

抗 GM1 抗体が及ぼす神経系培養細胞の細胞膜への影響の解明

藤田医科大学医学部脳神経内科学講座

研究協力者 武藤多津郎

共同研究者 植田晃広、水谷泰彰、島さゆり

研究要旨

軸索障害型ギラン・バレー症候群（GBS）患者血清中に出現する抗 GM1 抗体が、末梢神経の GM1 と反応し、補体を活性化させて神経障害を来すと考えられている。我々は、別の観点からの研究で、この抗 GM1 抗体が神経細胞のラフトに影響し、ラフト上の神経栄養因子（NGF）の高親和性受容体である Trk の局在をラフト画分から非ラフト画分へ変化させてしまうことで、神経の分化・生存に必須の因子である NGF の作用が低下してしまうことを報告した。しかし、どのようにしてラフト上の重要な因子が局在変化するのかは明らかでなかった。そこで、ラフトを構成する重要な因子である sphingomyelin（SM）と ceramide 代謝に関与する neutral sphingomyelinase（nSMase）に着目し、抗 GM1 抗体の影響を調べた。結果、細胞膜画分で nSMase 活性と量が減少し、細胞膜の脂質構成に変化を来していることが証明された。この結果は、ラフト上の蛋白や糖脂質などの重要な分子に対する抗体が、ラフト構成分子と機能に変化を及ぼするということである。このような観点からも、本疾患の病態解明を進めていくことが重要であると考えられた。

研究目的

軸索障害型 GBS 患者血清中に出現する抗 GM1 抗体が、末梢神経の GM1 をターゲットとし、補体の活性化を介して末梢神経を障害している可能性が報告されているが、その詳細は不明である。我々は、これまで神経系培養細胞 PC12 細胞に Trk cDNA を高発現させた stable transfectant である PCtrk 細胞に、抗 GM1 抗体を作用させると、神経細胞への分化・生存に必須の因子である NGF の高親和性受容体 Trk が、本来の局在部位である細胞膜ラフトから非ラフト画分へその局在を変化すること、その局在変化によりリガンドに対する反応性が低下することを見出し、この反応性低下が本疾患の病態の一部を構成している可能性を報告してきた¹⁾。

我々は、ラフトの主要な構成成分である

sphingomyelin（SM）と ceramide 代謝に関与する neutral sphingomyelinase（nSMase）に着目し、その活性に及ぼす抗 GM1 抗体の影響と新たな細胞膜への作用を調べた。

研究方法

PCtrk 細胞を市販の抗 GM1 抗体を種々の濃度で 24 時間作用させた。Whole cell 及び我々の既報²⁾の細胞分画法を用いて調整した膜画分での nSMase 活性とタンパク量を調べた。また、ショ糖密度勾配超遠心法でラフト画分を得て nSMase 活性を測定した¹⁾。脂質分析は、whole cell と膜画分で調べた³⁾。さらに、細胞培養液中の exosome の分泌量も測定した。

研究結果

抗 GM1 抗体を作用させた PCtrk 細胞では、

有意に膜画分で nSMase 活性が低下し、そのタンパク量も減少した。Whole cell では同活性に変化は認めなかった。抗 GM1 抗体を作用させた細胞より調整したラフト画分でも有意に nSMase 活性が低下していた。

一方、脂質分析から、whole cell では変化を認めなかったが、抗 GM1 抗体で処理した細胞の膜画分で SM 量は明らかに増加していた。

また、抗 GM1 抗体で処理した細胞の細胞培養液中の exosome 量は減少していた。

考察

PCtrlk 細胞に抗 GM1 抗体が作用すると細胞膜画分とラフト画分で nSMase 活性が有意に抑制されることが判明した。この膜画分での nSMase 活性の減少は、膜画分でのみ SM 量の増加をもたらした。このことは、ラフト機能制御に大きく関わる脂質が細胞膜上で有意に変化し得る事を意味し、抗 GM1 抗体の持つ作用の新たな側面を示唆している。さらに、nSMase 活性が exosome 放出に関与するという報告もあり、exosome の放出とラフト機能の間に何らかのクロストークが存在する可能性を示唆しており、今後この観点からの研究の推進が重要であると考えられた⁴⁾。

結論

神経細胞やグリア細胞膜ラフト上に存在する蛋白や糖脂質に対する抗体が、ラフト構成脂質を変化させ得ると共にそれが病態形成の一部となっているという観点と、また exosome 放出を介して全身に影響を及ぼしている可能性があるという観点からも、本疾患

を解明していくことが重要と考えられた。

文献

1. Ueda A, Shima S, Miyashita T, Ito S, Ueda M, Kusunoki S, Asakura K, Mutoh T. Anti-GM1 antibodies affect the integrity of lipid rafts. *Mol Cell Neurosci*. 2010 Dec; 45(4):355-62.
2. Hamano T, Mutoh T, Tabira T, Araki W, Kuriyama M, Mihara T, Yano S, Yamamoto H. Abnormal intracellular trafficking of high affinity nerve growth factor receptor, Trk, in stable transfectants expressing presenilin 1 protein. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005 Jun 13;137(1-2):70-6
3. Mutoh T, Kawamura N, Hirabayashi Y, Shima S, Miyashita T, Ito S, Asakura K, Araki W, Cazzaniga E, Muto E, Masserini M. Abnormal cross-talk between mutant presenilin 1 (I143T, G384A) and glycosphingolipid biosynthesis. *FASEB J*. 2012 Jul;26(7):3065-74
4. Ueda A, Shima S, Murate K, Kikuchi K, Nagao R, Maeda T, Muto E, Niimi Y, Mizutani Y, Mutoh T. Anti-GM1 ganglioside antibodies modulate membrane-associated sphingomyelin metabolism by altering neutral sphingomyelinase activity. *Mol Cell Neurosci*. 2018 Jun; 89:42-48.

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案：なし