

ニーマンピック病の臨床および病態に関する研究

分担研究者：高橋 勉（秋田大学大学院医学系研究科医学専攻小児科学講座教授）

研究要旨

ニーマンピック病は、ライソゾームにおける水解酵素 ASM (A/B 型) あるいは膜蛋白の異常 NPC1 あるいは NPC2 (C 型) でスフィンゴミエリンあるいはコレステロールがエンドゾームに蓄積し肝脾腫・肺機能異常・多彩な神経症状などを示す稀な遺伝性疾患である。脂質の蓄積減少を起こす薬物療法の開発が期待されている。本研究では C 型細胞に対して蓄積脂質減少をもたらす酢酸 (butyrate) および Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor の効果に関してスフィンゴミエリン分解酵素 ASM の発現量の観点から分析し、C 型細胞への蓄積脂質減少効果に二次的 ASM 欠損の改善が重要であることを示した。

A. 研究目的

ニーマンピック病 A/B 型は、ライソゾーム酸性スフィンゴミエリナーゼ (Acid sphingomyelinase: ASM) 異常によりライソゾームにスフィンゴミエリンが蓄積し、二次的にコレステロールが蓄積する。一方、ニーマンピック病 C 型は細胞内コレステロール輸送に関与する NPC1 あるいは NPC2 の異常によりライソゾームに遊離コレステロールが蓄積する。ニーマンピック病 C 型細胞では二次的に ASM 活性低下とスフィンゴミエリン蓄積が観察される。

ASM 酵素の酵素活性刺激薬として酪酸 (butyrate) が知られている。そこでまず、C 型細胞に酪酸を投与して本細胞に観察される二次的 ASM 欠損に対する効果を詳細に分析した。

次に、C 型細胞に対して報告された Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor の蓄積脂質減少効果に関して検討した。この効果に関しては変異 NPC1 蛋白の発現量を増加させる効果から生じる可能性が示され、軽症 C 型細胞だけへの効果である点が報告されている。しかし、我々が見出した酪酸 (butyrate) の C 型細胞に対する

蓄積脂質減少効果も酪酸が HDAC Inhibitor の 1 つであることから減少効果に ASM 活性が関与している可能性を想定し検討した。

B. 研究方法

・酪酸 (butyrate) と ASM

正常培養リンパ芽球および C 型培養リンパ芽球に対して、ASM 活性上昇作用を持つ酪酸 (butyrate) を添加 (10mM) し、各細胞の、**1)** ASM 活性、**2)** ASM mRNA レベル、**3)** 細胞内コレステロール含量、を調べた。次に、**4)** C 型皮膚線維芽細胞および **5)** ASM 欠損皮膚線維芽細胞に関して、酪酸 (butyrate) 添加の有無により細胞内遊離コレステロールをフィリピン染色で調べ検討した。

・HDAC inhibitor の効果と ASM

**6)** 正常皮膚線維芽細胞および C 型皮膚線維芽細胞に対して、HDAC Inhibitor として valproic acid (2μM)、vorinostat (10μM)、panobinostat (75μM) を加えコレステロール蓄積の程度を Filipin 染色および Amplex Red cholesterol

quantification (Fluoroscan Asent system)にて評価した。**7)**ASM のコレステロール輸送への関与を調べるために ASM Inhibitor として desipramine (50 $\mu$ M) を追加で加えその蓄積脂質に関して調べた。

### C. 研究結果

研究結果は以下の通りであった。

・酪酸 (butyrate) と ASM

**1)** 24 時間 10mM 酪酸添加後、正常および NPC1 培養リンパ芽球の ASM 活性は、負荷前と比較しそれぞれ 3.3 倍および 4.6 倍と有意に増加した ( $p < 0.01$ )。

**2)** 両細胞の ASM mRNA 発現レベルは、24 時間 10mM 酪酸添加後、著明に増加した ( $p < 0.01$ )。

**3)** NPC 培養リンパ芽球における、酪酸添加前および 10mM 酪酸添加後の細胞内遊離コレステロール量は酪酸添加により有意に低下した ( $p < 0.05$ )。

**4)** NPC1 皮膚線維芽細胞におけるフィリピン染色では、24 時間 10mM 酪酸添加後、細胞内遊離コレステロール蓄積の劇的な減少が観察された。

**5)** ASM 欠損皮膚線維芽細胞では酪酸添加後フィリピン染色で、細胞内遊離コレステロールの蓄積の減少を認めなかった。

・HDAC inhibitor の効果と ASM の

**6)** C 型培養皮膚線維芽細胞に観察される遊離コレステロール蓄積は valproic acid、yoricostat、panobinostat により減少した。しかし、desipramine を加えることでコレステロール蓄積が再び観察された。この結果は、**7)**HDAC Inhibitor による細胞内コレステロール輸送の改善には、ASM 活性の存在が重要であることを示していた。

### D. 考察

ASM 活性上昇作用を持つ酪酸 (butyrate) は、培養リンパ芽球に対して ASM mRNA を上昇させることで ASM 活性を上昇させた。そして、二次的 ASM 活性低下がみられる C 型細胞においては、ASM 活性を正常化することで細胞内蓄積遊離コレステロールを減少させた。この酪酸の作用は ASM 欠損コレステロール蓄積細胞では観察されなかった。

細胞内遊離コレステロール蓄積は C 型細胞の基本病態であるが、二次的 ASM 活性の低下を回復させることで、蓄積コレステロールを減少させたことは、今後の ASM 酵素を調節する薬剤開発の可能性を示すものである。

今回の対象とした C 型細胞は、比較的軽症のタイプであり、重症度の違う細胞に対する検討や新たな ASM 活性のアクチベーターの検索など今後の課題である。

C 型細胞の蓄積脂質に対する HDAC inhibitor の減少作用は ASM 抑制剤である desipramine により軽減され、減少した脂質が再び増加した。その結果は細胞内でコレステロール輸送に関与する NPC1 および NPC2 の作用には ASM が大きく関与していることを示している。

### E. 結論

細胞外由来の LDL コレステロールは LDL 受容体からライソゾームに至り酸性リパーゼにより遊離コレステロールとなる。その後のライソゾームから細胞質への輸送に C 型ニーマンピック病の原因である NPC1 および NPC2 が関与する。本研究によりこの輸送には A/B 型ニーマンピック病の欠損酵素である ASM が関与している可能性がある。従って、C 型ニーマンピック病の細胞

内脂質蓄積の改善には、二次的 ASM 欠損を改善する必要がある。

ニーマンピック病 C 型の原因である NPC1 および NPC2 のコレステロール輸送には ASM が関与している可能性がある

## F. 研究発表

### < 論文 >

- 1) Takamura A, Sakai N, Shinpoo M, Noguchi A, Takahashi T, Matsuda S, Yamamoto M, Narita A, Ohno K, Ohashi T, Ida H, Eto Y: The useful preliminary diagnosis of Niemann-Pick disease type C by filipin test in blood smear. Mol Genet Metab, 111: 401-404, 2013
- 2) Oyama C, Hirayama M, Noguchi A, Arai H, Takahashi T : Butyrate reduces free cholesterol accumulation in Niemann-Pick disease type 1 cells (Nova Scotia form) through the induction of acid sphingomyelinase. Akita J. Med 38: 111-119, 2011.

### < 著書 >

- 1) 高橋 勉 : Niemann-Pick 病、新領域別症候群シリーズ No.23、血液症候群 (第 2 版) —その他の血液疾患を含めて—、日本臨床、日本臨床社、491-75、2013.
- 2) 小山千嘉子、高橋 勉 : ニーマンピック病 A, B 型、新領域別症候群シリーズ No.20、先天代謝異常症候群 (第 2 版) 下—病因・病態研究、診断治療の進歩—、日本臨床、日本臨床社、472-75、2012.
- 3) 野口篤子、高橋 勉 : Niemann-Pick 病 C 型、先天代謝異常症 Diagnosis at a Glance, 診断

と治療社、東京、28-31、2011.

- 4) 高橋 勉 : ニーマンピック病 A、B 型、ライソゾーム病 - 最新の病態、診断、治療の進歩 - (初版)、診断と治療社、東京、154-158、2011.
- 5) 高橋 勉 : ライソゾームの生成と膜代謝、ライソゾーム病 - 最新の病態、診断、治療の進歩 - (初版)、診断と治療社、東京、10-13、2011 .
- 6) 高橋 勉 : Niemann-Pick 病 . 小児科臨床ピクシス 23, 中山書店、東京、235-237、2010.
- 7) 高橋 勉 : Niemann-Pick 病, 小児疾患診療のための病態生理, 小児内科 vol.41 増刊号, pp.462-465、2009 .

### < 学会発表 >

- 1) Hirayama, M., Oyama, C., Noguchi, A., Takahashi, T. Histone deacetylase inhibitors need acid sphingomyelinase to reduce the abnormal storage of cholesterol in Niemann-Pick C1 cells. The 3rd Asian congress for inherited metabolic diseases, Chiba, Japan, Nov. 2013.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし