

200935059A

厚生労働科学研究研究費補助金  
こころの健康科学研究事業

ニューロパチーの病態におけるプロテオグリカンの  
役割の解明と新規治療法の開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 楠 進

平成22年(2010年)4月

# 目 次

## I. 総括研究報告

ニューロパチーの病態におけるプロテオグリカンの役割の解明と 新規治療法の開発	1
楠 進	

## II. 分担研究報告

1. ニューロパチーの病態におけるプロテオグリカンの役割の解明と 新規治療法の開発	5
楠 進	
2. ニューロパチーの病態におけるプロテオグリカンの役割の解明と 新規治療法の開発	9
門 松 健 治	
3. ニューロパチーに関連する HNK-1 糖鎖抗原の調製と血中抗体測定法の検討	13
岡 昌 吾	
4. ニューロパチーの病態におけるプロテオグリカンの役割の解明と 新規治療法の開発	16
北 川 裕 之	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	27
-----------------	----

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括研究報告書

ニューロパチーの病態におけるプロテオグリカンの役割の解明と新規治療法の開発

研究代表者 楠 進 近畿大学医学部教授

**研究要旨**

ニューロパチーの病態におけるプロテオグリカンの果たす役割を解明するために、以下の検討を行った。1) プロテオグリカンの一種であるフォスファカンに対する慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (CIDP) 患者血中の自己抗体上昇の有無を検討した。2) コンドロイチン硫酸 (CS) 糖鎖合成酵素である C6ST のノックアウトマウスを用いた免疫性神経疾患の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の検討を行った。3) ラット実験的自己免疫性神経炎 (EAN) におけるプロテオグリカン (コンドロイチン硫酸 (CS) およびケラタン硫酸 (KS)) の解析を行った。4) HNK-1 糖鎖抗原を認識する単クローン抗体の反応特異性を解析した。5) 末梢神経障害患者で一塩基多型が見出されているコンドロイチン  $\mu$ -アセチルガラクトサミン転移酵素-1 (ChGn-1) によるコンドロイチン硫酸鎖の合成制御機構を解析した。その結果、CIDP の一部において抗 phosphacan 抗体陽性例が見出され、同抗体が運動失調の病態と関連する可能性が示唆された。EAE において CS は神経保護的に作用していることが明らかになった。EAN の病態進行と脊髄ミクログリアの 150-250 kDa KSPG の発現の間に強い相関があることが明らかになった。HNK-1 エピトープに対する抗体の反応には多様性があるが、そのような多様性と抗体陽性例の臨床特徴に関連がある可能性が考えられた。ChGn-1 によりコンドロイチン硫酸鎖の本数が制御されていることがわかった。以上の結果は、免疫性およびそれ以外のニューロパチーの病態にプロテオグリカンが深く関わっていることを示唆しており、今後さらに詳細な検討が必要と考えられた。

研究分担者

門松健治・名古屋大学大学院医学系研究科  
教授

岡昌吾・京都大学大学院医学研究科教授

北川裕之・神戸薬科大学教授

楠らは、HNK-1 エピトープをもつプロテオグリカンの一種である phosphacan を調整し、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (CIDP) 患者血清中の抗体測定を行って、phosphacan が CIDP の標的分子である可能性を検討した。

**A. 研究目的**

ニューロパチーの病態におけるプロテオグリカンの果たす役割を解明するために、以下の検討を行った。

また実験動物モデルを用いた免疫性ニューロパチーの検討の前段階として、免疫性神経疾患の病態におけるプロテオグリカンの役割を検討するために、コンドロイチン

6-O-硫酸基転移酵素 1 (C6ST1) を欠損するマウス (C6ST1-KO) を用いて実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を作成し、野生型マウスの場合と比較検討した。

門松らは、ラット実験的自己免疫性神経炎 (EAN) におけるプロテオグリカン (コンドロイチン硫酸 (CS) およびケラタン硫酸 (KS)) の解析を行った。

岡らは、細胞を用いて HNK-1 糖鎖が付加された各種の糖タンパク質やプロテオグリカンを調製し、HNK-1 糖鎖抗原を認識する単クローン抗体を用いて、抗体と各 HNK-1 キャリア分子との反応特異性の解析を行った。

北川らは、前年度までに末梢神経障害患者で頻度の高いコンドロイチン *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素-1 (ChGn-1) の一塩基多型を見出していたが、今年度は ChGn-1 によるコンドロイチン硫酸鎖の合成制御機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

## B. 研究方法

Phosphacan は、ヒト IgG の Fc 領域を融合した phosphacan-Fc として調製した。CIDP44 例 (男性 26 例、女性 18 例) につき、抗 phosphacan IgM 抗体を ELISA 法で測定した。OD 値を抗体価の指標として用い、正常対照の平均+3SD を超える値を示したものを陽性と判定した。陽性例の臨床的特徴を検討した。

C57/B6 にバッククロスされた C6ST1-KO を用いた。同マウスは共同研究者である門

松によって作成された。MOG (35-55) ペプチドを用いて EAE を誘導した。EAE 誘導後 40 日目に病理学的に評価した。コントロールは野生型 B6 マウス (Wt) を用いた。MOG 特異的リンパ球の recall response を評価した。

ミエリン蛋白である P2 を用いてラットで EAN を作成し、ケラタン硫酸プロテオグリカン (KSPG)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) の挙動を解析した。

Myelin associated glycoprotein (MAG),  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG), phosphacan などの末梢ミエリン構成成分である糖タンパク質やプロテオグリカンを、ヒト IgG の Fc 領域との融合タンパク質として発現できるプラスミドを作成し、HNK-1 糖鎖を発現させるためのプラスミドと同時に COS-1 細胞にトランスフェクションし、HNK-1 糖鎖抗原を持つタンパク質を精製した。HNK-1 抗体、6B4 抗体、および Cat-315 抗体の 3 種のモノクローナル抗体の、上記抗原との反応をしらべた。

HeLa 細胞を用いて ChGn-1 を過剰発現する細胞や、RNA 干渉法を用いた遺伝子ノックダウンを行った細胞を構築して、CS 鎖を定量した。また糖転移活性を欠失させた ChGn-1 の変異体を HeLa 細胞で過剰発現させ、同様に細胞が産生する CS 鎖を定量した。さらにそれぞれの細胞が産生する CS 鎖の鎖長解析も行った。

(倫理面への配慮)

本研究は近畿大学の倫理委員会において

承認を受けた。血中抗体測定については患者本人へ十分に説明を行い、文書で同意を得た。プライバシーの保護には十分に配慮した。実験動物の取り扱いは、近畿大学および名古屋大学の「実験動物取り扱い指針」を遵守した。

### C. 研究結果

CIDP44 例中、抗 phosphacan IgM の陽性例は 4 例みられた。全例で末梢神経伝導検査における伝導速度の低下と遠位潜時の延長をみとめ、また運動失調（3 例は深部感覚障害性、1 例は小脳性）をみとめた。

C6ST1-KO は Wt と比べて EAE 症状が悪化し、症状改善も遅延した。recall response では、サイトカイン産生パターンや細胞増殖反応に差は見られなかった。

ラット EAN の症状の極期を少し過ぎたところで解析したところ、CSPG については発現の変化はなかったが、150-250 kDa の KSPG の発現が脊髄でのみほとんど消失していた。正常の脊髄で KSPG を発現しているのはミクログリアであり、その KSPG が EAN で消失することがわかった。

MAG は N 型糖鎖上に HNK-1 糖鎖抗原を有することが確認された。一方、 $\alpha$ -DG および phosphacan は O 型糖鎖上に HNK-1 糖鎖抗原を有することが示めされた。HNK-1 抗体は MAG、 $\alpha$ -DG、phosphacan に対し同じような反応性を示すのに対し、Cat-315 抗体および 6B4 抗体は、 $\alpha$ -DG、phosphacan により強い反応性を示すことが明らかとなった。

ChGn-1 の発現量とコンドロイチン硫酸の二糖総量に相関性が見られた。この結果より、ChGn-1 はコンドロイチン硫酸鎖の合成量を制御していることが示唆された。ChGn-1 変異体を過剰発現させても、親株と同程度のコンドロイチン硫酸量しか合成されず、コンドロイチン硫酸量は増加しなかった。この結果より、ChGn-1 の糖転移活性はコンドロイチン硫酸鎖の合成量を制御するのに、必須であることが明らかとなった。ChGn-1 を過剰発現しても親株の HeLa 細胞と比較して、その鎖長にほとんど変化がないため、ChGn-1 を過剰発現することによるコンドロイチン硫酸合成量の増加はコンドロイチン硫酸鎖の本数が増加していることに起因することが明らかとなった。

### D. 考察

今回の検討により、一部の CIDP でプロテオグリカンのひとつであるフォスファカンに対する抗体陽性例があることが明らかになった。これらの反応は HNK-1 糖鎖をもたない phosphacan に対してはみられず、HNK-1 抗原が標的と考えられる。IgM 抗 phosphacan 抗体陽性の CIDP4 例全例で運動失調がみられ、同抗体と運動失調の関連が示唆された。

免疫性神経疾患の動物モデルである EAE においてコンドロイチン硫酸 (CS) は神経保護的に作用していることが明らかになった。Recall response の結果から、CS は EAE の induction phase において炎症反応を修飾する働きはないが、中枢神経を攻撃する因

子から防御している可能性がある。また CS は神経修復に促進的な役割を果たしているものと推測された。

ミクログリアでの KSPG の発現消失と EAN の病態の関連を今後検討する必要がある。またミクログリアに発現がみられた 150-250 kDa のものは既知の KSPG ではなく、その同定と機能解明を行う必要がある。

HNK-1 糖鎖を認識するとされるモノクローナル抗体に、反応の多様性が認められた。HNK-1 糖鎖抗原に対する抗体は、タンパク質の種類および付加している糖鎖構造の違いにより反応性多様であると考えられる。ニューロパチー患者血清中の抗 HNK-1 抗体にも反応の多様性が存在する可能性があり、今後の検討が必要である。

ChGn-1 によりコンドロイチン硫酸鎖の本数が制御されていること、さらにその制御には ChGn-1 の糖転移活性が必須であることを明らかになった。今後、ChGn-1 のこのような機能とその障害が、ニューロパチーの病態にどのように関連するかの検討が必要である。

#### E. 結論

CIDP の一部において、硫酸化糖鎖抗原をもつ phosphacan は標的抗原のひとつである。

抗 phosphacan 抗体は運動失調の病態と関連する可能性がある。

EAE において CS は神経保護的に作用していることが明らかになった。CS の調節が免疫性神経疾患の治療につながる可能性があり、免疫性ニューロパチーモデルについても今後の検討が必要である。

EAN の病態進行と脊髄ミクログリアの 150-250 kDa KSPG の発現の間に強い相関があることが明らかになった。

HNK-1 エピトープに対する抗体の反応には多様性があるが、そのような多様性と抗体陽性例の臨床特徴に関連がある可能性がある。

ChGn-1 によりコンドロイチン硫酸鎖の本数が制御されている。ChGn-1 の変異による、コンドロイチン硫酸鎖の本数の減少とニューロパチー発症の関連を今後検討する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

各分担報告参照

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

各分担報告参照

## 研究要旨

免疫性ニューロパチーとプロテオグリカンについて、1) プロテオグリカンの一種であるフォスファカンに対する慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (CIDP) 患者血中の自己抗体の検討、2) コンドロイチン硫酸 (CS) 糖鎖合成酵素である C6ST のノックアウトマウスを用いた免疫性神経疾患の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の検討、の二つの検討を行った。その結果、CIDP44 例中の 4 例において、HNK-1 糖鎖をもつフォスファカンに対する抗体が陽性であり、陽性例は全例が運動失調を伴っていた。また C6ST のノックアウトマウスでは EAE が重症化し、回復も遅延した。CIDP の一部において、HNK-1 抗原をもつ phosphacan は標的抗原となることが明らかとなった。また抗 phosphacan 抗体は運動失調の病態と関連する可能性が考えられた。免疫性神経疾患モデルである EAE において、CS は神経保護的に作用していると考えられ、CS の調節が免疫性ニューロパチーを含む免疫性神経疾患の治療につながる可能性がある。

### A. 研究目的

慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (CIDP) は、自己免疫機序によるニューロパチーであるが標的は明らかではない。同じく免疫性ニューロパチーであるギラン・バレー症候群や IgM パラプロテイン血症に伴うニューロパチーでは、複合糖質にの糖鎖に対する抗体活性が高頻度にみられるが、CIDP ではまれである。一方プロテオグリカンに対する抗体の検討は従来ほとんど行われていない。今回は、硫酸化糖鎖抗原である HNK-1 糖鎖をもつプロテオグリカンである phosphacan に対する IgM 抗体を測定し、抗体陽性例の臨床的特徴を検討した。

また実験動物モデルを用いた免疫性ニューロパチーの検討の前段階として、免疫性

神経疾患の病態におけるプロテオグリカンの役割を検討するために、コンドロイチン 6-O-硫酸基転移酵素 1 (C6ST1) を欠損するマウス (C6ST1-KO) を用いて実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を作成し、野生型マウスで作成した場合と比較検討した。

### B. 研究方法

Phosphacan は、ヒト IgG の Fc 領域を融合した phosphacan-Fc として調製した (研究分担者の岡の研究室で行った)。ラット phosphacan cDNA を pEF-Fc に組み込んだ発現プラスミドを作成し、この発現プラスミドを COS-1 細胞に導入した。また、HNK-1 糖鎖をもつ phosphacan を得る際には pIRES-GlcAT-P-HNK-1ST を同時に細胞に導

入した。4日後に培養上清を回収し、protein G-Sepharose カラムを用いて、phosphacan-Fc を精製した。

平成 19 年 9 月から 20 年 2 月の間に、近畿大学神経内科に抗糖脂質抗体の検査依頼があった CIDP44 例（男性 26 例、女性 18 例）につき、抗 phosphacan IgM 抗体を ELISA 法で測定した。OD 値を抗体価の指標として用い、正常対照の平均+3SD を超える値を示したものを陽性と判定した。陽性例の臨床的特徴を検討した。

C57/B6 にバッククロスされた C6ST1-KO を用いた。同マウスは共同研究者である門松によって作成され、近畿大学医学部実験動物舎に搬送後、SPF の条件下で繁殖した。

EAE は MOG(35-55)ペプチドを用いて誘導し、症状（EAE スコア）を毎日観察した。EAE 誘導後 40 日目に灌流固定後に脳脊髄を摘出し、病理学的に評価した。コントロールは野生型 B6 マウス（Wt）を用いた。

MOG 特異的リンパ球の recall response を評価するために、MOG 感作 12 日目で脾臓と所属リンパ節を摘出し single cell 状態のリンパ球を MOG 再刺激下で培養した。48 時間目の培養上清の各種サイトカインを ELISA にて測定し、細胞増殖は  $^3\text{[H]}$  取り込みにて評価した。

（倫理面への配慮）

本研究は近畿大学の倫理委員会において承認を受けた。血中抗体測定については患者本人へ十分に説明を行い、文書で同意を得た。プライバシーの保護には十分に配慮した。実験動物の取り扱い、近畿大学医

学部内の「実験動物取り扱い指針」を遵守した。

### C. 研究結果

CIDP の中で、抗 phosphacan IgM の OD 値が正常対照の平均+3SD を超える症例は 4 例みられた。男性 3 例、女性 1 例であり、発症年齢は平均 52 歳であった。4 症例の臨床的特徴の検討では、4 例全例で末梢神経伝導検査における伝導速度の低下と遠位潜時の延長をみとめ、また運動失調（3 例は深部感覚障害性、1 例は小脳性）をみとめた。

C6ST1-KO は Wt と比べて EAE 症状が悪化し、症状改善も遅延した。recall response では、サイトカイン産生パターンや細胞増殖反応に差は見られなかった。

### D. 考察

HNK-1 糖鎖は、末端に硫酸化グルクロン酸基をもち、神経系の糖蛋白である MAG、PMP-22、P0、糖脂質の SGPG、プロテオグリカンである phosphacan などに発現する。従来 IgM パラプロテイン血症を伴うニューロパチーの標的抗原として MAG や SGPG が知られているが、プロテオグリカンに対する抗体活性はほとんど検討されていない。今回の検討により、一部の CIDP でプロテオグリカンのひとつであるフォスファカンに対する抗体陽性例があることが明らかになった。これらの反応は HNK-1 糖鎖をもたない phosphacan に対してはみられず、HNK-1 抗原が標的と考えられる。、高力価



の IgM 抗 phosphacan 抗体をもつ CIDP4 例全例で運動失調がみられ、同抗体と運動失調の関連が示唆された。

多くの神経疾患において、神経可塑性に異常が生じていることが知られているが、ECM の主要構成成分であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CS) が神経可塑性に関与することが示されている。炎症性脱髄疾患においては、CS が神経保護的に働くのか、神経傷害的に働くのかは、詳しく解析されていなかったが、今回の我々の結果から、EAE において CS は神経保護的に作用していることが明らかになった。

Recall response の結果から、CS は EAE の induction phase において炎症反応を修飾する機能はなさそうであるが、EAE において C6ST1-KO は症状がより増悪していることから、CS は中枢神経を攻撃する因子から防御している可能性がある。また C6ST1-KO では、EAE 症状の回復が遅い傾向があることから、CS は神経修復に促進的な役割を果たしているものと推測される。

これらの所見は今後免疫性ニューロパチーとプロテオグリカンの関連を考える上で、重要なデータと考えられる。

#### E. 結論

CIDP の一部において、硫酸化糖鎖抗原をもつ phosphacan は標的抗原のひとつである。抗 phosphacan 抗体は運動失調の病態と関連する可能性がある。

EAE において CS は神経保護的に作用していることが明らかになった。CS の調節が免

疫性神経疾患の治療につながる可能性があり、免疫性ニューロパチーモデルについても今後の検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表:

1. Kureshiro J, Miyamoto K, Kusunoki S. Selective phosphodiesterase-3 inhibitor cilostazol ameliorates EAE. *Neuroreport* 2009; 20: 718-722.
2. Ogawa G, Kaida K, Kusunoki S, Ueda M, Motoyoshi K, Kamakura K. Antibodies to ganglioside complexes consisting of asialo-GM1 and GQ1b or GT1a in Fisher and Guillain-Barré syndromes. *J Neuroimmunol* 2009; 214: 125-127.
3. Miyamoto K, Nagaosa N, Motoyama M, Kataoka K, Kusunoki S. Upregulation of water channel aquaporin-4 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci*, 2009; 276: 103-107.
4. Kaida K, Kusunoki S. Guillain-Barré syndrome: update on immunology and treatment. *Expert Rev Neurother* 2009; 9: 1307-1319
5. Kaida K, Kusunoki S. Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré

- syndrome and Fisher syndrome:  
Mini review. J Neuroimmunol, in  
press
6. 楠 進。抗 GD1b 抗体による失調性ニューロパチー。神経内科 70: 384-389, 2009
  7. 楠 進。シンポジウム 末梢神経疾患研究の現在：免疫介在性ニューロパチー。臨床神経学 49: 956-958, 2009
2. 学会発表:
1. 1. Saigoh K, Izumikawa T, Koike T, Shimizu J, Kitagawa H, Kusunoki S. Chondroitin beta-1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase (ChGn-1) missense mutations are associated with neuropathies. 134th Annual Meeting of the American Neurological Association. Baltimore, USA, October 11-14, 2009
  2. Kusunoki S, Kanata A, Kaida K. Clinical features of Guillain-Barré syndrome with anti-GD1a/GD1b IgG antibodies. 2009 Meeting of Peripheral Nerve Society. Wurzburg, Germany, July 4-8, 2009.
  3. 楠 進。シンポジウム「末梢神経疾患研究の現在」：免疫介在性ニューロパチー。第50回日本神経学会総会（2009年5月20日～22日、仙台）
  4. 青松宏美、上田昌美、金田明子、楠 進。CIDPにおける血中抗スルファチド抗体活性の検討。(PK-114)第50回日本神経学会総会（2009年5月20日～22日、仙台）臨床神経学2009; 49: 1033
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得：なし
  2. 実用新案登録：なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
（分担）研究報告書

ニューロパチーの病態におけるプロテオグリカンの役割の解明と新規治療法の開発

研究分担者 門松 健治 名古屋大学大学院医学系研究科教授

### 研究要旨

ギランバレー症候群のラットモデル EAN を用いてプロテオグリカンの病態への関与を解析した。その結果、EAN の病態進行と脊髄ミクログリアの 150-250 kDa KSPG の発現の間に強い相関があることが明らかになった。

#### A. 研究目的

プロテオグリカンの発現解析および神経培養系での解析を通してニューロパチーの病態におけるプロテオグリカンの役割を解明し、ニューロパチー治療への新しい糸口を得る。

#### B. 研究方法

ギランバレー症候群のモデルとして定着しているラットEAN (experimental autoimmune neuritis) はミエリンタンパク質P2に対する免疫反応（主に細胞性免疫）によって引き起こされる。胸髄、腰髄のレベルで末梢神経、後根神経節および脊髄が侵されることが知られている。このモデルを用いてケラタン硫酸プロテオグリカン (KSPG)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) の挙動を解析した。

当初、マウスで行うことを予定していたが、再現性の観点からラットモデルが優れていること、PGの挙動をはじめに信頼性のあるモデルで取りたいこと、の2つの理由でラットモデルを優先させることにした。生後10週の雄Lewisラットに100 $\mu$ g P2ペプチドを complete Freund adjuvant と混合して皮下注射した。

解析はKS, CS 特異的な抗体を用いた Western blot と免疫染色、さらには成体ラット後根神経節の神経細胞の初代培養による神経突起伸長などによって行っ

た。

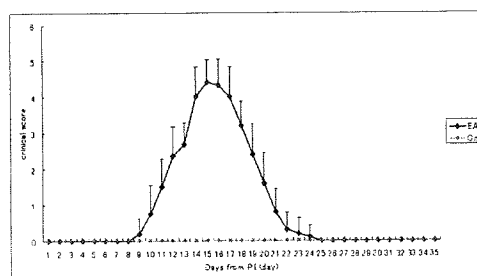
（倫理面への配慮）

名古屋大学動物実験指針に沿って実験を行った。

#### C. 研究結果

後肢の運動麻痺を指標にすると P2 注射から 8~25 日の間が症状の発現する時期であり、麻痺のピークは 15-16 日、25 日以降では麻痺は消失した（図 1）。

EAN clinical score



Clinical score: 0-normal 1-8mp ta2 2-abnormal gsh 3-mild paraparesis 4-moderate paraparesis 5-complete paraparesis 6-completa paraparesis

図1

P2 ペプチド注射後 18 日の坐骨神経、後根神経節、脊髄、脳（大脳、小脳、海馬、線条体、間脳、中脳、橋）について CSPG, KSPG の発現を Western blot で解析したところ、CSPG については発現の変化はなかった。ところが 150-250 kDa の KSPG の発現が脊髄でのみほとんど消失していることが明らかになった（図 2）。組織染色の結果、正常で KSPG を発現している脊髄の細胞はミクログリアであること、その発現が E

ANでは消失することが分かった。Western blot、組織染色の両方共にKSPG発現消失は遅くともP2ペプチド注射後12日（神経麻痺の早期）には起こっていることを示した。初代培養した神経細胞、アストログリア、ミクログリアでも150-250 kDaのKSPGを発現する細胞はミクログリアのみであった（図3）。

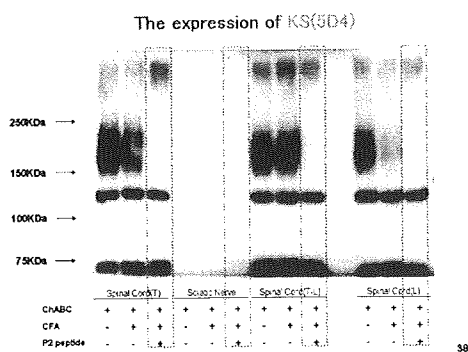


図 2

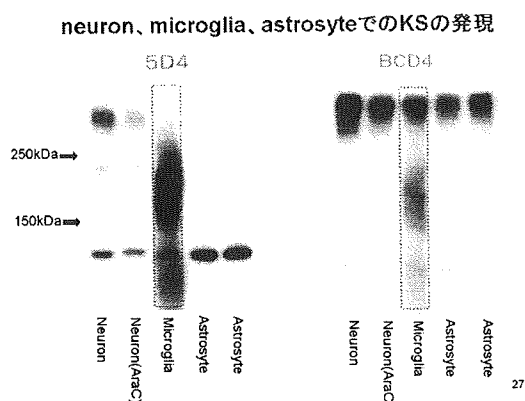


図 3

成体ラット後根神経節の神経細胞の初代培養で、PG (CSPG、KSPG の混合) による神経突起伸長阻害を見たが、コンドロイチン硫酸分解酵素 chondroitinase ABC で阻害解除はできるものの、ケラタン硫酸分解酵素 keratanase II では阻害解除はできないことから成体ラット後根神経節神経細胞の神経突起再生は KSPG の影響はほとんど受けないことが示唆された。

また、中枢神経での KS 欠損マウス (GlcNAc6ST-1 欠損) および野生型マウスを用いて脊髄損傷モデルを作ると、KS 欠損マウスの運動機能回復が有意に促進されることが分かった。その際に KS 発現が主にミクログリアとオリゴデンドロサイトに誘導されることを明らかにした。

#### D. 考察

我々は既にミクログリアの初代培養では TGFβ1 によって KSPG の発現誘導が起こることを報告している (Yin et al., 2009)。また、脊髄損傷においてはミクログリアで KSPG の誘導が起こることが報告されている (Jones et al., 2002)。我々も、上述のとおりマウスモデルでそれを確認している。一方で interferon γ のようなミクログリア活性化サイトカインではミクログリアの KSPG 産生は抑制される (Sebastian et al., 2000)。

これらのデータと今回の EAN での発見を組み合わせるとミクログリアによる KSPG 発現低下は単にミクログリアの活性化のマーカーとしてというより、ミクログリア機能に直接繋がる意味を考えるべきであることを示唆している。ミクログリアの KS 発現の消失は当初レポートされたように活性化を意味し、病態によっては、例えば脊髄損傷のときなどは反応性に KS (+) ミクログリアが保護因子として出現するのかもしれない。

すなわち、解決すべき疑問は 1. ミクログリアの KSPG 発現低下と EAN に見られる運動神経麻痺の因果関係、2. ミクログリアの KSPG 発現低下と EAN に見られる感覚異常との因果関係である。以上を背景に今後は以下の課題に挑むべきであると考えている。

(1) ラット EAN の更なる解析  
神経麻痺の起こる以前 (P2 注射後 8 日より以前) の KSPG 発現の解析を行う。P2X、P2Y などのミクログリアのマーカーを参照に KSPG 発現とミクログリア活性化の相関の有無を明らかにする。Th 細胞などの免疫系細胞浸潤、サイトカイン発現との相関を見る。

#### (2) KS 欠損マウスの EAN

「ミクログリアの KSPG は神経保護的に働く」と想定するなら KS 欠損マウスではより早期に、あるいはより重篤な、神経麻痺が起こることが予想される。その検証を行う。さらに KS 欠損マウス由来ミクログリアの挙動 (形態、サイトカイン産生、サイトカインに対する反応性、活性化マーカーの発

現の程度など)を野生型マウス由来のミクログリアと比較する。

(3) ミクログリア由来 KSPG の同定  
これまで知られるKSPGで150-250 kDaのサイズを持つものではなく、既存の抗体にも反応しない。我々は既にマウスミクログリア細胞括BV2細胞はKSPGを産生することを確認している。この細胞からKSPGを大量調整してその同定を行う。次年度以降、その機能ならびにヒトのギランバレー症候群での発現の解析を目指す。

#### E. 結論

EANの病態進行と脊髄ミクログリアの150-250 kDa KSPGの発現の間に強い相関があることが明らかになった。

#### F. 健康危険情報:該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Yin, J., Sakamoto, K., Zhang, H., Ito, Z., Imagama, S., Kishida, S., Natori, T., Sawada, M., Matsuyama, Y., Kadomatsu, K. Transforming growth factor- $\beta$ 1 upregulates keratan sulfate and chondroitin sulfate biosynthesis in microglia after brain injury. *Brain Res.* 1263, 10-22 (2009).

(2) Sakakima H, Yoshida Y, Yamazaki Y, Matsuda F, Ikutomo M, Ijiri K, Muramatsu H, Muramatsu T, Kadomatsu K. Disruption of the midkine gene (Mdk) delays degeneration and regeneration in injured peripheral nerve. *J Neurosci Res.* 87, 2908-2915 (2009).

(3) Hobo, A., Yuzawa, Y., Kosugi, T., Kato, N., Asai, N., Sato, W., Maruyama, S., Ito, Y., Kobori, H., Ikematsu, S., Akira Nishiyama, A., Matsuo, S., Kadomatsu, K. The growth factor midkine regulates the renin-angiotensin system in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 1616-1625 (2009).

(4) Kato, N., Yuzawa, Y., Kosugi, T., Hobo, A., Sato, W., Miwa, Y., Sakamoto, K., Matsuo, S., Kadomatsu, K.

The E-selectin ligand Basigin/CD147 is responsible for neutrophil recruitment in renal ischemia/reperfusion. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 1565-1576 (2009).

(5) Mu, P., Nagahara, S., Makita, N., Tarumi, Y., Kadomatsu, K., Takei, Y. Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: Combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. *Int. J. Ca*

*ncer* 125, 2978-2990 (2009).

(6) Takenaka, H., Horiba, M., Ishiguro, H., Sumida, A., Hojo, M., Utsui, A., Akita, T., Sakuma, S., Ueda, Y., Kodama, I., Kadomatsu, K. Midkine prevents ventricular remodeling and improves long-term survival after myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296, H462-469 (2009).

(7) Yazaki S, Iwamoto M, Onishi A, Miwa Y, Suzuki S, Fuchimoto D, Sembon S, Furusawa T, Hashimoto M, Oishi T, Liu D, Nagasaka T, Kuzuya T, Maruyama S, Oga wa H, Kadomatsu K, Uchida K, Nakao A, Kobayashi T. Successful cross-breeding of cloned pigs expressing endo-beta-galactosidase C and human decay accelerating factor. *Xenotransplantation* 16, 511-521 (2009).

(8) Sumida A, Horiba M, Ishiguro H, Takenaka H, Ueda N, Ooboshi H, Ophhof T, Kadomatsu K, Kodama I. Midkine Gene Transfer after Myocardial Infarction in Rats Prevents Remodeling and Ameliorates Cardiac Dysfunction. *Cardiovasc Res.* (2010) in press

(9) Kadomatsu, K. Midkine Regulation of the Renin-Angiotensin System. *Curr Hypertens Rep* (2010). in press. Review.

##### 2. 学会発表

(1) 門松健治 神経軸索再生とプロテオグリカン 第32回分子生物学会シンポジウム 横浜

(2) 門松健治 軟骨と脳:その極めて似通ったマトリックス組成 第22回日本軟骨代謝学会 名古屋

(3) 門松健治 神経軸索再生とプロテオグリカン 第1回名古屋大学高等研究院セミナー 名古屋

(4) 門松健治 疾患モデルブタの医学研究への応用 平成21年度東海畜産学会シンポジウム 名古屋

(5) 門松健治、岸田聡 難治性神経芽腫の生物学的特性:動物モデルから学んだこと 第25回小児がん学会シンポジウム 千葉県浦安市

(6) Mu P, Kadomatsu K, Takei Y. Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: Combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. 8<sup>th</sup>

Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association: Cancer Genomics, Epidemiology, and the Development of Novel Therapeutics. (Hilton Waikoloa Village, Waikoloa, Hawaii, USA Feb 5-9, 2010) .

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(1) 特願2009-521624, PCT/JP2008/  
061834(外国) 神経傷害に基づく機能不全

の改善剤およびRhoキナーゼ活性化抑制剤

(2) 特願2008-105183, PCT/JP2009/

057503(外国) 神経因性疼痛の改善剤

特願 2009-51866, PCT/JP2009/000863

(外国): 特許番号第 4423375 急性腎障害のバイオマーカーおよびその用途

(3) 12/554,560 (米国) ミッドカインを標的とした治療方法

ニューロパチーに関連する HNK-1 糖鎖抗原の調製と血中抗体測定法の検討

研究分担者 岡 昌吾 京都大学医学研究科 教授

**研究要旨** HNK-1 糖鎖抗原は糖鎖の非還元末端に硫酸化されたグルクロン酸を持つ神経系に特徴的な糖鎖抗原である。本糖鎖抗原は末梢ミエリン構成成分である糖脂質や糖タンパク質、プロテオグリカンなど多様な分子上に多様な糖鎖構造で発現していることが知られている。本研究では HNK-1 糖鎖抗原をもつ多様な分子を調製し、ニューロパチー患者血清中に存在する糖鎖抗体との反応特異性を詳細に解析するための基盤となる研究を行った。

**A. 研究目的**

HNK-1 糖鎖抗原は単クローン抗体 HNK-1 によって認識される糖鎖の総称で、その構造的特徴は糖タンパク質や糖脂質などの非還元末端側に共通に存在する *N*-アセチルラクトサミン構造 Gal $\beta$ 1-4GlcNAc の末端ガラクトース残基に、特徴的な 3 位の硫酸化されたグルクロン酸が結合している点にある。HNK-1 糖鎖抗原は非常に免疫原性が高く、本糖鎖を認識する単クローン抗体 (L2, NC-1, VC1.1, M6749, 6B4, Cat315 など) が多く独立の研究室から別々の名前で報告されている。しかし、最近の研究によってこれらの HNK-1 糖鎖抗原には構造的な多様性が存在することや前述の単クローン抗体がその多様性に対応している反応する可能性を示す研究結果が報告されてきている。

一方、IgM パラプロテイン血症を伴うニューロパチーの標的抗原として MAG および SGPG が知られているが、これらの抗原は HNK-1 糖鎖を含んでいる。本研究代表者である楠らはギラン・バレー症候群やフィッシャー症候群において、多くの糖鎖に対する抗体を見出し、病態との関連の解明を進めてい

る。そこで本研究では HNK-1 糖鎖が付加された糖タンパク質やプロテオグリカンを生体あるいは細胞より系統的に調製し、ニューロパチー患者血清中に存在する糖鎖抗体との反応性を詳細に解析することにより、自己免疫の新規標的抗原の同定やニューロパチーの新たな病態メカニズム解明への手がかりをつかむことを目的としている。本年度は細胞を用いて HNK-1 糖鎖が付加された糖タンパク質やプロテオグリカンを調製した。また調製した HNK-1 糖鎖抗原に構造的な多様性があることを確認し、一部は研究代表者がニューロパチー患者血清を用いて血中糖鎖抗体の測定を行う研究に提供した。さらに我々の研究室では患者血清中の自己抗体の代わりに HNK-1 糖鎖抗原を認識する単クローン抗体をモデルとして用い、抗体と各 HNK-1 キャリア分子との反応特異性の解析を行った。

**B. 研究方法**

1. HNK-1 糖鎖抗原を持つ糖タンパク質の調製

標的タンパク質としては myelin associated

glycoprotein (MAG),  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG), phosphacan などの末梢ミエリン構成成分である糖タンパク質やプロテオグリカンを用いることにした。まず、それぞれのタンパク質をヒト IgG の Fc 領域との融合タンパク質として発現できるプラスミドを作成した。各タンパク質の発現用プラスミドと HNK-1 糖鎖を発現させるためのプラスミドとを同時に COS-1 細胞にトランスフェクションし、4 日後に培養上清を回収した。その培養上清から protein G Sepharose カラムを用いて HNK-1 糖鎖抗原を持つタンパク質を精製した。

## 2. ELISA 法を用いた単クローン抗体の特異性の検討

細胞より調製した各タンパク質を PBS で希釈し、96 well マイクロテストプレートに 1 well あたり 0.05  $\mu$ g 添加し、コーティングを行った。一次抗体として HNK-1 抗体、6B4 抗体、および Cat-315 抗体を用い室温で 2 時間反応させた。次に、二次抗体として HRP 標識した anti-mouse IgM 抗体および anti-rabbit IgG 抗体を室温で 2 時間反応させた。発色基質としては Sure Blue TMB Microwell Peroxidase Substrate を用いて、450 nm の吸収を測定した。

## C. 研究結果

### 1. HNK-1 糖鎖の構造的多様性

COS-1 細胞より HNK-1 糖鎖を発現させた MAG-Fc、 $\alpha$ -DG-Fc および phosphacan-Fc を精製し、*N*-glycosidase F 処理により *N* 型糖鎖の除去を行い、Western Blot で確認した。その結果、MAG は *N*-glycosidase F により HNK-1 抗体反応性が消失することから、*N* 型糖鎖上に HNK-1 糖鎖抗原を有することが確認された。一方、 $\alpha$ -DG および phosphacan は *N*-glycosidase F に抵抗性を示すことから、*O* 型糖鎖上に HNK-1 糖鎖抗原

を有することが示めされた。また、 $\alpha$ -DG および phosphacan の構造は、論文及び当研究室で行った実験により、それぞれ *O*-mannose 型糖鎖およびムチン型糖鎖上に存在すると考えられた。

### 2. HNK-1 糖鎖抗原を認識する抗体の特異性

HNK-1 糖鎖抗原に対する単クローン抗体としては HNK-1 抗体、6B4 抗体、Cat-315 抗体を用いた。6B4 抗体、Cat-315 抗体は HNK-1 糖鎖抗原を認識すると考えられているが抗原特異性の詳細な解析はなされていない抗体である。そこで、上述した HNK-1 糖鎖抗原を持つタンパク質に対する各抗体の反応性を ELISA 法を用いて解析した。その結果、HNK-1 抗体は MAG、 $\alpha$ -DG、phosphacan に対し同じような反応性を示すのに対し、Cat-315 抗体および 6B4 抗体は、 $\alpha$ -DG、phosphacan により強い反応性を示すことが明らかとなった。即ち、HNK-1 抗体は *N* 型糖鎖上の HNK-1 糖鎖抗原 (MAG との反応性) や *O* 型糖鎖上の HNK-1 糖鎖抗原 ( $\alpha$ -DG、phosphacan との反応性) を広く認識するのに対し、Cat-315 抗体および 6B4 抗体は *N* 型糖鎖上の HNK-1 糖鎖抗原 (MAG との反応性) に比べ *O* 型糖鎖上の HNK-1 糖鎖抗原 ( $\alpha$ -DG、phosphacan との反応性) をより強く認識すると考えられた。

## D. 考察

HNK-1 糖鎖を認識する 6B4 抗体、Cat-315 抗体は *O* 型糖鎖を持つ phosphacan や  $\alpha$ -DG 上の HNK-1 糖鎖に反応性が高いことが明らかとなった。現在、これら抗体が糖鎖の違いのみならずタンパク質部分の違いを認識しているのかどうかについては不明である。しかし、本研究により HNK-1 糖鎖抗原に対する抗体はタンパク質の種類および付加している糖鎖構造の違い



いにより反応性が異なるものが存在すると考えられ、ニューロパチー患者血清中の抗 HNK-1 抗体にも多様な反応性を示すものが存在するのではないかと予想された。

#### E. 結論

本研究はニューロパチー患者血清中の抗 HNK-1抗体についてタンパク質の種類や糖鎖の種類によって異なる反応特異性を持つものの可能性を示したものである。さらにその反応特異性と、実際の臨床症状や治療反応性との相関を解析することにより自己免疫の新規標的抗原の同定やニューロパチーの新たな病態メカニズム解明への手がかりを与える可能性を示すものである。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Morita I, Kakuda S, Takeuchi Y, Kawasaki T, Oka S. HNK-1 (human natural killer-1) glyco-epitope is essential for normal spine morphogenesis in developing hippocampal neurons. *Neuroscience*. 164(4), 1685-1694 (2009).

Morita I, Kakuda S, Takeuchi Y, Itoh S, Kawasaki N, Kizuka Y, Kawasaki T, and Oka S. HNK-1 glyco-epitope regulates the stability of the glutamate receptor subunit GluR2 on the neuronal cell surface. *J. Biol. Chem.* 284(44): 30209-32017 (2009).

Anzai D, Tonoyama Y, Ikeda A, Kawasaki T, Oka S. Regulated expression of the HNK-1 carbohydrate is essential for medaka (*Oryzias latipes*) embryogenesis. *Glycobiology*. 19(8), 868-78 (2009).

Tonoyama Y, Anzai D, Ikeda A, Kakuda S, Kinoshita M, Kawasaki T, Oka S. Essential

role of beta 1,4-galactosyltransferase 2 during medaka (*Oryzias latipes*) gastrulation. *Mech Dev.* 126 (7), 580-594 (2009).

Yoshihara T, Sugihara K, Kizuka Y, Oka S, Asano M. Learning/memory impairment and reduced expression of the HNK-1 carbohydrate in beta 4-galactosyltransferase-II-deficient mice. *J Biol Chem.* 284 (18), 12550-12561 (2009).

Kizuka Y, Tonoyama Y, and Oka S. Distinct transport and intracellular activities of two GlcAT-P isoforms. *J. Biol. Chem.* 284(14), 9247-9256 (2009).

##### 2. 学会発表

岡昌吾, 森田一平, 竹内祐介, 木塚康彦, 角田品子 グルタミン酸受容体に発現する HNK-1糖鎖の役割 第32回日本分子生物学会年会(2009年12月横浜)

Ippei Morita, Shinsko Kakuda, Yusuke Tkeuchi, Satsuki Itoh, Nana Kawasaki and Shogo Oka The expression and function of HNK-1 glyco-epitope on a glutamate receptor subunit GluR2 アメリカ糖鎖生物学会 (2009年11月サンディエゴ)

森瀬譲二、木塚康彦、森田一平、殿山泰弘、橋井則貴、川崎 ナナ、岡昌吾 Phosphacan上に存在する HNK-1 糖鎖に関する研究第29回日本糖質学会年会(2009年9月飛騨)

岡昌吾 神経特異的糖鎖の機能とその発現制御第10回関西グライコサイエンスフォーラム(2009年5月大阪)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

ニューロパチーの病態におけるプロテオグリカンの役割の解明と新規治療法の開発

研究分担者 北川 裕之 神戸薬科大学教授

## 研究要旨

最近、近畿大学の楠らのグループは、コンドロイチン硫酸の合成に関与する糖転移酵素の一つであるコンドロイチン *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素-1 (ChGn-1) に、アミノ酸置換を伴う一塩基多型を2種類見だし、それらがニューロパチー例で対照と比較して頻度が高いことを明らかにしている。我々は、ニューロパチー例で見いだされた *ChGn-1* 遺伝子の一塩基多型により、ChGn-1 の酵素活性が失われることを明らかにした。そこで本研究では、ChGn-1 によるコンドロイチン硫酸鎖の合成制御機構を明らかにしようと試みた。その結果、ChGn-1 によりコンドロイチン硫酸鎖の本数が制御されていること、さらにその制御には ChGn-1 の糖転移活性が必須であることが明らかとなった。したがって、ニューロパチーの症例においては ChGn-1 が変異することにより、コンドロイチン硫酸鎖の本数が減少していることが示唆された。

## A. 研究目的

コンドロイチン硫酸鎖は、硫酸化グリコサミノグリカン多糖鎖のひとつであり、コアタンパク質に共有結合したコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして、ほとんど全ての細胞表面や細胞外マトリックスに存在している。コンドロイチン硫酸鎖は、グルクロン酸と *N*-アセチルガラクトサミンが交互に繰り返した構造を基本糖鎖骨格にもち、その様々な部位が基質特異性の異なる硫酸基転移酵素群によって硫酸化修飾を受けて構造多様性を獲得する。これまでの研究から、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、中枢神経系のマトリックスに豊富に存在することが知られ、神経回路網の形成に重要な役割を果たしていると考えられている。

最近、研究代表者の楠らは、コンドロイチン硫酸の合成に関与する糖転移酵素の一つであるコンドロイチン *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素-1 (ChGn-1) にニューロパチー例で対照と比較して頻度が高い一塩基多型を見いだした。また、我々は、ニューロパチー例で見いだされた *ChGn-1* 遺伝子の一塩基多型により、ChGn-1 の酵素活性が失われることを明らかにしてきた。しかしながら、生体内においては ChGn-1 と同様の基質特異性を示すコンドロイチン硫酸合成酵素が複数存在するため、ChGn-1 がどのような機構でコンドロイチン硫酸鎖の生合成を制御しているのかは不明であった。そこで本研究では、ChGn-1 によるコンドロイチン硫酸鎖の合成制御機構を明らかにすることにより、ニューロパチーの病態におけ

るコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの機能の解明を試みた。

## B. 研究方法

ChGn-1 のコンドロイチン硫酸鎖生合成における機能を明らかにするために、ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞を用いて ChGn-1 を過剰発現する細胞や、RNA 干渉法を用いた遺伝子ノックダウンを行った細胞を構築した。そして、細胞が産生するコンドロイチン硫酸鎖の量をコンドロイチナーゼ ABC でコンドロイチン硫酸鎖を特異的に二糖単位にまで分解することにより定量した。また、ChGn-1 の糖供与体との結合ドメインを変異させ、糖転移活性を欠失させた変異体を HeLa 細胞で過剰発現させ、同様に細胞が産生するコンドロイチン硫酸鎖の量を定量した。さらに、最近コンドロイチン硫酸鎖の鎖長もその機能に重要であることが示唆されているため、それぞれの細胞が産生するコンドロイチン硫酸鎖の鎖長解析をゲル過クロマトグラフィーにより行った。

## C. 研究結果

ChGn-1 の変異により、ニューロパチーの病態において、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンがどのように変化しているかを明らかにするために、ChGn-1 のコンドロイチン硫酸鎖の生合成における機能の解明を試みた。まず、ChGn-1 を過剰発現する HeLa 細胞を構築し、細胞が産生するコンドロイチン硫酸鎖の変化を分析した。ネオマイシン耐性遺伝子をもつ pCMV-Script ベクター

に ChGn-1 を組み込み、HeLa 細胞に導入し、Geneticin を含む培地で培養することで遺伝子導入されていない細胞を死滅させ、ChGn-1 を過剰発現する HeLa 細胞を作製した。さらに、ChGn-1 の発現をノックダウンするために、ChGn-1 の配列に相補的な shRNA を発現するベクター(SureSilencing shChGn-1)を HeLa 細胞に導入し、Puromycin を含む培地で培養することで遺伝子導入されていない細胞を死滅させ、ChGn-1 の発現を抑制させた HeLa 細胞を構築した。それぞれの細胞について、ChGn-1 の発現量を real-time PCR により調べ、最も発現が高いあるいは低い細胞を用いて分析を行った。それぞれの細胞から抽出・精製したグリコサミノグリカン画分を、コンドロイチン硫酸を二糖にまで分解するコンドロイチナーゼ ABC で消化し、消化されたコンドロイチン硫酸鎖を蛍光標識し、陰イオン交換 HPLC を行いコンドロイチン硫酸鎖の総量を解析した。その結果、ChGn-1 の発現量とコンドロイチン硫酸の二糖総量に相関性が見られた。この結果より、ChGn-1 はコンドロイチン硫酸鎖の合成量を制御していることが示唆された。

次に、ChGn-1 の糖転移活性がコンドロイチン硫酸鎖の合成量を制御するのに必要であるかを明らかにするために、糖供与体との結合に必要な DVD (Asp-Val-Asp) ドメインを DVA(Asp-Val-Ala)に変異させ、ChGn-1 の糖転移活性を欠失させた変異体(ChGn-1 mutant)を HeLa 細胞で過剰発現させた細胞を構築し、細胞が産生するコンドロイチン

硫酸鎖を分析した。その結果、ChGn-1 変異体を過剰発現させても、親株の HeLa 細胞と同程度のコンドロイチン硫酸量しか合成されず、コンドロイチン硫酸量は増加しなかった。この結果より、ChGn-1 の糖転移活性はコンドロイチン硫酸鎖の合成量を制御するのに、必須であることが明らかとなった。

さらに、ChGn-1 過剰発現細胞におけるコンドロイチン硫酸鎖の増加が、本数の増加と鎖長の伸長のどちらに起因するのかを明らかにするため、細胞から抽出・精製したグリコサミノグリカン画分をそれぞれゲルろ過クロマトグラフィーにより分画し、各画分に含まれるコンドロイチン硫酸の二糖総量を求めることにより鎖長解析を行った。その結果、親株の HeLa 細胞のコンドロイチン硫酸の鎖長と比較すると、ChGn-1 を過剰発現してもその鎖長にほとんど変化がないため、ChGn-1 を過剰発現することによるコンドロイチン硫酸合成量はコンドロイチン硫酸鎖の本数が増加していることに起因することが明らかとなった。

#### D. 考察

今回、ChGn-1 によりコンドロイチン硫酸鎖の本数が制御されていること、さらにその制御には ChGn-1 の糖転移活性が必須であることを明らかにした。したがって、ニューロパチーの症例においては ChGn-1 が変異することにより、コンドロイチン硫酸鎖の本数が減少していることが示唆された。そのため、ChGn-1 の変異によりコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの合成異常が存

在すると、minor trauma にさらされやすい末梢神経の障害からの修復や再生が十分にできなくなる可能性が考えられる。しかしながら、ChGn-1 は *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素であり、単独ではコンドロイチン硫酸鎖の二糖繰り返し構造を合成できないため、他のコンドロイチン硫酸合成酵素と共同してコンドロイチン硫酸鎖の合成を制御していると予想される。そのため、引き続きコンドロイチン硫酸の合成を制御していることが明らかとなってきたコンドロイチン硫酸合成酵素のニューロパチー症例における検討およびコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの機能の解析を行うことで、ニューロパチーの病態におけるプロテオグリカンの役割を解明する予定である。

#### E. 結論

コンドロイチン硫酸鎖の本数の減少とニューロパチーとの関連が疑われた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表:なし

##### 2. 学会発表:

1. H. Kitagawa: Role of the sulfation pattern of chondroitin sulfate in its neuritogenic activities: The 6th International Proteoglycan Meeting, Aix les Bains, France, September 13-17, 2009 (Invited speaker).