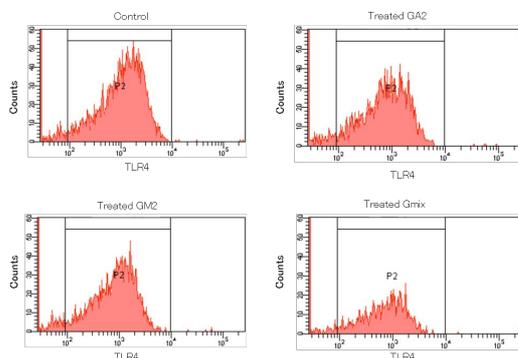


図 5 GA2,GM2 添加による TLR2,TLR4 の発現量

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

山口 章 (YAMAGUCHI, Akira)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号：20381585

(3) 連携研究者

()

研究者番号：