-Review-

Sandhoff病の新規治療法を目指した病態解析

大石一彦

Pathophysiology of Sandhoff Disease and Novel Thrapeutic Targets

Kazuhiko Oishi

Department of Pharmacology, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan.

(Received August 9, 2022)

Sandhoff disease (SD) is a glycosphingolipid storage disease resulting from a genetic mutation in *HEXB* and associated deficiency in β -hexosaminidase activity. This defect causes abnormal accumulation of ganglioside GM2 and related glycolipids in lysosomes, resulting in progressive deterioration of the central nervous system. *Hexb*-knockout (*Hexb*^{-/-}) mice, an established animal model, show abnormalities similar to the severe phenotype seen in human infants. We used iPS cells derived from this mouse model (SD-iPSCs) to examine abnormal neuronal lineage differentiation and development *in vitro* during the asymptomatic phase of SD. Differentiation ability along the time axis appears to be altered in SD-iPSCs in which the differentiation into astrocytes is accelerated. This abnormal differentiation was suppressed by introducing the *Hexb* gene. These results indicate that the abnormal differentiation of SD-iPSCs into the nervous system reflects the pathogenesis of SD. Analysis using *Hexb*^{-/-} mice revealed that activated microglia causes astrogliosis at the early stage of development that can be ameliorated *via* immunosuppression. Furthermore, reactive astrocytes in the cortex of *Hexb*^{-/-} mice express adenosine A_{2A} receptors in the late inflammatory phase. Inhibition of this receptor resulted in a decrease in activated microglial cells and inflammatory cytokines/ chemokines. These results suggest that the astrocyte A_{2A} receptor is important as a sensor that regulates microglial activation in the late inflammatory phase. Thus, our results provide new insights into the complex pathogenesis of SD.

Key words-Sandhoff disease, neural differentiation, neurodegeneration, gliosis

1. はじめに

リソソーム病は、リソソーム内の加水分解酵素の 遺伝的欠損に関連しており、その結果、基質の分解 が阻害され、エンドソームやリソソームに未分解の 基質が蓄積し、最終的に細胞機能が損なわれる代謝 性疾患である.この疾患は現在50種類以上存在し、 骨格、脳、皮膚、心臓、中枢神経系など、身体の 様々な部位に影響を及ぼし、重篤な症状を引き起こ し、しばしば早期に死に至る.

GM2 ガングリオシドーシスは、常染色体劣性遺 伝形式を示す遺伝性疾患で、リソソーム内の加水分 解酵素の一種であるβ-ヘキソサミニダーゼの遺伝的 欠損により引き起こされる。そのため糖脂質である GM2 ガングリオシドなどが神経系の細胞に過剰に

明治薬科大学薬理学研究室(〒204-8588 東京都清瀬市 野塩2-522-1)

e-mail: oishikz@my-pharm.ac.jp

蓄積し、それに伴って中枢神経症状などを呈する代 表的なリソソーム病である.¹⁾ *B*-ヘキソサミニダー ゼは3つのアイソザイムからなり、それぞれ2つの サブユニットで構成されている. HexA $\iota_{\alpha} \wr_{\beta}$ のサ ブユニットからなり、HexBは2つのBサブユニット から. HexSは2つのaサブユニットから構成されて いる。各サブユニットは特定の遺伝子によってコー ドされており. αサブユニットにはHEXA. Bサブユ ニットにはHEXBがある.また,GM2活性化タンパ ク質GM2AはGM2ガングリオシドに対する加水分 解活性を持たない付属タンパク質であるが、GM2A は、GM2ガングリオシドと複合体を形成し、これ がHexAと複合体を形成することでGM2ガングリオ シドが分解される. ヒトではGM2 ガングリオシド を分解できるのはHexAだけである. したがって. α サブユニット, β サブユニット,及びGM2Aのい ずれが欠損してもGM2ガングリオシドの分解がで きなくなるためGM2ガングリオシドーシスとなる (Fig. 1). それぞれ HEXA, HEXB 及び GM2A 遺伝子

本総説は、2021年度退職にあたり在職中の業績を中心 に記述されたものである。



Fig. 1. Schematic Representation of GM2 Gangliosidosis HexA, hexosaminidase A; HexB, hexosaminidase B; HexS, hexosaminidase S; GAGs, N-acetylgalactosamine.

の変異は、それに基づく常染色体劣性遺伝病である Tay–Sachs病、Sandhoff病(Sandhoff disease: SD)ある いはGM2A活性化タンパク質欠損症を発症する.²⁻⁴⁾

SDは、リソソーム内の加水分解酵素であるB-へ キソサミニダーゼのHex AとHex Bを構成するサ ブユニットのうち. B-サブユニットをコードする HEXB 遺伝子の変異により両方の酵素活性が同時に 失われる疾患である. その結果, GM2 ガングリオ シドの加水分解ができなくなり、GM2ガングリオ シドが主としてニューロンに蓄積する.SDは、発 症年齢、神経症状によって3種類の病型が存在す る、生後半年以前に発症する乳児型は知的障害、眼 底黄斑部のチェリーレッド斑. 視力障害. 痙れん などを呈する、生後2-10歳で発症する若年型は運 動障害,言語障害などがみられ、50歳代までの発 症が知られている成人型は脊髄小脳変性症や運動 ニューロン疾患類似の症状を呈するものがある.し かし、GM2ガングリオシドの蓄積が脳神経系の機 能を障害するメカニズムに関しては不明な点が多い のが現状である. それは、患者の発達時期における 神経系の情報がブラックボックスであることが一つ の要因である. また, GM2 ガングリオシドーシス に対する根本的治療法は確立していない、そのため 様々な合併症 (痙れん,嚥下障害,呼吸障害など) に対する対症治療が中心となっている.

*Hexb*遺伝子をノックアウトした*Hexb^{-/-}マウス*(*Hexb*-KOマウス)は、SDの病態を反映したモデル

マウスとして知られている.⁵⁾この*Hexb*-KOマウス は、生後8週齢頃までは明らかな症状は認めない が、次第に動作が緩慢になり四肢振戦が現れる.生 後12週齢頃からは驚愕反応や運動失調,筋力低下 などの運動障害が現れ,生後16週齢頃で死に至る. この*Hexb*-KOマウスを用いて,酵素補充療法,細 胞移植療法,遺伝子治療,基質抑制療法などの新規 治療法の研究開発が行われている.⁶⁻¹⁰⁾

SDの分子病態メカニズムは依然として不明な部 分が多いが、このHexb-KOマウスを用いた解析か ら、「GM2ガングリオシドや代謝産物の蓄積による 細胞内構造の破錠・細胞死が引き金となり、症状期 が始まる生後8週齢以降でミクログリアやアストロ サイトが関与する炎症・自己免疫系が症状の進行と ともに活性化し、ニューロンのアポトーシスととも に神経変性が起こる | とする説が一般的に受け入れ られている.11,12)一方で、個体発生から無症状期の 間で起きている変化についての報告はほとんど明 らかになっていないが、このHexb-KOマウス胎仔 の海馬領域から調製したニューロンの神経突起の 異常¹³⁾や、生後4週齢の無症状期のHexb-KOマウ スから調製した後根神経節ニューロンでの神経細 胞死が報告されている.14)これらのことは、胎生期 や無症状期に起きるニューロンの変化が、その後に 起こる脳神経系の機能障害の原因の一部になってい ることを推測させるが、本質的な原因解明のために は、症状が現れる前の体の中で起こっている変化を

*in vitro*で再現することが不可欠である.本研究では,*Hexb*-KOマウスの体細胞から人工多能性幹細胞(*iPS*細胞)を作製し,神経系の発生・分化から発症 過程までを*in vitro*で再現し,発症前の早期からどのように病態変化していくのかを*Hexb*-KOマウスから得られる知見と比較解析を行った.

SDはどのようなメカニズムで発症するのか?本 研究では、「SDの発症前早期に潜在する神経系の発 生・分化に関わるシグナリングの破綻が原因とな り、中枢神経系の発達過程の異常を引き起こし、神 経変性が進行し中枢神経系の機能が障害され発症す る」とする独自の仮説を提唱するに至った.この仮 説を立証し、ヒトの系へ帰納することで、SDの病 態の本質的解明に繋がるばかりでなく、SDの新た な治療戦略の開発基盤を提供できると考える.

2. 神経系への分化異常

中枢神経系の発生は、原腸陥入時に起こる神経誘 導に始まる.原腸陥入により中胚葉が予定外胚葉に 接することにより、外胚葉の正中部分には神経板が 誘導され、やがてこれが内側に窪んで神経上皮細胞 から構成される神経管が形成される.その後神経 管は、前後軸及び背腹軸に沿って領域化が進行し、 領域ごとに異なる特徴を持つ複雑な構造に発達し、 脳・脊髄が形成されていく.

この中枢神経系の発生過程において、細胞レベル でも劇的な変化を遂げる.神経上皮細胞は、未分化 な神経幹細胞であり、この細胞が対称分裂を繰り返 すことで新たな神経幹細胞を生み出す. マウスの中 枢神経系の発生において、この時期は、胎生期8日 から10日に当たる。胎生期11.5日頃より神経幹細 胞は非対称分裂を引き起こすようになり、新たな神 経幹細胞とともに、もう一つの娘細胞はニューロン へと運命づけられた神経前駆細胞を生み出す.神経 前駆細胞は、対称分裂を繰り返すとともにニューロ ンを産生する、このニューロン新生は胎生後期まで 続くが、胎生期17.5日頃になると、アストロサイト やオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞を産生 するようになる、神経幹細胞の分化能は、時間的・ 空間的に厳密に制御されており、このことにより、 様々な種類のニューロンやグリア細胞が適切な時期 に適切な場所に配置される要因の一つとなってい る.

ヒトを含めた哺乳動物の神経幹細胞の培養法が確



Fig. 2. Schematic Representation of Sox2 and Notch/Hes Signaling

立され,線維芽細胞増殖因子(bFGF)などの増殖因 子存在下で,長期培養することが可能である.¹⁵⁻¹⁸⁾ また,培養した神経幹細胞は,増殖因子を除くこと でニューロンやグリア細胞に分化させることが可能 である.すなわち,神経幹細胞の自己複製能や多分 化能を *in vitro*で再現することが可能である.そこ で,*Hexb*-KOマウス胎仔由来神経幹細胞の神経分化 異常を検討する目的で,*Hexb*-KOマウス及び同腹仔 ヘテロマウスの胎生期12.5日齢の胎仔脳より,神経 幹細胞を培養し,神経幹細胞の性質と増殖能,そし て神経系への分化能を比較検討した.

Hexb-KOマウス胎仔脳由来の神経幹細胞コロ ニー (neurosphere) では、神経幹細胞が減少し、 ニューロンとアストロサイトが増加していた. ま た. Hexb-KOマウス胎仔脳由来神経幹細胞を分化誘 導すると、神経幹細胞とニューロンが減少し、アス トロサイトが増加していた.神経幹細胞は、神経上 皮細胞から由来するラジアルグリア細胞に起因す ることが明らかにされており、19)神経系を構成する ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイ トなどに分化することの出来る多分化能を有してい る. Sox2は、神経幹細胞の分化を抑制し、未分化 状態の維持に関与する、ニューロンの分化は、神経 系特異的なbasic-helix-loop-helix (bHLH)型の転写 因子のカスケードにより制御されている (Fig. 2). Sox2は、この転写カスケードの上位にあるbHLH の転写を抑制することにより神経分化を抑制する ことが明らかになっている.^{20,21)} Hexb-KOマウスで は、Sox2が抑制され時間軸に従った細胞分化能が

変化を受けていると考えられる。また、この時間 軸に従った細胞分化のスイッチングの原因の一つ に、Notchシグナルによる制御があると考えられて いる.²²⁻²⁴⁾ Notch は未分化な細胞に発現する分子で あり、隣接した細胞に発現するNotchリガンドから の刺激によって細胞内ドメインが切り出されて核内 へと移行し、RBP-J/Notch 複合体を形成する.この 複合体がbHLH型転写抑制因子であるHes1, Hes5の 発現を誘導するが、Notchリガンドの発現は周期的 に増減しており(オシレーション)、その結果起こ るHes1などのオシレーションが、分化抑制及び幹 細胞の維持に働くことが知られている.25,26)発生後 期になるとNotchシグナルはSTAT3のリン酸化を介 してアストロサイトへの分化を誘導する.27)アスト ロサイト特異的遺伝子プロモーター中のSTAT3結 合部位は発生初期においてはメチル化を受けてお り、発生後期になると脱メチル化によりアストロサ イトへの分化能を獲得することが知られている.28) 一方, ニューロンへの分化シグナルにはneurogenin (Ngn) や Mash1 などの bHLH 型転写促進因子が関係 していることが知られている.²⁹⁻³²⁾これらの転写促 進因子は、前述したHes1やHes5により転写が阻害 される. またMash1は、ニューロンへの分化を誘導 するだけでなくグリア細胞への分化を積極的に抑制 することが知られている.32)

したがって, *Hexb*-KOマウスでは, この時間軸に 従った細胞分化能が変化を受けており, 神経幹細胞 の増殖能が低下し, ニューロンへの分化のタイミン グは早期に完了した一方で, アストロサイトへの分 化のタイミングが加速されているのではないかと考 えられる. 神経発生過程において, 神経系の分化は 時間的・空間的に制御され, そのため, 様々なタイ プのニューロンとグリア細胞が適正なタイミング で適正な位置に配置される. 一つの可能性として, *Hexb*-KOマウスでは, その表現型が本質的な発生プ ログラムに影響を与え, そのため, 神経学的機能不 全につながっているのかもしれない.

3. iPS細胞を利用した in vitro 病態解析

3-1. SD-iPS細胞の樹立 SDの発症前早期に 潜在する病因を検討するために, *Hexb*-KOマウスか らiPS細胞を樹立した (SD-iPS細胞). 従来, iPS細 胞を誘導するには, レトロウイルスやレンチウイル スなどのウイルスベクターを用いていたが, ベク

ターと導入遺伝子の両方が永久に染色体に組み込ま れることになる.33-36)このようなベクターは,正常 な機能を妨げかねないような変異を引き起こすこと になり、導入された遺伝子の発現が、特定の系統へ の分化に影響を与えかねない. これらの欠点を回 避するために、iPS細胞の作製にoriP/EBNA-1-based episomal vectorを用いた. oriP/EBNA1-based vector は、細胞分裂時に複製されるためプラスミドが保持 される. また、プラスミドは時間の経過とともに消 失するが、細胞の初期化には十分であるので、得 られた細胞には遺伝子導入されたDNAを含まない ことになる.^{37,38)} 樹立した SD-iPS 細胞は,遺伝子発 現、増殖能、多分化能の点でマウスiPS細胞と極め て類似しており、SD-iPS細胞をSDに関連する主要 な細胞種であるニューロンに分化誘導することが可 能であった、したがって、今回樹立したSD-iPS細 胞は、マウスiPS細胞と同等の性質を持っているこ とが示唆される.更に、このSD-iPS細胞は、GM2 ガングリオシドの疾患特異的な蓄積を示した.し たがって、SD-iPS細胞を利用することにより、SD の胎生期や無症状期から起こっている病態変化を in vitroで再現することが初めて可能となる.

マウスES/iPS細胞から神経分化を誘導する方 法として,血清存在下において浮遊培養を行い, embryoid bodyをつくらせる方法が一般的である. この胚様体は実際の胚と同様に,三胚葉の分化を誘 導することが可能であり,レチノイン酸存在下にお いては神経系への分化が更に促進されることが示さ れている.³⁹⁾しかし,このような誘導方法では内胚 葉,中胚葉系への分化も同時に引き起こされてしま う.また,レチノイン酸の添加によって神経分化と 同時に神経組織の後方化も引き起こされるために, 終脳をはじめとした前方の神経組織の誘導は困難で あった.

その後マウスES細胞から神経分化を誘導する方 法が多く報告され、レチノイン酸やFGFなどの増 殖因子、フィーダー細胞を使用することなく、無血 清培地中でマウスES細胞を浮遊培養し、細胞塊を 形成させることで、効率よくニューロンへ分化させ ることができる serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates (SFEB)法が確立された.⁴⁰⁾ SFEB 法により誘導されたニューロンは、主に終脳領域 のニューロンであり、今までに報告されている領 域決定因子に対し, *in vivo*と同様の反応性を保持し ている.更にU-bottomed 96 well plateを用いて培養 する(SFEBq法)ことで,より多くの大脳皮質前駆 細胞を誘導することができる.⁴¹⁾このSFEBq法によ る三次元培養は大脳皮質前駆細胞を多く誘導するだ けでなく,中枢神経系組織の発生に必要とされる神 経上皮構造を形成し,層構造を持った大脳皮質組織 を産生することができる.すなわち,より大脳の発 生に近い状態でこれまでは困難であった発生段階 におけるSDに対する異常を観察することが可能で ある.

一方, stromal cell-derived inducing activity (SDIA) 法とはマウスや霊長類のES細胞やiPS細胞から効 率よく中脳ドパミン神経などの脳幹のニューロン をin vitroで産生する方法として確立された方法で ある.⁴²⁾このSDIA法では, ES細胞やiPS細胞をPA6 ストローマ細胞と無血清培地で共培養することで, ES細胞やiPS細胞から神経系細胞への分化をほぼ選 択的に誘導することができる.

Hexb-KOマウス由来iPS細胞の神経系への分化異 常を検討する目的で,SDIA法を用いた解析ととも に,大脳皮質様神経組織を分化誘導できる方法で あるSFEBq法を用いて行った.⁴¹⁾すなわち,2種類 の神経系分化法で得られたそれぞれのSD-iPS細胞 由来神経幹細胞について,神経幹細胞マーカーであ るNestinやSox2の発現強度を比較解析することで, 神経幹細胞としての性質を検討した.また,神経幹 細胞の増殖能について神経幹細胞コロニーのサイズ や数で解析した.更に,ニューロンやグリア細胞へ の分化能に異常があるかを免疫抗体染色により検討 した.

Hexb-KOマウスの胎生期12.5日齢の胎仔脳より 神経幹細胞を培養し、神経幹細胞の性質と増殖能、 そして神経系への分化能を比較検討したところ、 Hexb-KOマウスはヘテロマウスと比較して神経幹 細胞の増殖能とニューロンへの分化能が有意に低下 し、アストロサイトへの分化能が有意に増加してい た.そこで、SD-iPS細胞をSFEBq法で培養し、大 脳皮質様組織を作製し検討した.その結果、Hexb-KOマウス胎仔由来神経幹細胞での結果と同様に、 神経幹細胞の増殖能とニューロンへの分化能がとも に有意に低下し、アストロサイトへの分化能が有意 に増加していた.したがって、SD-iPS細胞由来大 脳皮質様組織の神経幹細胞は, Hexb-KOマウス胎仔 脳由来の神経幹細胞コロニーの場合と同様に, 増殖 能が低下しており, 神経幹細胞からの分化が促進さ れて, ニューロンへの分化が抑制され, アストロサ イトが増加したと考えられる.

ミグルスタットは、スフィンゴ糖脂質合成の第一 段階に働く酵素であるグルコシルセラミド合成酵素 を阻害するため、ガングリオシドの合成が阻害され る. その下流のGM2ガングリオシドの合成も阻害 されるため、Hexb-KOにおいては、GM2ガングリ オシドの蓄積を減少させることが期待できる. そ こで、SFEBg法で観察された変化がミグルスタット で回復するか検討したところ、ミグルスタットは、 SD-iPS細胞で見られた変化を有意に回復した。以 上のことより、SFEBq法によりSD-iPS細胞から誘 導した神経幹細胞は、Hexb-KOマウス胎仔由来神経 幹細胞より調製した神経幹細胞とその性質が類似 しており、神経系への分化異常を反映しているこ とが明らかとなった. また、ミグルスタットにより GM2ガングリオシドの蓄積を減少させると神経系 への分化異常が回復することから, in vitroで観察さ れた神経系への分化異常は、SDの病態を反映した ものであることが明らかとなった.

SDIA法を用いて、SD-iPS細胞を神経系へ分化誘 導し検討したところ, 野生型マウス由来iPS細胞に 比べて、SD-iPS細胞から形成された神経幹細胞コ ロニーはその数と面積が減少すること, SD-iPS細 胞由来の神経幹細胞からのニューロンへの分化能 が低下し、アストロサイトへの分化が増大すること を見い出した.43,44) したがって, SD-iPS細胞由来神 経幹細胞コロニーの神経幹細胞は, Hexb-KOマウス 胎仔脳由来の神経幹細胞コロニーやSD-iPS細胞由 来の大脳皮質様組織から培養した神経幹細胞コロ ニーの場合と同様に、増殖能が低下しており、神 経幹細胞からの分化が促進されて、ニューロンへの 分化が抑制され、アストロサイトが増加したと考え られる. この分化能の低下は, SD-iPS細胞にHexb 遺伝子を強制発現させることで回復することから, Hexb 遺伝子の欠損により、ニューロンへの分化能 が低下することが明らかとなった.加えて、ミグル スタットによりGM2ガングリオシド等の蓄積を阻 害すると、これらの異常が回復することを報告して いる.^{8,9)}このことは、GM2ガングリオシド等の異常





Values represent the mean \pm S.E. from six independent experiments. *p<0.05, ***p<0.005.

蓄積が神経系への分化異常の一因であることを示し ている.⁴⁴⁾

SD-iPS細胞からSDIA法により誘導した神経幹細 胞を用いて、Sox2, Notch1とHes1に対するリアルタ イムPCR解析を行った (Fig. 3). SD-iPS 細胞由来神 経幹細胞のSox2のmRNA発現レベルは、野生型iPS 細胞由来の神経幹細胞に比べて有意に減少してい た. また、Notch1とHes1のmRNA発現レベルも野 生型iPS細胞由来の神経幹細胞に比べて有意に減少 していた. すなわち、SD-iPS細胞由来の神経幹細 胞は、Sox2と、Notch1やHes1の発現が減少し、神 経幹細胞からの分化が促進された結果、ニューロン への分化が抑制され、アストロサイトの分化が増大 したと考えられる.したがって、Hexb-KOマウス では、Notch/Hes 経路が抑制され時間軸に従った細 胞分化能が変化を受けており、早期に神経幹細胞 が発生後期の性質を獲得し、神経幹細胞の増殖能 が低下し、ニューロンへの分化のタイムングは早期 に完了した一方で、アストロサイトへの分化のタイ ミングが加速されているのではないかと考えられ る (Fig. 4). 神経発生過程において、神経系の分化 は時間的・空間的に制御され、そのため、様々なタ イプのニューロンとグリア細胞が適正なタイミング で適正な位置に配置される.一つの可能性として, Hexb-KOマウスでは、その表現型が本質的な発生プ ログラムに影響を与え,そのため,神経学的機能不 全につながっているのかもしれない. 以上のこと より, SD-iPS細胞から神経系へのin vitro分化異常 は、SDの病態を反映したものであることが明らか



Fig. 4. Schematic Representation Showing Abnormal Differentiation of Neural Stem Cells Derived from Sandhoff Disease Model Mouse

となった.この手法を用いれば,疾患の病態解明といった基礎研究の応用だけでなく,創薬スクリーニングにも応用できる.例えば,SDIA法で形成された神経幹細胞コロニーの面積や数の回復を指標に薬物探索を行えば,簡便かつ大規模にSDに対する新規の薬剤を探すことが期待される.

3-2. 治療標的としての分子シャペロン 現 在,病態メカニズムの主因であるGM2ガングリオ シドーシスに対する根本的治療法は確立されていな いため,様々な合併症(痙れん,嚥下障害,呼吸障 害など)に対する対症療法が中心となっている.近 年,ファブリー病を始めとする他のリソソーム病 や,中枢神経における物質の蓄積という類似点を持 つアルツハイマー病及びパーキンソン病において, 低分子化合物によるケミカルシャペロンを用いた新 規治療方法の研究開発が行われている.45-47)ケミカ ルシャペロンとは、標的タンパク質に低分子化合物 を作用させることで、分解され易いタンパク質の安 定化や変異によるタンパク質の構造変化の修復を目 的とした新しい治療法である.

分解基質であるGM2 ガングリオシドの輸送は, エンドサイトーシスによって,細胞内に輸送され, 初期エンドソーム,後期エンドソームを経由して リソソームへと運ばれる.その一方で,初期エン ドソームからトランスゴルジネットワーク(trans Golgi network: TGN)を経由しエキソサイトーシス によって細胞外へ排出される逆行性輸送が存在す る.初期エンドソームよりTGNへの輸送にはvacuolar protein sorting (VPS) 35-VPS29-VPS26と sorting nexin (SNX) proteinsによって形成されるレトロマー 複合体と呼ばれるタンパク質複合体が担っていると される.⁴⁸⁾アルツハイマー病,パーキンソン病にお いて,これらの複合体の変異及び発現の低下が報告 されている.⁴⁹⁻⁵³⁾

アルツハイマー病の原因と考えられているアミ ロイド β (A β) の蓄積は、その前駆体タンパク質で あるアミロイド前駆体タンパク質 (amyloid-beta precursor protein: APP) が主としてエンドソームにおい てβ-セクレターゼ (BACE1) 及びγ-セクレターゼに よって切断され生じると考えられている. Mecozzi らは、アルツハイマー病に対し、レトロマー構 成因子VPS35を標的とした新規治療法を検討し た、⁵⁴⁾まず、VPS35の安定化を指標に、in silicoスク リーニングによりthiophene-2,5-diylbis (methylene) dicarbamimidothioate (R55) 及びその類似化合物であ る thiophen-2-ylmethyl carbamimidothioate (R33) を同 定した. VPS35を安定させた結果, APPを逆行性輸 送によってエンドソームから遠ざけることでABの 蓄積を抑制し、ニューロンへの障害を回避できるこ とを報告している. すなわち, VPS35の安定化によ る逆行性輸送の亢進は、エンドソーム内の異常タ ンパク質や分解基質の凝集を低減できる. そこで, VPS35安定化ケミカルシャペロンにより逆行性輸送 を増強することで、GM2ガングリオシド等のリソ ソームへの蓄積を低減し, SD 由来細胞での神経系 への分化異常を改善できるか検討した.

SD-iPS細胞における分化異常が、逆行性輸送の

増強により回復するかを検討する目的で、SD-iPS 細胞にVPS35遺伝子を強発現させた細胞を用いて検 討した. SD-iPS細胞における神経幹細胞コロニー 形成能の低下はVPS35の強発現よって回復した.更 に、SD-iPS細胞におけるニューロンへの分化能の 低下とアストロサイトへの分化能の増大も、VPS35 遺伝子の強発現によって改善された.したがって, SDにおいてもVPS35との関連性が示されたととも に、VPS35及びレトロマー複合体を安定化させるケ ミカルシャペロンよってSD-iPSにおける神経系へ の分化異常が改善されることが考えられる. そこ で、VPS35に対するケミカルシャペロンであるR33 のSD-iPS細胞の分化異常に対する作用を検討する 目的で、SDIA法を用いてiPS細胞から神経系細胞 へ分化誘導し解析を行った. SD-iPS細胞における 神経幹細胞コロニー形成能の低下、そしてHexb-KO マウス由来神経幹細胞から神経系への分化におけ るニューロンの減少及びアストロサイトの増加は、 いずれもR33によって改善された. したがって. VPS35安定化ケミカルシャペロンのR33存在下で SD-iPSを培養し神経系へ分化誘導すると、分化異 常が改善することが示された.このことから、R33 がHexb-KOマウス胎仔内で起きる神経系への分化 異常に対しても効果を示す可能性が考えられる.

更に、生体内細胞においても同様の効果が観察で きるかを調べるために生体由来神経幹細胞を用いて 実験を行った. Hexb-KOマウスの胎生期12.5日齢の 胎仔脳の大脳皮質より神経幹細胞を培養し、R33の 神経系への分化能に対する作用を検討した. Hexb-KOマウス由来細胞の神経幹細胞コロニー形成能は ヘテロマウス由来細胞と差がなく、また、R33を処 理しても差が見られなかった.一方, Hexb-KOマ ウス由来神経幹細胞の分化を誘導すると、Hexb-KO マウスではヘテロマウスと比較してニューロンの 割合が減少し、アストロサイトの割合が増加した. Hexb-KOマウス由来神経幹細胞にR33を処理するこ とでこの分化異常は回復した.この結果より、R33 はSDにおける中枢神経系への分化異常に対する改 善効果が期待される。以上のことより、ケミカル シャペロンを用いたVPS35安定化による逆行性輸送 の増強は、GM2ガングリオシド等のリソソームへ の蓄積を低減し、神経系への影響を回復することで SDの新たな治療戦略となると考えられる.

4. Hexb-KOマウスを用いた病態解析

4-1. グリア細胞の活性化 アルツハイマー病 やパーキンソン病のような神経変性疾患では、慢性 的に神経炎症が生じており、 病態の進行に関与する ことが知られている.神経炎症はミクログリアやア ストロサイトの活性化により誘発される中枢神経に おける免疫応答であり、病変部位に活性化されたミ クログリアやアストロサイトの集積がみられる.活 性化したミクログリアはTNF-αなどの炎症性サイト カインを放出し、免疫応答を引き起こす.5)アスト ロサイトは活性型となり、GFAPの発現増強や様々 な遺伝子発現の変化を引き起こす.56)活性化アスト ロサイトは、活性型へ誘導するトリガーの多様性 により細胞障害性のA1アストロサイトと、細胞保 護性のA2アストロサイトに分類される。A1アスト ロサイトへの変化は、ミクログリアから分泌され るIL-1a, TNF-a, Clgによって誘導されることが報告 されている.57) すわなち、神経変性等により周囲の 環境の変化を感受したミクログリアがそれに応じ てTNF-αやIL-1αなどの炎症サイトカインを分泌し. これらの刺激によりアストロサイトはA1アストロ サイトへと変化する.

Hexb-KOマウスにおいても、このグリア細胞の活 性化や炎症性サイトカインの発現の増強といった 脳内の神経炎症が観察されている。16週齢のHexb-KOマウス脳において、CD68陽性の活性化ミクロ グリアやGFAP強陽性の活性化アストロサイトが 観察され、炎症性サイトカインであるIL-1a, IL-1β, TNF-αなどの増加が観察されている.⁵⁸⁾活性化アス トロサイトでは、Ccl3 (MIP-1a)の発現が増強して いるが、Hexb-KOマウスとCcl3 (MIP-1a)遺伝子欠 損マウスを交配すると、生存率や運動機能の改善が 見られることが報告されている.⁵⁹⁾これらのことか ら、SDにおいても、ミクログリアとアストロサイ トによる免疫応答が症状の悪化に関与していること が示唆される.

4-2. 治療標的としてのグリア細胞 *Hexb*-KO マウスのニューロン特異的に*Hexb* 遺伝子を発現さ せると, GM2 ガングリオシドの蓄積が改善され, 神経細胞死も改善されることが明らかにされてい る.⁶⁰⁾ しかし興味深いことに, このマウスではミク ログリアやアストロサイトの活性化の抑制はみられ ない. このことは, 神経細胞にGM2 ガングリオシ ドが蓄積することで神経変性が引き起こされるもの の、神経炎症は別の機構を介して引き起こされ、必 ずしも神経変性を引き起こすには十分ではないこと を示している、神経変性の病変が見られる以前の生 後2-4週齢の*Hexb*-KOマウスを解析したところ、大 脳皮質においてCD68を発現する活性化ミクログリ アがすでに観察されており、早期の段階ですでに 免疫応答が生じていることを明らかにしている.⁵⁸⁾ *Hexb* 遺伝子は、ミクログリアにも発現しているこ とがわかっていることから、⁶¹⁾ *Hexb* 遺伝子の欠損が 何らかの機構を介して無症状期の段階で神経炎症を 引き起こし、病変を増悪していることが推測され る.

免疫応答の活性化を抑制する目的で, Hexb-KO マウスに対してFcR遺伝子欠損マウスを交配する と, GM2 ガングリオシドの蓄積は観察されるもの の,神経細胞死の改善や生存率の向上,運動機能障 害の改善が見られた.⁶²⁾また,免疫応答の活性化を 抑制する目的で,Hexb-KOマウスに対してスフィン ゴシン1-リン酸受容体の機能的アンタゴニストであ るフィンゴリモド(FTY720)を3週齢より投与する と,ミクログリアやアストロサイトの活性化が抑制 され,運動機能の改善が見られた.⁵⁸⁾これらのこと から,SDにおいて,免疫系の活性化を抑制するこ とで症状を改善できることが示された.

Hexb-KOマウスにおいて、活性化したアストロ サイトにアデノシン A₂₄ 受容体が発現することを見 い出している.⁶³⁾アデノシンは、神経変性など病態 時においてその病変局所においてアデノシンの濃 度が増加する.⁶⁴⁾ Hexb-KOマウスの大脳皮質におい て、アデノシンA_{2A}受容体の発現は運動障害が現れ る時期の10週齢頃から大脳皮質のアストロサイト において増加することが観察された. そこで, 10 週齢よりHexb-KOマウスにアデノシンA₂₄受容体 アンタゴニストであるイストラデフィリンを投与 すると、運動機能の改善が観察された.このとき、 GFAP強陽性の活性化アストロサイト数の増加に影 響はなかったが、CD68陽性のミクログリア数の増 加が抑制された。また炎症性サイトカインである IL-1 α , IL-1 β , 及びケモカインである Ccl2/Cxcl10の 発現の増強が減少した.

以上のことをまとめると、まず、*Hexb*-KOマウス において、ミクログリアの活性化が進行すると炎症 性サイトカインであるIL-1aやTNFaの発現が増強 され、その結果、アストロサイトが活性化型になる ことでアデノシンA_{2A}受容体の発現が誘導される. 病変局所においてアデノシンの濃度が増加すると、 アデノシンA_{2A}受容体の刺激によりCcl2などのケモ カインの発現が誘導される.これらの一連の応答に よりミクログリアの遊走や活性化の増強が引き起こ されたと考えられる.したがって、新規治療標的と してのグリア細胞の活性化抑制がSDの新たな治療 戦略につながると考えられる.

5. おわりに

SDの病態の本質的原因解明のため、Hexb-KOマウスの体細胞からiPS細胞を作製し、神経系の発生・分化から発症過程までをin vitroで再現し、発症前の早期からどのように病態変化していくのかをHexb-KOマウスから得られる知見と比較解析を行った。

SDIA法やSFEBg法を用いて, SD-iPS細胞を神経 系へ分化誘導し検討したところ,野生型マウス由 来iPS細胞に比べて、SD-iPS細胞から神経幹細胞へ の分化能と神経幹細胞からニューロンへの分化能が ともに顕著に低下することを見い出した. この分化 能の低下は、SD-iPS細胞にHexb遺伝子を強制発現 させることで回復することから, Hexb 遺伝子の欠 損により、ニューロンへの分化能が低下することが 明らかとなった.したがって、Hexb遺伝子の欠損 は神経系細胞への分化に影響を与えることが示唆 された. 更に. ケミカルシャペロンを用いたVPS35 安定化による逆行性輸送の増強は、GM2ガングリ オシド等のリソソームへの蓄積を低減し, SDにお ける中枢神経系への分化異常を改善できることを示 した、これらのことは、神経系の発生・分化過程を SD-iPS細胞を用いて in vitro で再現することで初め て明らかにすることができた知見である.

更に, Hexb-KOマウス脳において,神経変性が観察される以前の早期からミクログリアやアストロサイトの活性化が観察された.早期からのミクログリアなど免疫系細胞の活性化を抑制すると,アストロサイトの活性化を抑制できること,更に運動機能の低下が改善することを見い出した.また,Hexb-KOマウス脳において,神経炎症が進行している時期のアストロサイトにアデノシンA_{2A}受容体が発現し,これを抑制することでミクログリアの活性化を抑制

できることを見い出した.

したがって、*Hexb*-KOマウスでは、胎生期での神 経幹細胞の分化・発達異常⇒神経変性⇒無症状期で の活性化アストロサイトの増加やミクログリアなど の免疫系細胞の活性化⇒神経炎症・自己免疫系の活 性化⇒神経変性や神経細胞死の増悪、が経時的に生 じていることが示唆される.以上の成果をもとに、 「SDの発症前早期に潜在する神経系の発生・分化に 係わるシグナリングの破綻が原因となり、中枢神経 系の発達過程の異常を引き起こし、神経変性と神経 炎症が進行し中枢神経系の機能が障害され発症す る」とする独自の仮説を提唱するに至った.

謝辞 本稿の執筆にあたり,共同研究を進めて くださった櫻庭 均先生(明治薬科大学・教授),兎 川忠靖先生(明治薬科大学・教授),伊藤孝司先生 (徳島大学薬学部・教授)に深謝いたします.また, 本研究に協力いただいた研究室の皆様に感謝いたし ます.

利益相反 開示すべき利益相反はない.

REFERENCES

- Gravel R. A., Kaback M. M., Proia R. L., Sandhoff K., Suzuki K., Suzuki K., "The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease," eds. by Valle D. L., Antonarakis S., Ballabio A., Beaudet A. L., Mitchell G. A., McGraw-Hill, New York, NY, 2001, pp. 3827–3876.
- Sandhoff K., Harzer K., J. Neurosci., 33, 10195– 10208 (2013).
- Mahuran D. J., Biochim. Biophys. Acta, 1455, 105– 138 (1999).
- Huang J. Q., Trasler J. M., Igdoura S., Michaud J., Hanal N., Gravel R. A., *Hum. Mol. Genet.*, 6, 1879–1885 (1997).
- Sango K., Yamanaka S., Hoffmann A., Okuda Y., Grinberg A., Westphal H., McDonald M. P., Crawley J. N., Sandhoff K., Suzuki K., Proia R. L., *Nat. Genet.*, 11, 170–176 (1995).
- Jeyakumar M., Butters T. D., Cortina-Borja M., Hunnam V., Proia R. L., Perry V. H., Dwek R. A., Platt F. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 6388–6393 (1999).
- 7) Norflus F., Tifft C. J., McDonald M. P., Goldstein

G., Crawley J. N., Hoffmann A., Sandhoff K., Suzuki K., Proia R. L., *J. Clin. Invest.*, **101**, 1881– 1888 (1998).

- Foust K. D., Nurre E., Montgomery C. L., Hernandez A., Chan C. M., Kaspar B. K., *Nat. Biotechnol.*, 27, 59–65 (2009).
- Walia J. S., Altaleb N., Bello A., Kruck C., LaFave M. C., Varshney G. K., Burgess S. M., Chowdhury B., Hurlbut D., Hemming R., Kobinger G. P., Triggs-Raine B., *Mol. Ther.*, 23, 414–422 (2015).
- Kitakaze K., Mizutani Y., Sugiyama E., Tasaki C., Tsuji D., Maita N., Hirokawa T., Asanuma D., Kamiya M., Sato K., Setou M., Urano Y., Togawa T., Otaka A., Sakuraba H., Itoh K., *J. Clin. Invest.*, **126**, 1691–1703 (2016).
- Wada R., Tifft C. J., Proia R. L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 10954–10959 (2000).
- 12) Jeyakumar M., Thomas R., Elliot-Smith E., Smith D. A., van der Spoel A. C., d'Azzo A., Perry V. H., Butters T. D., Dwek R. A., Platt F. M., *Brain*, **126**, 974–987 (2003).
- Pelled D., Riebeling C., van Echten-Deckert G., Sandhoff K., Futerman A. H., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 29, 341–349 (2003).
- Sango K., Yamanaka S., Ajiki K., Tokashiki A., Watabe K., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 28, 23–34 (2002).
- Reynolds B. A., Weiss S., Science, 255, 1707– 1710 (1992).
- Kilpatrick T. J., Bartlett P. F., *Neuron*, 10, 255–265 (1993).
- Davis A. A., Temple S., *Nature*, **372**, 263–266 (1994).
- Palmer T. D., Ray J., Gage F. H., Mol. Cell. Neurosci., 6, 474–486 (1995).
- Tramontin A. D., Garcia-Verdugo J. M., Lim D. A., Alvarez-Buylla A., *Cereb. Cortex*, **13**, 580–587 (2003).
- Bylund M., Andersson E., Novitch B. G., Muhr J., Nat. Neurosci., 6, 1162–1168 (2003).
- Graham V., Khudyakov J., Ellis P., Pevny L., *Neuron*, **39**, 749–765 (2003).
- 22) Shimizu T., Kagawa T., Inoue T., Nonaka A., Takada S., Aburatani H., Taga T., *Mol. Cell. Biol.*, 28, 7427–7441 (2008).
- 23) Hitoshi S., Alexson T., Tropepe V., Donoviel D., Elia A. J., Nye J. S., Conlon R. A., Mak T. W., Bernstein A., van der Kooy D., *Genes Dev.*, 16, 846–858 (2002).

- 24) Lutolf S., Radtke F., Aguet M., Suter U., Taylor V., *Development*, **129**, 373–385 (2002).
- 25) Shimojo H., Ohtsuka T., Kageyama R., *Neuron*, 58, 52–64 (2008).
- Kageyama R., Ohtsuka T., Shimojo H., Imayoshi I., *Nat. Neurosci.*, **11**, 1247–1251 (2008).
- 27) Kamakura S., Oishi K., Yoshimatsu T., Nakafuku M., Masuyama N., Gotoh Y., *Nat. Cell Biol.*, 6, 547–554 (2004).
- 28) Takizawa T., Nakashima K., Namihira M., Ochiai W., Uemura A., Yanagisawa M., Fujita N., Nakao M., Taga T., *Dev. Cell*, 1, 749–758 (2001).
- Casarosa S., Fode C., Guillemot F., *Development*, 126, 525–534 (1999).
- Cau E., Gradwohl G., Fode C., Guillemot F., Development, 124, 1611–1621 (1997).
- Galichet C., Guillemot F., Parras C. M., *Development*, 135, 2031–2041 (2008).
- Tomita K., Moriyoshi K., Nakanishi S., Guillemot F., Kageyama R., *EMBO J.*, **19**, 5460–5472 (2000).
- Takahashi K., Yamanaka S., Cell, 126, 663–676 (2006).
- 34) Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B. E., Jaenisch R., *Nature*, 448, 318–324 (2007).
- 35) Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S., *Cell*, 131, 861–872 (2007).
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S., *Nature*, 448, 313–317 (2007).
- Lindner S. E., Sugden B., *Plasmid*, 58, 1–12 (2007).
- Nanbo A., Sugden A., Sugden B., *EMBO J.*, 26, 4252–4262 (2007).
- Bain G., Kitchens D., Yao M., Huettner J. E., Gottlieb D. I., *Dev. Biol.*, 168, 342–357 (1995).
- Watanabe K., Kamiya D., Nishiyama A., Katayama T., Nozaki S., Kawasaki H., Watanabe Y., Mizuseki K., Sasai Y., *Nat. Neurosci.*, 8, 288–296 (2005).
- Eiraku M., Watanabe K., Matsuo-Takasaki M., Kawada M., Yonemura S., Matsumura M., Wataya T., Nishiyama A., Muguruma K., Sasai Y., *Cell Stem Cell*, 3, 519–532 (2008).
- Kawasaki H., Mizuseki K., Nishikawa S., Kaneko S., Kuwana Y., Nakanishi S., Nishikawa S. I., Sasai Y., *Neuron*, 28, 31–40 (2000).
- Ogawa Y., Tanaka M., Tanabe M., Suzuki T., Togawa T., Fukushige T., Kanekura T., Sakuraba

H., Oishi K., PLoS ONE, 8, e55856 (2013).

- 44) Ogawa Y., Kaizu K., Yanagi Y., Takada S., Sakuraba H., Oishi K., *PLoS ONE*, **12**, e0178978 (2017).
- Khanna R., Soska R., Lun Y., Feng J., Frascella M., Young B., Brignol N., Pellegrino L., Sitaraman S. A., Desnick R. J., Benjamin E. R., Lockhart D. J., Valenzano K. J., *Mol. Ther.*, 18, 23–33 (2010).
- 46) Auluck P. K., Chan H. Y., Trojanowski J. Q., Lee V. M., Bonini N. M., *Science*, **295**, 865–868 (2002).
- 47) Berman D. E., Ringe D., Petsko G. A., Small S. A., *Neurotherapeutics*, **12**, 12–18 (2015).
- 48) Reitz C., Mol. Genet. Genomics, 290, 413–427 (2015).
- 49) Small S. A., Kent K., Pierce A., Leung C., Kang M. S., Okada H., Honig L., Vonsattel J. P., Kim T. W., *Ann. Neurol.*, 58, 909–919 (2005).
- Follett J., Norwood S. J., Hamilton N. A., Mohan M., Kovtun O., Tay S., Zhe Y., Wood S. A., Mellick G. D., Silburn P. A., Collins B. M., Bugarcic A., Teasdale R. D., *Traffic*, 15, 230–244 (2014).
- Follett J., Bugarcic A., Yang Z., Ariotti N., Norwood S. J., Collins B. M., Parton R. G., Teasdale R. D., *J. Biol. Chem.*, **291**, 18283–18298 (2016).
- 52) Munsie L. N., Milnerwood A. J., Seibler P., Beccano-Kelly D. A., Tatarnikov I., Khinda J., Volta M., Kadgien C., Cao L. P., Tapia L., Klein C., Farrer M. J., *Hum. Mol. Genet.*, **24**, 1691–1703 (2015).
- Zavodszky E., Seaman M. N., Moreau K., Jimenez-Sanchez M., Breusegem S. Y., Harbour M. E., Rubinsztein D. C., *Nat. Commun.*, 5, 3828 (2014).
- 54) Mecozzi V. J., Berman D. E., Simoes S., Vetanovetz C., Awal M. R., Patel V. M., Schneider R. T., Petsko G. A., Ringe D., Small S. A., Nat.

Chem. Biol., 10, 443-449 (2014).

- 55) Inoue K., Pharmacol. Ther., 109, 210–226 (2006).
- 56) Kwon H. S., Koh S. H., *Transl. Neurodegener.*, 9, 42 (2020).
- 57) Liddelow S. A., Guttenplan K. A., Clarke L. E., Bennett F. C., Bohlen C. J., Schirmer L., Bennett M. L., Münch A. E., Chung W. S., Peterson T. C., Wilton D. K., Frouin A., Napier B. A., Panicker N., Kumar M., Buckwalter M. S., Rowitch D. H., Dawson V. L., Dawson T. M., Stevens B., Barres B. A., *Nature*, 541, 481–487 (2017).
- 58) Ogawa Y., Sano T., Irisa M., Kodama T., Saito T., Furusawa E., Kaizu K., Yanagi Y., Tsukimura T., Togawa T., Yamanaka S., Itoh K., Sakuraba H., Oishi K., Sci. Rep., 7, 40518 (2017).
- 59) Wu Y. P., Proia R. L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101, 8425–8430 (2004).
- 60) Kyrkanides S., Brouxhon S. M., Tallents R. H., Miller J. N., Olschowka J. A., O'Banion M. K., *J. Neuroinflammation*, **9**, 186 (2012).
- Masuda T., Amann L., Sankowski R., Staszewski O., Lenz M., d'Errico P., Snaidero N., Costa Jordão M. J., Böttcher C., Kierdorf K., Jung S., Priller J., Misgeld T., Vlachos A., Meyer-Luehmann M., Knobeloch K.-P., Prinz M., *Nat. Immunol.*, 21, 802–815 (2020).
- 62) Yamaguchi A., Katsuyama K., Nagahama K., Takai T., Aoki I., Yamanaka S., J. Clin. Invest., 113, 200–208 (2004).
- Ogawa Y., Furusawa E., Saitoh T., Sugimoto H., Omori T., Shimizu S., Kondo H., Yamazaki M., Sakuraba H., Oishi K., *Neurobiol. Dis.*, **118**, 142– 154 (2018).
- 64) Sperlagh B., Vizi E. S., Curr. Top. Med. Chem., 11, 1034–1046 (2011).