

脳の発生、発達、病態におけるスフィンゴ糖脂質の機能解析研究

Study on the Physiological and Pathophysiological Functions of Glycosphingolipids in the Nervous System

代表研究者

東海大学・未来科学技術共同研究センター・糖鎖工学研究施設

松田純子

Institute of Glycotechnology, Future Science and Technology Joint Research Center, Tokai University

Junko Matsuda

Glycosphingolipid is an important lipid component in a biomembrane to form super-molecular structure called "micro-domain", and is rich in nervous system.

Lysosomal storage disorders (LSDs) are caused by the dysfunction of degradative pathway of glycosphingolipids in lysosome. Most of them show severe neurological dysfunction. Although the recent advances in the way of therapy for LSDs, including enzyme replacement therapy and bone marrow transplantation, it is still very difficult to treat their neurological symptoms. We therefore investigated the possibility of new therapy for the neurological symptoms of LSDs using the mouse models of Krabbe disease, which is one of the LSDs caused by the deficiency of lysosomal GALC and shows the progressive paralysis due to the demyelination in the central and peripheral

nervous system. In the demyelinating regions of Krabbe disease, massive infiltration of macrophage like cells (Globoid cells) was the most prominent and characteristic pathological feature. Based on these findings, we hypothesized that macrophage mediated drug delivery system could be used for the therapy of Krabbe disease. To test this hypothesis, we prepared the oligo-mannose coated liposome (M3- liposome), which was known to be efficiently taken up by the peritoneal macrophages, and injected them into the abdominal cavity or cerebral left ventricle of the mouse models of Krabbe disease (*Twitcher* mouse and saposin A knockout mouse), and examined its distribution in the peritoneum and brain. As a result, M3-liposome which was injected into the cerebral left ventricle was preferably taken up by the peri-ventricular macrophages in *Twitcher* mice, saposin A knockout mice, and wild type mice. In *Twitcher* mice and saposin A knockout mice, these macrophages were seemed to migrate from peri-ventricular area to the brain tissue. Although further quantitative analyses are necessary, these findings suggest that M3-liposome-macrophage mediated drug delivery system could be used for the therapy of Krabbe disease and other demyelinating diseases.

研究目的

スフィンゴ糖脂質は、生体膜に存在し、シグナルの認識・伝達にかかわる生体超分子構造“ミクロドメイン”を形成する重要な脂質成分である。脳・神経系は、他の組織に比べ、多彩で豊富なスフィンゴ糖脂質を含み、その分布には、領域別・細胞別のみならず、発生段階別にも際立った特異性がある。これらの事実は、スフィンゴ糖脂質が、脳機能の発現において、重要な役割を演じていることを示唆している。

一方、スフィンゴ糖脂質のライソゾームにおける分解障害であるライソゾーム病は、その多くが神経系に重篤な障害をきたす。治療法としては、酵素補充療法、骨髄移植などの効果が報告されているが、神経病変に対する効果はいまだ極めて乏しい。

我々は、これまでの研究で、スフィンゴ糖脂質代謝関連遺伝子のノックアウトマウスを作成し、その表現型の解析を行ってきた。本研究では、我々が作成したノックアウトマウスを用いて、ライソゾーム病の神経病変に対する新たな治療法開発に取り組んだので報告する。

研究経過

糖鎖被覆リポソームを用いたクラッペ病神経病変に対する新規治療法の開発

クラッペ病(別名Globoid cell leukodystrophy)は、ライソゾーム酵素であるガラクトシルセラミダーゼ(GALC)の遺伝的欠損を病因とする遺伝性脱髄疾患である。GALCは髄鞘形成細胞であるオリゴデンドログリア、シュワン細胞に特異的に発現し、髄鞘の主要な構成脂質であるガラクトシルセラミドを主要な基質とする。クラッペ病患者では、中枢および末梢神経系において進行性の脱髄が起こり、患者の多くは生後数ヶ月で神経症状を発症し、2歳までに死にいたる。骨髄あるいは臍帯血移植が酵素補充療法の観点から実施されているが、神経病変への治療効果は乏しい。その最大の原因は血液脳関門(BBB: blood-brain barrier)が障壁となり、酵素が中枢神経系に十分には到達しないことにある。

一方、クラッペ病の神経病理所見では、Globoid cell leukodystrophyの別名のとおり、脱髄領域への多核マクロファージ(Globoid cell)の浸潤が特徴的である。そこで、我々は、当施設で開発された人工糖脂質被覆リポソーム-オリゴマンノース被覆リポソーム-が腹腔マクロファージに効率的に取り込まれることに着目し、マクロファージ系細胞の遊走能を利用した中枢神経系へのdrug delivery system構築の可能性を検討した。

クラッペ病には自然発生のGALC欠損モデル-*Twitcher*マウス-と、我々が独自に作成したGALC活性化たんぱく質欠損モデル-サポシンAノックアウトマウス-が存在し、それぞれ、乳児型クラッペ病、遅発型クラッペ病の表現型を呈する。本研究では、*Twitcher*マウス、サポシンAノックアウトマウスおよび野生型マウスを用いて検

討を行った。まず、マンノトリオースを含む人工糖脂質(M3-DPPE)からなるリポソーム(M3-liposome)とDPPEのみのリポソーム(Bare-liposome)を作成した。生体内での追跡を可能にするため、内部には標識蛍光物質(FITC-BSA)を封入した。M3-liposomeとBare-liposomeをそれぞれ、*Twitcher*マウス、サポシンAノックアウトマウス、野生型マウスの腹腔内および側脳室内に投与し、その腹腔内、脳内での動態を検討した。その結果、腹腔内投与では、*Twitcher*マウス、サポシンAノックアウトマウス、野生型マウスのいずれにおいても腹膜マクロファージへのすみやかな取り込みが認められたが、脳内への明確な遊走細胞は同定できなかった。標識物質の問題点など、手法の改良が必要と考えられた。一方、左側脳室内投与では、*Twitcher*マウス、サポシンAノックアウトマウスおよび野生型マウスにおいて、投与されたM3-liposomeの両側の脳室周囲マクロファージへの取り込みが観察された。さらに、*Twitcher*マウス、サポシンAノックアウトマウスにおいては、貪食マクロファージの脳実質内への遊走が推定された(**Fig. 1**)。また、*Twitcher*マウスではアストログリア細胞のマーカータンパク質であるGlial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) に免疫陽性で、アストログリア細胞の形態を呈する細胞にFITC陽性のものが散見された(**Fig. 1**)。Bare-liposomeは腹腔内投与、側脳室内投与ともほとんど取り込みを認めなかった。これらの所見から、M3-liposomeは、腹腔マクロファージと同様に、脳内のマクロファージにも効率的に貪食され、貪食したマクロファージの一部は脳実質内に遊走しうることを示唆された。脳室周囲マクロファージによるM3-liposomeの取り込みと遊走の機構を検討する目的で、*Twitcher*マウス、サポシンAノックアウトマウスおよび野生型マウス脳におけるマンノースレセプター(Mrc1, Mrc2, Signr1, Signr3)およびサイトカイン・ケモカインの発現量を検討したところ、脳組織にもマンノースレセプターの発現を認め、Mrc1, Mrc2は*Twitcher*マウスおよびサポシンAノックアウトマウスにおいて野生型マウスよりその発現が亢進していた(**Fig. 2**)。ケモカインMCP-1(monocyte chemoattractant protein 1)は*Twitcher*マウスにおいては野生型マウスの103倍、サポシンAノックアウトマウスにおいては野生型マウスの22倍に発現が亢進していた。

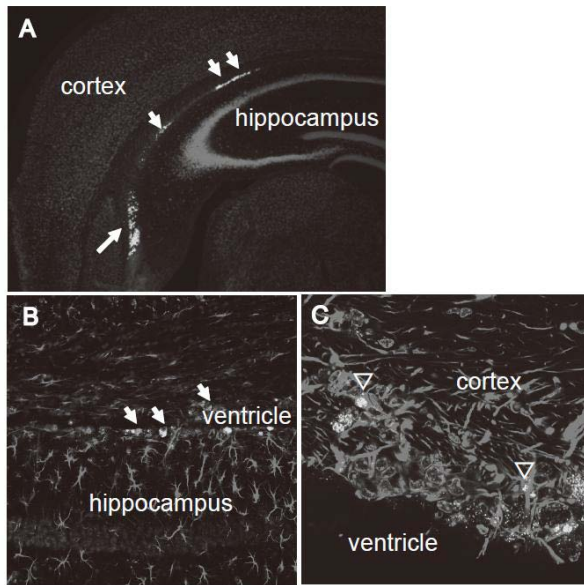


Figure 1.

Administration of M3-DPPE liposome into the cerebral lateral ventricle of *Twitcher* mice.

A and B: Arrows indicate macrophage like cells which phagocytosed FITC-BSA encapsulated M3-DPPE liposome. Majority of the FITC positive cells were observed in the peri-ventricular area but some migrated cells were observed in the cortex. **C:** Arrow head indicates GFAP positive cells with FITC-BSA.

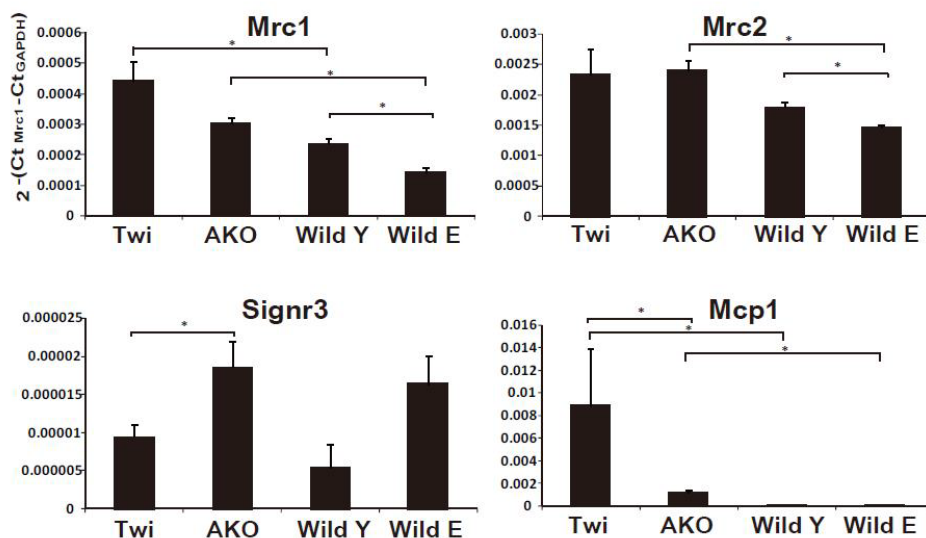


Figure 2.

Real-time PCR analyses for the expression of mannose receptors (Mrc1, Mrc2, Signr3) and MCP1 in *Twitcher* mice (Twi: 34.0±1.4days), saposin A knockout mice (AKO: 94.5±12.1 days) and wild type mice (Wild Y: 36.5±7.1 days, Wild E: 129.0±2.0 days). *: P<0.05. N=4-5 for each group.

考察

クラッペ病の脱髄病変部位では、他の脱髄疾患に比し、マクロファージ様細胞の浸潤とミクログリア、アストログリアの活性化が顕著である。この免疫応答は他の代表的な脱髄疾患である多発性硬化症がTリンパ球の活性化を特徴としているのとは異なり、特徴的であるといえる。今回は、このマクロファージの遊走能をBBB突破の技術基盤として利用する可能性を検討した。その結果、M3-liposomeは、腹腔マクロファージと同様に、脳内のマクロファージにも効率的に貪食されること、*Twitcher*マウスおよびサポシンAノックアウトマウス脳で、貪食したマクロファージの一部は脳実質内に遊走しうることが示唆された。この結果を踏まえ、今後は定量的な解析を加える必要がある。*Twitcher*マウスおよびサポシンAノックアウトマウスの脳内ではさまざまなサイトカイン・ケモカインの発現が亢進し、中でもMCP-1の著明な発現亢進を認めた。MCP-1はマクロファージから産生され、局所のマクロファージ、ミクログリアの活性化を引き起こすとともに、単球の走化性の活性化を介して、体循環から、単核系細胞を炎症あるいは損傷部位局所に集積させる作用がある。*Twitcher*マウスおよびサポシンAノックアウトマウス脳において、一部のマクロファージの脳実質内への遊走が観察されたことは、MCP-1の発現亢進によるものかもしれない。今回の検討では、肯定的な所見の得られなかった体循環から中枢神経系へのマクロファージの遊走の可能性を含め、マクロファージの脳内への遊走の分子メカニズムについて今後のさらなる検討が必要である。

我々のこれまでの研究成果も示すように、スフィンゴ糖脂質の多様性が、脳神経系をはじめ、各組織あるいは細胞における機能発現に重要であり、その質的、量的変化は生体において重篤かつ特徴的な病変を引き起こすことは明白である。しかしながらその多様性ゆえに細胞単位での分子メカニズムはいまだ不明な点が多い。新たな治療戦略の開拓には、個体レベルでの解析に加え、細胞単位での分子メカニズムの解析が不可欠であり、今後の検討課題である。

研究発表

口頭発表

- 1) Matsuda J, Yoneshige A, Suzuki K. Generation of the anti-mouse prosaposin specific antibody: Regional accumulation of prosaposin in the hippocampus of saposin D knockout mouse. The 57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. October 23-27, 2007, San Diego, California, USA.
- 2) Yoneshige A, Matsuda J, Sasaki A, Suzuki K. Patterned cerebellar Purkinje cell degeneration in mouse models of saposin D deficiency and Niemann-Pick

type C disease is associated with selective expression of sphingosine kinase. The 57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. October 23-27, 2007, San Diego, California, USA.

3) 米重あづさ、佐々木彩乃、松田純子 Yoneshige A, Sasaki A, Matsuda J
サポシンD欠損マウスおよびニーマンピック病C型マウスの小脳プルキンエ細胞死とスフィンゴシンキナーゼ発現. 第49回日本先天代謝異常学会. 2007年11月15-17日・山形市(山形県).

4) Yoneshige A, Sasaki A, Suzuki K, Matsuda J. Patterned cerebellar Purkinje cell degeneration in mouse models of saposin D deficiency and Niemann-Pick type C disease is associated with selective expression of sphingosine kinase. International Symposium of Lysosomal Storage Diseases. November 29-December 1, 2007, Tokyo, Japan.

5) 佐々木彩乃、米重あづさ、松田純子. スフィンゴリポドーシスモデルマウス組織中のスフィンゴシン1リン酸およびスフィンゴ糖脂質リゾ体濃度の測定. BMB2007 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会. 2007年12月11-15日・横浜市(神奈川県).

6) Matsuda J., Suzuki K. The function of sphingolipid in the nervous system: Lessons learnt from mouse models of specific sphingolipid activator protein deficiency. (招待講演)
Second Special Meeting of the International Society of Neurochemistry, on Neural Glycoproteins and Glycoproteins. December 1-5, 2006, Antigua, West Indies.

7) Matsuda J., Yoneshige A., Kubo N., Suzuki K. Prosaposin is up-regulated in the brain and placenta of lysosomal storage disorders (LSDs) in the mouse: Possible markers for the neonatal screening for LSDs ? The 6th meeting of the international society for neonatal screening. September 16-19, 2006, Awaji, Hyogo and Tokushima, Japan.

8) Yoneshige A., Kubo N., Suzuki K., Matsuda J. Generation of a specific anti-mouse prosaposin antibody: Specific up-regulation of prosaposin in the brain of saposin D knockout mouse. The 20th IUBMB International Congress of

Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. June18-23, 2006, Kyoto, Japan.

誌上発表

1) Matsuda J, Yoneshige A, Suzuki K. The function of sphingolipids in the nervous system: Lessons learnt from mouse models of specific sphingolipid activator protein deficiencies. *J. Neurochem.* 103, Supplement 1, 32-38, 2007.

2) Sun Y, Witte DP, Zamzow M, Ran H, Quinn B, Matsuda J, Grabowski GA. Combined saposin C and D deficiencies in mice lead to a neuronopathic phenotype, glucosylceramide and α -hydroxy ceramide accumulation, and altered prosaposin trafficking. *Hum. Mol. Genet.* 16: 957-971, 2007.

3) Matsuda J, Suzuki K. Krabbe disease (Globoid cell leukodystrophy). In *Lysosomal Storage Disorders* edited by Barranger, J., Cabrera-Salazar, M.A., Springer, New York, pp. 269-283, 2007.

4) Matsuda J, Vanier MT, Popa I, Portoukalian J, Suzuki K. GD3-and O-acetylated GD3-gangliosides in the GM2 synthase-deficient mouse brain and their immunohistochemical localization. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 82: 189-196, 2006.

5) 松田純子. スフィンゴリピドーシスの新たな疾患モデルマウスの作成; 神経系におけるスフィンゴ糖脂質の生理機能の理解と神経病変治療法の開発をめざして. *日本先天代謝異常学会雑誌* 第22巻、第1号、35-41、2006.

Figure 1.

Administration of M3-DPPE liposome into the cerebral lateral ventricle of *Twitcher* mice.

A and **B**: Arrows indicate macrophage like cells which phagocytosed FITC-BSA encapsulated M3-DPPE liposome. Majority of the FITC positive cells were observed in the peri-ventricular area but some migrated cells were observed in the cortex. **C**: Arrow head indicates GFAP positive cells with FITC-BSA.

Figure 2.

Real-time PCR analyses for the expression of mannose receptors (Mrc1, Mrc2, Signr3) and MCP1 in *Twitcher* mice (Twi: 34.0 ± 1.4 days), saposin A knockout mice (AKO: 94.5 ± 12.1 days) and wild type mice (Wild Y: 36.5 ± 7.1 days, Wild E: 129.0 ± 2.0 days). *: $P < 0.05$. N=4-5 for each group.