

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08284

研究課題名(和文) ニューロン-グリア相互作用における 1,6フコースの役割

研究課題名(英文) Role of alpha1,6-fucosyltransferase Fut8 in neuron-glia interactions

研究代表者

福田 友彦 (Fukuda, Tomohiko)

東北医科薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40433510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：1,6フコース転移酵素Fut8欠損マウスは、LTPの減弱を示す。脳内炎症がLTP減弱の一因であることから、1,6フコースと炎症の關係に注目して解析を行った。Fut8欠損マウスではミクログリアのサイズ・数ともに有意に増加していた。これは、Fut8欠損マウスのミクログリアは刺激を伴わない状況で活性化していることを示している。LPSで刺激に対する感受性も高まっていた。さらに、ミクログリア細胞株BV2細胞を用いても同様の結果であった。これらの結果は、コアフコシル化の欠損によりグリア細胞が容易に活性化状態になること、すなわち、コアフコースはグリア細胞の活性化の抑制に働くことを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1,6フコースはグリア細胞の活性化の抑制に働くことを明らかにした。Fut8の生体での発現は脳組織で特に高い。それは、グリア細胞の過剰な活性化の抑制に関係しているためと考えられる。ミクログリアやアストロサイトの活性化による炎症反応が神経変性疾患の病態形成に関わることが近年わかってきており、Fut8欠損マウスの表現型の解析により、神経変性疾患の病態形成に糖鎖の視点からの新知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：1,6-Fucosyltransferase(Fut8)-deficient (Fut8 KO)mice displayed depresses hippocampal long-term potentiation. Since neuroinflammation is a common pathological change in most brain diseases, this study was focused on investigating the effects of Fut8 in microglia and astrocytes. The number of Iba-1 positive cells and GFAP positive cells were significantly increased in both untreated and lipopolysaccharide stimulated inflammatory Fut8 KO mice by comparison with both wild-type (WT) and hetero Fut8 KO mice. Stimulation with pro-inflammatory factors induced expression levels of fucosylation in primary microglia and astrocytes, as well as in glial cell lines. Cell motility and iNOS expression were easily induced by IFN- $\gamma$  in Fut8-KO BV-2 cells compared with WT cells. These results indicated that 1,6-fucosylation may negatively regulate microglia and astrocytes responses to extrinsic stimuli during the process of neuroinflammation.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：Fut8 1,6フコース ミクログリア アストロサイト 神経炎症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖鎖構造は糖鎖関連遺伝子の発現パターンによって極めて多様な構造を持つ。同じ糖タンパク質であっても発生・発達の時期や組織・細胞によって異なることが知られており、糖鎖修飾はタンパク質の機能発現に重要な役割をはたしている。神経系における機能性糖鎖としては神経系の細胞接着分子などに特徴的に発現しているポリシアル酸(PSA)やHNK-1糖鎖など限られた構造に注目が集まっているが、脳組織に発現する糖鎖の特徴としてN型糖鎖の根元に1,6結合でフコース結合した1,6フコースが多いことがあげられる。1,6フコースを転移する糖転移酵素(Fut8)欠損マウスの表現型の解析から、統合失調症の患者に見られる症状と一致する障害を見出し、治療薬の有効性を確認した(Fukuda T., et al. JBC., 2011)。また、神経分化モデル細胞PC12を用いて、神経突起形成に支障が生じることを明らかにした(Gu W., Fukuda T., et al. FASEB J., 2013)。認知障害に焦点をあてた電気生理学的解析を行い、海馬ニューロンでのLTP(Long-term potentiation)の著しい減弱を見出した。シナプス後肥厚のAMPA型グルタミン酸(AMPA)受容体数の増加がLTPの主要な機構であると考えられていることから、Fut8欠損によるAMPA受容体数の減少が予測されたが、予想に反して複合体形成能が亢進し、受容体数が増加していることを見出した。これらは多様な構造をもつ糖鎖修飾を受ける糖タンパク質中でも、Fut8の標的タンパク質の機能が1,6フコースの有無という単糖一つ分の僅かな違いにより制御されており、その乱れが記憶・学習の基礎過程であるLTPの減弱とシナプス後肥厚のAMPA受容体数の増加という、相反する現象に関わっていることを強く示唆している(Gu W., Fukuda T., et al. JBC., 2015)。

### 2. 研究の目的

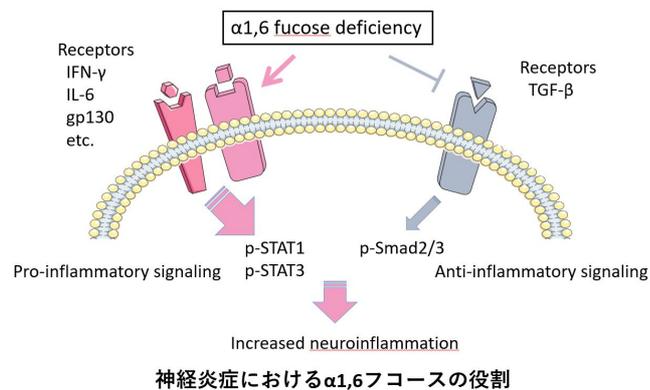
ニューロンにおけるFut8の機能の詳細な解析を行なうために作成したニューロン特異的Fut8欠損マウスに作業記憶の障害が認められなかったことから、ニューロンの数を大きく上回り、ニューロンの活動やシナプスの再編成に積極的に関与するなど、機能の重要さが注目されているグリア細胞に焦点を当て、1,6フコースによる糖タンパク質の機能制御を解析し、ニューロン-グリア相互作用における1,6フコースの意義を明らかにする。さらに、Fut8欠損マウスで見られた統合失調症様の症状を1,6フコースとニューロン-グリア相互作用に注目することで、未解明である発症機構を糖鎖による機能制御の視点から提案する。

### 3. 研究の方法

ニューロンにおけるFut8の機能の詳細な解析を行なうために作成したニューロン特異的Fut8欠損マウスに作業記憶の障害が認められなかったことから、LTPの減弱と深く関わる脳内の炎症反応に注目して解析を行った。Fut8欠損マウスの脳組織をグリア細胞の活性化の指標となる抗体を用いて、平常時と免疫担当細胞活性化を誘導した場合の感受性を検討した。さらに、株化ミクログリア細胞BV-2細胞からCRISPR/CAS9システムを用いてFut8を欠損させたBV-2細胞を作製・突起形成を指標に活性化に与える影響を解析した。また、IFN- $\gamma$ で刺激・活性化し、iNOSの発現量を指標にミクログリアにおける1,6フコースの機能を解析した。また、cAMP依存的なアストロサイト分化能を持つラットC6グリオーマ細胞を用いてミクログリアと同様に、IL-6/STAT3シグナル伝達経路の活性化を指標にアストロサイトにおける1,6フコースの機能を解析した。

### 4. 研究成果

脳内の炎症反応や免疫系の変化も、LTP 減弱の原因となることが報告されているので、1,6 フコースと炎症反応や免疫系の関係に注目して解析を行った。Fut8 欠損マウスの脳組織をグリア細胞の一つで、中枢の免疫担当細胞として知られるミクログリアのマーカー抗 Iba1 抗体で染色したところ、野生型よりミクログリアのサイズ・数ともに有意に増加していた。これは、Fut8 欠損マウスのミクログリアは刺激を伴わない状況で活性化していることを示している。また、免疫担当細胞活性化作用をもつリポ多糖(LPS)を腹腔内に投与すると Fut8 欠損マウスは野生型マウスより感受性が高まっていた。炎症と 1,6 フコースの関係を調べるため、ミクログリアの細胞株 BV2 細胞を炎症性サイトカイン IFN- $\gamma$  で刺激すると 1,6 フコースの発現が濃度依存的に増加した。1,6 フコースとミクログリア活性化の関連を明らかにするため、Fut8 欠損 BV2 細胞を作成し、炎症性サイトカイン IFN- $\gamma$  による誘導型一酸化窒素合成酵素 iNOS の発現誘導を指標に検討したところ、野生型より Fut8 欠損 BV2 細胞のほうがより顕著に iNOS の発現が誘導された。Fut8 欠損することで、生体防御反応が生じやすくなることを示唆している。グリア細胞集団間での相互作用を検討するため、グリア細胞の一種でミクログリアとともに、炎症メディエーターや炎症促進性サイトカインを産生するアストロサイトに注目した。株化アストロサイトの入手が困難なことから cAMP 依存的なアストロサイト分化能を持つラット C6 グリオマ細胞に CRISPR/CAS9 システムを用いて Fut8 を欠損させた細胞を作成した。アストロサイトを IL-6 で刺激すると、STAT3 が活性化され、それに続くアストロサイトのマーカー GFAP の発現が誘導される。IL-6 で刺激したところ、野生型より Fut8 欠損 C6 細胞のほうが IL-6/STAT3 シグナル伝達経路が活性化されることがわかった。さらに、野生型の初代培養アストロサイトに L-フコースのアナログである 2-fluorofucose (2FF) を添加することにより、フコシル化を抑制すると、IL-6/STAT3 シグナル伝達経路が活性化された。初代培養細胞を用いても株化細胞の結果を再現できることから、1,6 フコシル化の欠損によりグリア細胞が容易に活性化状態になるこ



とを明らかにした(Lu X., Fukuda T., et al. BBA GEN SUB., 2018 図)。すなわち、1,6 フコースはグリア細胞の活性化の抑制に働くことを示しており、Fut8 欠損マウスの脳神経に見られる障害は、ニューロンだけではなく 1,6 フコースによるグリア細胞の活性化の抑制が解除されたことに起因したものであることを強く示唆している。これまで報告がなかった Fut8 欠損患者が 2018 年に報告され、Fut8 欠損マウスが患者の症状をよく反映していることが分かった(Am J Hum Genet. 2018;102:188-195.)。本研究成果は Fut8 欠損マウスをモデル動物として、未解明な統合失調症の発症機構へつながることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Lu Xu, Zhang Dongmei, Shoji Hayato, Duan Chengwei, Zhang Guowei, Isaji Tomoya, Wang Yuqin, Fukuda Tomohiko, Gu Jianguo	4. 巻 1863
2. 論文標題 Deficiency of 1,6-fucosyltransferase promotes neuroinflammation by increasing the sensitivity of glial cells to inflammatory mediators	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 598 ~ 608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2018.12.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田友彦, 庄子隼人, 陸需, 張冬梅, 伊左治知弥, 顧建国
2. 発表標題 コアコースによるグリア細胞過活性化の抑制
3. 学会等名 92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田友彦, 庄子隼人, 陸需, 張冬梅, 伊左治知弥, 顧建国
2. 発表標題 1,6フコシルトランスフェラーゼ(Fut8)欠損によるグリア細胞の活性化
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田友彦・陸需・庄子隼人・張冬梅・伊左治知弥・顧建国
2. 発表標題 Roles of 1,6-fucosylation in glial cells
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----