

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23790361

研究課題名（和文）

ガングリオシド欠損によるグリア細胞活性化機構の解明

研究課題名（英文）

Elucidation of activation mechanisms for ganglioside-deficient glial cells

研究代表者

大海 雄介 (OHMI YUHSUKE)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：10584758

研究成果の概要（和文）：細胞膜上に発現している酸性糖脂質、ガングリオシドは神経系に高発現し、神経の発生や維持に寄与している。本研究では、神経組織を構成する細胞の一つであるグリア細胞（神経細胞を保護、維持する細胞）にもガングリオシドが発現することを明らかにした。また、ガングリオシドが欠損したマウスのグリア細胞は脳内で異常な活性上昇を示し、ガングリオシド欠損グリア細胞で炎症因子であるサイトカインに対する感受性が亢進していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Gangliosides (acidic glycosphingolipids) expressed on the plasma membrane are highly expressed in nerve tissues of vertebrates, and are involved in their development and functions. Our study clarified that glial cells components of nerve tissues, also express gangliosides on the plasma membrane, and glial cells in gangliosides-deficient mice were abnormally activated in the brain and enhanced sensitivity for inflammatory cytokines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：糖鎖生物学、神経科学、免疫生化学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：アストロサイト、ミクログリア、ニューロン、ガングリオシド、神経変性、炎症

1. 研究開始当初の背景

ガングリオシドは脊椎動物の神経系組織に多く発現していることから神経組織の発生と機能に深く関与していると考えられている。ヒトでは、ガングリオシド欠損による幼児性癲癇と多発性の興奮性神経異常を示す症例が報告された。しかし、ガングリオシド欠損による神経変性の機序は不明であった。

我々はGM2/GD2 合成酵素とGD3 合成酵素が欠損し、GM3 以外のガングリオシドが消失し

たダブルノックアウト(DKO)マウスを作成し解析してきた。DKOマウスは、12週齢過ぎから突然死を起こし、また若齢期から神経変性が現れた。さらに、加齢に伴う歩行異常やブルキンエ細胞の脱落が認められた。小脳内で補体活性の亢進に伴いTNF α 、IL-1 α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインが増加し、過剰な炎症が惹起されたことが、神経変性の要因と考えられた。DKOマウスの小脳組織では、

アストロサイトやミクログリアの著しい増生が確認され、炎症性因子の過剰発現は、この増生グリア細胞に由来することが示唆された。興味深いことに、DKO マウスに補体C3 欠損マウスを交配させたTKO マウスでは、補体活性化や炎症性サイトカインの顕著な低下が認められ、炎症症状が顕著に減弱したが、アストロサイトの増生は亢進したままであった。これは、ガングリオシド欠損がグリア細胞の異常活性化を惹起したためと考えられ、ガングリオシド欠損に起因した補体非依存性のグリア増殖・活性化メカニズムが存在することを示唆している。

2. 研究の目的

アストロサイトやミクログリアは中枢神経系における炎症反応の中心的な役割を担っており、その活性化により炎症性サイトカインを放出し、また活性化ミクログリアは貪食細胞として機能する。アストロサイトは正常時には中枢神経組織の支持細胞として、エネルギー供給や blood-brain-barrier (BBB) の構築など様々な機能を果たすが、炎症が惹起されると反応性アストロサイトに分化し、神経損傷部位の修復を行う一方、過度なグリオシスによる神経伸長の阻害や、炎症性サイトカインの放出による過剰炎症及び神経変性を誘発する。また、グリア細胞はアルツハイマー病などの神経変性疾患でも増生しており、様々な神経変性に深く関与していると考えられる。そこで、我々は、ガングリオシド欠損によって惹起されるグリア細胞の性状の異常や活性化機構を解明し、神経炎症と神経変性の新たな機序を明らかにする。

3. 研究の方法

グリア細胞におけるガングリオシドの分別的役割を明らかにするため、ガングリオン

ド欠損アストロサイト、ミクログリアを用いて、ガングリオシド欠損によって惹起されるグリア細胞の性状の異常や活性化機構を検討する。そのために、下記の検討を行う。

(1) ガングリオシド欠損マウスから初代培養アストロサイトとミクログリアを樹立し、グリア細胞におけるガングリオシドprolifeを明らかにする。

(2) ガングリオシド欠損に起因するアストロサイトとミクログリアの活性化の機序を解明するため、野生型 (WT) 及びガングリオシド欠損マウスの脳組織切片を用いて、細胞膜構造の変化に基づく異常活性・増殖の検討を行う。さらに初代培養細胞を用いて、定常状態におけるガングリオシド欠損グリア細胞の増殖能や炎症性・抑制性サイトカインの発現レベルの変化をWTのグリア細胞と比較検討する。また、サイトカインに対する感受性がガングリオシド欠損によって亢進するかを明らかにするため、炎症性サイトカイン (IL-6) 刺激下におけるガングリオシド欠損グリア細胞の形態変化やサイトカインの発現を検討し、サイトカインに対する受容体の発現と機能および細胞膜局在変化等を検討する。

(3) ガングリオシド欠損アストロサイトの異常により BBB の構築に変化が起きていることを検討するため、エバンスブルー法などを行い、試薬の BBB 漏出を検討する。これにより、ガングリオシド欠損アストロサイトに起因する BBB の崩壊と炎症反応への関与を明らかにする。

(4) ガングリオシド欠損アストロサイトやミクログリアによる神経変性を検討するため、初代培養アストロサイトとミクログリアを WT およびガングリオシド欠損マウスの神経細胞と共培養し、神経細胞の変化を細胞形態や数によって確認する。ニューロンに対するトキシックな作用が見られたら、その原因因子

を抗体ブロックなどにより究明する。

以上により、ガングリオシド欠損による炎症反応及び神経変性機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ガングリオシド欠損グリア細胞の性状解析のため、生後 0 日の WT 及び、ガングリオシド欠損マウス (GD3 合成酵素ノックアウト (KO) マウス、GM2/GD2 合成酵素 KO マウス、両者の DKO マウス) 脳から初代培養アストロサイトとミクログリアを樹立した。また、上記マウス初代培養アストロサイトのガングリオシド *prolife* を明らかにするため、各ガングリオシド抗体を用いて flow cytometry を行った結果、野生型アストロサイトにはニューロンと同様に主に GM1, GD1a, GD1b, GT1b が高発現し、これらのガングリオシドは合成酵素を欠損させることにより消失した。アストロサイトにはガングリオシドが高発現しており、欠損マウスではこれらのガングリオシドが欠失する事によりアストロサイトの性状に異常が引き起こされることが示唆された。

(2) WT 及びガングリオシド欠損マウスの脳組織切片を用いて、細胞膜構造の変化に基づく異常活性・増殖の検討を行った結果、ガングリオシド欠損マウス脳では GFAP 陽性アストロサイトが顕著に増加した。また、ミクログリア全体の検出は Iba1 で明瞭に可能であったが、DKO マウスにおいて明らかに強く染色された。また、M1 ミクログリアのマーカである抗 iNOS 抗体で染色した結果、多くのミクログリアが抗 iNOS 抗体で染色された。一方、M2 マーカーであるアルギナーゼ 1 抗体での染色は、脳組織全体が軽度に染色され、現在、再検討中である。

初代培養アストロサイトを用いて、GD3 合成酵素 KO、GM2/GD2 合成酵素 KO アストロサイトの

平常状態における増殖能を検討した結果、野生型マウスと比べ大きな違いが見られなかった。また、WT と GD3 合成酵素 KO、GM2/GD2 合成酵素 KO アストロサイト、ミクログリアの炎症性・抑制性サイトカイン ($TNF\alpha$, $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-10$) の発現レベルを real time RT-PCR にて比較検討した結果、 $IL-6$ の発現レベルが、WT に比べ GD3 合成酵素 KO アストロサイトで亢進していた。また、WT 及び GM2/GD2 合成酵素 KO アストロサイトを炎症性サイトカイン ($IL-6$) で刺激した結果、WT に比べ、GM2/GD2 合成酵素 KO アストロサイトでは炎症性サイトカインの発現が顕著に亢進した。さらに、GM2/GD2 合成酵素 KO アストロサイトでは抗炎症因子 SOCS3 の発現低下が認められた。また、GM2/GD2 合成酵素 KO ミクログリアではこのような変化は認められなかった。以上の結果は、ガングリオシドがアストロサイトにおける炎症性サイトカインへの反応を制御していることを示唆している。今後、ガングリオシドの変化がグリア細胞のシグナル伝達にどのように影響するかを検討していく予定である。

(3) GD3 合成酵素 KO マウス、GM2/GD2 合成酵素 KO マウス、DKO マウスの BBB 構築に変化が起きていることを検討するため、エバンスブルー法の条件検討を行った。WT マウスに LPS を腹腔投与した後、エバンスブルー溶液を尾静脈注射し、脳への浸透を吸光度にて確認した結果、LPS を投与したマウス脳においてエバンスブルー溶液の浸透が顕著に確認できた。今後、上記方法によって決定した条件を用いて、ガングリオシド欠損マウス BBB の構築異常を検討する。現在、各週齢マウスを準備中である。

(4) ガングリオシド欠損により活性化したグリア細胞がいかに炎症そして神経変性を惹起するかを解明するため、WT マウス由来のニューロンに対する WT、DKO 初代培養グリアの作

用を検討すべく、ニューロンの初代培養技術を、宮崎大学医学部の高宮考悟研究室に赴いて習得した。現在、ガングリオシド欠損マウス脳を用いて検討を開始した。

これらの所見を総合して、ガングリオシド欠損グリア細胞は明らかに機能異常が認められた。また、現在ガングリオシド欠損によって惹起されるグリア細胞内のシグナル伝達や、細胞間シグナル伝達の異常の詳細な解析が進行中である。

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10件)

1. Yuhsuke Ohmi, Yuki Ohkawa, Yoshio Yamauchi, Orié Tajima, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa: Essential Roles of Gangliosides in the Formation and Maintenance of Membrane Microdomains in Brain Tissues. *Neurochem Res.* 37(6), 1185-91, 2012. 査読有り

2. Koji Nishiguchi, Tetsuhiro Yasuma, Daisuke Tomida, Makoto Nakamura, Kohei Ishikawa, Masato Kikuchi, Yuhsuke Ohmi, Toshimitsu Niwa, Nobuyuki Hamajima, Koichi Furukawa, and Hiroko Terasaki: C9-R95X Polymorphism in Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 53(1), 508-12, 2012. 査読有り

3. Koichi Furukawa, Yuhsuke Ohmi, Yuki Ohkawa, Noriyo Tokuda, Orié Tajima, Keiko Furukawa: Molecular mechanisms for the regulation of nervous systems with

glycosphingolipids. *Seikagaku.* 83(3), 169-173, 2011. 査読有り

4. Yuki Ohkawa, Yuhsuke Ohmi, Orié Tajima, Yoshio Yamauchi, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa: Wisp2/CCN5 up-regulated in the central nervous system of GM3-only mice facilitates neurite formation in Neuro2a cells via integrin-Akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 411(3), 483-489, 2011. 査読有り

5. Koichi Furukawa, Yuhsuke Ohmi, Yuki Ohkawa, Noriyo Tokuda, Yuji Kondo, Orié Tajima, Keiko Furukawa: Regulatory mechanisms of nervous systems with glycosphingolipids. *Neurochemical Research.* 36(9), 1578-1586, 2011. 査読有り

6. Yuhsuke Ohmi, Orié Tajima, Yuki Ohkawa, Yoshio Yamauchi, Yasuo Sugiura, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa: Gangliosides are essential in the protection of inflammation and neurodegeneration via maintenance of lipid rafts: elucidation by a series of ganglioside-deficient mutant mice. *J Neurochem.* 116(5), 926-935, 2011. 査読有り

[学会発表] (計5件)

Yuhsuke Ohmi: Roles of gangliosides in the regulation of lipid rafts. The 5th Nagoya Global Retreat, Obu,

Aichi, Feb 1-2 2013,

大海雄介:脳内環境におけるガングリオシド糖鎖の分別的役割の解明。新学術領域研究「脳内環境：恒常性維持機構とその破綻」冬の班会議（2013年1月16-17日 京都）

大海雄介:脳内環境におけるガングリオシド糖鎖の分別的役割の解明。新学術領域研究「脳内環境：恒常性維持機構とその破綻」夏のワークショップ（2012年7月23-24日 仙台）

大海雄介:ガングリオシドは神経炎症と変性の抑制に必須である。第9回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム（2011年11月24-25日 名古屋）

大海雄介、田島織絵、大川祐樹、山内祥生、古川圭子、古川 鋼一:Roles of gangliosides on the maintenance of integrity of lipid rafts. 第84回日本生化学会大会合同大会（2011年9月21-24日 京都）

〔図書〕（計6件）

古川鋼一、大海雄介、大川祐樹、古川圭子、田島織絵：神経疾患と糖鎖の関わり、Annual Review 神経 2013（株）中外医学、pp37-45, 2013

古川鋼一、浜村和紀、大川祐樹、大海雄介、古川圭子：糖鎖修飾によるシグナル伝達の制御、実験医学増刊 30（5）「シグナル伝達研究最前線 2012 編集：井上純一郎、武川睦寛、徳永文稔、今井浩三 翻訳後修飾，解析技術，疾患との関連から創薬応用まで」111-116，

2012

古川鋼一、大海雄介、大川祐樹、徳田典代、古川圭子：GM3 合成酵素欠損症、日本臨床 別冊 新領域別症候群シリーズ 20「先天代謝異常症候群」617-620, 2012

古川鋼一、大海雄介、大川祐樹、徳田典代、古川圭子：糖脂質糖鎖による脳神経系統御の分子メカニズム、生化学 83(3)169-178, 2011

古川鋼一、大海雄介、大川祐樹、徳田典代、田島織絵、古川圭子：生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール. 第三章 糖鎖関連遺伝子ノックアウトマウス、エル・アイ・シー 303-308. 2011.

古川鋼一、大海雄介、大川祐樹、徳田典代、田島織絵、古川圭子：ガングリオシド欠損と神経機能障害、「脳21」、金芳堂 50-54, Vol. 14, No. 1, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大海 雄介 (OHMI YUSUHKU)
名古屋大学・医学系研究科・特任助教
研究者番号：10584758

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし