

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860234

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症発症に関わるミクログリアの活性化とケラタン硫酸の決定的相関

研究課題名(英文)Keratan sulfate is involved in the pathogenesis of ALS

## 研究代表者

大籠 友博(Ohgomori, Tomohiro)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80584755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らはケラタン硫酸が神経可塑性の制御に重要であることを報告してきた。最近このケラタン硫酸がALSの発症後、一部の活性化ミクログリア上に発現してくることを見出している。そこで、本研究ではこのケラタン硫酸プロテオグリカン(KSPG)のコアタンパク質を同定した。ショットガンプロテオミクス法による同定は困難であったため、アレイ解析により候補分子を絞り込んだ。骨髄系幹細胞マーカーとして知られるCD34が候補分子の1つであることを明らかにした。また申請者はALS病態進行に伴うミクログリアの形態解析も行った。その結果、病態形成過程におけるミクログリアは4種に大別されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that keratan sulfate (KS) is important for the regulation of neuronal plasticity. Recently, we found that KS also expressed in a subpopulation of microglia. In this study, we identified one candidate of KSPG core proteins using an ALS mouse model and cultured cells. CD34 which is well known as the hematopoietic stem marker, could be modified by KS, and it was upregulated in the spinal cord of ALS model mice.

We also performed morphometric analysis of microglia during the pathogenesis of ALS. Microglia is a kind of immune cells in the central nervous system and activated by the cell autonomous and non-cell autonomous manners during the pathogenesis of neurodegenerative disease, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Here, we examined the morphology of microglia during the pathogenesis using an ALS mouse model SOD1G93A transgenic mice (a model of ALS)Tg, and microglia were categorized into four groups.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 ミクログリア ケラタン硫酸 形態学

### 1. 研究開始当初の背景

神経組織の細胞外微小環境は他の組織と大きく異なっている。他の組織の細胞外マトリックスがタンパク質中心であるのに対し、神経組織ではプロテオグリカン、ヒアルロン酸など長大な糖鎖を含む分子で占められる。プロテオグリカンはコアタンパク質に2糖の繰り返し構造を持つ長大な糖鎖(グリコサミノグリカン; GAG)がついたもので、中でもコンドロイチン中産(CS)鎖がついたコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)が代表的なプロテオグリカンである。CS分解酵素は脊髄損傷後の機能回復を促進することから細胞外微小環境のCSPGの軸索再生阻害機能が注目されている(Nature 416 636-640, 2002)。申請者は本研究開始前までの成果として、中枢神経に発現したグリコサミノグリカンの一種であるケラタン硫酸(KS)を分解する酵素の投与は、脊髄損傷後の機能回復を促進することを明らかにした(J. Neurosci. 31 17091-17102, 2011)。このように外傷性神経障害においてKSPGは神経ネットワークの再構築を阻害する効果を持つことが明らかにされた。神経変性疾患においても細胞外微小環境の破綻が起こるが、神経変性疾患におけるKSPGの役割は明らかにされていない。本研究の目的は神経変性疾患におけるKSの役割を解明することにある。研究対象とする神経変性疾患として申請者は筋萎縮性側索硬化症(ALS)を選択した。ALSは中枢神経において運動ニューロンが選択的に傷害を受け、極めて早く進行する神経変性疾患である。日本国内には6000人のALS患者があり、毎年新たに2000人がALSを発症するといわれている。現在までに数種の遺伝子変異がALSの発症に関わるとの報告があるが、決定的な原因はいまだ解明されていない。研究開始までの成果として申請者はまず最も劇症型の症状を持ち長年のALS研究に用いられてきた変異型SOD1 G93Aトランスジェニックマウスを用いて研究を進めた。抗KS抗体を用いた免疫染色によって、ALSを発症したマウスの脊髄組織内では、Iba1陽性の活性化ミクログリアにおいてKSの発現量が上昇することを明らかにした。申請者は研究開始前までにALSの病態形成におけるKSの役割を明らかにするため、KSを欠損したALSマウスの作成に取り組んだ。研究開始時点で申請者が所属していた研究室では中枢神経組織のKS合成に必須の糖転移酵素であるGlcNAc6ST-1の欠損マウスを既に作成していた。実際このマウスの脊髄内では、脊髄損傷時におこるKSの過剰産生が起こらない(J. Neurosci. 30 5937-5947, 2010)。そこで当該マウスと変異型SOD1 G93Aトランスジェニックマウスとの交配実験を行ってきた。予想通り、このマウスの脊髄ではKSの発現が完全に消失していた。このKSを持たないALSマウスと通常のALSマウスの表現型を比較することによって

ALSの病態形成におけるKSの役割を明らかにできるものと考えた。

### 2. 研究の目的

ALS発症におけるミクログリアの活性化とKSの発現には強い関連性があることが明らかである。実際、これまでもアルツハイマー病や牛海綿状脳症などでもミクログリア上にKSが発現するのを報告されている(J. Neurosci. 28 5312-5320, 2008, Science 277 94-98, 1997)。さらに興味深いことに、網膜に存在するミクログリアでは光刺激依存的な活性化、KSの発現量が高い相関関係を持つことが報告されている(Invest. Ophthalmol Vis Sci 42 3301-3310, 2001)これらの報告はミクログリアの活性化とKSに決定的な相関があることを裏付けるものである。ところがこれらの研究では、KSは単なる活性化ミクログリアのマーカーとしてとらえられており、生物学的意義については不明であった。本申請研究開始前までに、中枢神経組織内のKS合成を特異的に阻害できるGlcNAc6ST-1欠損マウスを用いて、脊髄損傷後に過剰に産生されるKSPGが強力な軸索再生阻害因子として働き、機能回復を遅延させることを明らかにしてきた。そこで、このマウスを利用してミクログリア上のKSの生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

主に変異型SOD1 G93AトランスジェニックマウスとGlcNAc6ST-1を欠損させた変異型SOD1 G93Aトランスジェニックマウスの表現型・遺伝子発現レベルの比較検討を行い、有意な差が認められる点を探索する。ミクログリアに発現するKSPGの実態をつきとめ、その生物学的機能をIn vitro実験系で明らかにする。

### 4. 研究成果

1) KS欠損型ALSマウスの表現型についてALSマウスとKS欠損型ALSマウスの表現型を生存率、体重変化、10rpm速度のRotarodテスト、15rpm速度のRotarodテストで比較検討した。その結果いずれの評価系においてもALSの病態形成が通常のALSモデルマウスに比べて早く進行することが明らかになった(Hirano K, Ohgomori T, PLoS One, 2013, 図1)このことから神経変性疾患(特にALS)においてKSは神経保護的な役割を果たしていることが強く示唆された。

2) KSの欠損は抗炎症性ミクログリアを誘導を抑制する

中枢神経組織内の活性化されたミクログリアには、その活性化パターンが2つ存在するといわれている。1つは炎症性サイトカインを分泌し神経細胞死を誘導する炎症性ミクログリア(M1型)、もう1つは抗炎症性サイトカインを分泌し神経細胞の生存を促進す

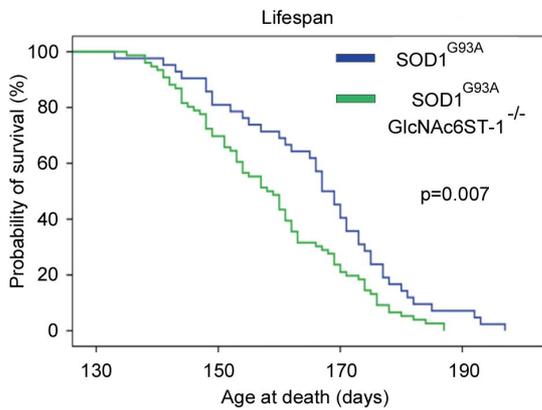
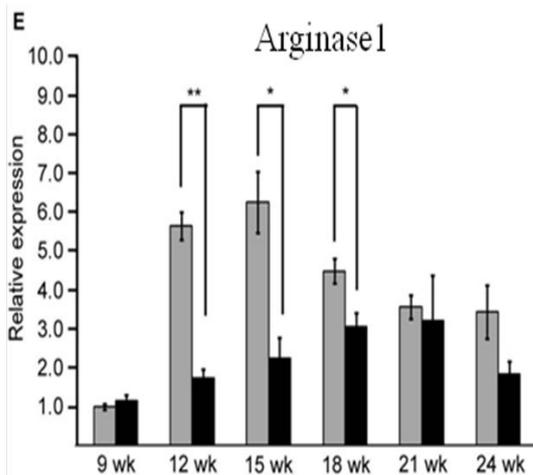


図1 KS欠損によるALSの悪化

る抗炎症性ミクログリア(M2型)である。ALSの病態形成の極めて早い時期にはM2ミクログリアが一過的に発現上昇し、病状が悪化するにつれてM1型ミクログリアが急速に増加するようになる。これらのミクログリアは数種のマーカー遺伝子の発現量によって区別することができる(Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T et al, 2013)。KSは活性化ミクログリアにのみ発現していることから、KSとミクログリアの活性化には深い関連性があると考えた。各ミクログリアのマーカー遺伝子の時期依存的な発現パターンを調べたところ、KS欠損型ALSマウスの脊髄内では病態形成の早期におこるM2型ミクログリア遺伝子の誘導が特異的に阻害されていることを明らかにした(Hirano K, Ohgomori et al, 2013、図2)これらの結果はミクログリアの抗炎症的な活性化と決定的な関連性がある



ことを示している。  
図2 KS欠損によるM2遺伝子の発現抑制

3) ミクログリアに発現するKSPGの同定  
申請者は本研究とは別に進行する研究において、イオンスプレー型質量分析装置(ESI-MS)を用いたショットガンプロテオミクス法によって、軸索再生を阻害するKSPGの実態を同定することに成功している。そこで本研究では同様の手法を用いてミクログリアに発現するKSPGの同定を試みた。抗KS

抗体(5D4)をCNBr活性化Sepharoseに固定化し、ALSマウス脊髄から得られた抽出液を反応させた。カラムを洗浄後ジエチルアミン溶液を用いて溶出させた。各フラクションを抗KS抗体5D4でイムノプロットしたところ、溶出画分にKSPGが得られていることが明らかになった(図3)。そこでこの画分に含まれるタンパク質をショットガンプロテオミクス法で網羅的に同定した。一方で、KSが見られない野生型マウスおよびKS欠損型ALSマウスを用いて同様の画分を調整し、ショットガンプロテオミクスによって網羅的にタンパク質を同定した。3種の候補分子リストを比較して、ALSマウスにおいて高スコアで特異的に同定される分子を抽出した。いくつかの特異的な分子は同定できるものの、いずれも高いスコアを得ることができなかった。

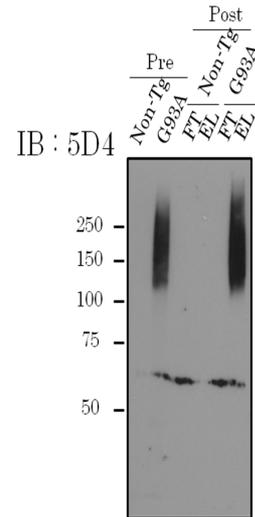


図3 抗体カラムによるKSPGの精製

4) ミクログリア上KSPGの候補分子の推定とIn vitro発現系を用いたKS修飾糖タンパク質を標的とする場合、ショットガンプロテオミクス法ではいくつかの課題がある。そのうち最も大きな課題は、糖鎖修飾によってペプチド鎖の分子量が大きく変動するため、データ解析ソフトMASCOT上で擬陽性もしくは同定不能となることである。そこで、予め取得していたマイクロアレイ解析のデータから候補分子を推定することにした。このマイクロアレイ解析データは野生型マウス、ALSマウス、KS欠損型マウス、KS欠損型ALSマウスの脊髄組織から得られたmRNAを用いて行われたものである。絞り込みのクリテリアとして下記を用いた。

野生型マウスとALSマウスの比較で有意に増加している。

KS欠損マウスとKS欠損型ALSマウスの比較で有意に増加している。

野生型マウスとKS欠損マウスでは変化がない。

以上の条件を満たしており、かつイムノプロットによる分子量が150kDa~250kDa周辺に観察される分子として、CD34に着目した。マウスTotal RNAからCD34遺伝子の全長をpcDNA3.1 myc his Aベクターにクローニングした。本プラスミドをKS産生能があるCOS-1細胞にトランスフェクションした。一定時間培養後、細胞の可溶化液からTALON metal affinityゲルを用いてHis tag融合型タンパ

ク質を精製し、抗 myc 抗体、抗 KS 抗体 5D4 でイムノプロットした。抗 myc 抗体を用いたイムノプロットでは予想された分子量よりもわずかに小さい 120 ~ 150kDa のバンドとして見られた。しかしながらこの条件では精製された CD34 myc his タンパク質上に KS 鎖の発現は見られなかった。ALS 発症では GlcNAc6ST-1 や KSGal6ST などの KS 合成酵素の発現量が有意に増加することも判明している (Hirano K, Ohgomori et al, 2013)。そこで、COS-1 細胞に対して CD34 myc his ベクターと同時に KS 合成酵素遺伝子をコードする pCMV6/b3GnT7、pCMV6/GlcNAc6ST-1、pCMV6/b4GalT4、pCMV6/KSGal6ST プラスミドを同時にトランスフェクションした。前述と同様に His tag 融合タンパク質を精製し、抗 myc 抗体、抗 KS 抗体 5D4 でイムノプロットした。抗 KS 抗体 5D4 によるイムノプロットによって 150kDa ~ 250kDa の位置に強い反応性が認められた (図 4)。これらの発現実験をマウス初代培養ミクログリアでも行い、同様の結果を得た。CD34 は大量の O 型糖鎖を有することから、KS 修飾も O 型糖鎖上に起こる可能性が考えられる。そこで、KS 合成酵素群と同時に Core 2 O 型糖鎖の合成を促進する Gcnt-1 遺伝子を追加で導入する実験を行った。精製された His tag 融合型 CD34 に対する、抗 KS 抗体 5D4 の反応性を調べたところ、その分子量が顕著に増大していることが分かった。

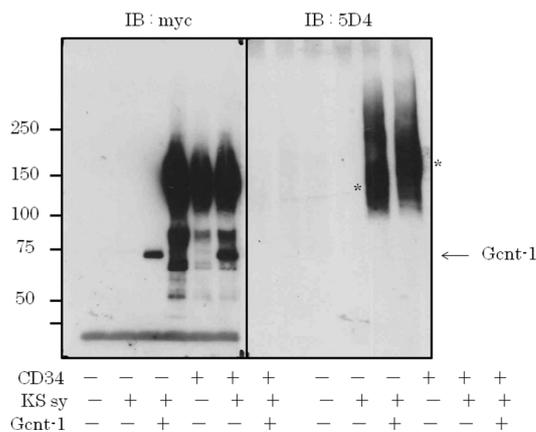


図 4 CD34 と KS 合成酵素群の強発現実験

#### 5) In vivo における KSPG の発現

抗 CD34 抗体による組織染色を行い、KS やミクログリアマーカー Iba1 との局在が一致するかどうかを調べた。野生型マウスの脊髄組織では CD34 が血管内皮細胞に選択的に発現していた。一方で、ALS マウスでは血管内皮細胞の他に一部ミクログリアにも発現していた。抗 KS 抗体 5D4、抗 CD34 抗体 (MEC34 および RAM34)、抗 Iba1 抗体を用いた 3 重染色を行ったところ、KS 陽性ミクログリアに CD34 の発現が確認された。興味深いことにすべてのミクログリアが CD34、KS2 重要性になるわけではなく、CD34 陽性 / KS 陰性ミクログリアが一定量存在することが分かった。ま

た、未固定の細胞における CD34 や KS の発現を調べるために、Percoll 濃度勾配法を用いてミクログリアの濃縮画分を取得し、抗 KS 抗体、抗 CD34 抗体 (RAM34) を用いたフローサイトメトリー解析を行った。その結果、野生型マウスに比べて ALS マウスでは強い抗 CD34 抗体 / 抗 KS 抗体反応性が認められた。

#### 6) Invitro 培養系を用いたミクログリア上 KS の機能解析

単離された系においてミクログリア上 KS の機能を解析するために、初代培養ミクログリアを使用した。哺乳 1 日齢のラット脳から分散培養したミクログリアは KS を発現している。この KS は LPS およびインターフェロンで刺激することによって増大する。ラットミクログリアに対して KSGal6ST siRNA を導入しノックダウンを行った。抗 KS 抗体によるイムノプロットでは、その反応性が完全に消失した。培養上清中に含まれる炎症性サイトカイン IL-1、TNF の濃度は LPS およびインターフェロンによる刺激で有意に増加したが、KSGal6ST のノックダウンによってさらに亢進することが判明した。また、回収した細胞から mRNA を抽出し iNOS に対する定量 PCR を行ったところ、その発現量も同様の傾向を示すことが明らかになった (Matsui H, Ohgomori T et al, 2013, 図 5、図 6)。この結果はミクログリアに発現した KS が炎症性サイトカインの産生を負に制御する可能性を示している。

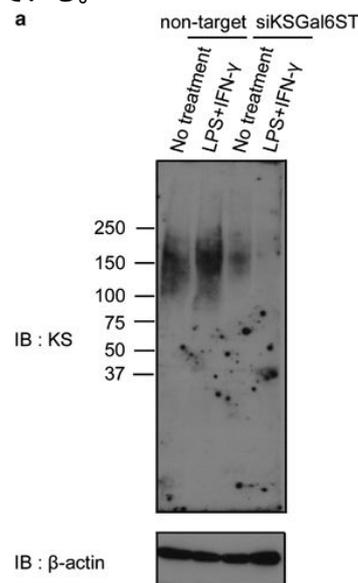


図 5 KSGal6ST の発現抑制効果

#### 7) ALS 病態形成過程におけるミクログリアの形態学的解析

申請者は 2013 年 10 月より所属が変更になった。新所属では解剖学講座に所属したため、ALS の病態形成過程を解剖学的に評価する研究に方向性をシフトした。2013 年までの研究によってミクログリアに発現する KS は ALS の病態形成早期から見られ、これまで知られ

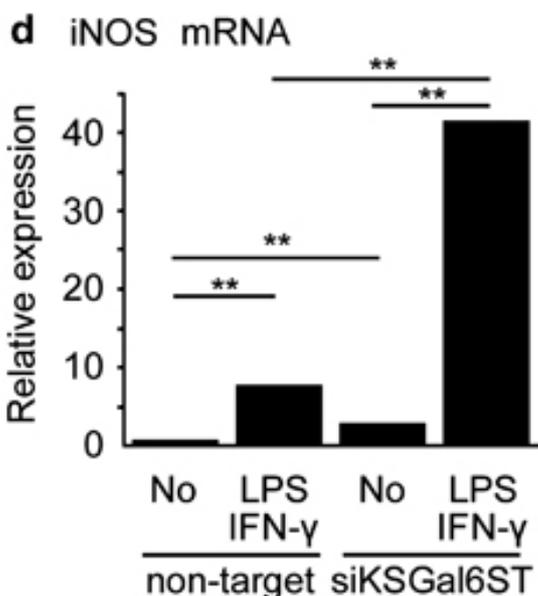


図6 KSGal6ST 発現抑制による炎症の亢進

ていた活性化ミクログリアのマーカー分子よりも早い段階から観察されることが判明していた。ミクログリアは活性化によってその形態が著しく変化するが、いつ形態変化が開始されるのか、形態変化が持つ生物学的な意味についてはほとんど議論されてこなかった。そこで、ALS の発症前・早期・進行期に分けて Iba1 で染色されるミクログリアの形態をニューロトレーシングシステム Neurolucida を用いて詳細に解析した。その結果、数種の形態学的パラメーターが ALS 発症前から変化することを見出した（未発表データ）。

#### 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 3 件)

Yamada J, Ohgomori T, Jinno S. Perineuronal nets affect parvalbumin expression in GABAergic neurons of the mouse hippocampus. *Eur J Neurosci.* 41, 368-378, 2015

Matsui H, Ohgomori T, Natori T, Miyamoto K, Kusunoki S, Sakamoto K, Ishiguro N, Imagama S, Kadomatsu K. Keratan sulfate expression in microglia is diminished in the spinal cord in experimental autoimmune neuritis. *Cell Death & Dis.* 4 e946, 2013  
Co-first author

Hirano K, Ohgomori T, Kobayashi K, Tanaka F, Matsumoto T, Natori T, Matsuyama Y, Uchimura K, Sakamoto K, Takeuchi H, Hirakawa A, Suzumura A, Sobue G, Ishiguro N, Imagama S, Kadomatsu K. Ablation of keratan sulfate accelerates early phase

pathogenesis of ALS. *PLoS One* 8(6) e66969, 2013

Co-first author

〔学会発表〕(計 5 件)

大籠友博、山田純、門松健治、神野尚三 ALS と軸索輸送傷害の関連性 第 37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 11 日～13 日 横浜市

Tomohiro Ohgomori, Shozo Jinno Molecular heterogeneity of perineuronal nets in the thalamic reticular nucleus of mice, with reference to the topographic organization JSCR SFG joint meeting Glycans in Neuroscience 2014 年 11 月 16 日 ホノルル

大籠友博、神野尚三 視床網様核におけるペリニューロナルネットのヘテロな分布様式 第 120 回日本解剖学会総会 2015 年 3 月 21 日～23 日 神戸市

大籠友博、平野健一、小林和克、内村健治、平川晃弘、今釜史郎、門松健治 Ablation of keratan sulfate accelerates early phase pathogenesis of ALS 第 36 回日本神経科学大会

大籠友博、神野尚三 第 119 回日本解剖学会総会 ALS 病態モデルにおけるニューロン・グリア連関をシナプスレベルで明らかにする 2014 年 3 月 27 日～29 日 下野市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/biochem/>

<http://www.ana2.med.kyushu-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大籠友博 (名古屋大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・研究員→九州大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・助教)

研究者番号: 80584755

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし