

201027081A

厚生労働科学研究研究費補助金
障害者対策総合研究事業

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 楠 進

平成23年(2011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. ニューロパチーにおけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン 糖鎖遺伝子の解析	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	8
門 松 健 治	
3. ニューロパチーに関連する HNK-1 糖鎖抗原の調製とその糖鎖構造解析	12
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	15
北 川 裕 之	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	23
-----------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）

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) ニューロパチー症例についてコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)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) 遺伝子の解析を行った。2) ラット実験的自己免疫性神経炎(experimental autoimmune neuritis, EAN)を用いてケラタン硫酸プロテオグリカン (KSPG) の挙動を解析した。3) HNK-1 糖鎖の構造的多様性を解析した。4) ChGn-1の、CS鎖の合成制御機構について解析した。その結果、何らかのニューロパチー148例中23例のChGn-1 遺伝子にアミノ酸置換を伴う一塩基変異がみられ、うち14例は著明な酵素活性の低下がみられた。一方132例の疾患対照では10例にアミノ酸置換を伴う一塩基変異がみられ、6例では著明な酵素活性の低下がみられた。これらの変異のうち、2部位の変異はニューロパチーにのみ認められた。EANの解析では、EANに伴ってKS陰性のミクログリアが増加すること、増加するミクログリアの少なくとも一部はM2ミクログリアが含まれることがわかった。HNK-1糖鎖は、MAGではN型糖鎖上に、 α -DGおよびPhosphacanではO型糖鎖上に存在することが確認された。CS鎖の本数の制御には、ChGn-1のほかにコンドロイチン4-O-硫酸基転移酵素-2 (C4ST-2) も関与していることがわかった。以上の結果から、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与していることが示唆され、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

オグリカンについては従来ほとんど検討されてこなかった。本研究は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し、新たな治療ストラテジーを構築することを目的とする。

楠らは、ニューロパチーの病態とコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)の糖鎖合成酵素遺伝子の異常の関連を解明することを目的として、CSPG の糖転移酵素の一つであるコンドロイチン *N*-アセチル

A. 研究目的

プロテオグリカンはニューロパチーの病態や治療による回復過程に大きく影響すると考えられるが、ニューロパチーとプロテ

ガラクトサミン転移酵素-1 (ChGn-1) に焦点を当てて検討した。

門松らは、ラット実験的自己免疫性神経炎 (experimental autoimmune neuritis, EAN)におけるケラタン硫酸(KS)の解析を行った。

岡らは、HNK-1 糖鎖の構造的多様性およびPhosphacan上のHNK-1糖鎖の構造解析を行った。

北川らは、従来の検討によりニューロパチーとの関連が考えられる、CS鎖の本数の制御機構について検討した。

B. 研究方法

各種の病態によるニューロパチー症例148例、および疾患対照132例について、ChGn-1遺伝子の7つのエクソンの塩基配列を解析した。

ミエリン蛋白であるP2を用いてラットでEANを作成し、KSPGに特異的な抗体によるWestern blotや免疫組織染色、マイクログリアマーカーであるIba1、M1マクロファージ/マイクログリアマーカーED1およびM2マクロファージ/マイクログリアマーカーMMRなどによる免疫組織染色を施行した。

COS-1細胞よりHNK-1糖鎖を発現させたMAG-Fc、 α -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。またCOS-1細胞から調製したphosphacanをあらかじめコンドロイチナーゼABC消化とN-glycosidase-F消化により、CS鎖とN型糖鎖を除去した後、ヒド

ラジン分解によってO型糖鎖を遊離させ還元末端をピリジルアミノ化し、液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS)を用いて構造解析を行った。

マウス繊維芽細胞であるL細胞やコンドロイチン4-O-硫酸基転移酵素-1 (C4ST-1)の発現が欠損しているsog9細胞を用いて、ChGn-1およびC4ST-2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、細胞が産生するCS鎖の量を定量した。また、それぞれの細胞が産生するCS鎖の鎖長解析をゲルろ過クロマトグラフィーにより行った。

(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。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

ニューロパチー148例中23例において、ChGn-1遺伝子にアミノ酸置換をきたす一塩基変異をみとめ、そのうち14例の一塩基置換は著明な酵素活性の低下を伴っていた。一方で、疾患対照132例中10例にもアミノ酸置換をきたす一塩基置換を認め、そのうち6例では著明な酵素活性の低下もみられた。酵素活性著明低下をきたす一塩基置換のうちニューロパチー患者2例にみられたもの(各例1か所ずつ)は疾患対照にはみられなかった。

脊髄でのKSの発現はEANの症状が出る

頃に消退し、症状回復後も発現の再現には時間を要した。一方マイクログリアマーカーであるIba1、M1マクロファージ/マイクログリアマーカーED1およびM2マクロファージ/マイクログリアマーカーMMRの発現は、KSと鏡像関係を示した。免疫組織染色ではEANでマイクログリアが顕著に増加するがKSの発現を見ることはない。対照的に正常ラットではマイクログリアの数は少ないものの、その一部がKSを発現していた。またM2マーカーMMR陽性のマイクログリアのほぼすべてはIba1陽性であった。

HNK-1糖鎖は、MAGではN型糖鎖上に、 α -DGおよびPhosphacanではO型糖鎖上に存在することが確認された。またPhosphacanのHNK-1糖鎖はO型糖鎖の中でもムチン型のcore 2分岐上に発現していることが明らかとなった。

L細胞でもsog9細胞においても、ChGn-1の発現量とCSの二糖総量に相関性が見られた。この結果より、ChGn-1は、CS鎖の合成量を制御していることが示唆された。またC4ST-2の発現量とCSの二糖総量にも相関性が見られた。ゲルろ過クロマトグラフィーによる解析により、ChGn-1やC4ST-2を過剰発現することによるCS合成量の増加は、CS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

ニューロパチーの14例のChGn-1遺伝子に3か所の酵素活性低下を伴う一塩基置換

を見出した。そのうち1か所は疾患対照にもみられたが、2か所はニューロパチーにのみみられた。今回見出された遺伝子変異はheterozygote変異であること、また変異のみられた症例の臨床病型も多様であることから、今回の解析で見出された変異は、直ちにニューロパチーを引き起こすものである可能性は少ない。しかしminor traumaにさらされやすい末梢神経においては、今回見出されたような糖鎖合成系の異常が存在することが、傷害からの修復や再生にとって不利となる可能性が考えられる。今後症例数を増やして詳細な解析を行う必要がある。

EANの症状の極期における脊髄マイクログリアのKS発現の消失は傷害的に働くのか、細胞保護的に作用するのか、今後検討する必要がある。

昨年の報告で、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーの一部の症例で、MAGに対する抗体活性は陰性であるが、HNK-1糖鎖をもつPhosphacanに対する抗体がみられることを報告した。今回の検討から、N型糖鎖のみを持つMAGでは検出されない患者血清中の抗体がphosphacanによって検出された理由はHNK-1糖鎖の構造的な違いによるものである可能性が示唆された。

CS鎖の本数の制御には、C4ST-2も関与していることが明らかになった。したがって、C4ST-2についてもChGn-1について行ったようなニューロパチー症例における遺伝子解析を検討する必要がある。

E. 結論

CS の糖鎖合成不全とニューロパチーとの関連が疑われた。

ラット EAN の病態進行に伴って発現が消失するケラタン硫酸は、少なくとも M2 ミクログリアに発現することが分かった。

HNK-1 糖鎖の構造的多様性が示され、Phosphacan 上の HNK-1 糖鎖の構造が明らかとなった。

ニューロパチーとの関連が疑われている CS 鎖の本数の減少には、ChGn-1 ばかりでな

く C4ST-2 も関与していることが明らかになった。

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

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）

分担研究報告書

ニューロパチーにおけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン糖鎖遺伝子の解析

研究代表者 楠 進 近畿大学医学部教授

研究要旨

ニューロパチーとプロテオグリカンの糖鎖合成異常の関連を検討する目的で、148例のニューロパチー症例についてコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)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) 遺伝子の解析を行った。その結果、23例にアミノ酸置換を伴う一塩基変異がみられ、うち14例は著明な酵素活性の低下がみられた。一方132例の疾患対照では10例にアミノ酸置換を伴う一塩基変異がみられ、6例では著明な酵素活性の低下がみられた。これらの変異のうち、2部位の変異はニューロパチーにのみ認められた。CSPGの糖鎖合成不全とニューロパチーの病態との関連が示唆された。

A. 研究目的

プロテオグリカン(PG)は長大な糖鎖であるグリコサミノグリカン(GAG)とコアタンパク質からなる分子であり、神経系組織の細胞外マトリックスの主成分である。近年、PGのひとつであるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)が中枢神経損傷後の軸索再生阻害に関与することが示され、治療のための分子標的として注目されている。一方で、PGは神経系組織に必須の土壌を提供するものでもある。したがってプロテオグリカンはニューロパチーの病態や治療による回復過程に大きく影響すると考えられるが、従来ほとんど検討されてこなかった。

本研究では、ニューロパチーの病態とCSPGの糖鎖合成酵素遺伝子の異常の関連を解明することを目的として、CSPGの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)にとくに焦点を当てて検討した。

B. 研究方法

当院並びに共同研究施設を受診したニューロパチー症例148例、疾患対照132例について検討した。

遺伝子解析の同意を得た患者からへパリン採血を行い、DNAの精製を行った。

ChGn-1遺伝子の7つのエクソンについてダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究は厚生労働省ヒト遺伝子解析研究に関する倫理指針に準拠し、近畿大学医学部倫理委員会において承認を受けた。遺伝子解析については、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。

C. 研究結果

ニューロパチー148例中23例において、ChGn-1遺伝子にアミノ酸置換をきたす一塩基変異をみとめ、そのうち14例の一塩基置換は著明な酵素活性の低下を伴っていた。一方で、疾患対照132例中10例にもアミノ酸置換をきたす一塩基置換を認め、そのうち6例では著明な酵素活性の低下もみられた。酵素活性著明低下をきたす一塩基置換のうちニューロパチー患者2例にみられたもの（各例1か所ずつ）は疾患対照にはみられなかった。残りの12例にみられたもの（上記と異なる1か所）は、疾患対照の6例にもみられた。

ChGn-1酵素活性の著明低下をきたす一塩基置換をもつニューロパチー症例は、Guillain-Barré症候群1例、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー3例、CMT1例、原因不明のニューロパチー9例であった。一方疾患対照では、パーキンソン病が2例、多発性硬化症、てんかん、辺縁系脳炎、原因不明の白質脳症1例であった。

D. 考察

ニューロパチーの14例のChGn-1遺伝子に3か所の酵素活性低下を伴う一塩基置換を見出した。そのうち1か所は疾患対照にもみられたが、2か所はニューロパチーにのみみられた。

今回見出されたChGn-1の遺伝子変異はheterozygote変異であることから、体内における糖転移酵素活性は低下しているものの残存していると考えられる。また、変異

のみられた症例の臨床病型も多様である。したがって、今回の解析で見出された変異は、直ちにニューロパチーを引き起こすものである可能性は少ない。しかしminor traumaにさらされやすい末梢神経においては、今回見出されたような糖鎖合成系の異常が存在すると、傷害からの修復や再生が十分にできなくなる可能性があり、病態への関与も考えられる。今後症例数を増やしてさらに詳細な解析を行う必要がある。

E. 結論

コンドロイチン硫酸の糖鎖合成不全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:

- 1) Saigoh K, Izumikawa T, Koike T, Shimizu J, Kitagawa H, Kusunoki S. *Chondroitin beta-1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (ChGn-1) missense mutations are associated with neuropathies*. J Hum Genet, in press.
- 2) Kaida K, Kusunoki S. Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: Mini-review. J Neuroimmunol, 2010; 223: 5-12.

3) Kusunoki S, Kaida K. Antibodies against ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and related disorders. *J Neurochem*, 2011; 116: 828-832

4) 楠 進。CIDP と抗ガングリオシド抗体。*神経内科* 72: 284-289, 2010

2. 学会発表:

1) Kusunoki S. Gangliosides and ganglioside complexes as targets for Guillain-Barré syndrome. The Fourth ISN Special Neurochemistry Conference "Membrane Domains in CNS Physiology and Pathology", Erice, Italy, May 22-26, 2010

2) Kusunoki S, Aomatsu H, Morise J, Oka S. Anti-phosphacan antibody in CIDP. Tenth International Congress of Neuroimmunology, Sitges, Spain, October 26-30, 2010, *J Neuroimmunol* 228: 179, 2010

3) 青松宏美、森瀬譲二、岡昌吾、楠 進。CIDP における phosphacan に対する血中抗体の検討。第 51 回日本神経学会総会 (2010 年 5 月 20 日～22 日、東京)

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（障害者対策総合研究事業）

（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 の病態進行に伴って発現が消失するケラタン硫酸は、少なくとも M2 ミクログリアに発現することが分かった。このデータは病態進行における脊髄ミクログリアの役割解明につながる。

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。

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。

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。

生後 10 週の雄 Lewis ラットに 100 μ g P2 ペプチドを complete Freund adjuvant と混合して皮下注射した。

C. 研究結果

前年度までに以下のことを解明していた。すなわち、P2 ペプチド感作後 8 日ごろから症状が出現し、16 日前後でピークとなりその後消退する。末梢神経炎が主体であるにも拘らず、EAN の脊髄で 150-250kDa を中心に KS の発現が消失した。KS 発現消失のタイムコースは、EAN の症状発現と合致した。次に、KS の発現を詳細に調べるために組織染色を行った。その結果、正常脊髄ではミクログリアの一部が KS を産生していることが分かった。

そこでさらに詳細にミクログリアの出現のプロファイル、ミクログリアの種類とKS発現の関係を調べた。特に、マクロファージ同様、ミクログリアもM1(炎症性)とM2(抗炎症性)に区別されると考えられることに注目した。

図1に示すように脊髄でのKSの発現はEANの症状が出る頃に消退し、症状回復後も発現の再現には時間を要する。

KS発現は症状のみならずミクログリア出現とも鏡像関係を示す

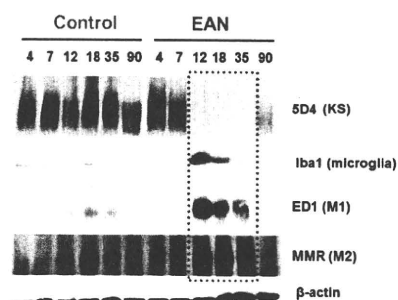


図1

これと鏡像を示すのがミクログリアの出現である。ミクログリアマーカーであるIba1の発現に留まらず、M1マクロファージ/ミクログリアマーカーED1およびM2マクロファージ/ミクログリアマーカーMMRの発現も、KSと鏡像関係を示す。

実際に免疫染色ではEANでミクログリアが顕著に増加するがKSの発現を見ることはない。対照的に正常ラットではミクログリアの数は少ないものの、その一部がKSを発現していることがわかる。

さらに興味深いのはM2マーカーMMR陽性のミクログリアのほぼすべてがIba1陽性であることである。

以上から、以下の2点が明らかになった。

- (1) EANに伴ってKS陰性のミクログリアが増加する。
- (2) 増加するミクログリアの少なくとも一部はM2ミクログリアが含まれる。

D. 考察

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を見出して報告した(Ito et al., J. Neurosci., 2010)。脊髄損傷に際して野生型マウスでは脊髄にKS発現を見るのだが、その主なリソースはミクログリアであった。さらにケラタン硫酸を消化する酵素を直接脊髄に投与と、ラットの脊髄損傷の症状改善が見られた(Imagama et al., 投稿中)。以上から炎症を伴う中枢神経系疾患においてはミクログリアのKS発現が神経機能回復に負に働く可能性を想定していた。

ところがEANの結果は予想に反して、KS発現のないミクログリアが増えるというものであった。しかも、増加するミクログリアには、抗炎症作用があるといわれるM2ミクログリアが含まれる。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産生は抑制されることが報告されている(Sebastian et al., 2000)。

以上を考え合わせると、(1)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、と考えることが可能である。もう一つの見方として、(2) KS(+)ミクログリアはむしろ細胞傷害性であり、EANの病態進行に反応性にKSの発現を消去する機構が働き、細胞保護的なKS(-)ミクログリアが出現して、病態改善に努めようとするとも考えることもできる。

上の2つの仮説に挑み、ニューロパチー治療の糸口を見出すために、今後、以下に取り組みたい。

(1) ラット EAN の更なる解析

生体内(脊髄)からミクログリアを単離してFACSによる詳細な解析を行う。CD11b, CD45, Iba1, 5D4, ED1, MMRなどのマーカーの発現プロファイルから、KSを発現するミクログリアの種類、KSを消化した際に起こるミクログリアのプロファイルの変化を調べる。

(2) ミクログリア由来 KSPG の同定

成体からミクログリアを単離して培養し、それから得られる150-250 kDaのKSPGを同定する。同定にはアフィニティークラムおよびLC/MS/MSを用いる。

(3) ミクログリア上のKSの機能

成体からミクログリアを単離して培養し、KSを消化した際に起こるミクログリアの反応をNOやサイトカインなどを中心に解析する。

以上のデータをもとに、KS(+)ミクログリアが細胞保護あるいは細胞傷害のいずれの機能を担うのかを判定し、治療への糸口を得る。

E. 結論

ギランバレー症候群のラットモデル EANの病態進行に伴って発現が消失するケラタン硫酸は、少なくともM2ミクログリアに発現することが分かった。このデータは病態進行における脊髄ミクログリアの役割解明につながる。

F. 健康危険情報:該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Ito, Z., Sakamoto, K., Imagama, S., Matsuyama, Y., Zhang, H., Hirano, K., Ando, K., Yamashita, T., Ishiguro, N., Kadomatsu, K. N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1-deficient Mice Show Better Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* 30, 5937-5947 (2010).

(2) Wakao, N., Imagama, S., Tauchi, R., Muramoto, A., Zhang, H., Natori, T., Takeshita, S., Ishiguro, N., Matsuyama, Y., Kadomatsu, K. Hyaluronan oligosaccharides promote functional recovery after spinal cord injury in rats. *Neurosci. Lett.* 488, 299-304 (2010).

(3) Hayashi M, Kadomatsu K, Ishiguro N. Keratan sulfate suppresses cartilage damage and ameliorates inflammation in an experimental mice arthritis model. *Biochem Biophys Res Commun.* 401, 463-8 (2010).

2. 学会発表

(1) Kadomatsu, K. Axonal regeneration and proteoglycans. 28th Naito Conference July 27-30, 2010, Shonan, Japan

(2) Kadomatsu, K. The role of proteoglycans in neural plasticity. The 65th west lake international symposium of Zhejiang University. November. 20, 2010. Hangzhou, China

(3) 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 2009.12.10 横浜

(4) 門松健治 プロテオグリカンと神経再生 Neuro2010 2010.9.2-4 神戸

(5) 門松健治 ケラタン硫酸と神経回路再編 BMB2010 2010.12.7-10 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

(1) 特願 2010-508216 神経因性疼痛の改善剤

(2) 特願 2010-283910 中枢神経疾患治療剤

ニューロパチーに関連する HNK-1 糖鎖抗原の調製とその糖鎖構造解析

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ことを目的としている。本年度は昨年度に引き続き HNK-1 糖鎖抗原をもつ糖タンパク質を調製し、研究代表者へ供給するとともに、phosphacan 上に発現する HNK-1 糖鎖の構造解析を行った。

A. 研究目的

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、これらは HNK-1 糖鎖抗原を含んでいる。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抗原の総称で、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*-アセチラクトサミン構造 Gal β 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。最近の研究によって HNK-1 糖鎖抗原は糖脂質、糖タンパク質、プロテオグリカン等様々な分子上に多様な形で存在することが明らかにされて来ている。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。本年度は昨年度に引き続き、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の検討するため、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、研究代表者に供給した。また昨年度の解析の結果、phosphacan 上に存在する HNK-1 糖鎖が患者血清中の抗体と反応性を示したことから、Phosphacan 上に発現する HNK-1 糖鎖の構造解析を行った。

B. 研究方法

1. HNK-1 糖鎖抗原を持つ糖タンパク質の調製

用いたタンパク質は myelin associated glycoprotein (MAG), α -dystroglycan (α -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である。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. Phosphacan 上の HNK-1 糖鎖の構造解析

HNK-1 糖鎖を発現した phosphacan を COS-1 細胞より調製し、コンドロイチナーゼ ABC 消化によりコンドロイチン硫酸鎖を除去し、次に N-glycosidase-F 消化により N 型糖鎖を除去した。その後、ヒドラジン分解により糖鎖を遊離させ、遊離した糖鎖を 2-アミノピリジンを用いて蛍光標識した。HPLC を用いたゲル濾過により過剰の試薬を除いた後、質量分析により HNK-1 糖鎖の構造解析を行った。

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、 α -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、 α -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確認された。また、phosphacan についてはコンドロイチナーゼ ABC 消化でも HNK-1 抗体との反応性が残存したことから、コンドロイチン硫酸鎖上ではなく、O-mannose 型糖鎖あるいはムチン型糖鎖上に存在すると考えられた。

2. Phosphacan 上の HNK-1 糖鎖の構造解析

COS-1 細胞から調製した phosphacan をあらかじめコンドロイチナーゼ ABC 消化と

N-glycosidase-F 消化により、コンドロイチン硫酸鎖と N 型糖鎖を除去した後、ヒドラジン分解によって O 型糖鎖を遊離させ還元末端をピリジルアミノ化し、液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS)を用いて構造解析を行った。その結果、phosphacan 上に存在する O 型糖鎖は主にムチン型 (GalNAc を介してタ

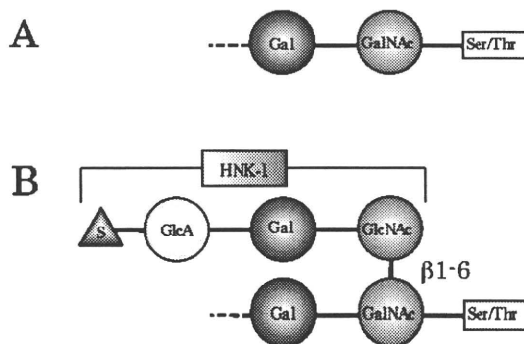


図 1

ンパク質の Ser または Thr と結合している糖鎖の総称 (図 1 A) であり、O-Mannose 型糖鎖は検出されなかった。HNK-1 糖鎖はタンパク質に結合している GalNAc に GlcNAc が β 1-6 で分岐したいわゆる core 2 構造上に存在することが明らかとなった (図 1B)。

D. 考察

ニューロパチー患者血清中に phosphacan 上の HNK-1 糖鎖との反応性を示す抗体の存在が観察されたことから、phosphacan 上の糖鎖構造解析を行った。その結果、HNK-1 糖鎖は O 型糖鎖の中でもムチン型の core 2 分岐上に発現していることが明らかとなった。N 型糖鎖のみを持つ MAG では検出されない患者血清中の抗体が phosphacan によって検出された理由は HNK-1 糖鎖の構造的な違いによるものであると考えられた。また、HNK-1 糖鎖を認識するマウスの単クローン抗体 6B4 抗体、Cat-315 抗体も MAG に比べ phosphacan 上の HNK-1 糖鎖に反応性が高いことから、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って反応性が異なるものが存在すると考えられた。

E. 結論

本研究により phosphacan 上の HNK-1 糖鎖の構造が明らかとなり、ニューロパチー患者血清中の抗 HNK-1 抗体がどのような糖鎖を認識しているのかについての知見が得られた。今後はさらに多様な HNK-1 糖鎖を様々なタンパク質に発現させることにより、今まで検出できなかったニューロパチー患者血清中の抗 HNK-1 抗体を検出できる系の構築を試みる。最終的には患者血清中に存在する抗 HNK-1 抗体の反応特異性と、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見出したいと考えている。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Kizuka Y and Oka S. •Regulation of HNK-1 (Human Natural Killer-1) Carbohydrate Expression: Multiple Control Mechanisms of Biosynthetic Enzyme Activity. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 22. 194-199 •(2010).

岡 昌吾 記憶学習に関与する糖鎖 臨床化学, 39(4), 37-38 (2010)

中川直樹, 森田一平, 岡 昌吾 HNK-1 糖鎖抗原と神経突起の形成 脳 2 1, 14 (1), 37-43 (2011)

2. 学会発表

岡昌吾, 森瀬譲二, 中川直樹, 竹内祐介, 森田一平 神経系における HNK-1 糖鎖機能

と発現調節機構

生理学研究所 糖鎖機能研究会 (2010年 7月岡崎 招待講演)

Oka S. Role of HNK-1 Glyco-Epitope in Spine Morphogenesis. The 28th Naito Conference on Glycan Expression and Regulation (2010年 7月湘南 招待講演)

Takeuchi Y, Morita I, and Oka S. Functional analysis of HNK-1 glyco-epitope expressed on a glutamate receptor subunit GluR2. International Carbohydrate Symposium (ICS2010) (2010年 8月幕張)

Yoshihara T, Sugihara K, Kizuka Y, Oka S. and Asano M. Learning/memory impairment and reduced expression of the HNK-1 carbohydrate in α -1,4-Galactosyltransferase-2-deficient mice. Neuroscience 2010 (2010年 11月 San Diego)

岡 昌吾 HNK-1 糖鎖によるグルタミン酸受容体細胞表面発現量の調節 第 33 回日本分子生物学会、第 84 回に本生化学大会合同大会 (2010年 12月神戸 招待講演)

河野 哲也、木塚 康彦、吉原 亨、浅野 雅秀、岡 昌吾 HNK-1 糖鎖の生合成過程における beta4-galactosyl transferase-II の役割 第 33 回日本分子生物学会、第 84 回に本生化学大会合同大会 (2010年 12月神戸)

森瀬 譲二、森田一平、岡 昌吾 神経細胞由来神経突起伸長因子の探索第 33 回日本分子生物学会、第 84 回に本生化学大会合同大会 (2010年 12月神戸)

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（障害者対策総合研究事業）

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種類見いだし、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考えた。昨年度は、ChGn-1 によりコンドロイチン硫酸鎖の本数が制御されること、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。本年度は、コンドロイチン硫酸鎖の本数の制御には、ChGn-1 のほかにコンドロイチン 4-O-硫酸基転移酵素-2 (C4ST-2) も関与していることを明らかにした。

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 (1)。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 (1)。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

一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

昨年度の研究で、ChGn-1 の発現量を変化させると 4 位が硫酸化されたコンドロイチン硫酸鎖の量が、ChGn-1 の発現量に応じて変化することが示唆されていた。そこで本年度は、ChGn-1 の機能発現における 4 位が硫酸化されたコンドロイチン硫酸鎖の関与を明らかにするために、マウス繊維芽細胞である L 細胞や 4 位の硫酸化に関わるコンドロイチン 4-O-硫酸基転移酵素-1 (C4ST-1) の発現が欠損している *sog9* 細胞を用いて、ChGn-1 および C4ST-2 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、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ろ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 の機能発現における 4 位が硫酸化されたコンドロイチン硫酸鎖の関与を調べた。まず、ChGn-1 を過剰発現する L 細胞や *sog9* 細胞 (C4ST-1 が

欠損) 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、L 細胞や *sog9* 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 L 細胞や *sog9* 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 L 細胞や *sog9* 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 L 細胞や *sog9* 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、L 細胞でも *sog9* 細胞においても、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 C4ST-1 の有無に関わらず、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、C4ST-1 のホモログである C4ST-2 を過剰発現する L 細胞を構築し、上記と同様の方法で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。さらに、C4ST-2の発現を抑制させたL細胞も上記と同様の方法で構築し、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。その結果、C4ST-2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。

さらに、ChGn-1やC4ST-2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L細胞やsog9細胞のコンドロイチン硫酸の鎖長と比較すると、ChGn-1やC4ST-2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やC4ST-2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(2)。

D. 考察

今回、コンドロイチン硫酸鎖の本数の制御には、C4ST-2も関与していることが明らかになった。したがって、ニューロパチーの症例の中には、ChGn-1ばかりでなくC4ST-2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症例も存在することが示唆された。そのため、C4ST-2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。さらに、C4ST-2はChGn-1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可能性も考えられる。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たC4ST-2やChGn-1のニューロパチー症例における検討および最近作成されたChGn-1のノックアウトマウス(3)を用いた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

ニューロパチーとの関連が疑われているコンドロイチン硫酸鎖の本数の減少には、ChGn-1ばかりでなくC4ST-2も関与していることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表:

1. Saigoh, K., Izumikawa, T., Koike, T., Shimizu, J., Kitagawa, H., and Kusunoki, S. Chondroitin beta-1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (ChGn-1) missense mutations are associated with neuropathies. *J. Hum. Genet.*, in press (2011).

2. Izumikawa, T., Okuura, Y., Koike, T., Sakoda, N., and Kitagawa, H. Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 regulates the chain length of chondroitin sulfate in cooperation with chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-2. *Biochem. J.*, 434 (2), 321-331 (2011).
3. Watanabe, Y., Takeuchi, K., Higa-Onaga, S., Tsujita, M., Abe, M., Natsume R., Li, M., Furuichi, T., Saeki, M., Izumikawa, T., Hasegawa, A., Yokoyama, M., Ikegawa, S., Sakimura, K., Amizuka, N., Kitagawa, H., and Igarashi, M. Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 is required for normal cartilage development. *Biochem. J.*, 432 (1), 47-55 (2010).

2. 学会発表:

1. H. Kitagawa: Role of chondroitin sulfate in development: International Anatomical Sciences and Cell Biology Conference 2010, Singapore, May 26-29.2010 (Invited speaker).

2. H. Kitagawa: Importance of chondroitin sulfate chains during development: The 28th Naito Conference, Kanagawa, Japan, July 27-30, 2010 (Invited speaker).
3. 北川裕之。「コンドロイチン硫酸鎖の硫酸化パターンによる視覚野「臨界期」制御」第33回日本分子生物学会年会／第83回日本生化学会大会（2010年12月7日ー10日、神戸）（ワークショップ講演）
4. 北川裕之。「コンドロイチン硫酸鎖の硫酸化コードによる神経機能の制御」第2回新潟プロテオグリカン研究会（2011年2月4日、新潟）（招待講演）

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