

201122013A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 楠 進

平成24年(2012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. 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の解明	7
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	10
門 松 健 治	
3. ニューロパチーに関連する HNK-1 糖鎖抗原の構造的多様性と その発現制御	14
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	18
北 川 裕 之	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
---------------------	----

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

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) 免疫性神経疾患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二種類のノックアウトマウスについての実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を用いた解析を行った。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 糖鎖は脱髄性ニューロパチーにおける標的として知られるが、プロテオグリカンの橋渡し構造に存在するHNK-1糖鎖についての解析を行った。4)、CS鎖の合成制御機構について解析した。その結果、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)の硫酸基に関わるC6ST1のノックアウトマウスでは、EAEがより重症化した。CSPGの糖鎖構造が正常であることは、中枢神経内での病原性リンパ球による攻撃に対して防衛的に働いている可能性が示唆された。一方、KSのノックアウトマウスではEAEが軽症化した。プロテオグリカンの糖鎖の修飾が新たな治療標的となる可能性が示された。EANの解析では、正常脊髄において細胞保護性ミクログリアに存在したKSPGが発症に伴って消失することがわかり、KSPGがEANの病態に関与していると考えられた。HNK-1を作るHNK-1STがプロテオグリカンとタンパク質を結ぶ橋渡し領域の末端グルクロン酸を硫酸化してHNK-1糖鎖抗原を合成することがわかった。ニューロパチーとの関連が考えられるCS鎖の本数の制御には、ChGn-1のほかにC4ST-2も関与するが、そのC4ST-2による制御の詳細が明らかとなった。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与していることを示しており、今後さらに詳細な検討が必要と考えられる。

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

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、ニューロパチーの病態におけるプロテオグリカンの役割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の構築につなげることを目的とする。

A. 研究目的

プロテオグリカンはニューロパチーの

楠らは、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) を用いて、神経免疫疾患の病態におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) およびケラタン硫酸プロテオグリカン (KSPG) の関与を検証した。

門松らは、昨年度に引き続き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。

HNK-1 はヒトの脱髄性ニューロパチーの標的エピトープとして知られる。岡らは、プロテオグリカンの橋渡し構造に存在する従来とは異なる HNK-1 糖鎖抗原に関して解析を行い、その発現調節に関わる酵素を明らかにした。

北川らは、ヒトで酵素活性の消失を伴う変異が明らかとなっている合成酵素である ChGn-1 による CS 糖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 CSPG の機能の解明を試みた。

B. 研究方法

CS の解析には 6 位硫酸化に必要な C6ST1 を欠損したマウス (C6ST1-KO) と C6ST1 を強制発現させたマウス (C6ST1-Tg) を、KS の解析には脳での KS 生合成に必要な GlcNAc 6-1 遺伝子を欠損したマウス (KS-KO) を用いた。MOG(35-55) ペプチドを抗原として用いて EAE を誘導し、臨床症状を評価した。MOG 特異的リンパ球の recall response、

48 時間目の培養上清の各種サイトカインの ELISA による測定、Adptive transfer EAE (AT-EAE) なども検討した。

Lewis ラットに P2 ペプチドを complete Freund adjuvant と混合して接種し、EAN を作成した。昨年までの成果より、脊髄における KSPG の発現が変化することがわかっているため、脊髄サンプルを経時的に採取し、KS の発現やミクログリアの活性化を中心に Western blot、免疫組織染色、FACS およびサイトカインの定量を行った。さらにミクログリア上の KSPG を同定するためにアフィニティークロマトグラフィーと質量分析を行った。

プロテオグリカンの橋渡し構造に存在する HNK-1 糖鎖抗原の解析にはトロンボモジュリンを用いた。可溶型のトロンボモジュリンを HNK-1ST 存在下あるいは非存在下で CHO 細胞にトランスフェクションし、培養上清中に分泌されたトロンボモジュリンをウエスタンブロットにより解析した。さらに、精製して抗凝固活性を測定し、受容体基質としてコンドロイチン硫酸合成酵素活性を測定した。

C4ST-2 による CS 鎖の量の制御機構を明らかにするために、GalNAc-結合領域構造を基質として、コンドロイチン重合化酵素を酵素源に用いて、CS 鎖の重合化を検討した。また、マウスの繊維芽細胞株 (L 細胞) および、その変異株で C4ST-1 の発現が欠失している sog9 細胞に ChGn-1 を過剰発現させ、細胞が産生する CS 鎖の

総量を、コンドロイチナーゼ ABC で CS 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 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)

実験動物の取り扱い、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

C6ST1-KO での active-EAE の症状は WT に比べてより重篤であった。AT-EAE でも同様であり、recall response では差がなかったことから、C6ST1 は中枢神経内での病原性リンパ球による神経細胞への攻撃に対して防御的に働いている可能性が示唆された。しかし C6ST1 を強制発現させた C6ST-Tg では、EAE スコアは WT と有意差を認めなかった。

一方、KS-KO では WT と比べて EAE は軽症であり、Recall response でも KS-KO 由来のリンパ球は WT 由来のリンパ球よりも細胞増殖反応が軽度であった。

EAN モデルより得たサンプルについての Western blot の結果、未処置の脊髄では 150-250 kDa の KSPG の発現が確認されたが麻痺発症後には消失した。CSPG については発現の変化はなかった。経時的には、KSPG の消失は遅くとも P2 ペプチド注射後 12 日 (神経麻痺

の早期) には起こり、90 日には回復の兆候が見られた。組織染色では、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り、その発現が EAN では消失することがわかった。ミクログリアは EAN に伴って特に後角での増加が顕著であった。一方、KS 陽性ミクログリアは前角優位であったが、後角にも存在し、両領域とも EAN に伴って消失した。CD11b、CD45 による FACS 解析の結果、EAN に伴って増加する細胞のほとんどはミクログリアであることが分かった。病態進行に伴うサイトカインの産生量に検討では、炎症性サイトカインの上昇と抗炎症性サイトカインの減少がみられた。

細胞保護性 (M2) ミクログリアのマーカーである MMR と細胞傷害性 (M1) ミクログリアのマーカーである CD68 を用いて活性化ミクログリアと KS との関係調べたところ、正常脊髄のミクログリアは MMR と KS を同時に発現しているが CD68 陽性ミクログリアは正常脊髄にはみられなかった。EAN の病態が進むと KS の発現は消失したが、MMR 陽性ミクログリア、CD68 陽性ミクログリアともに増加した。さらにミクログリア上の KSPG を同定するために抗 KS 抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行ったところ、150-250 kDa の KSPG が濃縮され、質量分析にかけて数個の候補が得られた。

トロンボモジュリンは HNK-1ST によ

り硫酸化され、HNK-1 抗体と反応するようになり、非プロテオグリカン型として合成された。CS 鎖が結合する橋渡し領域四糖構造 (GlcA-Gal-Gal-Xyl) の末端グルクロン酸が硫酸化されたトロンボモジュリンは、抗凝固活性が有意に低下した。またこのようなトロンボモジュリンは CS 鎖生合成酵素 (ChSy/ChPF) の基質とならなかったことから、橋渡し構造の硫酸化は CS 鎖生合成において阻害的に働くことが示された。

ChGn-1 により合成される GalNAc-結合領域を基質に用い、CS 鎖の重合化を検討したが、CS 鎖の重合化は全く起こらなかった。一方、GalNAc(4-O-sulfate)-結合領域を基質に用い、CS 鎖の重合化を検討した結果、CS 鎖の重合化が促進された。また C4ST-2 が GalNAc-結合領域に効率よく硫酸基を転移することがわかった。L 細胞および sog9 細胞に ChGn-1 を過剰発現させた細胞では、野生型の L 細胞および sog9 細胞と比較し、CS の総量が増加した。また親株の L 細胞および sog9 細胞の CS 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かった。GalNAc-結合領域に効率よく硫酸基を転移した C4ST-2 を L 細胞で過剰発現およびノックダウンした細胞を構築し、細胞が産生した CS 鎖の総量および鎖長を解析した。その結果、C4ST-2 の発現量とコンドロイチン硫酸鎖の本数および総量が相関していることが明らかとなった。

D. 考察

CS は EAE effector phase において病態を抑制する役割を果たしていることが示唆された。また C6ST1 を正常よりも増やしても EAE の改善はなく、正常構造 CS が EAE の制御に重要と考えられた。脳損傷モデルでは CS は創傷治癒を遅延させることと合わせて考察すると、CS は中枢神経内において細胞や物質が無秩序に拡散するのを抑制しているものと推測された。一方、KS は EAE 病態に促進的に働いていた。MOG 特異的リンパ球の recall response おいて、KS はリンパ球の活性化に影響して病態促進的に機能していることが示唆された。PG のコントロールにより EAE を治療することができる可能性があり、神経免疫疾患の新たな治療戦略となることが期待される。

脊髄損傷では、アストロサイトの活性化によって分泌型 KSPG が誘導され、それが神経突起伸長を阻害すると考えられている。一方、ミクログリア上の KSPG は、病態を抑制する方向に働く可能性があり、EAN でのミクログリア上の KSPG の消失が、病態の増悪に伴うことと関連する可能性がある。今回ミクログリア上の KSPG の同定の手掛かりが得られたので、さらに詳細な検討を行う予定である。

HNK-1ST がプロテオグリカンとタンパク質を結ぶ橋渡し領域四糖構造 (GlcA-Gal-Gal-Xyl) の末端グルクロン酸を硫酸化し、HNK-1 糖鎖抗原を合成することが明らかとなった。また HNK-1ST は

生体内で、プロテオグリカン上の糖鎖の発現調節に関与している可能性が示された。

C4ST-2 も CS 鎖の本数の制御に関与していることが明らかになった。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、今後のヒト神経疾患での検討が必要である。

E. 結論

CS および KS は神経免疫疾患の病態に関与しており、新たな治療ターゲットとして期待される。

EAN の病態進行と脊髄ミクログリアの KSPG の発現の間に強い逆相関があることが明らかになり、ミクログリア上の KSPG が EAN の病態において機能分子である可能性が示された。

従来の HNK-1 糖鎖と異なる構造の HNK-1 糖鎖抗原の生合成酵素が明らかになった。

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 も関与しており、その二つの酵素は共同して作用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

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の解明

研究代表者 楠 進 近畿大学医学部教授

研究要旨

神経免疫疾患におけるプロテオグリカン（PG）の役割について、多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を用いて検証した。ケラタン硫酸プロテオグリカン（KS）とコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CS）はいずれも細胞表面や細胞マトリックスに存在し、中枢神経系においては無秩序なシナプス形成を防ぐための再生阻害因子として機能している。このため脳損傷動物モデルを用いた実験では KS や CS は神経再生を阻害する方向に働くことが示されている。CS の解析には 6 位硫酸化に必要な C6ST1 を欠損したマウス（C6ST1-KO）、KS の解析には脳での KS 生合成に必要な GlcNAc 6-1 遺伝子を欠損したマウス（KS-KO）を用いた。C6ST1-KO では野生型マウス（WT）に比べて EAE 症状が悪化したのに対して、KS-KO では WT に比べて軽症であった。C6ST1 は末梢での抗原特異 T リンパ球の活性化には影響がなく、中枢神経内での神経細胞への傷害に保護的に働いていることが示唆された。また C6ST1 を強制発現させたマウスでは EAE 症状に変化がなかったことから、6 位硫酸化された CS が一定以上存在すれば EAE に抑制的に機能すると推測された。一方 KS は末梢での抗原特異リンパ球の活性化に促進的に関与しており、KS-KO で EAE 症状が軽症化した理由の一つと考えられた。このように、PG の種類によっては EAE の病態に促進的に働くものと、抑制的に働くものがあることが明らかになった。PG の調節は、神経免疫疾患の新規治療法となる可能性が考えられた。

A. 研究目的

プロテオグリカン（PG）は保水性の高い長い糖鎖がコア蛋白質に結合した複合体で二糖繰り返し構造となっており、糖鎖の種類によってコンドロイチン硫酸（CS）、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸（KS）などに分類される。PG は中枢神経系では細胞外マトリックスの主要構成成分として豊富に存在している。中枢神経における PG は無秩序なシナプス形成を防ぐための再生阻害因子として機能しており、脳損傷動物モデルを用い

た実験では CS や KS が存在すると神経再生が阻害される。しかし神経免疫疾患での PG の病態への関与は不明である。

本研究では多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を用いて神経免疫疾患における CS および KS の関与を検証した。

B. 研究方法

CS の解析には 6 位硫酸化に必要な C6ST1 を欠損したマウス（C6ST1-KO）と

C6ST1 を強制発現させたマウス (C6ST-Tg) を、KS の解析には脳での KS 生合成に必要な GlcNAc 6-1 遺伝子を欠損したマウス (KS-KO) を用いた。いずれも B6 バックグラウンドであり、野生型 B6 マウス (WT) をコントロールとした。Active immunization EAE (Active-EAE) は MOG(35-55)ペプチドを用いて誘導した。MOG 特異的リンパ球の recall response の評価は 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 ^3H 取り込みにて評価した。Adptive transfer EAE (AT-EAE) は in vitro で培養した MOG 反応性 T 細胞を naive マウスに経静脈投与した。

(倫理面への配慮)

近畿大学の実験動物取り扱い規約を遵守して実験を行った。

C. 研究結果

Active-EAE では C6ST1-KO は WT に比べて症状が悪化した。AT-EAE でも同様の結果であり、Recall response では差がなかったことから、C6ST1 は末梢での抗原特異 T リンパ球の活性化には関与しておらず、中枢神経内において病原性リンパ球が神経細胞に対する攻撃を防御的に働いている可能性が示唆された。しかし C6ST1 を強制発現させた C6ST-Tg では EAE スコアは WT よりも軽症化することはなく有意差を認めなかった。

一方、KS-KO では WT と比べて EAE 症

状は軽症であった。Recall response でも KS-KO 由来のリンパ球は WT 由来のリンパ球よりも細胞増殖反応は軽度であった。つまり KS は EAE の induction phase において病態促進的に働いていることが示唆された。

D. 考察

CS は EAE effector phase において中枢神経内での神経組織の感受性に何らかの役割を果たしていることが示唆された。また C6ST1 を正常よりも増やしても EAE は改善しなかったことから、CS は 4 位と 6 位のバランスが重要であり、正常構造 CS が EAE を悪化させないために重要であると考えられた。脳損傷モデルでは CS は創傷治癒を遅延させることと合わせて考察すると、CS は中枢神経内において細胞や物質が無秩序に拡散するのを抑制しているものと推測される。つまり、創傷治癒の場面では神経細胞が早く伸展することを抑制し、EAE では病原性リンパ球が中枢神経内に浸潤し拡散するのを妨げている可能性がある。

一方、KS は CS とは逆に EAE 病態に促進的に関与していた。MOG 特異的リンパ球の recall response は CS が関与していないのに対して、KS はリンパ球の活性化に影響していたことから、KS は EAE induction phase において病態促進的に機能していることが示唆された。

PG は種類によって EAE に対して促進的にも抑制的にも働くことが明らかになった。PG の合成や生理活性を修飾することで EAE を治療することができる可能性があり、

多発性硬化症をはじめとする神経免疫疾患の新たな治療戦略として期待される。

E. 結論

CSおよびKSはEAEの病態に関与しており新たな治療ターゲットとして期待される。

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* 2011 56: 143-146
- 2) Mauri L, Casellato R, Ciampa MG, Uekusa Y, Kato K, Kaida K, Motoyama M, Kusunoki S, Sonnino S. Anti-GM1/GD1a complex antibodies in GBS sera specifically recognize the hybrid dimer of GM1-GD1a. *Glycobiology* 2012; 22: 352-360.
- 3) Kuwahara M, Suzuki S, Takada K, Kusunoki S. Antibodies to LM1 and LM1-containing ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol* 2011; 239: 87-90.

4) 上田昌美、楠 進. 免疫性末梢神経障害の診断・治療と最近の話題。 *Brain and Nerve* 63: 549-555, 2011

2. 学会発表:

- 1) 楠 進. 自己抗体からみたニューロパチー. 第 52 回日本神経学会学術大会 (2011年5月18日~20日、名古屋)
- 2) 宮本勝一、田中紀子、門松健治、楠 進. 実験的自己免疫性脳脊髄炎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役割. 第 52 回日本神経学会学術大会 (2011年5月18日~20日、名古屋)
- 3) 宮本勝一、田中紀子、門松健治、北川裕之、楠 進. 実験的自己免疫性脳脊髄炎におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン. 第23回日本神経免疫学会学術大会 (2011年9月15日~17日、東京)
- 4) 楠 進. 免疫性末梢神経障害と糖鎖に対する抗体. 第 84 回日本生化学会大会 (2011年9月21日~24日、京都)
- 5) Kusunoki S, Suzuki S, Ueda M, Kuwahara M. Clinical features associated with fine specificity of IgG anti-GQ1b antibodies. 136th Annual Meeting of the American Neurological Association, San Diego, CA, USA, September 25-27, 2011.

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

研究要旨

ギランバレー症候群のラットモデル EAN (experimental autoimmune neuritis) 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 の病態進行と脊髄のケラタン硫酸プロテオグリカン (KSPG) の発現の間に強い逆相関があることが明らかになった。すなわち、病態進行に伴って KSPG の発現が消失した。さらにこの KSPG はミクログリアに発現することを見出した。KSPG の発現の消褪に伴ってミクログリアの活性化マーカーの上昇がみられた。今回の発見はニューロパチーの病態解明に新たな一石を投じる。今後 KSPG のミクログリアでの機能を明らかにしたい。

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。中でも KSPG に注目し、病態の発生・進行との関わりを軸にニューロパチーでの KSPG の役割を明らかにしたい。

脊髄サンプルを経時的に採取し、KS の発現やミクログリアの活性化を中心に Western blot、免疫組織染色、FACS および サイトカインの定量を行った。さらにミクログリア上の KSPG を同定するためにアフィニティークロマトグラフィーと質量分析を行った。

(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

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ラット EAN はギランバレー症候群のモデルとして定着している。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。このモデルでは胸髄、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。

C. 研究結果

EAN モデルは予想通りの表現型を示した。すなわち、後肢の運動麻痺を指標にすると P2 注射から 8~25 日の間に麻痺症状が出現した。麻痺のピークは 15-16 日であり、25 日以降では麻痺は消失した。

Western blot の結果、未処置の脊髄では 150-250 kDa の KSPG の発現が確認された。ところがその発現は、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）で消失した。コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）については発現の変化はなかった。

経時的には、KSPGの消失は遅くともP2ペプチド注射後12日（神経麻痺の早期）には起こり、90日には回復の兆候が見られた。

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がわかった。その発現がEANでは消失した。そこでミクログリアの動態を見ることにした。ミクログリアは脊髄前角、後角ともに存在するがEANに伴って両領域で増加した。特に後角での増加が顕著であった。一方、KS陽性ミクログリアは前角優位であったが、後角にも存在し、両領域ともEANに伴って消失した。CD11b、CD45によるFACS解析の結果、EANに伴って増加する細胞のほとんどはミクログリアであり、マクロファージとは異なることが分かった。次に病態進行に伴うサイトカインの産生量を検討した。その結果、炎症性サイトカインの上昇と抗炎症性サイトカインの減少が分かった。

現在受け入れられつつあるコンセプトとして、活性化ミクログリアは細胞傷害性（M1）と細胞保護性（M2）の2種類に大まかに分類されるというものがある。M2ミクログリアのマーカーであるMMRとM1ミクログリアのマーカーであるCD68を用いてKSとの関係を調べた。そ

の結果、正常脊髄のミクログリアはMMRとKSを同時に発現していることが分かった。一方、CD68陽性ミクログリアは正常脊髄には見ることはできなかった。EANの病態が進むとKSの発現は消失するのだが、MMR陽性ミクログリア、CD68陽性ミクログリアともに増加した。ミクログリアのマーカーであるIba1とMMRあるいはCD68はほとんど重なることからEANでのミクログリアはMMR/CD68ともに陽性である可能性が高い。

さらにミクログリア上のKSPGを同定するために抗KS抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行い、150-250 kDaのKSPGを濃縮することに成功した。そのサンプルを質量分析にかけて数個の候補を得た。

D. 考察

脊髄損傷においてはミクログリアでKS発現の誘導が起こることが報告されている（Jones et al., 2002）。我々も、マウスおよびラットモデルでそれを確認している（Ito et al., 2010; Imagama et al., 2011）。一方で今回のEANでは傷害に伴ってKS発現はむしろ消失した。この一見相反するデータをどのように解釈したらよいのだろうか？

KS分解酵素を使うと脊髄損傷が軽くなることから、我々はKSが軸索再生の阻害因子として働くと報告した（Imagama et al., 2011）。ここで考慮すべきはアストロサイトとミクログリアの二つのKSのソ

ースである。実際に *in vitro* ではアストロサイトの活性化によって分泌型 KSPG が誘導される。この分泌型 KSPG によって神経突起伸長は阻害される。組織免疫染色でも細胞間にも KS の反応性が見られる。つまり、分泌型 KSPG が軸索再生阻害の主役である可能性は高い。この KS が KS 分解酵素によって分解されたことが脊髄損傷を軽くした理由だと考えることができる。では、ミクログリアの KSPG はどうなのか？

脊髄損傷でのミクログリア活性化は M1→M2→M1/M2 と経時的に変化することが一般に受け入れられている。一つの可能性として、KSPG は M2 ミクログリアの上に発現し、細胞保護性を担保する機能分子であるとする仮説が成り立つ。あるいは M2→M1/M2 のトランスフォーム (M1 形質の獲得) を抑制する機能を担う可能性もある。さらには M1 機能そのものを抑えるという仮説も成り立つ。もしこれらの仮説のうちの一つが正しければ EAN でミクログリアの KS 発現が消失し病状が悪化する現象はよく説明できる。EAN では M2→M1/M2 の変化が起こっているのかもしれない。

上の仮説の検証を含めてニューロパチーの病態解明を進めるにはミクログリア上の KSPG の同定が重要である。幸い、本研究でその候補を幾つか絞り込むことに成功した。今後はこの分子を核にミクログリア活性化と EAN 病態進行の関係について研究を進めたい。

E. 結論

EAN の病態進行と脊髄ミクログリアの KSPG の発現の間に強い逆相関があることが明らかになった。ミクログリア上の KSPG は EAN の病態において機能分子である可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表:

1. Tauchi R., Imagama S., Natori T., Ohgomori T., Muramoto A., Shinjo R., Matsuyama Y., Ishiguro N., Kadomatsu K. The endogenous proteoglycan-degrading enzyme ADAMTS-4 promotes functional recovery after spinal cord injury. **J. Neuroinflamm.** In press.
2. Sakai, K., Yamamoto, A., Matsubara, K., Nakamura, S., Naruse, M., Mari Yamagata, M., Sakamoto, K., Tauchi, R., Wakao, N., Imagama, S., Hibi, H., Kadomatsu, K., Ishiguro, N., Ueda, M. Multifaceted neuro-regenerative activities of human dental pulp stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord. **J. Clin. Invest.**, 122(1):80-90, 2012
3. Sakamoto K, Bu G, Chen S, Takei Y, Hibi K, Kodera Y, McCormick LM, Nakao A, Noda M, Muramatsu T, Kadomatsu K. The premature ligand-receptor interaction during biosynthesis limits the production

- of growth factor midkine and its receptor LDL receptor-related protein 1(LRP1). **J Biol Chem.** 286, 8405-8413 (2011).
4. Kato, N., Kosugi, T., Sato, W., Ishimoto, T., Hiroshi Kojima, H., Sato, Y., Sakamoto, K., Maruyama, S., Yukio Yuzawa, Y., Matsuo, S., Kadomatsu, K. Basigin/CD147 promotes renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. **Am. J. Pathol.** 178, 572-529 (2011)
 5. Huang, P., Kishida, S., Cao, D., Murakami-Tonami, Y., Mu, P., Nakaguro, M., Koide, N., Takeuchi, I., Akina Onishi, A., Kadomatsu, K. The neuronal differentiation factor NeuroD1 downregulates the neuronal repellent factor Slit2 expression and promotes cell motility and tumor formation of neuroblastoma. **Cancer Res.** 71(8):2938-2948 (2011)
 6. Imagama, S., Sakamoto, K., Tauchi, R., Shinjo, R., Ohgomori, T., Ito, Z., Zhang, H., Nishida, Y., Asami, N., Takeshita, S., Sugiura, N., Watanabe, H., Yamashita, T., Ishiguro, N., Matsuyama, Y., Kadomatsu, K. Keratan sulfate restricts neural plasticity after spinal cord injury. **J. Neurosci.** 31(47):17091-17102 (2011)
2. 学会発表:
1. Kadomatsu, K. Proteoglycans and neuronal network reconstruction. 7th international conference on proteoglycans. October 16-20, 2011, Sydney, Australia
 2. Kadomatsu, K. Proteoglycans and neuronal network reconstruction. Glycobiology Japan-Netherland joint seminar 2011. October 9-10, 2011. Nagoya Japan
 3. 門松健治 糖鎖による神経回路再編の制御 第8回日本病理学会カンファレンス 2011.8.5松本
 4. 門松健治 神経変性疾患とケラタン硫酸 第19回プロテオグリカンフォーラム 2012.2.11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

ニューロパチーに関連する HNK-1 糖鎖抗原の構造的多様性とその発現制御

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 N 型糖鎖や O 型糖鎖上に HNK-1 糖鎖抗原をもつ糖タンパク質を調製し、研究代表者へ供給した。さらに、プロテオグリカンの橋渡し構造に存在する従来とは異なる HNK-1 糖鎖抗原についての解析を行い、その調節機構と役割を明らかにするとともに、その供給体制を確立した。

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-アセチルラクタサミン構造 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きている。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

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 N 型糖鎖や O 型糖鎖上に 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、プロテオグリカンの橋渡し構造に存在する従来とは異なる HNK-1 糖鎖抗原に関して解析を行い、その発現調節に関わる酵素を明らかにした。

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. プロテオグリカンの橋渡し構造に存在する HNK-1 糖鎖抗原の解析

プロテオグリカンの橋渡し構造に存在する HNK-1 糖鎖抗原の解析にはトロンボモジュリンを用いた。可溶型のトロンボモジュリンを HNK-1ST 存在下あるいは非存在下で CHO 細胞にトランスフェクションし、培養上清中に分泌されたトロンボモジュリンをウエスタンブロットにより解析した。さらに、得られたトロンボモジュリンを精製し、抗凝固活性を測定した。また、精製されたトロンボモジュリンを受容体基質としてコンドロイチン硫酸合成酵素活性を測定した。

C. 研究結果

1. HNK-1 糖鎖抗原を持つ糖タンパク質の調製

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、それぞれのタンパク質上に N 型糖鎖、0-mannose 型糖鎖、ムチン型糖鎖として HNK-1 糖鎖が付加されていることを確認後、研究代表者へ送付した。

2. プロテオグリカンの橋渡し構造に存在する HNK-1 糖鎖抗原の解析

トロンボモジュリンは血管内皮細胞の細胞膜上に発現するプロテオグリカンで、抗凝固性因子として重要な役割を有することが知られている。トロンボモジュリンにはコンドロイチン硫酸鎖をもつプロテオグリカン型と非プロテオグリカン型が存在し、尿中に検出されるトロンボモジュリンには図 1 に示すような硫酸化された非プロテオグリカン型のトロンボモジュリンが検出されるこ

とが知られていた。そこで、今回この糖鎖の硫酸化に HNK-1 糖鎖の合成酵素である HNK-1ST が関与するかどうかについて検討を行った。可溶型のトロンボモジュリンを HNK-1ST 存在下あるいは非存在下で CHO 細胞にトランスフェクションし、培養上清中に分泌されたトロンボモジュリンを HNK-1 抗体によるウエスタンブロットで解析した。その結果、トロンボモジュリンは HNK-1ST によって硫酸化され、HNK-1 抗体と反応性を獲得し、非プロテオグリカン型として合成されることが明らかとなった。さらに、図 1 のようにコンドロイチン硫酸鎖が結合する橋渡し領域四糖構造 (GlcA-Gal-Gal-Xyl) の末端グルクロン酸が硫酸化された糖鎖を持つ

HNK-1ST によるコンドロイチン硫酸鎖の抑制

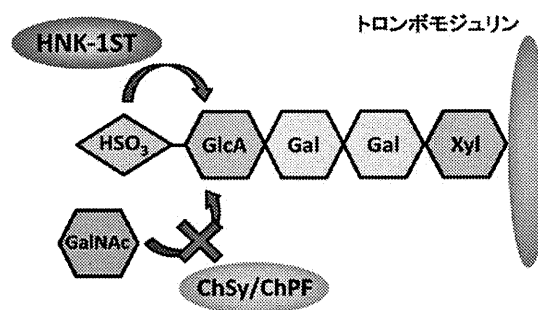


図 1

トロンボモジュリンは、抗凝固活性が有意に低下することが明らかとなった。またこの硫酸化四糖をもつトロンボモジュリンはコンドロイチン硫酸鎖生成酵素 (ChSy/ChPF) の基質とならなかったことから、橋渡し構造の硫酸化はコンドロイチン硫酸鎖生成において阻害的に働くことが示された。

D. 考察

HNK-1 糖鎖合成に関与する酵素のうちグルクロン酸転移酵素は脳等の比較的限局された場所に発現するが、HNK-1ST は生体の多くの場所で発現することが知られていた。このことは HNK-1ST が従来の HNK-1 糖鎖合成以外の機能をもつことを示唆していた

が、その詳細は不明であった。今回、**HNK-1ST**がプロテオグリカンとタンパク質を結ぶ橋渡し領域四糖構造 (GlcA-Gal-Gal-Xyl)の末端グルクロン酸を硫酸化し、従来のHNK-1糖鎖と異なる構造のHNK-1糖鎖抗原 (HNK-1抗体と反応する糖鎖抗原)を合成することが明らかとなった。さらに、この硫酸化により、コンドロイチン硫酸鎖生合成が阻害されたことから、HNK-1STは生体内で、プロテオグリカン上の糖鎖の発現調節に関与している可能性が示された。

E. 結論

本研究において従来のHNK-1糖鎖と異なる構造のHNK-1糖鎖抗原の生合成酵素を明らかになり、このHNK-1糖鎖抗原を細胞を用いて大量に調製することが可能となった。また、この新たなHNK-1糖鎖抗原は神経系でも発現していることを示す予備的な結果も得ている。以上のことから、この新たなHNK-1糖鎖抗原を多様なHNK-1糖鎖の一つとして用い、ニューロパチー患者血清中の抗HNK-1抗体の検出に利用することが可能となった。最終的には多様な構造を持つHNK-1糖鎖と患者血清中に存在する抗HNK-1抗体の反応特異性を詳細に検討し、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

T. Kouno, Y. Kizuka, N. Nakagawa, T. Yoshihara, M. Asano, and S. Oka. Specific Enzyme Complex of Beta-1, 4-galactosyltransferase-II and GlcAT-P

Facilitates Biosynthesis of N-linked HNK-1 Carbohydrate. *J Biol Chem.* 286 (36), 31337-31346 (2011).

N. Nakagawa, T. Izumikawa, H. Kitagawa and S. Oka. Sulfation of glucuronic acid in the linkage tetrasaccharide by HNK-1 sulfotransferase is an inhibitory signal for the expression of a chondroitin sulfate chain on thrombomodulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415 (1), 109-113 (2011).

M. Hirano, B.Y. Ma, N. Kawasaki, S. Oka, and T. Kawasaki. Role of interaction of mannan-binding protein with meprins at the initial step of complement activation in ischemia/reperfusion injury to mouse kidney. *Glycobiology* 22(1), 84-95 (2012).

Y. Kizuka, N. Nakagawa, I. Morita, and S. Oka. Requirement of acidic amino acids in the Glucuronyltransferase-P (GlcAT-P) flexible loop for its enzyme activity. *Glycans: Biochemistry, Characterization and Applications.* (2012) In press.

2. 学会発表

岡昌吾, 生体高分子としての糖鎖に秘められた魅力 再生医療サポートビジネス懇話会 京都市リサーチパーク (2011年6月23日 京都 招待講演)

岡昌吾, 中川直樹, 森田一平, 木塚康彦, GlcAT-Pの酵素活性におけるflexible loopの役割 第30回日本糖質学会 (2011年7月11-13日 新潟県長岡市)

S. Oka, Functional enzyme complex of β 1,4-galactosyltransferase-II and GlcAT-P in HNK-1 biosynthesis. SECOND JOINT AUSTRIA/JAPAN SEMINAR ON COMPARATIVE AND DEVELOPMENTAL GLYCOBIOLOGY. (Aug.20, 2011, University of Natural Resources and Life

Sciences Vienna (BOKU), Vienna 招待講演)
演)

S. Oka, Y. Kizuka, N. Nakagawa, T. Yoshihara, M. Asano, and T. Kouno, Functional Enzyme Complex of Beta-1, 4-galactosyltransferase-II and GlcAT-P in HNK-1 biosynthesis. Glyco21 (21st international symposium on glycoconjugates), (August 21-26, 2011, University of Vienna).

S. Oka, Function and regulation of the HNK-1 glyco-epitope in the nervous System. 日蘭糖鎖科学 Joint Seminar, (Oct. 8-11, 2011, 名古屋大学医学部 招待講演)

N. Nakagawa, T. Kouno, Y. Kizuka, T. Yoshihara, M. Asano, and S. Oka. Role of a specific enzyme complex of Beta-1, 4-galactosyltransferase-II and GlcAT-P in HNK-1 biosynthesis. The 31st Naito Conference on Glycan Expression and Regulation II. (2011年9月13-16日 シャトレーゼガトーキングダムサッポロ 札幌)

岡 昌吾 藪野景子、中川直樹、森瀬譲二 HNK-1 糖鎖抗原の構造的機能的多様性 第84回日本生化学大会 (2011年9月21日-24日 京都国際会館 京都 招待講演)

岡 昌吾 神経機能に重要な糖鎖とその合成機構 第17回高知システム糖鎖生物学教育研究センターセミナー (2011年12月7日 高知大学医学部 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
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。昨年度までに、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、その制御には ChGn-1 の糖転移活性が必須であること、さらに、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。本年度は、この C4ST-2 によるコンドロイチン硫酸鎖の本数の制御の詳細を明らかにした。

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

昨年度までの研究で、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、そして、C4ST-2 の発現量とコンドロイチン硫酸の二糖総量にも相関性が見られることを明らかにした。そこで本年度は、C4ST-2 によるコンドロイチン硫酸鎖の量の制御機構を明らかにするために、まず GalNAc-結合領域構造を基質に用い、コンドロイチン重合化酵素を酵素源に用い、コンドロイチン硫酸鎖の重合化を検討した。さらに、以前、我々は ChGn-1 と同じ活性を保持しているコンドロイチン N-アセチルガラクトサミン転移酵素-2 (ChGn-2) とコンドロイチン 4-O-硫酸基転移酵素-1 (C4ST-1) によって合成される二糖繰り返し領域の非還元末端の GalNAc(4-O-sulfate) 構造が、その後に引き続くコンドロイチン硫酸鎖の重合化を促進することを報告した。そこで、GalNAc(4-O-sulfate)-結合領域を基質に用い、コンドロイチン硫酸鎖の重合化が促進されるかも検討した。また、ChGn-1 が C4ST-1 もしくは他の C4ST と共同してコンドロイチン硫酸鎖の本数を制御しているかを明らかにするために、マウスの繊維芽細胞株(L細胞)および、その変異株で C4ST-1 の発現が欠失している sog9 細胞に ChGn-1

を過剰発現させ、細胞が産生するコンドロイチン硫酸鎖の総量を、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 により合成される GalNAc-結合領域を基質に用い、コンドロイチン硫酸鎖の重合化を検討したが、コンドロイチン硫酸鎖の重合化は全く起こらなかった。一方、GalNAc(4-O-sulfate)-結合領域を基質に用い、コンドロイチン硫酸鎖の重合化が促進されるかを検討した結果、コンドロイチン硫酸鎖の重合化が促進された。そこで、次に GalNAc-結合領域を基質に用い、これまで3種類存在する硫酸基転移酵素の基質特異性を調べた結果、C4ST-2 が GalNAc-結合領域に効率よく硫酸基を転移することが明らかとなった。さらに、C4ST-1 の発現が欠失している sog9 細胞に ChGn-1 を過剰発現させ、細胞が産生するコンドロイチン硫酸鎖の総量および鎖長を解析した。その結果、L細胞および sog9 細胞に ChGn-1 を過剰発現させた細胞では、野生型の L細胞および sog9