

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591511

研究課題名(和文)ライソゾーム病神経変性におけるオートファジー機能の解明と誘導・阻害による治療研究

研究課題名(英文) Experimental study for the treatment of neuronal degeneration in lysosomal storage diseases by modification of autophagy

研究代表者

田中 あけみ (TANAKA, Akemi)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30145776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ライソゾーム病の神経障害において、オートファジーの亢進が重要とされている。ムコ多糖症II型モデルマウス(IDS-KO)を用いてオートファジー関連薬物の投与により、ライソゾーム病の神経障害の治療を目的に研究を行った。

IDS-KOの脳組織でオートファジー亢進を示すSCMAS染色を行うと、6週齢より陽性反応を示した。25週齢より神経細胞に異常封入体が現れた。オートファジーの抑制作用を持つクロロキンを4週齢より経口投与し25週齢で観察したところ、異常封入体を持つ神経細胞は存在せず、20週齢マウスと同等の病相であった。このことから、オートファジーの抑制により病状の進行を遅らせる可能性が推測された。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is an important factor in the degeneration of neuronal cells of lysosomal storage diseases. We did an experimental study of modifying the autophagy to treat the neurodegeneration in the brain of the mucopolysaccharidosis type II model mouse (IDS-KO).

SCMAS staining of the brain of IDS-KO showed abnormal stimulation of autophagy in various cells especially in neuronal cells, which began from around 6 weeks old IDS-KO. At age 25 weeks, abnormal inclusion bodies appeared in the cytoplasm of neuronal cells of IDS-KO brain, which was not existed at age 20 weeks. We administered chloroquine to IDS-KO orally from 4 weeks old until the examination at 25 weeks old, which findings of the brain were similar to those of 20 weeks old IDS-KO. The result suggested that the inhibition of autophagy could suppress the disease progression in the brain of IDS-KO.

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：ライソゾーム病 神経変性 オートファジー 経口治療薬

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、今までにライソゾーム病の脳障害の治療に向けて遺伝子治療 (Takaura N, et al. *Gene Ther* 10: 1487-93, 2003) や細胞移植治療 (Sawada T, et al. *Brain Dev* 31: 717-24, 2009) の研究を続けてきた。これらは実験的な効果は認められたが、臨床応用には治療の安全性と効果の持続性に問題が残されたままとなった。効果の持続性には病宿主の免疫反応が重要な課題であることも見えてきた。さらなる発展のためには、「治療の方法」だけでなく「神経変性の病態解明」の両面からのアプローチが必要であると結論し、本研究計画に至った。

近年、オートファジーを促進させることにより、アルツハイマー病 (Lee JH, et al. *Cell* 141: 1112-4, 2010) やハンチントン病 (Tsvetkov AS et al. *PNAS* 107: 16982-87, 2010) などの神経変性疾患の進行が抑制されると報告され、分解代謝の障害とライソゾームの不安定化は神経変性の共通のメカニズムとして重要視されてきている。ライソゾーム病の神経障害においてもオートファジーが大きくかかわっていると考えられるようになった。そこで、このオートファジーを修飾する薬剤により、ライソゾーム病の神経病変の進行を抑制できないかと研究を計画した。

## 2. 研究の目的

我が国において、ムコ多糖症 II 型はムコ多糖症全体の 6 割近くを占め、その 7 割が脳障害を伴う重症型である。現在、重症型、軽症型を問わず、すべてのムコ多糖症 II 型患者は酵素補充療法を受けているが、重症型の脳障害に対する効果は無い。ムコ多糖症 II 型の脳障害の病態研究および治療研究は、医療経済的にも社会的にも重要である。

ムコ多糖症 II 型患者組織には、ヘパラン硫酸とデルマタン硫酸が蓄積する。ムコ多糖症 II 型のモデルマウスを用い (1) 脳障害のメカニズムをオートファジー中心に組織所見より分析し、さらに、マウスに経口薬剤を投与して (2) オートファジーをコントロールするにより、神経変性を加療できる可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 脳病変の継時的変化の電子顕微鏡による観察

IDS-KO は、20 週齢ころより動きが少なくなり、寿命はおよそ 12 か月である。IDS-KO を 4 週、8 週、20 週、25 週および 36 週でそれぞれ屠殺して電子顕微鏡にて脳組織を観察した。

### (2) 脳組織におけるオートファジーの継時的変化の観察

IDS-KO の生後 2 日、1 週、2 週、4 週、6 週、8 週の脳組織をポリユビキチン化タンパク質をオートファゴソームにつなぐリン酸化 p62

(活性型 p62) およびミトコンドリアがオートファジーを受けたときに現れる SCMAS の染色を行い、オートファジーの亢進が始まる時期と過程を観察した。

### (3) 薬物投与による影響の観察

オートファジー阻害物質の一つであるクロロキンを 4 週齢より経口投与し、25 週齢時に脳組織を検索した。また、オートファジー誘導物質の一つであるラパマイシン 4 週齢より腹腔内投与し、14 週齢で脳組織を検索した。

## 4. 研究成果

### (1) 脳病変の継時的変化の電子顕微鏡による観察

20 週齢の IDS-KO の脳組織の電子顕微鏡による観察では、大小の空胞が細胞質に充満したミクログリアおよびアストロサイトが脳組織全体に認められ (図 1)、ムコ多糖等の蓄積に伴うオートファジーの亢進により、ライソゾームが膨化していると推測された。他方、神経細胞は正常の形態であった。神経細胞の変化は 25 週齢において初めて認められ、胞体内に淡い渦巻状の封入体が多数出現した (図 2)。空胞化したミクログリアの数はむしろ減少していた。

### (2) 脳組織におけるオートファジーの継時的変化の観察

生後 2 日目から 8 週齢までの IDS-KO の脳組織について、リン酸化 p62 および SCMAS の染色を行ったところ、6 週齢より陽性反応を示した。染色性は、神経細胞に強く表れた (図 3)。36 週齢の IDS-KO を用い、関連物質を免疫染色にて検索した。SCMAS とともに、LAMP1 (lysosomal associated protein 1) が神経細胞、ミクログリアで陽性を示し、ライソゾームの活性化が推測された。ミトコンドリアの変性を示す TOM (mitochondrial protein translocase of the outer membrane) も神経細胞で強陽性を示し、オートファジーの亢進が推測された。GM3-ガングリオシドの染色では、IDS-KO の大脳皮質においてミクログリアおよび腫大した神経細胞に強い陽性反応を認め、神経細胞膜の変性崩壊が推測された。Ubiquitin はミクログリアで強い陽性を認め、ユビキチン-プロテオソーム系の亢進が推測された。PDI (protein disulfide isomerase) は、正常コントロールマウスと差を認めず、小胞体ストレス反応の亢進は大きくないと推測された。

### (3) 薬物投与による影響の観察

以上の結果を受けて、生後 4 週齢よりオートファジーの抑制作用があるクロロキンの経口投与を続けた。25 週齢で観察したところ、異常封入体を持つ神経細胞は存在せず 20 週齢マウスとよく似た病相であった。このことから、オートファジーの抑制により病状の進行を遅らせる可能性が推測された。他方、オートファジー誘導物質の一つであるラパマイシンを 4 週齢より腹腔内投与したが、薬物による副作用にてマウスが衰弱したため 14

週齢で脳組織を検索した。これについては有意な結果が得られなかった。

図 1

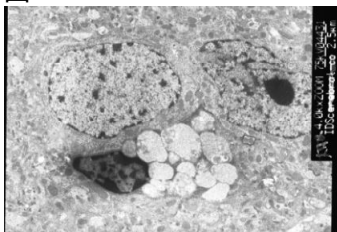


図 2

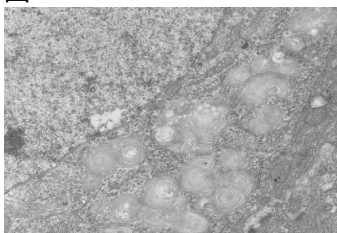
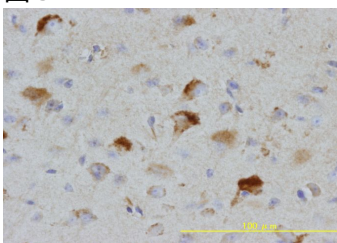


図 3



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) Patel P, Suzuki Y, Tanaka A, Yabe H, Kato S, Shimada T, Mason RW, Orii KE, Fukao T, Orii T, Tomatsu S, Impact of Enzyme Replacement Therapy and Hematopoietic Stem Cell Therapy on Growth in Patients with Hunter Syndrome. MGM reports 1: 184-196, 2014 (査読有)
  - 2) Maeda M, Suwa F, Takemura A, Toda I, Uemura M, Kuwabara A, Nisijima I. Expression of single-stranded DNA and p53 in delayed neuronal death after transient ischemia in the gerbil hippocampus. J Osaka Dent Univ 47: 31-40, 2013 (査読有)
  - 3) Hwu WL, Okuyama T, But WM, Estrada S, Gu X, Hui J, Kosuga M, Lin SP, Ngu LH, Shi H, Tanaka A, Thong MK, Wattanasirichaigoon D, Wasant P, McGill J, Current diagnosis and management of mucopolysaccharidosis VI in the Asia-Pacific region. Mol. Genet. Metab. 107: 136-44, 2012 (査読有)
  - 4) Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Takakura H, Sawada T, Tanaka T, Otomo T, Ohashi T, Ishige-Wada M, Yabe H, Ohura T, Suzuki N, Kato K, Adachi S, Kobayashi R, Mugishima H, Kato S, Long-term efficacy of hematopoietic stem cell transplantation on brain involvement in patients with mucopolysaccharidosis type II: A nationwide survey in Japan. Mol. Genet. Metab. 107:513-20, 2012 (査読有)
- 〔学会発表〕(計 14 件)
- 1) Tanaka A, Maeda M, Kadono C, Morimoto H. Efficacy of oral administration of chloroquine on the neuronal cells of iduronate 2-sulfatase gene knock-out mouse. 第 55 回日本先天代謝異常学会 H.25.11.27-29 (千葉)
  - 2) Hamazaki T, Tanaka A, Sawada T, Kadono C, Kudo S, Shintaku H. Genotype-phenotype correlation and the antibody formation against idursulfase in the course of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis type II. 第 55 回日本先天代謝異常学会 H.25.11.27-29 (千葉)
  - 3) Tanaka A, Hamazaki T, Kosuga M, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Sawada T, Yabe H, Ishige M, Mugishima H, Kato S. Efficacy of hematopoietic stem cell transplantation versus enzyme replacement therapy on intelligence in the patients with mucopolysaccharidosis type II. 第 55 回日本先天代謝異常学会 H.25.11.27-29 (東京)
  - 4) 田中あけみ, 濱崎考史, 鈴木 健, 奥山虎之, 坂口知子, 工藤聡志, 門野千穂, 藤川研人, 小田絵里, 藤直子, 斎藤三佳, 澤田智, 北川照, 桜庭 均, 斎藤静司。Pseudodeficiency allele は意外に多く存在する? 日本人類遺伝学会第 58 回大会 H.25.11.20-23 (仙台)
  - 5) 濱崎考史, 田中あけみ, 澤田智, 門野千穂, 工藤聡志, 新宅治夫。ムコ多糖症 II 型の酵素補充療法: 遺伝子型と表現型の相関と抗イズルスルファーゼ抗体の産生について。第 58 回日本人類遺伝学会 H.25.11.20-23 (仙台)
  - 6) 田中あけみ。Iduronate 2-sulfatase knock-out mouse における中枢神経病変の電子顕微鏡所見。第 55 回日本小児神経学会 H.25.5.29-6.1 (大分)
  - 7) 田中あけみ, 濱崎考史, 酒井規夫, 奥山虎之, 鈴木康之, 澤田智, 大橋十也, 大浦敏博, 麦島秀雄, 大友孝信。ムコ多糖症 II 型重症型の中枢神経障害に対する造血幹細胞移植と酵素補充療法の効果

- の比較。第 55 回日本小児神経学会 H.25.5.29-6.1 (大分)
- 8) 田中あけみ, 前田光代, 門野千穂, 森本秀人. Iduronate 2-sulfatase knock-out mouse における中枢神経病変の電子顕微鏡所見。第 54 回日本先天代謝異常学会 H.24.11.15-17. (岐阜)
  - 9) Tanaka A, Hamazaki T, Sawada T, Kadono C, Kudo S, Shintaku H. Anti-Idursulfase Antibody and the Efficacy of Enzyme Replacement Therapy in the Patients with Mucopolysaccharidosis Typa II. SSIEM 2012, Sep. 4-8, 2012 (Birmingham, England)
  - 10) Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Takakura H, Sawada T, Tanaka T, Otomo T, Ohashi T, Wada M, Yabe H, Ohura T, Suzuki N, Kato K, Adachi S, Kobayashi R, Mugishima H, Kato S. Stabilization of Symptoms and Activity of Daily Living (ADL) in the Patients with Mucopolysaccharidosis Type II Received Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 12<sup>th</sup> International Symposium on MPS and Related Diseases, Jun 28-Jul 1, 2012 (Noordwijkerhout, The Netherlands)
  - 11) Hamazaki H, Tanaka A, Sawada T, Kadono C, Kudo S, Shintaku H. Anti-idursulfase Antibody and the Efficacy of Enzyme Replacement Therapy in Mucopolysaccharidosis Type II Patients. 12<sup>th</sup> International Symposium on MPS and Related Diseases, Jun 28-Jul 1, 2012 (Noordwijkerhout, The Netherlands)
  - 12) Tanaka A, Sawada T, Suzuki K, Sakuraba H, Saitou S, Sakaguchi T, Kitagawa T. Newborn screening of Mucopolysaccharidosis I and II and Characterization of Pseudodeficiency Alleles of Iduronate 2-sulfatase Gene found in the Screening. 12<sup>th</sup> International Symposium on MPS and Related Diseases, Jun 28-Jul 1, 2012 (Noordwijkerhout, The Netherlands)
  - 13) Tanaka A, Sawada T, Suzuki K, Sakuraba H, Saitou S, Sakaguchi T, Kitagawa T. Pseudodeficiency Alleles of Iduronate 2-sulfatase Gene and the Structural Modeling of the Enzyme Protein. The 2<sup>nd</sup> Asian Congress of Inherited Metabolic Diseases Apr 1-4, 2012 (Seoul, Korea)
  - 14) Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Takakura H, Sawada T, Tanaka T, Otomo T, Ohashi T, Wada M, Yabe H, Ohura T, Suzuki N, Kato K, Adachi S, Kobayashi R, Mugishima H, Kato S. Long-term efficacy of hematopoietic

stem cell transplantation in the patients with mucopolysaccharidosis type II: a nationwide survey in Japan. Annual Meeting of Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism 2011, 2011. 8.29-9.2 (Geneva, Switzerland)

〔図書〕(計6件)

- 1) 田中あけみ. ムコ多糖症 II 型。先天代謝異常ハンドブック pp.192-193 中山書店 全 440 ページ 2013
- 2) 田中あけみ. ムコ多糖症。今日の神経疾患治療指針 pp.653-656 医学書院 全 1100 ページ 2013
- 3) 田中あけみ. 先天性ムコ多糖症。内科学第 10 版 pp.1868-1872 朝倉書店 2404 ページ 2013
- 4) 田中あけみ. ムコ多糖症 II 型。「先天代謝異常症候群」(第 2 版)下巻:別冊日本臨床 新領域症候群シリーズ No.20 pp.533-538, 2012
- 5) Tomatsu S, Montaño AM, Molano ACS, Roman D, Hintze J, Carvalho CG, Federhen A, Vieira TA, Giugliani R, Węgrzyn G, Tanaka A, Suzuki Y, Orii T. Chaptor 8: Enzyme Replacement Therapy for Lysosomal Storage Dseases. In: Neurochemistry of Metabolic Disease, pp. 129-158 (pages 301), Editors: Sanker Surendran, Nova Science Publishers, Inc (2011)
- 6) 田中あけみ. ムコ多糖症、ムコリピドーシス。今日の小児治療指針 第 15 版 p. 210 (総編集:大関武彦、古川満、横田俊一郎、水口雅。全 1001 ページ) 2011

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 あけみ (TANAKA AKEMI)  
 大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授  
 研究者番号: 30145776

(2)研究分担者

前田 光代 (NAEDA MITSUYO)  
 公益財団法人先端医療振興財団・上級研究員  
 研究者番号: 40122080

瀬戸 俊之 (SETO TOSHIYUKI)  
 大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
 研究者番号: 60423878

澤田 智 (SAWADA TOMO)  
 大阪市立大学・大学院医学研究科・研究員  
 研究者番号: 60585991