

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790899

研究課題名(和文)ギランバレー症候群患者血清中抗GM1抗体のラフト機能と構造への影響の解明

研究課題名(英文)Anti GM1 antibodies affect the function and the structure of lipid rafts

研究代表者

植田 晃広 (UEDA, AKIHIRO)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：20600703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜上には脂質ラフトというシグナル伝達分子や糖脂質が局在するマイクロドメインが存在する。我々は、抗GM1抗体が神経細胞の生存・分化に必須の神経成長因子(NGF)の高親和性受容体であるTrkを介するシグナル伝達系を障害し、それが通常ラフト上に存在するTrkの非ラフトへの局在変化によることを発見し報告した。中性スフィンゴミエリナーゼ(nSMase)はラフトの重要な構成分子であるスフィンゴミエリンを分解し、GM1の基質となるセラミドを産生するため、ラフトの機能や構造変化に重要な役割を果たしていることが予測される。我々は、抗GM1抗体により膜画分においてnSMase活性に変化があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Important signaling molecules (e.g. Trk-tyrosine kinase etc.) and glycolipids are present inside microdomains named 'lipid rafts' in the plasma membrane. Nerve growth factor (NGF) is essential for neuronal differentiation and survival in vivo and its functional receptor is Trk tyrosine kinase. Researchs to date, we have demonstrated that anti-GM1 antibodies directly influence the integrity of lipid rafts. The Trk protein is translocated from the original location of lipid rafts to non-lipid rafts fraction. Previous studies have shown that neutral sphingomyelinase (nSMase) is located in lipid rafts unlike acid sphingomyelinase in lysosomes and is postulated to be an important regulatory factor for the local contents of sphingomyelin in lipid rafts. In the present study, we found that anti-GM1 antibodies caused the alteration of nSMase activity in the plasma membrane fraction. Thus, anti-GM1 antibodies affect not only Trk protein function but also nSMase actions.

研究分野：神経内科学

キーワード：lipid rafts GM1ganglioside ガングリオシド 中性スフィンゴミエリナーゼ sphingomyelinase スフィンゴミエリン Trk 抗体

1. 研究開始当初の背景

軸索障害型 GBS 患者の多くに GM1 ガングリオシド (GM1) に対する自己抗体が認められることは以前から知られていた。細胞膜 lipid rafts はガングリオシドなどの糖脂質、スフィンゴミエリン、コレステロールで形成される細胞膜の微小領域で、「筏」のように細胞膜上に存在している。そして、この構造物中には種々例えば Trk、EGFR などの受容体型チロシンキナーゼ、GPI-anchored protein などのシグナル伝達分子も共局在しており、まさしく細胞の外部環境への交流の窓口の役割を果たす極めて重要な構造物である。我々はこれまで神経成長因子 (NGF: Nerve growth factor) の高親和性受容体である Trk がこの lipid rafts に局在すること、また同様にこの lipid rafts に存在する GM1 が Trk と直接の分子関係を持ち positive にその機能を制御している事実を見出し報告してきた (*J Neurochem* 1993; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; *J. Biol. Chem.* 1998; *Glycoconj. J.* 2000)。

一方、近年他の神経疾患例えばアルツハイマー病やプリオン病ではこれら疾患の病態発現にこの lipid rafts が重要な役割を果たしている事が報告されている。しかし、GBS においてはこの構造物の重要な構成物質 (GM1) に対する抗体が発見されているにも関わらず、lipid rafts を標的とした研究は文献上見当たらなかった。

そこで、我々は軸索障害型 GBS 患者 9 例と age-matched control 10 例の血清を用いて、これら血清が lipid rafts を介する細胞内情報伝達系に及ぼす影響を調べた。

検討項目として、まず Trk 蛋白を高発現する stable transfectant である PCtrk 細胞を作成し、

1) NGF による PC12 細胞からの神経突起伸長反応に及ぼす抗体の影響

2) NGF による Trk 蛋白自己リン酸化反応

3) Trk を始点とする細胞内キナーゼカスケードに存在する MAPK リン酸化に及ぼす影響

4) 脂質 lipid rafts 画分に局在する Trk 量への影響

5) rafts マーカー蛋白である Ras の分布状態に及ぼす血清の影響

を調べた。

その結果、

1) 患者抗体は NGF が誘導する PCtrk 細胞の神経突起伸長反応を著明に抑制した。また、抗原である GM1 で予め患者血清中の抗 GM1 抗体を吸収しておく、上記に観察された効果は消失した

2) 同様に患者血清は NGF による Trk チロシン残基の自己リン酸化反応を著明に抑制したが、対照血清にはこのような効果は見られなかった

3) MAPK リン酸化も患者血清は確かに抑制していた

4、5) 患者血清は lipid rafts 画分から non-rafts

画分への Trk 蛋白の移動を惹起させたが、rafts 画分のマーカー蛋白である Ras 蛋白の分布には全く影響を与えなかった

以上の結果より、軸索障害型 GBS 患者血清中の抗 GM1 抗体は PCtrk 細胞の NGF の Trk 受容体を介する分化・生存への重要なシグナル伝達系を障害することを証明し、本症が lipid rafts を target とした“rafts 病”である可能性を世界で初めて報告した (*Mol Cell Neurosci* 2010)。

2. 研究の目的

本研究では、本症患者に見られる抗 GM1 抗体が神経系細胞の細胞膜 lipid rafts に如何なる生物学的影響を与えるのかを、Trk のみならず lipid rafts を構成する脂質特に糖脂質、スフィンゴミエリン、コレステロールの細胞内動態に及ぼす影響と、lipid rafts 上に存在するレセプターなどの重要な分子への影響を総合的に検討することである。

3. 研究の方法

Trk の局在の変化を明らかにするため、ラットの褐色細胞腫由来細胞の PC12 細胞にヒト *trk-cTrk* を高発現させた stable transfectant である PCtrk 細胞 (PCT) を実験に使用した。

PCT を serum-free DMEM を用い、200 倍希釈となるように患者血清あるいは対照血清、また 1000 倍希釈した市販の抗 GM1 抗体も用いて反応時間を振って経時的に処理した後、ホモジネートを作成した。

subcellular protein fractionation 法で型の如く処理し、膜画分、細胞質画分、核画分を得た。

抗 Trk 抗体を一次抗体として Western blot 法を行い、ECL 化学発光法により各画分から陽性 Band を検出した。

免疫蛍光細胞染色法も実施した。

結果を分析し統計処理を行った。

一方で、Trk の局在している lipid rafts そのものに対する抗 GM1 抗体の影響も併せて検討した。

中性スフィンゴミエリナーゼ (nSMase: neutral sphingomyelinase) は lipid rafts の重要な構成分子であるスフィンゴミエリンを分解し、GM1 の基質となるセラミドを産生する。

セラミドはそれ自体が細胞内情報伝達の分子として働くだけではなく、セラミドから中性糖脂質が産生され、シアル酸が結合し酸性糖脂質である種々の GM1 をはじめとするガングリオシドが合成される。主にライソゾーム内で作用する酸性スフィンゴミエリナーゼ (aSMase: acid sphingomyelinase) は長く

研究されてきたが、近年 nSMase の研究も発展してきている。既に、PC12 細胞や小脳顆粒細胞を用いた研究により nSMase の基礎活性が NGF や脳由来神経栄養因子 (BDNF: Brain-derived neurotrophic factor) などの神経成長因子の働きに影響を及ぼすことが報告をされた。また nSMase はエンドソームの産生に関与し細胞膜と細胞内の物質輸送に關与していることも報告された。このように nSMase は、lipid rafts の構成分子のスフィンゴミエリン分解とセラミド産生、それに引き続く中性・酸性糖脂質酸性の合成を介して、細胞内外の情報伝達を担う Trk などの受容体型チロシンキナーゼなど lipid rafts 上の重要分子の働きに影響し、細胞膜と細胞内の物質輸送にもエンドソームを介して関与することで、lipid rafts を含む細胞膜のダイナミックな変化に重要な働きをしている。

このため、lipid rafts の機能や構造変化に重要な役割を果たしていることが予測される。我々は nSMase に着目し、前述の subcellular protein fractionation 法で得られた各画分の nSMase 活性の変化を調べた (Amplex[®] Red Sphingomyelinase Assay Kit, Invitrogen)。

また、抗 GM1 抗体処理後の細胞の脂質分析も行った。

4. 研究成果

抗 GM1 抗体により膜画分において nSMase 活性に変化があることを見出した。

また、抗 GM1 抗体の作用により、細胞内及び lipid rafts 内での脂質組成が大きく変化することを見出した。

この脂質組成の変化が、nSMase 活性に何らかの関連をもつのか、今後明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Asakura K, Ueda A, Mutoh T. Lipid rafts and their possible involvements in neuroimmunological disorders. *Front Biosci (Landmark Ed)* 20: 303-313, 2015. 査読有.
<https://www.bioscience.org/2015/v20/af/4310/fulltext.htm>

Fukui T, Asakura K, Hikichi C, Ishikawa T, Murai R, Hirota S, Murate KI, Kizawa M, Ueda A, Ito S, Mutoh T. Histone deacetylase inhibitor attenuates neurotoxicology of clioquinol in PC12 cells. *Toxicology* 331: 112-118, 2015. 査読有.
DOI: 10.1016/j.tox.2015.01.013.

Fukuda Y, Fukui T, Hikichi C, Ishikawa T, Murate K, Adachi T, Imai H, Fukuhara K, Ueda A, Kaplan AP, Mutoh T. Neurotrophin promotes NGF signaling through interaction of GM1 ganglioside with Trk neurotrophin receptor in PC12 cells. *Brain Res* 1596: 13-21, 2015. 査読有.
DOI: 10.1016/j.brainres.2014.11.041.

Shima S, Kawamura N, Ishikawa T, Masuda H, Iwahara C, Niimi Y, Ueda A, Iwabuchi K, Mutoh T. Anti-neutral glycolipid antibodies in encephalomyeloradiculoneuropathy. *Neurology* 82: 114-118, 2014. 査読有.
DOI: 10.1212/WNL.0000000000000015.

Asakura K, Ueda A, Shima S, Ishikawa T, Hikichi C, Hirota S, Fukui T, Ito S, Mutoh T. Targeting of aquaporin 4 into lipid rafts and its biological significance. *Brain Res* 1583: 237-244, 2014. 査読有.
DOI: 10.1016/j.brainres.2014.08.014.

〔学会発表〕(計5件)

Takao Fukui, Kunihiko Asakura, Seiko Hirota, Tomomasa Ishikawa Sayuri Shima, Akihiro Ueda, Shinji Ito and Tatsuro Mutoh. Histone Deacetylase Inhibitor Attenuates Neurotoxicity of Clioquinol. 第56回日本神経学会学術大会. 2015年5月23日. 新潟県朱鷺メッセ(新潟コンベンションセンター)・ホテル日航新潟.

水谷泰彰, 村手健一郎, 福井隆男, 廣田政古, 引地智加, 石川等真, 島さゆり, 植田晃広, 木澤真努香, 伊藤信二, 朝倉邦彦, 武藤多津郎. 抗中性糖脂質抗体が陽性であった EMRN の一例. 第140回日本神経学会東海北陸地方会. 2014年11月1日. 福井県福井市.

植田晃広, 島さゆり, 石川等真, 福井隆男, 村手健一郎, 廣田政古, 引地智加, 木澤真努香, 伊藤信二, 朝倉邦彦, 武藤多津郎. 抗中性糖脂質抗体陽性の脳脊髄根末梢神経炎(EMRN)の1例. 第19回日本神経感染症学会学術集会. 2014年9月4日. 金沢歌劇座.

島さゆり, 石川等真, 植田晃広, 新美芳樹, 岩淵和久, 武藤多津郎. 脳脊髄根末梢神経炎(EMRN)患者血清中に見出された新規抗中性糖脂質抗体. 第55回日本神経学会学術大会. 2014年5月22日. 福岡国際会議場・福岡サンパレス・福岡国際センター.

Mutoh T, Shima S, Ishikawa T, Ueda A,
Asakura K. New Autoantibodies Against Neutral
Glycolipids In
Encephalomyeloradiculoneuropathy. 2014.4.29.
The 66th American Academy of Neurology
Annual Meeting; Philadelphia.

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.fujita-hu.ac.jp/~sinkei/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

植田 晃広 (UEDA, AKIHIRO)
藤田保健衛生大学医学部・講師
研究者番号：20600703