

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19300144
 研究課題名（和文） 糖鎖異常に起因するヒト疾患モデルマウスの開発と発症機構の解析
 研究課題名（英文） Development of mouse models for human diseases caused by impaired glycosylation and analysis of their mechanisms
 研究代表者
 浅野 雅秀（ASANO MASAhide）
 金沢大学・学際科学実験センター・教授
 研究者番号：50251450

研究成果の概要（和文）：ガラクトース転移酵素やシアル酸合成酵素の遺伝子改変マウスを解析することにより、IgA 腎症やネフローゼの発症に糖鎖異常が関わっていることを明らかにした。また、ガラクトース含有糖鎖はその種類によって、空間学習・記憶や協調運動などの高次脳機能や初期発生にも重要な役割を担っていることを明らかにした。これらの成果は糖鎖の生物学的重要性を示すと共に、ヒト疾患の診断や治療に応用できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：It is clarified that impaired glycosylation is involved in the development of IgA nephropathy and nephrose using gene-manipulated mice of galactosyltransferases and sialic acid synthases. It is also revealed that galactose-containing carbohydrates play important roles in higher brain functions including special learning/memory and coordinated motor functions and early embryogenesis. These results indicate the biological importance of carbohydrates as well as clinical importance of carbohydrates in diagnosis and medical treatment of human diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2008 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：糖鎖生物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：IgA 腎症，ネフローゼ，糖鎖，ガラクトース転移酵素，シアル酸生合成，行動解析

1. 研究開始当初の背景

糖鎖が様々な生命現象において重要な役割を果たしていることが明らかになりつつあるが、それに伴って糖鎖異常がヒトの様々

な重要疾患、たとえば筋ジストロフィーや糖尿病、自己免疫疾患、感染症などの原因になっていることがわかってきた。我々は生体内での糖鎖の機能を解明するために、機能的糖

鎖の末端に位置するシアル酸とその内側のガラクトースに注目し、前者についてはシアル酸自体の生合成の鍵となるUDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) 遺伝子を、後者については β -1,4結合でガラクトースを転移する β -1,4-ガラクトース転移酵素 (β 4GalT) 遺伝子群を改変したマウスを作製して解析を進めていた。

β 4GalT-1 欠損マウスは IgA 腎症を自然発症することを見いだしたので、その発症機構を解析した。さらに β 4GalT 遺伝子群のうち、 β 4GalT-2 と β 4GalT-5 についても遺伝子改変マウスを作出してその表現型の解析を進めて、ヒト疾患モデルマウスの開発を目指した。一方、GNE 遺伝子の点変異はヒトの遺伝性筋疾患である縁取り空胞型遠位型ミオパチー (DMRV) の原因であることが報告され、日本人患者に多く見られるキナーゼ部位の点変異 (V572L) を導入した GNE 点変異マウス作出したので、筋疾患を中心に解析を進めた。

2. 研究の目的

β 4GalT-1 欠損マウスは IgA 腎症を発症し、その原因として患者と同様に IgA 分子の糖鎖不全が考えられたので、その観点から発症機構の解析を進めた。

β 4GalT 遺伝子群のうち、 β 4GalT-2 と β 4GalT-5 についても遺伝子改変マウスを作出した。 β 4GalT-2 欠損マウスは外見上は正常に見えるが、行動解析を進めて、脳神経系の異常を解析した。また、 β 4GalT-5 欠損マウスは予想に反して胎生致死となったので、発生過程における β 4GalT-5 の機能を解析した。

GNE 点変異マウスは DMRV のモデルになることが期待されるので、筋疾患の解析を中心に進めた。しかし、GNE の点変異は全身で生じているので、他の組織にも異常が発生する可能性を考えて解析を進めた。

3. 研究の方法

それぞれの遺伝子改変マウスはすでに作製できているので、それらを繁殖して IgA 腎症やネフローゼ、筋疾患の解析に用いた。まず対象となる臓器の組織学的な解析を行なうと共に、血中や尿中の生化学マーカーの測定を行った。IgA や Podocalyxin の糖鎖構造をレクチンや分子分析装置を用いて解析した。

骨髄移植は致死量の X 線を照射したレシピエントマウスに尾静脈から骨髄細胞を移植した。移植する骨髄細胞は区別できるように GFP を発現するものを使用した。コロニー形成アッセイは、採取した骨髄細胞を種々のサイトカインを含む半固形培地で培養し、形成されたコロニーの数を測定した。

行動解析はテストバッテリー方式で、ホー

ムケージ活動量、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路、モリス型水迷路、バランスビームテスト、ロータ・ロッドテスト、受動的回避反応テストなどを行った。

胎生期の解析は、胚の切片の組織学的解析や whole mount in situ hybridization によるマーカー遺伝子の発現解析、野生型のテトラプロイド胚とのキメラ胚作製によるテトラプロイドレスキュー実験を行った。

4. 研究成果

(1) β 4GalT-1 欠損マウス (IgA 腎症モデル)

IgA 腎症患者は高 IgA 血症を呈し、血中 IgA が多量体を形成して腎臓に沈着しており、その原因として IgA1 の O 型糖鎖不全が疑われていた。 β 4GalT-1 欠損マウスの血中 IgA の性状を解析したところ、同様に IgA 濃度が高く、多量体を形成していた (図 1)。マウスの IgA 分子はヒトとは異なり、O 型糖鎖は結合しないが、N 型糖鎖は 2 カ所に結合するので、その構造解析を行った。ガラクトース転移酵素の欠損から予想されたように、ガラクトースの結合が完全に欠損していた。以上のことから β 4GalT-1 欠損マウスにおいても IgA の糖鎖不全が起こっており、それが IgA 沈着の原因と考えられた (論文 4)。

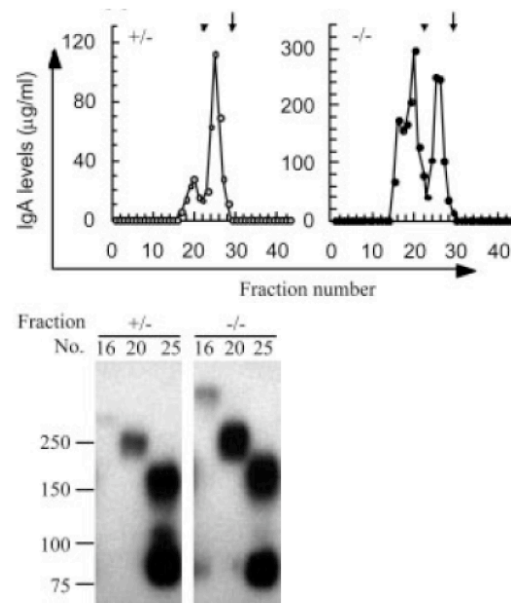


図 1 β 4GalT-1 欠損マウス由来の IgA は多量体を形成

ゲル濾過 (上図) や非還元下の電気泳動 (下図) で血清を分画すると、 β 4GalT-1 欠損マウス由来の IgA は多量体を形成していることがわかった。

上記のことを証明するために、 β 4GalT-1 欠損マウスの骨髄細胞を野生型マウスに移植して IgA 腎症の発症を試みた。しかし、驚いたことに β 4GalT-1 欠損マウスの骨髄細胞は骨髄に生着しないことがわかった (次の項

に述べる)。そこで野生型マウスの骨髄細胞を $\beta 4\text{GalT-1}$ 欠損マウスに移植して発症の阻止を試みた。発症を阻止することはできなかったが、血中の IgA 濃度の上昇は抑制されるようであった。

次に B 細胞でのみ $\beta 4\text{GalT-1}$ を発現するトランスジェニックマウスを作製して、 $\beta 4\text{GalT-1}$ 欠損マウスと交配することにより、B 細胞から産生される IgA の糖鎖は正常な構造をしている $\beta 4\text{GalT-1}$ 欠損マウスを作出した。マウスができたところで本研究期間は終了したので、引き続き別のプロジェクトで研究を継続している。

(2) 骨髄移植における骨髄幹細胞のホーミング

血球細胞と血管内皮細胞との接着にはセレクトインとそのリガンド糖鎖の結合が重要であるが、 $\beta 4\text{GalT-1}$ 欠損マウスではリガンド糖鎖であるシアリル Le^x の合成が障害されており、このマウスは皮膚などの炎症反応が減弱していることをすでに報告している (Asano et al. Blood, 2003)。骨髄幹細胞の骨髄へのホーミングにも関与する可能性があるため調べてみた。

致死量の X 線照射した野生型あるいは免疫不全の NOD-scid マウスに野生型や $\beta 4\text{GalT-1}$ ヘテロの骨髄細胞を移植した場合は、骨髄に生着してレシピエントマウスは生存したが、 $\beta 4\text{GalT-1}$ 欠損骨髄細胞を移植した場合は全例が死亡した。 $\beta 4\text{GalT-1}$ 欠損骨髄幹細胞自身のコロニー形成能は正常であったが、一旦レシピエントマウスに移植して短時間後に骨髄から細胞を回収してコロニー形成能を測定したところ、 $\beta 4\text{GalT-1}$ 欠損骨髄細胞はほとんど骨髄に生着していなかった。以上のことより、 $\beta 4\text{GalT-1}$ 欠損骨髄細胞は骨髄移植後の骨髄へのホーミング活性が著しく障害されていることがわかった。今後鍵となる糖鎖構造を明らかにしていく。

(3) $\beta 4\text{GalT-2}$ 欠損マウスの行動解析

$\beta 4\text{GalT}$ 遺伝子群の中で $\beta 4\text{GalT-1}$ と相同性の高い $\beta 4\text{GalT-2}$ 欠損マウスを作製した。外見上は特に異常は見られなかったが、行動解析を行うために近交系の C57BL/6 に戻し交配を行い、コンジュニック系統を作製した。テストバッテリー方式により 10 種類程度の基本的な行動解析を行ったところ、空間学習・記憶を測定するモリス型水迷路と協調運動/運動学習を測定するロータ・ロードテストとバランスビームテストに明らかな障害が見られた (図 2)。また、このマウスの海馬や大脳皮質において、神経可塑性に重要な役割を果たしている HNK-1 糖鎖の発現がほとんど消失していた。以前に HNK-1 糖鎖の合成を担う GlcAT-P 欠損マウスも空間学習に

障害があることを報告したが (Yamamoto, et al. JBC, 2002)、今回はこのマウスの協調運動についても調べてみたが、これは正常であった。したがって、 $\beta 4\text{GalT-2}$ は HNK-1 糖鎖の合成に必須であり、 $\beta 4\text{GalT-2}$ 欠損マウスの空間学習・記憶障害は海馬での HNK-1 糖鎖の消失が原因であることがわかった。一方、協調運動の障害は別の機能性糖鎖の関与が考えられた (論文 3)。

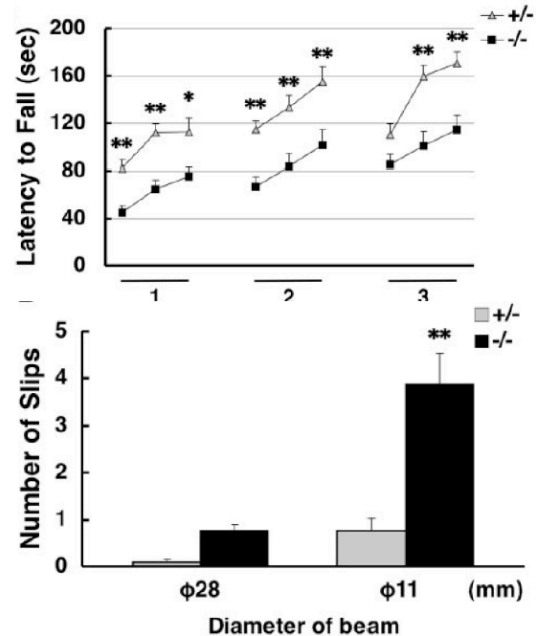


図 2 $\beta 4\text{GalT-2}$ 欠損マウスは協調運動に障害
ロータ・ロードテスト (上図) 及びバランスビームテストにおいて $\beta 4\text{GalT-2}$ 欠損マウスは協調運動に顕著な障害が見られた。

(4) $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損マウスの胎生致死

$\beta 4\text{GalT-2}$ と共に脳での発現が強い $\beta 4\text{GalT-5}$ についても遺伝子欠損マウスを作製した。このマウスは予想に反して胎生 9.5 日で致死になることがわかった。死亡前の胎仔と胎盤の組織学的な検索を行ったところ、胎仔では三胚葉の形成は起こっていたのに対して、胎盤では形態的な異常が見られた。そこで野生型のテトラプロイド胚と $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損胚とのキメラ胚を作製したところ、胎生後期まで発生が進むことがわかった。この結果は胎盤を野生型にすると $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損胚の発生が進むことを示しており、 $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損マウスの胎生致死の原因が胎盤などの胚体外組織にあることがわかった (論文投稿中)。

(5) GNE 点変異マウスでの腎疾患

当初はヒトの遺伝性筋疾患である DMRV のモデルマウスの作製を目指して解析を行った。一部の骨格筋に封入体が検出され、オートファジー様の変化も見られたが、結局マウスでは顕著な筋繊維の変性や筋力低下は

認められなかった。しかし、若齢よりタンパク尿が顕著に見られ、ネフローゼ症候群様の病態を示すことがわかった。糸球体の濾過機能を担う足細胞に発現している Podocalyxin のシアル酸が欠損しており、そのことにより足細胞の形態が異常になり、濾過機能が破綻していると考えられた。このように、同じ遺伝子の同じ点変異でもマウスとヒトでは病態が発現する場所が異なることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 21 件)

1. Izumikawa, T., Kanagawa, N., Watamoto, Y., Okada, M., Saeki, M., Sakano, M., Sugahara, K., Sugihara, K., Asano, M., and Kitagawa, H. Impairment of embryonic cell division and glycosaminoglycan biosynthesis in glucuronyltransferase-I deficient mice. *J. Biol. Chem.*, 285: 12190-12196, 2010. 査読有
2. Takahashi, I., Noguchi, N., Nata, K., Yamada, S., Kaneiwa, T., Mizumoto, S., Ikeda, T., Sugihara, K., Asano, M., Yoshikawa, T., Yamauchi, A., Shervani, N.J., Uruno, A., Kato, I., Unno, M., Sugahara, K., Takasawa, S., Okamoto, H., and Sugawara, A. Important role of heparan sulfate in postnatal islet growth and insulin secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383: 113-118, 2009. 査読有
3. Yoshihara, T., Sugihara, K., Kizuka, Y., Oka, S., and Asano, M. Learning/memory impairment and reduced expression of the HNK-1 carbohydrate in β 4-galactosyltransferase-II-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 284: 12550-12561, 2009. 査読有
4. Nishie, T., Miyaishi, O., Azuma, H., Kameyama, A., Naruse, C., Hashimoto, N., Yokoyama, H., Narimatsu, H., Wada, T., and Asano, M. Development of immunoglobulin A nephropathy-like disease in β -1,4-galactosyltransferase-I deficient mice. *Am. J. Pathol.* 170: 447-459, 2007. 査読有

[学会発表] (計 35 件)

1. 高垣聡一郎, 西江敏和, 浅野雅秀 「 β 1-4 結合型ガラクトース糖鎖は造血幹細胞の骨髄へのホーミングに必須である」第 32 回日本分子生物学会, ワークショップ, 2009 年 12 月 10 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
2. 伊藤光俊, 浅賀知也, 杉原一司, 吉原亨, 和田隆志, 浅野雅秀 「GNE V572L 点変異マウスにおける腎病変の発症機序とシアル酸糖鎖の関係」第 32 回日本分子生物学会, 2009 年 12 月 10 日, パシフィコ横浜 (神奈

川県)

3. Toru Yoshihara, Kazushi Sugihara, Yasuhiko Kizuka, Shogo Oka and Masahide Asano “Learning/memory impairment and reduced expression of the HNK-1 carbohydrate in β -1,4-Galactosyltransferase-II-deficient mice” 第 32 回日本神経科学大会, 2009 年 9 月 17 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)
4. 吉原亨, 杉原一司, 浅賀知也, 浅野雅秀 「テストバッテリー方式による GNE 点変異マウスの行動解析」第 56 回日本実験動物学会, 2009 年 5 月 14 日, 大宮ソニックホール (埼玉県)
5. 伊藤光俊, 浅賀知也, 杉原一司, 吉原亨, 山本章嗣, 浅野雅秀 「GNE V572L 点変異マウスにおける DMRV 様病態発症機序と糖鎖の関係」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008 年 12 月 11 日, 神戸国際会議場 (兵庫県)
6. 吉原亨, 杉原一司, 伊藤光俊, 浅賀智也, 浅野雅秀 「GNE 点変異マウスにおける不安行動の亢進—GNE V572L マウスの行動特性および組織学的解析—」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008 年 12 月 11 日, 神戸国際会議場 (兵庫県)
7. 引持陽子, 西江敏和, 福住好恭, 座間宏太, 伊東信, 浅野雅秀 「 β 4-ガラクトース転移酵素-5 はマウス初期胚の胚体外組織の形成に必須である」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008 年 12 月 11 日, 神戸国際会議場 (兵庫県)
8. Asano, M. “What do mice tell us about IgA nephropathy?” ASN Renal Week 2008, Invited speech, Nov 7, 2008, Philadelphia, PA, USA.
9. 西江敏和, 福住好恭, 座間宏太, 引持陽子, 伊東信, 浅野雅秀 「LacCer 合成酵素活性を担う β 4-ガラクトース転移酵素-5 はマウス初期発生に必須である」第 55 回日本実験動物学会, 2008 年 5 月 17 日, 仙台国際センター (宮城県)
10. 杉原一司, 浅賀知也, 伊藤光俊, 吉原亨, 山本章嗣, 浅野雅秀 「縁取り空胞型遠位型ミオパチーモデルマウスの開発と発症機序の解析」第 55 回日本実験動物学会, 2008 年 5 月 17 日, 仙台国際センター (宮城県)
11. 西江敏和, 福住好恭, 座間宏太, 伊東信, 浅野雅秀 「初期胚発生における β 4-ガラクトース転移酵素-5 遺伝子の役割」第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 2007 年 12 月 14 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
12. 浅賀知也, 杉原一司, 伊藤光俊, 吉原亨, 西江敏和, 和田隆志, 山本章嗣, 浅野雅秀 「縁取り空胞型遠位型ミオパチーモデル

マウスの開発と発症機序の解析」第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 2007 年 12 月 14 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

13. 吉原亨, 杉原一司, 木塚康彦, 岡昌吾, 浅野雅秀「 β 4GalT-2 ノックアウトマウスの学習・記憶障害と脳における HNK-1 糖鎖の発現低下」第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 2007 年 12 月 12 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
14. 浅野雅秀, 西江敏和, 宮石理, 成松久, 和田隆志「ガラクトース転移酵素遺伝子欠損マウスに発症する IgA 腎症の病態と発症機序」第 37 回日本腎臓学会東部学術大会, 2007 年 10 月 6 日, ワークショップ(招待), 大宮ソニックホール (埼玉県)
15. 吉原亨, 杉原一司, 浅野雅秀「テストバッテリー方式による β 4-GalT-II 欠損マウスの行動解析」第 54 回日本実験動物学会, 2007 年 5 月 23 日, タワーホール船堀 (東京都)

[図書] (計 3 件)

1. 浅野雅秀 「IgA 腎症の発症には糖鎖がからんでいる」 第 3 の生命鎖: 糖鎖の謎が今, 解る クバプロ 123-130, 2009.
2. 浅野雅秀 「免疫グロブリン A の糖鎖不全と腎臓疾患」 共立出版, 蛋白質核酸酵素 (2008 年 9 月号増刊) Vol.53, No.12, 1611-1616, 2008.
3. 浅野雅秀, 西江敏和 ミニレビュー「IgA の糖鎖不全と IgA 腎症」日本生化学会, 生化学 Vol.79, No.7, 673-678, 2007.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: GNE 遺伝子に変異を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物

発明者: 浅野雅秀, 浅賀知也, 杉原一司, 吉原亨

権利者: 金沢大学

種類: 特許

番号: 特願 2007-280909

出願年月日: 2007 年 10 月 29 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~asrc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 雅秀 (ASANO MASAHIDE)

金沢大学・学際科学実験センター・教授

研究者番号: 50251450

(2) 研究分担者

橋本 憲佳 (HASHIMOTO NORIYOSHI)

金沢大学・学際科学実験センター・准教授

研究者番号: 50242524

(3) 連携研究者

吉原 亨 (YOSHIHARA TORU)

金沢大学・子どものこころの発達研究センター・助教

研究者番号: 00401935

(H19 研究分担者)

杉原 一司 (SUGIHARA KAZUSHI)

金沢大学・医学系・技術専門職員

研究者番号: 10377418

(H19 研究分担者)