

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04681

研究課題名(和文) ガングリオシド欠損による脳神経系障害の解析と糖脂質補充による治療法の研究

研究課題名(英文) Study on neurological disorder caused by ganglioside-deficiency and therapeutics by glycolipid supplement

研究代表者

浅野 雅秀 (Asano, Masahide)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：50251450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳内に豊富に存在するガングリオシドの合成起点となるラクトシルセラミド(LacCer)の合成酵素は、ガラクトース転移酵素である4GalT-5と4GalT-6の両方が担うことを明らかにした。脳神経特異的4GalT-5と4GalT-6のダブル欠損マウスを作製したところ、成長遅延と運動失調を示して生後4週齢まで死亡した。ガングリオシドが消失することにより神経細胞が未熟となり、神経細胞の増殖因子(NGF)のシグナル伝達が減弱した。また、脊髄の軸索とミエリン鞘の形成が不全となり、運動失調が生じたと考えられた。本研究により神経系におけるガングリオシドの重要な機能を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の脳内には様々なガングリオシドが豊富に存在するが、ガングリオシドを完全に欠損させた場合の神経系に与える影響については不明な点が多かった。本研究でガングリオシドを欠損させたマウスを作製することに成功し、ガングリオシドの神経系での機能の一端を明らかにした。ヒトでも一部のガングリオシドが欠損したり、逆に異常に蓄積したりする疾患が知られているので、それらの病態解明や治療法の開発に有用なモデルマウスを開発できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：We clarified that B4galt5 and B4galt6 genes were responsible for Lactosylceramide (LacCer) synthase in the initial biosynthetic step of gangliosides abundantly present in the brain. Neuron-specific B4galt5 and B4galt6 double-deficient mice died before 4 weeks of age with growth retardation and ataxia. The ganglioside-deficiency caused immature neurons and reduced signal transduction through NGF. Furthermore, axonal and myelin formation were remarkably impaired in the spinal cord, resulting in motor ataxia. We could elucidate important functions of gangliosides in the nervous system.

研究分野：実験動物学

キーワード：ガングリオシド LacCer合成酵素 ガラクトース転移酵素 神経細胞 軸索 ミエリン鞘

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳内には様々な種類の ganglioside が存在し、それらの発現は発達段階で大きく変化するので、各 ganglioside は脳において固有の機能があると思われる。しかし、一部の ganglioside を欠損する KO マウスは、いずれも脳神経系に重篤な異常は見られず、他の ganglioside が存在すればその機能はある程度補完されることが示唆された。例えば、複合型 ganglioside が完全に欠損して GM3 と GD3、GT3 しか合成できない GM2/GD2 合成酵素欠損マウスは、一部にワーラー変性のような軸索変性とミエリン鞘の形成不全が観察されたが、外見上異常は認められず生存した (Sheikh *et al.* PNAS, 1999)。さらに、GM3 以外の ganglioside をすべて欠損する GM2/GD2 合成酵素と GD3 合成酵素のダブル欠損マウスでも、音刺激や機械的痛覚刺激に対する異常反応は見られたが、離乳期までは正常に成長した (Kawai *et al.* JBC, 2001, Inoue *et al.* JBC, 2002)。しかし、スフィンゴ糖脂質合成の最初のステップであるグルコシルセラミド (GlcCer) 合成酵素の脳神経特異的欠損マウス (完全破壊マウスは胎生致死) は生後すぐに運動失調を示し、3 週齢以内に死亡することが報告され、ganglioside が完全に欠損すると脳神経系に重篤な障害が生じることが示された (Jenemann *et al.* PNAS, 2005)。

ganglioside はセラミド (Cer) にグルコースが転移し、さらにガラクトースが転移したラクトシルセラミド (LacCer) がその合成起点となる (図 1)。以前にラットの脳における LacCer 合成酵素は $\beta 4\text{GalT-6}$ であると報告されていたが (Nomura *et al.* JBC, 1998)、我々の研究からマウスの初期胚では $\beta 4\text{GalT-5}$ が主要な LacCer であることを明らかにし、 $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損マウスは胎生致死を示すことを報告した (Nishie *et al.* Glycobiology, 2010)。

それでは脳神経系での LacCer 合成酵素はどうなっているのだろうか？我々は $\beta 4\text{GalT-5flox}$ マウスを作製して Nestin-Cre マウスと交配することで、脳神経特異的 $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損マウスを作製した。しかし、このマウスは外見上に異常は見られず、脳内の LacCer 合成酵素活性は野生型の約半分にしか減少しなかった。同じ頃、名古屋大学の古川先生らが $\beta 4\text{GalT-6}$ 欠損マウスを作製したが、このマウスも外見上異常は見られなかった (Tokuda *et al.* Glycobiology, 2013)。そこで、この $\beta 4\text{GalT-6}$ 欠損マウスを導入し、我々の脳神経特異的 $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損マウスとのダブル欠損マウス (以下ダブル欠損マウス) を作製した。

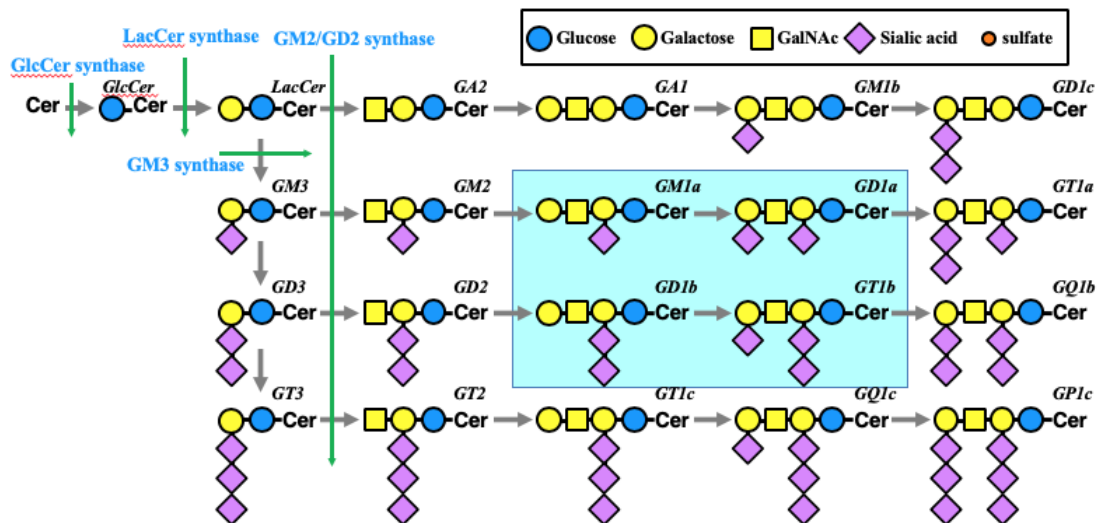


図1 スフィンゴ糖脂質の合成経路

2. 研究の目的

脳神経系において $\beta 4\text{GalT-5}$ あるいは $\beta 4\text{GalT-6}$ を欠損しても外見上の異常は見られなかったので、ダブル欠損マウスの解析を行い、脳神経系における LacCer 合成酵素の遺伝子を明らかにし、ganglioside の機能を解明する。さらに脳に豊富に存在する GM1 や GM3 などの ganglioside をダブル欠損マウスに投与して、治療実験を試みる。

3. 研究の方法

(1) マウスの作製

$\beta 4\text{GalT-5}$ 遺伝子のエキソン 4-7 を loxP で挟んだターゲティングベクターを相同組換えにより ES 細胞に導入し、薬剤耐性マーカーのネオマイシン耐性遺伝子を除いたあと、 $\beta 4\text{GalT-5flox}$ マウスを作製した。神経幹細胞で Cre を発現する Nestin-Cre マウスと交配することにより、脳神経特異的 $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損マウスを作製した。また、 $\beta 4\text{GalT-6}$ 欠損マウスは名古屋大学の古川先生より分与いただいた。この両者を交配することにより脳神経特異的ダブル欠損マウスを作製した。

(2) GlcCer と LacCer 合成酵素活性の測定

脳の抽出液を用いて GlcCer と LacCer の合成酵素活性を測定した。前者は C6-NDB-Cer の基質

に UDP-Glc を，後者は C6-NDB-GlcCer の基質に UDP-Gal を加えて酵素反応を行った。反応生成物を HPLC で定量してそれぞれの酵素活性を算出した。

(3) スフィンゴ糖脂質の解析

脳の抽出液からスフィンゴ糖脂質をクロロフォルム/メタノール液に抽出し，薄層クロマトグラフィー (TLC) で展開した。

(4) 組織学的解析

脳や脊髄を4%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定し，凍結切片あるいはパラフィン切片を作製した。骨を含む脊髄はTechnovit法で切片を作製した。切片はKluver-Barrera染色あるいは種々の蛍光抗体を用いて免疫染色を行った。電子顕微鏡用にはサンプルを2.5%グルタルアルデヒド/2%PFAで固定して，超薄切片を作製した。

(5) Neurosphere (神経幹細胞) の解析

胎生 14.5 日の胎仔脳より大脳基底核原基を単離し，Neurosphere 用の培養液で培養した。7 日ごとに浮遊している Neurosphere を Accutase により分散させて植え継ぎを行った。神経細胞への分化は，神経分化用培養液で低接着プレートを用いて培養し，10 日後に神経突起の観察を行った。

4. 研究成果

(1) 脳での LacCer 合成酵素遺伝子について

脳神経系において $\beta 4\text{GalT-5}$ あるいは $\beta 4\text{GalT-6}$ を欠損しても外見上の異常は見られなかったため，脳神経特異的ダブル欠損マウスを作製した。このダブル欠損マウスは生後 2 週齢から顕著な運動失調を示し，成長が遅延して (3 週齢で野生型の約 50% の体重)，4 週齢までにすべて死亡することがわかった (図 2)。脳における LacCer 合成酵素活性を測定したところ，脳神経特異的 $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損マウスでは約 40%， $\beta 4\text{GalT-6}$ 欠損マウスでは約 50% の残存活性が検出された。しかし，ダブル欠損マウスでは完全に活性が消失していた。さらに TLC により脳での ganglioside の解析を行ったところ，脳に豊富に存在する GM1a, GD1a, GD1b, GT1b などの ganglioside が消失していた。以上のことからマウスの胎仔では $\beta 4\text{GalT-5}$ が主要な LacCer 合成酵素であったが (Nishie *et al.* Glycobiology, 2010)，マウスの脳では $\beta 4\text{GalT-5}$ と $\beta 4\text{GalT-6}$ の二つが LacCer 合成酵素を担っていることが明らかとなった。一方，LacCer の一つ前の GlcCer 合成酵素活性は，ダブル欠損マウスと野生型マウスとで差がなかったが，ダブル欠損マウスでは LacCer が合成されないために，GlcCer が 3 倍程度蓄積していた。

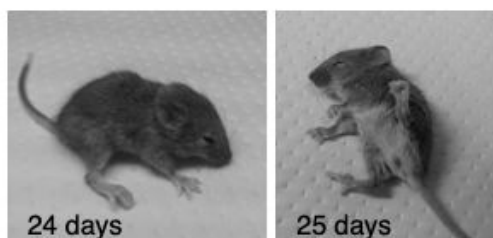
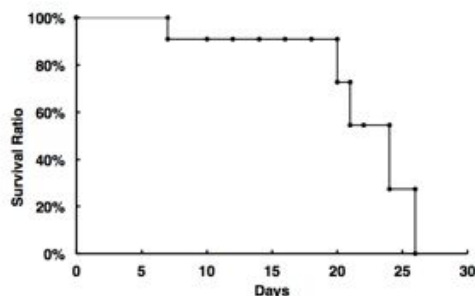


図2 ダブル欠損マウスの生存曲線と運動失調

(2) ダブル欠損マウスの大脳皮質の神経細胞は未熟である

ダブル欠損マウスの脳は体重に比例して小さかったが，光学顕微鏡レベルでは異常は検出できなかった。そこで電子顕微鏡で観察すると，ダブル欠損マウスの神経細胞は細胞質が未発達 (核の距離が近い) であり，核の周りの粗面小胞体の形成が不全で，タンパク質合成阻害剤を用いた実験からもタンパク質合成が低下していることがわかった。未熟な神経細胞のマーカーである Tbr1 で大脳皮質を染色すると，未熟な神経細胞は野生型では第 5 層だけに存在したが，ダブル欠損マウスではさらに上層部にも存在した。さらに，成熟神経細胞で形成されるペリニューロナルネット (PNN) を WFA で染色すると，ダブル欠損マウスではその形成が不全であった。以上のことからダブル欠損マウスの神経細胞は未熟な状態にあることが分かった。

(3) Neurosphere (神経幹細胞) の解析

ダブル欠損マウスと野生型マウスの胎仔の脳から調製した Neurosphere (神経幹細胞) の性質を比較した。両者の増殖には差がなかったが，いろいろな細胞間基質に対する結合能を測定したところ，ラミニンに対する結合能が顕著に低下していた。次に Neurosphere から神経細胞に分化をさせて神経突起の形成を観察した。ダブル欠損マウスの神経細胞は神経突起の伸長や分枝が顕著に低下していた。神経成長因子 (NGF) からの増殖シグナルは，その受容体 TrkA と下流の Lyn のリン酸化によって細胞内に伝えられるが，ダブル欠損マウスの神経細胞ではこれらのリン酸化が減弱していた。脳内の主要な ganglioside である GM1a とラミニンは *in vitro*

で結合することが知られており、ダブル欠損マウスでは GM1a を含む ganglioside が欠損しているため、NGF からの増殖シグナルが減弱し、神経突起の伸長が低下したと考えられた。

(4) 軸索とミエリン鞘の形成不全

大脳皮質での軸索 (NF による染色) とミエリン関連タンパク質である MBP, MAG, MOG, PLP の局在を免疫染色で解析した。ダブル欠損マウスでは MOG と PLP が軸索にまったく局在しておらず、MAG はドット状のシグナルが検出された。このドット状のシグナルはオリゴデンドロサイトの細胞体に局在していることがわかった。次に脊髄での解析を行ったところ、軸索がたいへん細く、4つのミエリン関連タンパク質はいずれも軸索の周りに局在していなかった(図3左)。そこで電子顕微鏡での観察を行ったところ、軸索は円心率が低く、大きく変形しており、ミエリン鞘の形成不全が見られた。さらに、ミエリン鞘が巻いていない細い軸索が多数散在していた(図3右)。以上のことから脊髄での神経伝達が障害されており、四肢の運動失調が生じたと考えられた。MAG は GD1a や GT1b などの ganglioside と結合することが知られているため、ダブル欠損マウスの神経細胞ではこれらの ganglioside が欠損しているために、MAG が軸索の周りに局在できない可能性が考えられた。

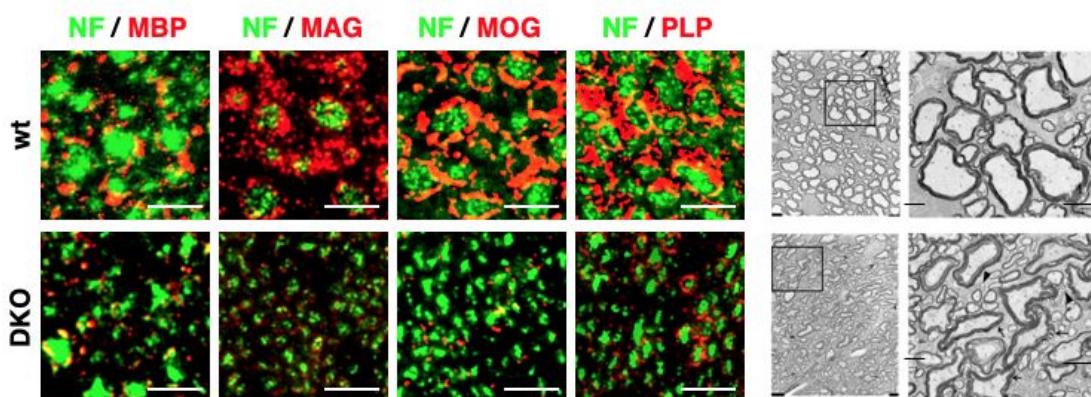


図3 ダブル欠損マウス脊髄の免疫染色と電顕

(5) まとめ

以上のようにダブル欠損マウスの解析から脳内に存在する ganglioside は神経細胞の増殖と成熟に必須であり、NGF のシグナル伝達に重要な役割を果たしていることがわかった。さらに、おそらく MAG との結合が障害されるために、軸索とミエリン鞘の形成が不全となり、運動失調を生じて離乳前に死亡することが明らかとなった。このように当初の想定以上に脳内での ganglioside の機能を明らかにすることができて、PLOS Genetics に論文を発表した。なお、論文の revise 時に多くの追加実験を求められたため、個々の ganglioside の機能を解明するために、個別の ganglioside を投与する治療実験まではできなかった。この研究については今後に進めていくことにしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoshihara, T., Satake, H., Nishie, T., Okino, N., Hatta, T., Otani, H., Naruse, C., Suzuki, H., Sugihara, K., Kamimura, E., Tokuda, N., Furukawa, K., Furukawa, K., Ito, M., and Asano, M. Lactosylceramide synthases encoded by B4galt5 and 6 genes are pivotal for neuronal generation and myelin formation in mice. *PLOS Genetics* 14: e1007545, 2018.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007545>

〔学会発表〕(計 5 件)

吉原亨, 八田稔久, 佐武寛之, 古川鋼一, 浅野雅秀「ラクトシルセラミド合成に関わるガラクトース転移酵素群欠損マウスの脳の組織学的解析」第 63 回日本実験動物学会総会, ポスター発表, 2016 年 5 月, 川崎

吉原亨, 八田稔久, 佐武寛之, 杉原一司, 沖野望, 伊藤信, 古川鋼一, 浅野雅秀「ラクトシルセラミド合成に関わるガラクトース転移酵素群欠損マウスの中枢神経系の組織学的解析」第 136 回関西実験動物研究会, 口頭発表, 2017 年 12 月, 京都

吉原亨, 佐武寛之, 西江敏和, 沖野望, 八田稔久, 大谷浩, 鈴木紘史, 杉原一司, 神村栄吉, 徳田典代, 古川圭子, 古川鋼一, 伊藤信, 浅野雅秀「ラクトシルセラミド合成に関わるガラクトース転移酵素群欠損マウスの中枢神経系の組織学的解析」第 65 回日本実験動物学会総会, 口頭発表, 2018 年 5 月, 富山

浅野雅秀「発生過程と神経系における LacCer 合成酵素の役割分担」第 19 回関西グライコサイエンスフォーラム, 招待講演, 2018 年 5 月, 大阪

吉原亨, 古川鋼一, 浅野雅秀「ラクトシルセラミド合成に関わる脳部位特異的ガラクトー

「ス転移酵素群欠損マウスの行動解析」第 66 回日本実験動物学会総会，ポスター発表，2019 年 5 月，福岡

〔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.anim.med.kyoto-u.ac.jp/research/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：吉原亨

ローマ字氏名：Toru Yoshihara

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：特定助教

研究者番号(8桁)：00401935

研究分担者氏名：成瀬智恵

ローマ字氏名：Chie Naruse

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30372486

(2)研究協力者

研究協力者氏名：杉原一司

ローマ字氏名：Kazushi Sugihara

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。