

**lyso スフィンゴ糖脂質が神経細胞死を引き起こす分子機構の解明**

**2024**

**渡邊 綾佑**

# 目次

本論文で用いた省略語 .....	3
第一章 緒論 .....	4
第二章 実験材料および実験方法 .....	7
第三章 結果 .....	12
3-1 lysoGM1 及び lysoGM2 は Akt シグナリング減弱を介して細胞死を引き起こす .....	12
3-2 細胞外より添加した lysoGM1 は細胞質に広がる .....	13
3-3 lysoGSLs は PI(3,4,5)P <sub>3</sub> の生成及び PI(3,4,5)P <sub>3</sub> と Akt の共局在を減少させる .....	15
3-4 lysoGSLs は PI3K の活性を直接阻害する .....	17
3-5 lysoGSLs はスフィンゴリピドーシスモデルマウスの症状に応じて蓄積する .....	19
3-6 スフィンゴリピドーシス患者線維芽細胞において Akt のリン酸化レベルは共通して低下している .....	21
第四章 考察 .....	22
参考文献 .....	25
謝辞 .....	29

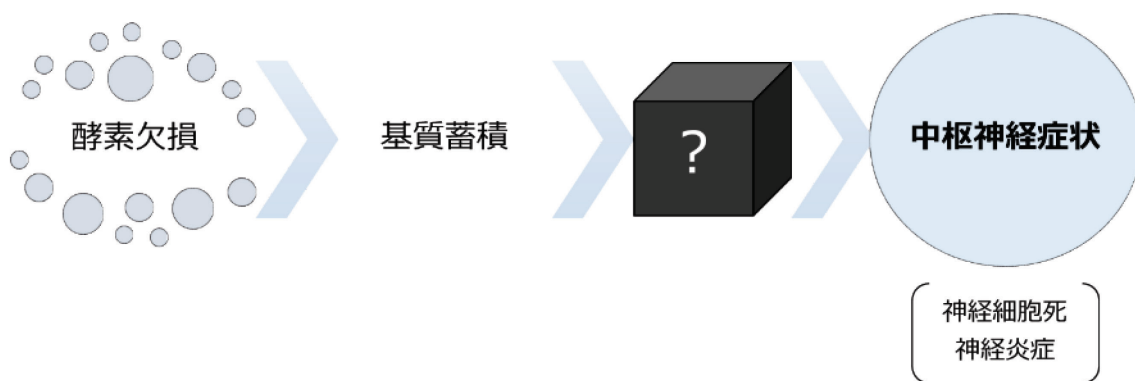
## 本論文で用いた省略語

省略語	名称
ASAH1	N-Acylsphingosine Amidohydrolase 1, 酸性セラミダーゼ 1
BBB	Blood Brain Barrier, 血液脳関門
CTXB	Cholera toxin subunit B, コレラトキシンサブユニット B
ERT	Enzyme Replacement Therapy, 酵素補充療法
GALC	Galactosylceramidase, $\beta$ -ガラクトシルセラミダーゼ
Gb3	Globotriaosylceramide, グロボトリアオシルセラミド
GBA1	Glucosylceramidase beta 1, $\beta$ -グルコセレブロシダーゼ 1
GLB1	Galactosidase beta 1, $\beta$ ガラクトシダーゼ 1
GM2A	Ganglioside GM2 activator, GM2 アクチベーター
GSLs	Glycosphingolipids, スフィンゴ糖脂質
HEXA	Hexosaminidase subunit alpha, $\beta$ ヘキソサミニダーゼ A
HEXB	Hexosaminidase subunit beta, $\beta$ ヘキソサミニダーゼ B
HRP	Horseradish peroxidase, 西洋ワサビペルオキシダーゼ
lysoGSLs	Lysoglycosphingolipids, lyso スフィンゴ糖脂質
PBS	Phosphate-buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水
PI (3, 4, 5) P <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-(3, 4, 5)-triphosphate, ホスファチジルイノシトール-3,4,5-トリスリン酸
SCDase	Sphingolipid ceramide N-deacylase, スフィンゴ脂質セラミド N-デアシラーゼ
SD	Sandhoff disease, Sandhoff 病
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, ドデシル硫酸ナトリウム
TBS	Tris-buffered saline, トリス緩衝生理食塩水

# 第一章 緒論

リソソーム病は、リソソーム内の加水分解酵素が遺伝的に欠損することによって発症する先天性代謝異常症である(Ferreira and Gahl, 2017)。欠損酵素の基質が細胞内のリソソームに過剰に蓄積することによって、患者は全身性の症状を示す。リソソーム病の中でも、スフィンゴ糖脂質(Glycosphingolipids; GSLs)が蓄積する疾患をスフィンゴリピドーシスと呼び、GSLsの蓄積によって発達遅延、小脳失調及びけいれん発作等の中樞神経症状を呈することが知られている(Xu *et al.*, 2010)。現在スフィンゴリピドーシスの治療法として、酵素補充療法(ERT)、薬理的シャペロン療法、造血幹細胞移植、遺伝子治療及び基質枯療法等が開発されている。しかし、中樞神経系への薬剤送達に技術的な課題があることや患者数が極めて少ないことから、これらの薬剤は未だに承認されていない(Abed Rabbo *et al.*, 2021)。そのため、病態メカニズムの解明は新規治療法開発のための課題となっている。

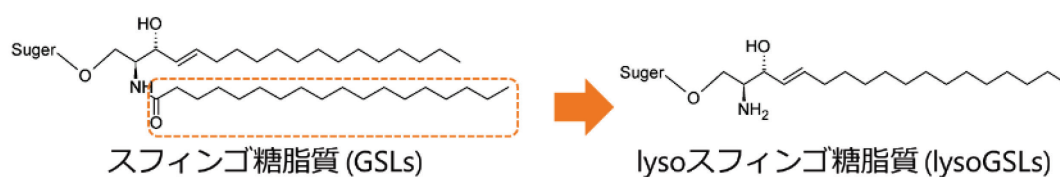
本疾患の患者死後脳においては、神経細胞死や神経炎症が観察されており、これらが中樞神経症状を進展させる要因だと考えられている(Rama Rao and Kielian, 2016)。本疾患において基質の蓄積が神経細胞死や神経炎症を引き起こすメカニズムについては、グリア細胞の異常活性化(Kawashita *et al.*, 2009; Rama Rao and Kielian, 2016)や小胞体ストレス(d'Azzo, Tessitore and Sano, 2006)、Ca<sup>2+</sup>シグナリング異常(Pérez-Cañamás *et al.*, 2017)及びミトコンドリア障害(Gegg and Schapira, 2015)等が考えられている。しかしながら、これらは他の神経変性疾患においても多くみられる病変であるため、本疾患において基質の蓄積が直接的に引き起こす病変については十分に解明されたとは言い難い (Figure 1-1)。



**Figure 1-1** スフィンゴリピドーシスの病態発現メカニズムに関する仮説

スフィンゴリピドーシスの患者死後脳では、神経変性や神経炎症が観察され、これらが中樞神経症状の原因と考えられている。しかし、酵素欠損による基質の蓄積が神経細胞死や神経炎症を引き起こす具体的なメカニズムについてはまだ十分に解明されていない。

一方で、GSLs から脂肪酸が切断された lyso スフィンゴ糖脂質(lysoGSLs)が、本疾患の患者脳や血清中で蓄積しているという報告がある(Kobayashi *et al.*, 1992; Orvisky *et al.*, 2002; Aerts *et al.*, 2008; Dekker *et al.*, 2011; Kodama *et al.*, 2011; Ferraz *et al.*, 2016)。lysoGSLs は基質が過剰に蓄積している患者のリソソーム内にて、酸性セラミダーゼ(ASAHI)によって産生されることが知られている(Ferraz *et al.*, 2016)。この lysoGSLs は細胞毒性があることが知られていることから、本疾患における病態発現の原因分子ではないかと考えられてきた(Sueyoshi, Maehara and Ito, 2001; O’Sullivan and Dev, 2015; Graziano *et al.*, 2016)。近年、ガラクトセレブロシダーゼ(GALC)を欠損させたクラッベ病モデルマウスにおいて、lysoGSLs の 1 つであるガラクトシルスフィンゴシン(サイコシン)を遺伝的および薬理的に減少させることによって病態が改善することが報告された(Li *et al.*, 2019)。また、lysoGSLs はプロテインキナーゼ C (PKC)の阻害活性があるという報告もあり(Hannun and Bell, 1987)、lysoGSLs が細胞内シグナリングに異常を引き起こす可能性がある。しかし、本疾患において細胞内シグナリング異常と神経細胞死を関連付ける報告は少なく、従って lysoGSLs の病態への関与も不明である (Figure 1-2)。



### 蓄積物質

GM1-ガングリオシドーシス	: GM1 ganglioside		+ lysoGM1
テイ-サックス病 (TSD)	: GM2 ganglioside	➔	+ lysoGM2
サンドホッフ病	: GM2 ganglioside		+ lysoGM2
ゴーシェ病	: Glucosylceramide		+ lysoGlc-Cer (Glucosylsphingosine)
ファブリー病	: Globotriaosylceramide (Gb3)		+ lysoGb3
クラッベ病	: Galactosylsphingosine (Psychosine)		

### Figure 1-2 スフィンゴリピドースで蓄積する GSLs と lysoGSLs との関係

スフィンゴリピドースでは、主に GSLs が蓄積することが知られている。それに加え、GSLs の脂肪酸部分が切断された lysoGSLs も蓄積することが知られている。この lysoGSLs は細胞毒性があることが知られているものの、病態との関連は不明である。

これまでに、我々の研究グループではスフィンゴリピドースの一種である GM2 ガングリオシドーシスにおいて、細胞生存において重要な役割を果たしている PI3K/Akt シグナリングの減弱が、神経細胞死の原因の 1 つであることを示してきた。そこで、我々は lysoGSLs が PI3K/Akt シグナリングに影響を与えることによって、神経細胞死を引き起こしているの

ではないかと考えた。本研究では、lysoGSLs が PI3K を直接阻害することで PI3K/Akt シグナリングを減弱させ、神経細胞死を引き起こすのではないかという仮説を検証するために *in vitro*、*in vivo* および *in silico* の実験を行った。

## 第二章 実験材料および実験方法

### 細胞培養

健常者(F258)、ゴーシェ病、GM1 ガングリオシドーシス(F430)及び GM2 ガングリオシドーシス(F218)患者由来ヒト皮膚線維芽細胞株は、10%(v/v)ウシ胎児血清(GIBCO Cat# 10270-106)を含む Ham's F-10 (Sigma-Aldrich)培地にペニシリン(70 $\mu$ g/mL) (Sigma-Aldrich Cat# P7794)、ストレプトマイシン(100 $\mu$ g/mL) (Sigma-Aldrich Cat# S6501-25G)を添加し 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

SH-SY5Y 細胞は、European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC Cat# 94030304, RRID: CVCL\_0019)から入手した。通常培養では10%(v/v)のウシ胎児血清(GIBCO Cat# 10270-106)を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma-Aldrich Cat# D8062)にペニシリン(70 $\mu$ g/mL) (Sigma-Aldrich Cat# P7794)、ストレプトマイシン(100 $\mu$ g/mL) (Sigma-Aldrich Cat# S6501-25G)を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。分化誘導では、培地中の血清濃度を3%まで下げ、10  $\mu$ M のレチノイン酸(Sigma-Aldrich Cat# R2625-100MG)存在下で少なくとも7日間培養した(Cheung *et al.*, 2009)。脂質の添加実験を行う際は、分化誘導した細胞をペニシリン(70  $\mu$ g/mL)とストレプトマイシン(100  $\mu$ g/mL)を含む無血清培地(Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham)で16時間培養した後に実験を行った。

尚、本研究は徳島大学病院医学研究倫理委員会の承認(No.5331)及び徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会の承認(No.2020-38)を得て実施した。

### lysoGSLs の生成・精製

lysoGM1 及び lysoGM2 は、瀧孝雄 博士より分与して頂いた GM1 及び GM2 ガングリオシドから、九州大学 伊東信 教授、沖野望 准教授より分与して頂いたスフィンゴ脂質セラミド N-デアシラーゼ (SCDase) (Kurita *et al.*, 2000)を用い既報に基づいて反応を行うことで生成した。lysoGSLs の精製には、Oasis® MCX 6 cc (150 mg) (Waters Cat# 186000255) を用いた。具体的には、カラムをメタノール及び水で平衡化した後、SCDase 反応液をカラムに滴下し、5%アンモニア水溶液を含むメタノールで lysoGSL を溶出した。得られた溶出液は乾固した後、エタノールに再溶解した。エタノール溶液中の lysoGSLs は TLC(展開溶媒 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/10% CaCl<sub>2</sub> 5:4:1(v/v/v))で展開した後、Orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で発色させることにより定量を行った。これらの反応及び精製過程で混入する物質が、細胞に影響を与えるかどうかを調べるため、実験に使用した GM1 および GM2 ガングリオシドは、これらの操作で得られた未反応物を精製して使用した。

## 細胞生存率の解析

細胞生存率は、WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt]試薬(細胞数試薬 SF) (ナカライテスク Cat# 07553-44)を用いて測定した。分化誘導した SH-SY5Y 細胞を  $2 \times 10^4$  cells/well になるよう 96-well plate に播種した。無血清培地で 16 時間培養した後、GSLs 及び lysoGSLs 添加し 48 時間培養した。その後プレートの各ウェルに WST-8 試薬を 10  $\mu$ L ずつ添加し、インキュベーター内で 2 時間培養した後、450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー(TECAN, Infinite® 200 pro-F Nano+)を用いて測定することで、細胞生存率を算出した。

## ウェスタンブロッティング

細胞を氷冷リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で 3 回洗った後、スクレーパーを用いて回収を行った。回収した細胞懸濁液を 5 分、12,000g  $\times$  4°C で遠心し、ペレットを RIPA バッファー(20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% Sodium deoxycholate 20  $\mu$ M Leupeptin, 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 mM EDTA, 1  $\mu$ M Pepstatin A, 2mM Imidazole, 1 mM NaF, 1.15 mM sodium molybdate, 1 mM Sodium Orthovanadate(V), 4 mM Potassium sodium tartrate, 1 mM  $\beta$ -Glycerophosphate)で再懸濁及び超音波破碎することで細胞内タンパク質の抽出を行った。その後、15 分、18,000 g  $\times$  4°C で遠心することで不溶物を除き、ウェスタンブロッティング用のサンプルとした。サンプルはローリー法(Bio-Rad Cat# 5000116JA)にてタンパク定量を行い、6 分の 1 量の 6  $\times$  SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) サンプルバッファー[0.3 M Tris-HCl(pH 6.8)/36%(v/v)glycerol(Wako) /1.2% (v/v) 2-mercaptoethanol (Wako)/24% (w/v) SDS/0.012% (w/v) bromophenol blue (Kishida Chemical)]を加え、100°C で 5 分間煮沸した。煮沸後、SDS-PAGE を行い PVDF 膜に転写、5% スキムミルク/Tris buffered saline containing 0.1 % Tween-20 (TBST)にて 1 時間室温でブロッキング、4°C オーバーナイトで一次抗体処理を行った。一次抗体は、Phospho-Akt (Ser 473) (Cell Signaling Technology Cat# 4060, RRID: AB\_2315049)、Akt (Cell Signaling Technology Cat# 4691, RRID: AB\_915783) 及び GAPDH (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-32233, RRID: AB\_627679)を用いた。PVDF 膜を洗浄した後、室温 1 時間で二次抗体処理を行った。二次抗体は抗ウサギ IgG、HRP 結合抗体(Cell Signaling Technology Cat# 7074)又は抗マウス IgG、HRP 結合抗体(Cell Signaling Technology Cat# 7076)を用いた。PVDF 膜は化学発光試薬(Perkin Elmer Cat# NEL113001EA)を用いて発光させ、画像処理システム(Chem-Doc, Bio-Rad)にて画像を取得した。



## TLC

GM1 ガングリオシド及び lysoGM1 を TLC プレート(Merk)にアプライし、展開溶媒(クロロホルム/メタノール/0.2%CaCl<sub>2</sub>=60:35:8)の条件にて展開を行った。展開、乾燥後、0.4 w/v% PIM(poly (isobutyl methacrylate)(sigma))溶液にプレートを 30 秒間浸した。溶液を乾燥させた後、湿潤箱(タッパーに水を含ませたろ紙を入れたもの)にパラフィルムを敷き、TLC プレートを設置した。TLC プレート上に希釈した Alexa Fluor® 488 Conjugate Cholera toxin subunit B (Invitrogen Cat#C34775)溶液をアプライし、パラフィルムを用いて均一に溶液を覆い室温 1 時間にて反応させた。反応後 PBS で洗浄し、LAS 4000 mini(light; blue, filter;Y515Di, GE Healthcare)を用いて画像を取得した。

## 免疫蛍光法

細胞を 8-well チャンバースライド(Nunc Cat# 177445JP)に播種し、下記の処理を行った。PBS で洗浄し、4% paraformaldehyde/PBS (Wako Cat# 066-02301)を用いて 16 時間 4°Cで固定処理を行った。PBS で洗浄した後、5% goat serum and (Cedarlane Cat# CL1200-100) 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Cat# A7906-50G)入りの PBS で 1 時間室温でブロッキングを行い、1 次抗体として anti-Akt (Cell Signaling Technology Cat# 4691, RRID: AB\_915783)及び anti-PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Thermo Fisher Scientific Cat# A-21328, RRID: AB\_2535837)を用い 16 時間 4°Cでインキュベートした。PBS で洗浄した後、Anti-Mouse IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) (Cell Signaling Technology Cat# 4408, RRID: AB\_10694704)及び Anti-Rabbit IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Alexa Fluor® 555 Conjugate) (Cell Signaling Technology Cat# 4413, RRID: AB\_10694110)を 1 時間室温で反応させた。GM1 ガングリオシド及び lysoGM1 は Alexa Fluor® 488 Conjugate Cholera toxin subunit B (LifeTechnologies Cat# C34775)を 1 時間室温で反応させて標識を行った。核は Hoechst 33258 で標識した。50% Glycerol 入りの PBS で封入後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM 700 (Carl Zeiss)を用いて蛍光を観察した。顕微鏡画像は ZEN blue edition (Carl Zeiss)を用いて画像処理を行った。

## PI3K 活性測定

GM1 ガングリオシド (GM1)、GM2 ガングリオシド (GM2)、lysoGM1 及び lysoGM2 のヒト精製 PI3K $\alpha$  に対する阻害活性は、ELISA キット (Echelon Biosciences Cat # K-1000S)を用いて、生成した PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 量を定量することにより測定した。測定方法はメーカープロトコルに従って行った。

## ドッキングシミュレーション

PI3K と lysoGSLs との結合様式を調べるため、下記の4つのステップにてドッキングシミュレーションを行った。(1)PI3K の構造準備、(2)結合部位の予測、(3)PI3K と lysoGSLs 分子とのドッキング、(4)結合エネルギーのスコアリング及び各結合ポーズの妥当性の確認。

ヒト PI3K の初期構造は、PI3K $\alpha$  の p110 $\alpha$  サブユニットの A 鎖を用いた(PDB: 4TUU)(Chen *et al.*, 2014)。ATP 結合部位の構造は、*Sus scrofa* 由来の PI3K 触媒サブユニットガンマアイソフォームの ATP 複合体(PDB: 1E8X) (Walker *et al.*, 2000)を用いた。ヒト PI3K と ATP の結合モデルは、Protein Preparation Wizard (Madhavi Sastry *et al.*, 2013)スクリプトを使用し作成した。lysoGSLs 分子については、LigPrep スクリプトの OPLS3 force field と Maestro(Schrodinger, LLC, New York, NY, USA)の Confgen を使用して、イオン化、エネルギー最小化及びコンフォメーションのサンプリングを行い、得られた構造をドッキングシミュレーションの入力構造とした。次に、PI3K-ATP 複合体上の推定結合可能部位を SiteMap プログラム(Schrodinger, LLC, New York, NY, USA)に組み込まれている grid-based energy calculation を用いて検出した(Halgren, 2007, 2009)。その結果、ATP 結合部位以外の部位を含めて lysoGSLs の推定結合部位を5つ得た。ドッキングシミュレーションは Glide (Friesner *et al.*, 2004; Halgren *et al.*, 2004) の SP ドッキングプログラム(Schrodinger, LLC, New York, NY, USA)を用いた。その結果、lysoGSLs 分子の結合予測ポーズは 25 ポーズ得られた。得られたポーズの lysoGSLs 結合エネルギーを Glide XP (Schrodinger, LLC, New York, NY, USA)を用いて評価した。最終的な結合モデルは、結合エネルギーから算出したドッキングスコアと結合予測ポーズの妥当性に基づいて選択した。画像は PyMOL (Schrödinger) を用いて作成した。

## 実験動物

横浜市立大学 山中正二 准教授から分与して頂いた Sandhoff 病モデルマウス(*Hexb*<sup>-/-</sup>, 129sv) (Sango *et al.*, 1995)を C57BL/6 (Japan SLC)と交配し、その子孫を specific pathogen-free (SPF)環境下で飼育した。8、12、16 週齢の雄および雌マウスの脳を、イソフルラン(Wako Cat # 099-06571)吸入麻酔下で断頭により安楽死させた後に採取した。マウスを用いた実験は徳島大学動物実験委員会から承認(T2019-72)を受け、徳島大学大学院医歯薬学研究部総合研究支援センター動物資源研究部門の施設において、徳島大学動物実験指針に則って行った。

## lysoGSLs の定量

マウス脳からの脂質抽出は一相系抽出法を用いて行った。すなわち、組織を 250  $\mu$ L のメタノールで超音波ホモジナイザーを用いてホモジナイズし、50 pmol の内部標準物質である N- $\omega$ -CD3-Octadecanoyl monosialoganglioside GM1 (Matreya Cat # 2050)、N- $\omega$ -CD3-

Octadecanoyl monosialoganglioside GM2 (Matreya Cat # 2051)、および C17 Ceramide (Avanti Polar Lipids Cat # 860517P)を加えた。ホモジナイズしたサンプルを 37°Cで 30 分間インキュベートし、遠心分離(10,000×g、5 分間、4°C)後、上清を新しいチューブに移した。ペレットを CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2/1; v/v)で再懸濁し、同様の方法で脂質を再抽出した。2 度の抽出で得た上清を Speed Vac で乾固した後、100 μL の Phase A[acetonitrile/methanol/water = 1/1/1 (v/v/v) containing 5 μM phosphoric acid and 1mM ammonium formate] / Phase B[2-propanol containing 5 μM phosphoric acid and 1 mM ammonium formate] = 7/3 (v/v) containing 100 μM EDTA に再溶解し、10 μL を LC-MS (LCMS-2020 SHIMADZU)にアプライした。機器の設定及び測定は(Yamamoto *et al.*, 2017)に従った。

### 統計解析

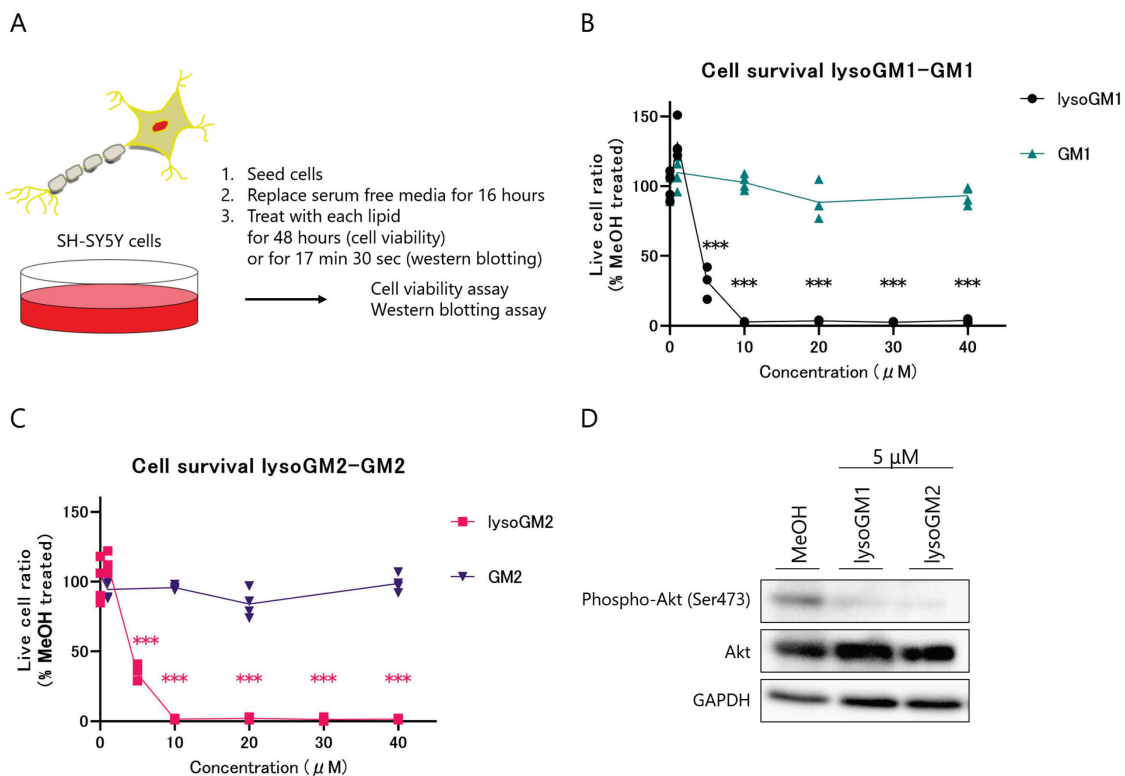
統計解析は Graph Pad Prism 9.1.2(Graph Pad Software Inc.)を用いた。lysoGSLs の細胞毒性については、lysoGSLs 処理時の生存率を MeOH 処理に対する生存率と one-way ANOVA followed by Dunnet test を用いて比較し、*P* 値を算出した。*P* < 0.05 のとき、有意な差があると判断した。

## 第三章 結果

### 3-1 lysoGM1 及び lysoGM2 は Akt シグナリング減弱を介して細胞死を引き起こす

lysoGSLs はマウス神経芽細胞腫(neuro2a 細胞)に対して細胞毒性を示すことが報告されている(Sueyoshi, Maehara and Ito, 2001)。そこで我々はヒト神経芽細胞種(SH-SY5Y cell)においても lysoGSLs が同様に細胞毒性を示すのかを確かめた(Figure 3-1A)。GSLs として GM1 ガングリオシド(GM1)及び GM2 ガングリオシド(GM2)を、lysoGSLs として lysoGM1、lysoGM2 を用意し、それぞれを異なる濃度で SH-SY5Y 細胞に処理した。その結果、GM1、GM2 では 0 から 40  $\mu$ M の濃度において細胞生存率に影響を与えないことが分かった。その一方で、lysoGSLs である lysoGM1、lysoGM2 は 5  $\mu$ M の濃度で細胞生存率を低下させることが分かった(Figure 3-1B、1C)。

次に、これらの条件下での細胞生存シグナリングについて検討を行った。PI3K/Akt シグナリングは、神経細胞の生存に重要なシグナリングの 1 つであることが広く知られている(Dudek *et al.*, 1997)。本シグナリングの指標となる Akt のリン酸化レベルをウェスタンブロッティングにて解析したところ、lysoGSLs の処理によってそのレベルが低下することが分かった(Figure 3-1D)。これらのデータは lysoGSLs が PI3K/Akt シグナリングを減弱させることで神経細胞死を引き起こしていることを示唆している。



**Figure 3- 1 lysoGM1 及び lysoGM2 は Akt シグナリング減弱を介して細胞死を引き起こす**

(A) 神経芽細胞腫(SH-SY5Y)を用いた lysoGSLs の細胞毒性解析の実験スキーム。  
 (B) (C) SH-SY5Y に GM1、lysoGM1、GM2、lysoGM2 を処理したときの細胞生存率を、WST-8 試薬を用いて測定した。各濃度における細胞生存率は、脂質濃度 0(0.4% MeOH 処理)を 100%として計算した。各プロットは各 well での測定値を示す(n = 4)。P 値は、one-way ANOVA followed by Dunnet test(\*\* $P < 0.001$ , 対 MeOH 処理)により算出した。(D) SH-SY5Y 細胞株を 5 $\mu$ M の lysoGM1 と lysoGM2 で処理した時の細胞抽出液のウェスタンブロッティングの結果を示す。抗体は Phosphorylated Akt (S473)、Akt 及び GAPDH に対するものを用いた。lysoGM1 及び lysoGM2 は、Akt のリン酸化レベルを低下させた。

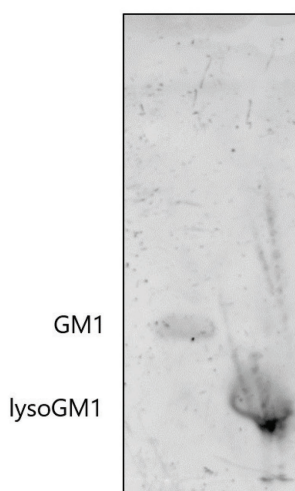
### 3-2 細胞外より添加した lysoGM1 は細胞質に広がる

lysoGSLs が細胞膜を透過し、細胞内に取り込まれるかどうかを調べるため、コレラトキシンサブユニット B(CTXB)を GM1、lysoGM1 のプローブとして用いた。CTXB は GM1 のプローブとしてよく用いられている(Aureli *et al.*, 2016)。それに加え、CTXB は lysoGM1 と

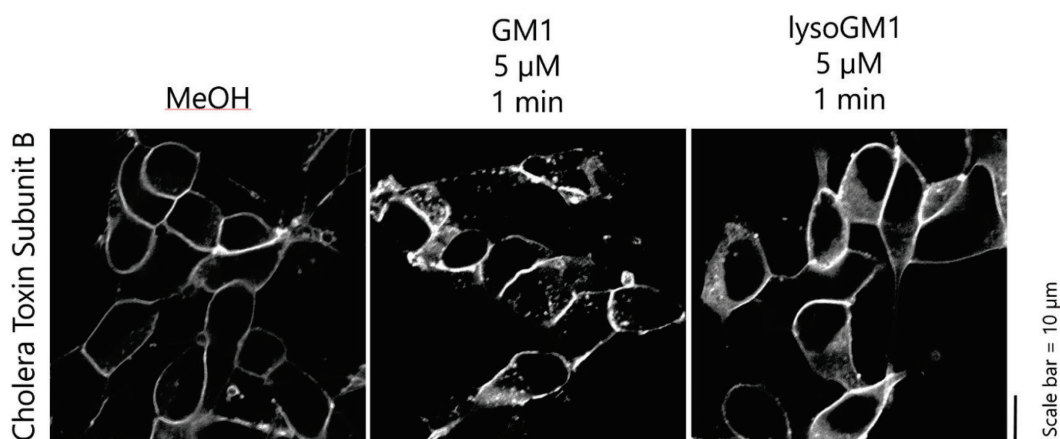
結合する能力があることを確認した(Figure 3-2A)。GM1 又は lysoGM1 を SH-SY5Y 細胞に添加した後、固定し CTXB と反応させた。その結果、GM1 を処理した細胞では顆粒状のシグナルが観察された。一方で lysoGM1 を処理した細胞では、細胞内に広がるような CTXB のシグナルが観察された(Figure 3-2B)。この結果は、GSLs が小胞輸送を介して細胞内に取り込まれるのに対し、lysoGSLs は小胞輸送を介さずに、細胞膜を透過し細胞内に取り込まれることを示している。

A

Cholera Toxin Subunit B



B



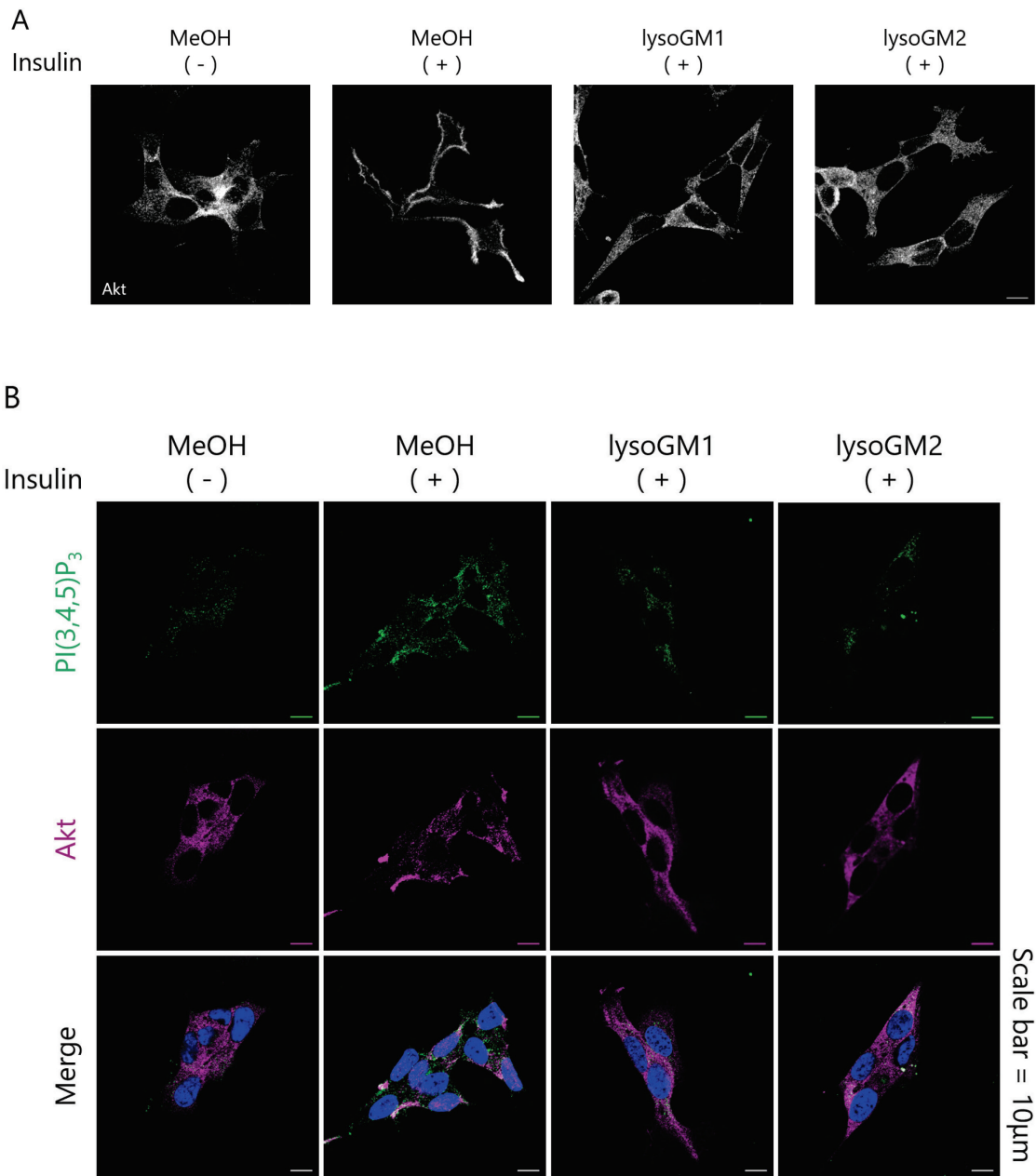
**Figure 3- 2 lysoGM1 は細胞質内に拡散する**

(A) GM1(左レーン)及び lysoGM1(右レーン)をそれぞれ TLC にスポットし、 $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / 0.2\% \text{CaCl}_2 \text{H}_2\text{O} = 60 : 35 : 8$  の展開溶媒を用いて展開を行った後、蛍光ラベル化した CTXB と反応させそのシグナルを観察した。CTXB は GM1 及び lysoGM1 の両方

と結合した。(B) 細胞を MeOH (コントロール処理)、5  $\mu$ M GM1 及び 5  $\mu$ M lysoGM1 で 1 分間処理した後に固定し GM1 及び lysoGM1 の分布を観察した。MeOH 処理では内因性の GM1 が観察されており、そのほとんどが細胞膜に存在することが分かる。添加した GM1 は細胞質内に顆粒状に分布した。一方で添加した lysoGM1 は細胞質内に広がるように分布した。

### 3-3 lysoGSLs は PI(3,4,5)P<sub>3</sub> の生成及び PI(3,4,5)P<sub>3</sub> と Akt の共局在を減少させる

PI3K/Akt シグナリングは、PI3K が細胞膜上で phosphatidylinositol-(3, 4, 5)-triphosphate (PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub>) を生成することを起点に、Akt が細胞膜上に誘導されリン酸化することで活性化することが知られている(Miao *et al.*, 2010)。これまでの実験により、lysoGSLs が Akt のリン酸化レベルを低下させることが分かったので、lysoGSLs が Akt の細胞膜への移行を阻害しているのではないかと考えた。そこで、本シグナリングを活性化することで知られる Insulin でシグナルを活性化し、lysoGSLs 添加時の Akt の局在解析を行うこととした。Insulin 単独刺激の結果、報告通り Akt は細胞膜付近に局在化した。しかしながら、Insulin と lysoGSLs を同時に処理すると、この局在変化が低下した(Figure 3-3A)。次に、Akt の上流にあたる PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub> について解析を行った。PI(3,4,5)P<sub>3</sub> は成長因子等が受容体に結合し、PI3K が活性化した際に、細胞膜上で増加することが知られている(Engelman, Luo and Cantley, 2006; Sasaki *et al.*, 2009; Safarian *et al.*, 2015)。実際に Insulin 処理すると PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub> のシグナルが細胞膜上で増加し、Akt と共局在した(Figure 3-3B)。しかしながら、Insulin と lysoGSLs を同時に処理するとこの現象は見られなくなった(Figure 3-3B)。この結果より、外部から添加した lysoGSLs が PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub> 生成を阻害していることが考えられる。



**Figure 3- 3 lysoGSLs は PI(3,4,5)P<sub>3</sub> の生合成及び Akt の細胞膜への移行を阻害する**

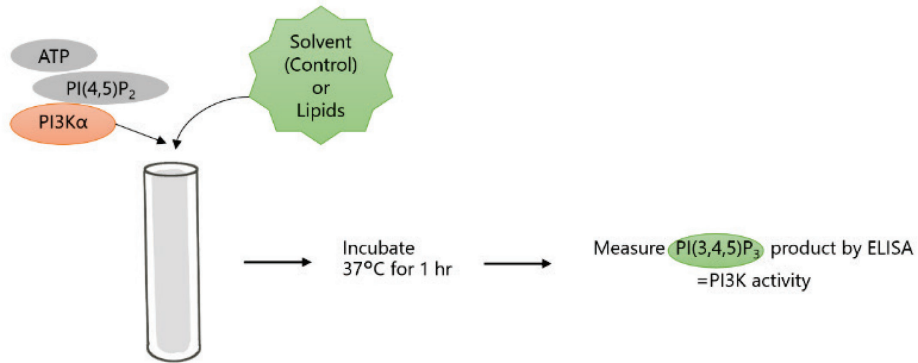
(A) (B) 免疫蛍光法にて、MeOH 処理(-)、100 nM Insulin と MeOH 処理(MeOH(+))、Insulin と lysoGM1(lysoGM1(+))、Insulin と lysoGM2(lysoGM2(+))の同時処理した後に(A)Akt および(B)Akt(magenta)と PI(3,4,5)P<sub>3</sub>(green)を観察した。Insulin は細胞膜の PI(3,4,5)P<sub>3</sub> を増加させ、Akt も細胞膜上へ移行したが、lysoGM1 及び lysoGM2 を処理すると PI(3,4,5)P<sub>3</sub> の増加及び Akt の細胞膜上への移行が阻害された。



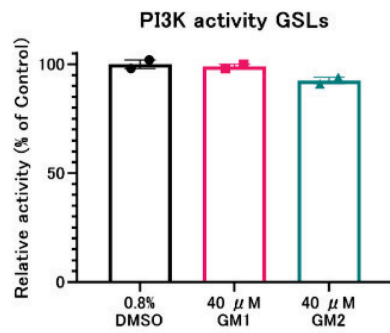
### 3-4 lysoGSLs は PI3K の活性を直接阻害する

これまでの結果より、lysoGSLs が PI3K の活性を直接阻害していることが考えられた。そこで、*in vitro* にて PI3K の活性測定し、lysoGSLs がこれを阻害するのかを確かめることとした。その結果、GSLs は 40  $\mu\text{M}$  でも PI3K の活性に影響を与えなかったのに対し、lysoGSLs は濃度依存的に PI3K 活性を低下させた。その時の IC<sub>50</sub> は 5.46  $\mu\text{M}$  (lysoGM1)及び 2.42  $\mu\text{M}$  (lysoGM2)であった(Figure 3-4B、C)。次に直接の相互作用様式を調べるため、PI3K $\alpha$  の p110 $\alpha$  サブユニットの鎖 A (PDB:4TUU) (Chen *et al.*, 2014)の構造情報に基づいて、PI3K と lysoGSLs とのドッキングシミュレーションを行った。その結果、lysoGSLs のスフィンゴシン骨格を PI3K の疎水性の高い部分に lysoGSLs の糖鎖部分を ATP 結合部位に相互作用させる予測結果が得られた(Figure 3-4D)。これらの結果より、lysoGSLs は直接 PI3K 活性を阻害しており、これにより PI3K/Akt シグナリングの減弱、細胞死を引き起こしていると考えられる。

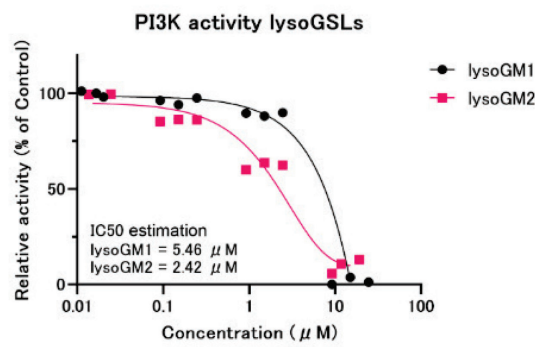
A



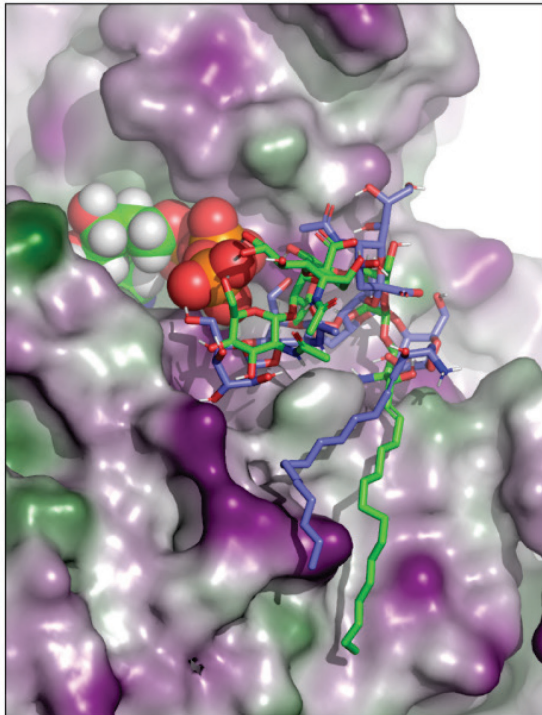
B



C



D



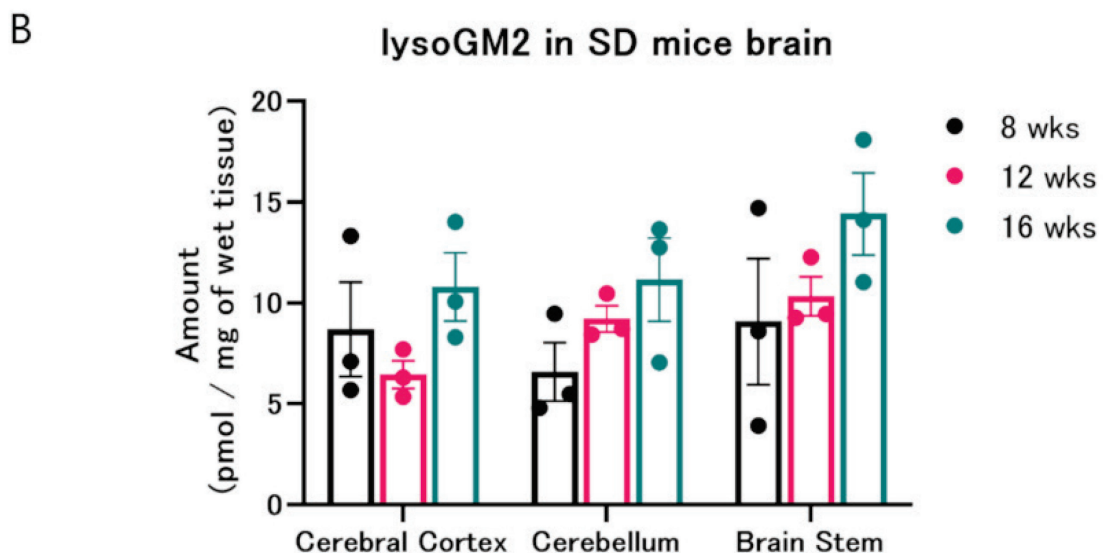
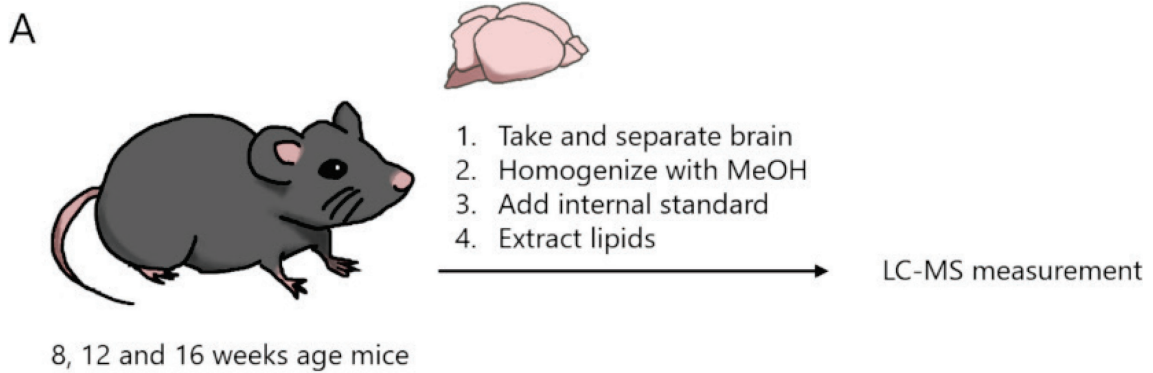
### Figure 3-4 lysoGSLs は PI3K を濃度依存的に直接阻害する

(A) lysoGSLs の PI3K 阻害活性を測定するための実験スキーム。(B) GSLs(GM1 及び GM2)または(C) lysoGSLs (lysoGM1 及び lysoGM2)存在下での PI3K 活性。各プロットはそれぞれ各測定結果を示す。(B) 棒グラフは平均値±標準誤差を示す(n = 2)。GSLs は PI3K 活性に影響を与えなかったが、lysoGSLs は濃度依存的に PI3K 活性を阻害した。(D) PI3K と ATP(球)、lysoGM1(紫色の棒)、lysoGM2(緑色の棒)とのドッキングシミュレーションモデル。図は PI3K $\alpha$  触媒ドメインを示し、疎水性領域及び親水性領域をそれぞれ紫色または緑色で示す。lysoGSLs は PI3K の触媒部位に結合する可能性が示された。

### 3-5 lysoGSLs はスフィンゴリピドーシスモデルマウスの症状に応じて蓄積する

スフィンゴリピドーシスにおける症状の進行と、lysoGSLs との関係性を調べるため、*in vivo* モデル動物における lysoGSLs 量の測定を行った。スフィンゴリピドーシスのモデルとして Sandhoff 病(SD)モデルマウスを用いた。このマウスは、*Hexb* の遺伝子変異によって作成され、GM2 ガングリオシドと、lysoGM2 が主に脳で蓄積することが知られている(Sango *et al.*, 1995; Kodama *et al.*, 2011)。SD モデルマウスは 10 週齢から神経変性に伴う進行性の神経症状を呈し、進行性の症状を悪化させながら 16 週齢から 20 週齢の間で死亡することが分かっている。我々は lysoGM2 の蓄積がこの中枢神経症状の進行と一致するのではないかと考え実験を行った。

野生型(WT)マウス及び SD モデルマウスの 8、12 及び 16 週齢の脳を用意し、大脳、小脳及び脳幹の部位に分けた後、脂質を抽出し、LC-MS にて lysoGM2 量を測定した。その結果、WT マウス脳では lysoGM2 が測定下限以下の量だったのに対し、SD モデルマウスでは週齢に応じて増加することが分かった(Figure 3-5)。これら大脳、小脳、脳幹の部位は、症状が発症した SD マウスにおいて神経細胞死が起こっている領域でもあるため、本結果は、lysoGM2 の蓄積が症状進行に関わることを示している。

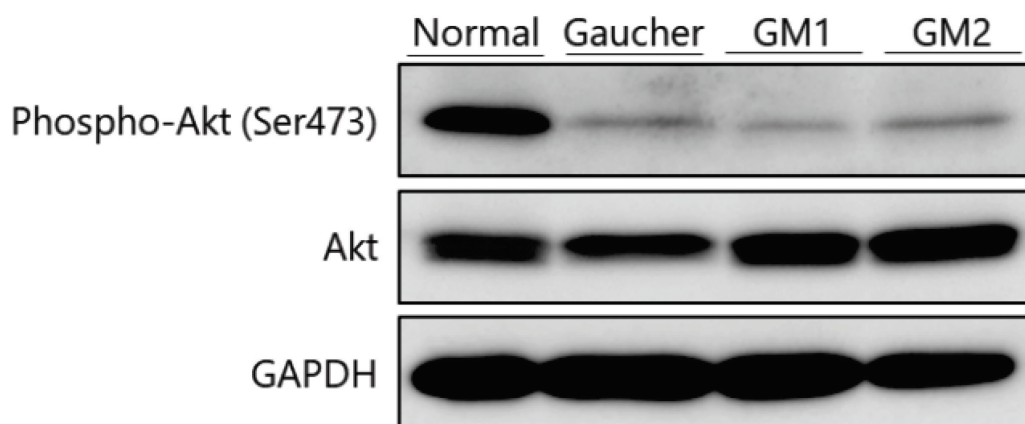


**Figure 3- 5 SD モデルマウス脳における lysoGM2 量は週齢に応じて増加する**

(A) SD モデルマウスにおける lysoGSLs の蓄積を解析するための実験スキーム。8、12 及び 16 週齢のマウス脳から脂質を抽出し、LC-MS にて脂質量を測定した。(B) lysoGM2 は SD モデルマウスの加齢に伴って蓄積する傾向を示した。WT 脳内の lysoGM2 は極めて低いため検出できなかった。プロットは各個体の測定値を示し、棒グラフは平均値  $\pm$  S.E.M.を示す( $n=3$ , (pmol / mg wet tissue))。SD モデルマウスでは症状の進行とともに lysoGM2 が蓄積した。

### 3-6 スフィンゴリピドーシス患者線維芽細胞において Akt のリン酸化レベルは共通して低下している

これまでの結果より、lysoGSLs が蓄積するスフィンゴリピドーシスでは、共通して PI3K の阻害及び下流の PI3K/Akt シグナリングの阻害が起こっていることが考えられた。そこで、スフィンゴリピドーシスに分類される、ゴーシェ病、GM1 ガングリオシドーシス及び GM2 ガングリオシドーシスの患者線維芽細胞を用いて、それぞれの Akt シグナリングの解析を行った。その結果、健常者由来の線維芽細胞に比べ、スフィンゴリピドーシス患者の線維芽細胞では、共通して Akt のリン酸化レベルが低下していた(Figure 3-6)。この結果より、スフィンゴリピドーシスにおいて蓄積する lysoGSLs は Akt シグナリング減弱を引き起こす共通した原因であることが考えられる。



**Figure 3- 6** スフィンゴリピドーシス患者細胞では、共通して PI3K/Akt シグナリングが減弱している

健常者(Normal)、ゴーシェ病(Gaucher)、GM1 ガングリオシドーシス(GM1)、GM2 ガングリオシドーシス(GM2)患者由来培養線維芽細胞の抽出液をウェスタンブロッティングした。抗体は Phosphorylated Akt (S473)、Akt、及び GAPDH に対するものを用いた。患者細胞における Akt のリン酸化レベルは、正常細胞に比べて共通して低下していた。

## 第四章 考察

これまでに、lysoGSLs が神経細胞やオリゴデンドロサイト前駆細胞のアポトーシスを誘導すること(Sueyoshi, Maehara and Ito, 2001; Graziano *et al.*, 2016)や、lysoGSLs が細胞機能やシグナル伝達に影響を与える PKC を直接阻害することが報告されている(Hannun and Bell, 1987)。しかし、これらの報告以降、lysoGSLs が細胞死を引き起こす詳細なメカニズムに関する報告はほとんどなされていない。また、lysoGSLs はスフィンゴリピドーシスにおいて蓄積することが知られているものの(Kobayashi *et al.*, 1992)、スフィンゴリピドーシスの病態に与える影響についても十分に研究はなされてこなかった。本研究は lysoGSLs が PI3K を直接阻害することで PI3K/Akt シグナルを減弱させ、細胞死を引き起こす可能性があることを示す初めての報告であり、本疾患における神経細胞死メカニズムの一部を明らかにした。

本研究では、lysoGSLs が PI3K を直接阻害すること示したが、疾患細胞内においてリソソーム内で生成される lysoGSLs が細胞膜に存在する PI3K と相互作用するのかが直接示すことが出来ていない。スフィンゴリピドーシスにおける lysoGSLs の生合成と蓄積のメカニズムについては、GSLs が過剰に蓄積すると酸性セラミダーゼ(ASAH1)によって lysoGSLs が産生されることが報告されている(Ferraz *et al.*, 2016)。従って本疾患においては、リソソームで合成された lysoGSLs がリソソーム膜を通過して細胞質 PI3K と相互作用し、PI3K/Akt シグナルを減弱させている可能性がある。我々は、細胞外から添加した lysoGM1 が細胞膜を透過して細胞質に入り、細胞質全体に分布することを明らかにした (Figure 3-2B)。また、既報によるとリソソームで産生された lysoglucosylceramide はリソソームから細胞質へ流出することが示されている(Taguchi *et al.*, 2017)。これらのことから、リソソーム内で生成される lysoGSLs は GSLs よりも親水性が向上することによってリソソーム膜から細胞質中へ抜け出し、PI3K と直接相互作用する可能性は高いと考えられる。今後本仮説を実験的に証明することが本研究の次なる課題である。

lysoGSLs と PI3K の相互作用様式については、ドッキングシミュレーションの結果であるため直接的な証明のためには共結晶構造の取得が課題である。ただし、lysoGSLs が PI3K の活性を阻害するという実験的なデータが得られていること及びドッキングシミュレーションについても lysoGSLs である lysoGM1 及び lysoGM2 は PI3K の触媒部位と安定化する結合様式が複数得られたのに対し、GSLs である GM1 ガングリオシドや GM2 ガングリオシドではほとんど安定化様式がシミュレーションされなかったことから、lysoGSLs が PI3K と相互作用し活性を阻害することは示されたと考えている。

本研究では、SD モデルマウスの脳において lysoGM2 が週齢に応じて蓄積することを示した(Figure 3-5)。既報によると、GM1 ガングリオシドーシスおよび GM2 ガングリオシドーシス患者の脳における lysoGM1 および lysoGM2 の量は、タンパク質 1 mg あたり 9.8~170 pmol であった(Kobayashi *et al.*, 1992)。本研究内で測定した SD モデルマウス脳内の lysoGM2 は

5~15 pmol/mg protein で、患者脳よりやや低い値であったが、文献で示されている値は死後脳であるのに対し、SD モデルマウス脳は生存している個体から採取した値であるため、症状の進行度合いから考えれば妥当な測定値であると考えられる。今後 SD モデルマウスにおける lysoGM2 の蓄積と症状との相関関係を明らかにすることで、lysoGM2 量が疾患重症度を判定するバイオマーカーの候補になることが期待される。

我々は、スフィンゴリピドーシスであるゴーシェ病、GM1 ガングリオシドーシス及び GM2 ガングリオシドーシス患者線維芽細胞において、Akt のリン酸化レベルが共通して低下していることを見出した。それぞれスフィンゴ糖脂質が蓄積するスフィンゴリピドーシスに分類されるが、ゴーシェ病は、グルコセレブロシダーゼ 1 (GBA1) 遺伝子の変異によって、脳内に  $\beta$ -グルコセレブロシドとグルコシルスフィンゴシンが蓄積する疾患であり、GM1 ガングリオシドーシスは、 $\beta$  ガラクトシダーゼ 1 (GLB1) の遺伝子変異によって GM1 および lysoGM1 が蓄積する疾患であり、GM2 ガングリオシドーシス (Tay-Sachs 病、Sandhoff 病及び GM2 活性化タンパク質欠損症) は、それぞれ  $\beta$  ヘキソサミニダーゼ A (HEXA) 遺伝子、 $\beta$  ヘキソサミニダーゼ B (HEXB) 遺伝子及び GM2 アクチベーター (GM2A) 遺伝子の変異によって引き起こされ、GM2 及び lysoGM2 が蓄積する疾患である。それぞれのスフィンゴリピドーシスで原因遺伝子や蓄積脂質は異なるが、lysoGSLs が蓄積することとは共通している。すなわち本研究より、スフィンゴリピドーシスで起こる神経細胞死は、lysoGSLs の蓄積による PI3K/Akt の減弱によるものだと考えられる。従って、本研究内容には含まれていないが、他のスフィンゴリピドーシスであるクラッペ病、ファブリー病及びニーマン・ピック病 A 型/B 型においても、それぞれ蓄積する lysogalactosylceramide、lysoglobotriaosylceramide 及び lysosphingomyelin が PI3K/Akt シグナルの減弱を引き起こし、神経細胞死を引き起こす可能性があると考えられる。さらにパーキンソン病では、そのリスク遺伝子にゴーシェ病の原因遺伝子である GBA1 遺伝子が挙げられている (Sidransky *et al.*, 2009)。パーキンソン病では神経細胞死が起こることが知られているが、その神経細胞死も GBA1 変異によって蓄積する lysoGSLs であるグルコシルスフィンゴシンによって引き起こされている可能性があり、本研究内容はスフィンゴリピドーシスに限らず、他の神経変性疾患の病態メカニズムに関連するかもしれない。

スフィンゴリピドーシスの治療法として、欠損酵素を補充する酵素補充療法 (ERT) がある (Platt, 2014)。しかし、ERT においては治療用酵素の投与によって中和抗体が産生され、効果が減弱することも懸念されている (Broomfield *et al.*, 2016)。費用面においても、治療用酵素は生体内のプロテアーゼによる分解を受けるため、治療用酵素を高用量、高頻度で投与するか、またはプロテアーゼ耐性型の治療用酵素を開発する必要があるため、治療コストが高額になることが考えられる (Kitakaze *et al.*, 2016)。また、静脈内投与型の ERT は治療酵素が血液脳関門 (BBB) を通過できないため、中枢神経症状には無効だとされている。そのため治療酵素をリザーバーを介して脳室内に投与する方法の開発が進められており、ムコ多糖症 2 型の治療においては使用が承認されている。しかし、リザーバーを介した継続的な脳室内投与

は、治療施設が限られていることや髄膜炎などの重篤な感染症を引き起こす危険性が懸念されている。これらのことから、本疾患において比較的非侵襲的で低コストな低分子化合物による治療法開発は今後も求められるものと推測される。本研究では、lysoGSLs による PI3K/Akt シグナリングの減弱が神経細胞死の原因であることを明らかにしたため、lysoGSLs の生成抑制や、PI3K/Akt シグナリングの活性化が新たな治療法になると考えられる。可能性のある薬剤の候補の1つは、リソソーム内 lysoGSLs の生成を抑制することが知られている酸性セラミダーゼ阻害剤であるカルモフルである (Ferraz *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019)。また、PI3K/Akt シグナリングの活性化剤として、S1PR のアゴニストである FTY720 (Zhang *et al.*, 2016) も、治療薬の候補になり得ると考えられる。これら2剤はすでに上市されている医薬品であるため、ドラッグリパーバシングによる適応拡大が検討可能であると考えられる。

上記の通り、本研究はこれまで不明であった lysoGSLs による細胞毒性機構を明らかにするものであり、今後更なるスフィンゴリピドーシスの病態解明や、治療法開発に役立つものであると考える。

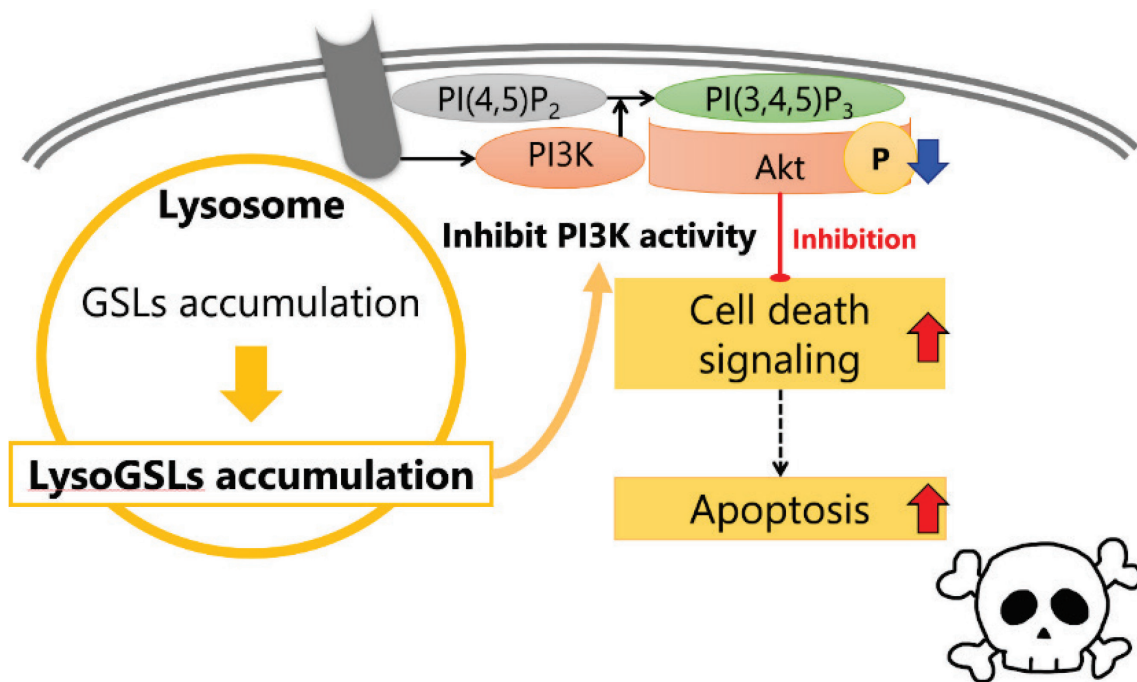


Figure 4-1 本研究成果の概略図

スフィンゴリピドーシスでは、欠損酵素の基質である GSLs が蓄積することによって lysoGSLs が蓄積する。この lysoGSLs が PI3K を直接阻害することによって、細胞生存シグナルを抑制的に制御する PI3K/Akt シグナリングが減弱し、細胞死が引き起こされる。



## 参考文献

- Abed Rabbo, M. *et al.* (2021) 'Sphingolipid lysosomal storage diseases: from bench to bedside', *Lipids in Health and Disease*, 20(1), p. 44. doi: 10.1186/s12944-021-01466-0.
- Aerts, J. M. *et al.* (2008) 'Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), pp. 2812–2817. doi: 10.1073/pnas.0712309105.
- Aureli, M. *et al.* (2016) 'GM1 Ganglioside: Past Studies and Future Potential', *Molecular Neurobiology*, 53(3), pp. 1824–1842. doi: 10.1007/s12035-015-9136-z.
- Broomfield, A. *et al.* (2016) 'The impact of the immune system on the safety and efficiency of enzyme replacement therapy in lysosomal storage disorders', *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 39(4), pp. 499–512. doi: 10.1007/s10545-016-9917-1.
- Chen, P. *et al.* (2014) 'Engineering of an isolated p110 $\alpha$  subunit of PI3K $\alpha$  permits crystallization and provides a platform for structure-based drug design', *Protein Science*, 23(10), pp. 1332–1340. doi: 10.1002/pro.2517.
- Cheung, Y.-T. *et al.* (2009) 'Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research', *NeuroToxicology*, 30(1), pp. 127–135. doi: 10.1016/j.neuro.2008.11.001.
- d'Azzo, A., Tessitore, A. and Sano, R. (2006) 'Gangliosides as apoptotic signals in ER stress response', *Cell Death and Differentiation*, 13(3), pp. 404–414. doi: 10.1038/sj.cdd.4401834.
- Dekker, N. *et al.* (2011) 'Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response', *Blood*, 118(16), pp. e118–e127. doi: 10.1182/blood-2011-05-352971.
- Dudek, H. *et al.* (1997) 'Regulation of Neuronal Survival by the Serine-Threonine Protein Kinase Akt', *Science*, 275(5300), pp. 661–665. doi: 10.1126/science.275.5300.661.
- Engelman, J. A., Luo, J. and Cantley, L. C. (2006) 'The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism', *Nature Reviews Genetics*, 7(8), pp. 606–619. doi: 10.1038/nrg1879.
- Ferraz, M. J. *et al.* (2016) 'Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases', *FEBS Letters*, 590(6), pp. 716–725. doi: 10.1002/1873-3468.12104.
- Ferreira, C. R. and Gahl, W. A. (2017) 'Lysosomal storage diseases', *Translational Science of Rare Diseases*, 2(1–2), pp. 1–71. doi: 10.3233/TRD-160005.
- Friesner, R. A. *et al.* (2004) 'Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy', *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), pp. 1739–1749. doi: 10.1021/jm0306430.

- Gegg, M. E. and Schapira, A. H. V. V (2015) 'Mitochondrial dysfunction associated with glucocerebrosidase deficiency', *Neurobiology of Disease*, 90, pp. 43–50. doi: 10.1016/j.nbd.2015.09.006.
- Graziano, A. C. E. *et al.* (2016) 'Krabbe disease: involvement of connexin43 in the apoptotic effects of sphingolipid psychosine on mouse oligodendrocyte precursors', *Apoptosis*, 21(1), pp. 25–35. doi: 10.1007/s10495-015-1183-4.
- Halgren, T. (2007) 'New Method for Fast and Accurate Binding-site Identification and Analysis', *Chemical Biology & Drug Design*, 69(2), pp. 146–148. doi: 10.1111/j.1747-0285.2007.00483.x.
- Halgren, T. A. *et al.* (2004) 'Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening', *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), pp. 1750–1759. doi: 10.1021/jm030644s.
- Halgren, T. A. (2009) 'Identifying and Characterizing Binding Sites and Assessing Druggability', *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(2), pp. 377–389. doi: 10.1021/ci800324m.
- Hannun, Y. A. and Bell, R. M. (1987) 'Lysosphingolipids Inhibit Protein Kinase C: Implications for the Sphingolipidoses', *Science*, 235(4789), pp. 670–674. doi: 10.1126/science.3101176.
- Kawashita, E. *et al.* (2009) 'Abnormal production of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  by microglial cell lines derived from neonatal brains of Sandhoff disease model mice', *Journal of Neurochemistry*, 109(5), pp. 1215–1224. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06041.x.
- Kitakaze, K. *et al.* (2016) 'Protease-resistant modified human  $\beta$ -hexosaminidase B ameliorates symptoms in GM2 gangliosidosis model', *Journal of Clinical Investigation*, 126(5), pp. 1691–1703. doi: 10.1172/JCI85300.
- Kobayashi, T. *et al.* (1992) 'Accumulation of Lysosphingolipids in Tissues from Patients with GM1 and GM2 Gangliosidoses', *Journal of Neurochemistry*, 59(4), pp. 1452–1458. doi: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb08460.x.
- Kodama, T. *et al.* (2011) 'Lyso-GM2 Ganglioside: A Possible Biomarker of Tay-Sachs Disease and Sandhoff Disease', *PLoS ONE*. Edited by R. Schiffmann, 6(12), p. e29074. doi: 10.1371/journal.pone.0029074.
- Kurita, T. *et al.* (2000) 'Enhancement of hydrolytic activity of sphingolipid ceramide N-deacylase in the aqueous-organic biphasic system.', *Journal of lipid research*, 41(5), pp. 846–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10787446>.
- Li, Y. *et al.* (2019) 'Genetic ablation of acid ceramidase in Krabbe disease confirms the psychosine hypothesis and identifies a new therapeutic target', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(40), pp. 20097–20103. doi: 10.1073/pnas.1912108116.
- Madhavi Sastry, G. *et al.* (2013) 'Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments', *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27(3), pp. 221–234. doi: 10.1007/s10822-013-9644-8.
- Miao, B. *et al.* (2010) 'Small molecule inhibition of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3)

- binding to pleckstrin homology domains', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(46), pp. 20126–20131. doi: 10.1073/pnas.1004522107.
- O'Sullivan, C. and Dev, K. K. (2015) 'Galactosylsphingosine (psychosine)-induced demyelination is attenuated by sphingosine 1-phosphate signalling', *Journal of Cell Science*, 128(21), pp. 3878–3887. doi: 10.1242/jcs.169342.
- Orvisky, E. *et al.* (2002) 'Glucosylsphingosine accumulation in tissues from patients with Gaucher disease: correlation with phenotype and genotype', *Molecular Genetics and Metabolism*, 76(4), pp. 262–270. doi: 10.1016/S1096-7192(02)00117-8.
- Pérez-Cañamás, A. *et al.* (2017) 'Sphingomyelin-induced inhibition of the plasma membrane calcium ATPase causes neurodegeneration in type A Niemann-Pick disease', *Molecular Psychiatry*, 22(5), pp. 711–723. doi: 10.1038/mp.2016.148.
- Platt, F. M. (2014) 'Sphingolipid lysosomal storage disorders', *Nature*, 510(7503), pp. 68–75. doi: 10.1038/nature13476.
- Rama Rao, K. V. and Kielian, T. (2016) 'Astrocytes and lysosomal storage diseases', *Neuroscience*, 323, pp. 195–206. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.05.061.
- Safarian, F. *et al.* (2015) 'Activation of S1P1 Receptor Regulates PI3K/Akt/FoxO3a Pathway in Response to Oxidative Stress in PC12 Cells', *Journal of Molecular Neuroscience*, 56(1), pp. 177–187. doi: 10.1007/s12031-014-0478-1.
- Sango, K. *et al.* (1995) 'Mouse models of Tay–Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism', *Nature Genetics*, 11(2), pp. 170–176. doi: 10.1038/ng1095-170.
- Sasaki, T. *et al.* (2009) 'Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases', *Progress in Lipid Research*, 48(6), pp. 307–343. doi: 10.1016/j.plipres.2009.06.001.
- Sidransky, E. *et al.* (2009) 'Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson's Disease', *New England Journal of Medicine*, 361(17), pp. 1651–1661. doi: 10.1056/NEJMoA0901281.
- Sueyoshi, N., Maehara, T. and Ito, M. (2001) 'Apoptosis of Neuro2a cells induced by lysosphingolipids with naturally occurring stereochemical configurations', *Journal of Lipid Research*, 42(8), pp. 1197–1202. doi: 10.1016/S0022-2275(20)31569-8.
- Taguchi, Y. V. *et al.* (2017) 'Glucosylsphingosine Promotes  $\alpha$ -Synuclein Pathology in Mutant GBA-Associated Parkinson's Disease', *The Journal of Neuroscience*, 37(40), pp. 9617–9631. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1525-17.2017.
- Walker, E. H. *et al.* (2000) 'Structural Determinants of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition by Wortmannin, LY294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine', *Molecular Cell*, 6(4), pp. 909–919. doi: 10.1016/S1097-2765(05)00089-4.
- Xu, Y.-H. *et al.* (2010) 'Multi-system disorders of glycosphingolipid and ganglioside metabolism', *Journal of Lipid Research*, 51(7), pp. 1643–1675. doi: 10.1194/jlr.R003996.
- Yamamoto, K. *et al.* (2017) 'Secreted Phospholipase A2 Specificity on Natural Membrane

Phospholipids', in *Methods in Enzymology*. 1st edn. Elsevier Inc., pp. 101–117. doi:  
10.1016/bs.mie.2016.09.007.

Zhang, L. *et al.* (2016) 'Traumatic Brain Injury-Induced Neuronal Apoptosis is Reduced Through Modulation of PI3K and Autophagy Pathways in Mouse by FTY720', *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(1), pp. 131–142. doi: 10.1007/s10571-015-0227-1.

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始懇切丁寧にご指導ご鞭撻下さいました、徳島大学大学院医歯薬学研究部(薬学域)薬科学教育部附属医薬創製教育研究センター 創薬生命工学分野 伊藤孝司 教授(現 徳島大学名誉教授)、辻大輔 助教(現 安田女子大学薬学部)、生物薬品化学分野 篠原康雄 教授に心より御礼申し上げます。

GM1 及び GM2 ガングリオシドをご供与下さりました、瀧孝雄 博士に心より御礼申し上げます。

lysoGSLs の生成にあたり、SCDace のご分与及び lysoGSLs の生成・精製法をご教授して下さいました、九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門 伊東信 教授、沖野望 准教授に心より御礼申し上げます。

lysoGSLs と PI3K のドッキングシミュレーションをして頂きました、産業技術総合研究所創薬分子プロファイリング研究センター 広川貴次 教授に心より御礼申し上げます。

LC-MS を用いた脂質解析は、徳島大学大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)山本圭 教授にご教授頂きました。心より御礼申し上げます。

本研究は、JSPS 科研費 18K06658、20K05750 及び AMED ACT-M(課題番号 21im0210116h0002)の助成を受けました。

本研究は、徳島大学大学院医歯薬学研究部 薬科学教育部附属医薬創製教育研究センター 創薬生命工学分野にて行われたものであり、研究に際してご協力下さいました、研究室の諸氏に心より御礼申し上げます。

本論文の図表及びイラストを作成いただいた妻 明奈に心より御礼申し上げます。

最後に、精神的・経済的支えとなり、始終暖かく見守って下さいました、家族に心より御礼申し上げます。

2024年 1月  
渡邊 綾佑