

複合糖脂質ノックアウトマウスを用いたガングリオシドの神経再生
に於ける役割の解明
研究課題番号:12670602

平成12-平成13年度科学研究費補助金(基盤研究[C](2)) 研究成果報告書

平成14年3月
研究代表者 安田 斎
〔滋賀医科大学医学部講師〕

はじめに

ガングリオシドはシアル酸を持つ糖脂質であり脊椎動物の中枢及び末梢神経に多量に発現しており、細胞間接着、細胞分化、及びニューロンの機能などに種々の影響を与えていると報告されているが、その *in vivo* での真の役割については不明な点が多い。我々は複合ガングリオシドの欠損マウスである b1,4,-N-acetylgalactosaminyl transferase (GalNAcT, GM2/GD2 synthase; EC 2.4.1.94) のノックアウトマウスを作製し *in vivo* における複合ガングリオシドの役割について検討を加えてきた (Yujing Y, Kawai H et al, J Clin Invest, 1999)。一方、これらの糖脂質に対する抗体はギラン・バレー 症候群 (以下 GBS) などの末梢神経障害を引き起こすことが知られており、糖脂質の *in vivo* での役割を検討することにより GBS などの末梢神経障害の病態の解明にも寄与するところが大きいものと思われる。また、近年これらの複合ガングリオシドはシアル酸を介した接着 (Sialonoadhesion) により myelin associated glycoprotein (以下 MAG) の ligand として生体内で働いている可能性が示唆されている。我々は米国 Johns Hopkins 大学の Griffin 博士らとの共同研究 (Sheikh KA, Kawai H et al, Proc Natl Acad Sci USA, 1999) により、このマウスの末梢神経においては MAG ノックアウトマウスに見られる脱髄、ワーラー変性様の変化と非常に類似した変化が認められ、*in vivo* において複合ガングリオシドと MAG がシアル酸を介した相互作用を実際に有する可能性を初めて示した。

そこで、本研究では各種ガングリオシド合成障害を示すノックアウトマウスを用いて、これらの欠損マウスが *in vivo* で神経再生障害を示すか、あるいは細胞レベルで細胞接着異常を示すかなどにつき検討を加えることにより、ガングリオシドの細胞接着・神経再生における役割と作用機序につき検討をくわえることを目的とした。

滋賀医科大学附属図書館



2001015616

研究組織

研究代表者: 安田斎 (滋賀医科大学医学部講師)

研究分担者: 前田憲吾 (滋賀医科大学医学部助手)

研究分担者: 川合寛道 (滋賀医科大学医員)

交付決定額(配分額)

(金額単位: 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成12年度	2200	0	2200
平成13年度	1200	0	1200
総計	3400	0	3400

研究発表

1. 学会誌等

1) Liu, Y., Wada, R., Kawai, H. and Proia, R. et al. (1999) A genetic model of substrate deprivation therapy for glycosphingolipid storage disorder. *J. Clin. Invest.* 103, 497-505

2) Sheikh, K. A., Kawai, H. et al. (1999) Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 10662-10667

3) Kawai, H., Proia, R. et al. (2001) Mice expressing only monosialoganglioside GM3 exhibit lethal audiogenic seizure. *J. Biol. Chem.* 276, 6885-6888.

2. 口頭発表

1) 川合寛道、前田憲吾、安田斎、吉川隆一:

糖脂質合成酵素ノックアウトマウスにおける内因性ガングリオシド機能の解明、第41回日本神経学会総会、2000年5月24日-26日

研究成果

1. 複合ガングリオシドの神経再生における役割: in vivo における検討

複合ガングリオシドの神経再生への関与を解明するため、まず坐骨神経の挫滅モデルを用い in vivo の検討を行った。

- 1) N-acetylgalactosamine-Transferase (GalNacT) ノックアウトマウスを用いて坐骨神経挫滅後の神経再生過程の電気生理学的検討を行った。同マウスでは a, b, c-series の多種類の複合糖脂質が欠損する。wild type (WT) および GalNacT (-/-) の 2 群間で坐骨神経挫滅後の神経再生過程を pinch reflex test (感覚神経) 及び神経伝導検査 (運動神経) にて経時的に検討した。
- 2) 坐骨神経挫滅 4 日後の pinch reflex test で WT: 4.2 ± 1.2 mm、GalNacT: 4.8 ± 1.5 mm の神経伸長が認められたが 2 群間に有意な差を認めなかった。
- 3) 一方、神経伝導検査についても、挫滅前の CMAP で潜時は WT: 1.5 ± 0.2 ms、GalNacT (-/-): 1.3 ± 0.2 ms、振幅は WT: 22.0 ± 5.6 mV、GalNacT (-/-): 25.6 ± 8.1 mV (mean \pm SD) であり、2 群間で潜時、振幅ともに有意差を認めず、CMAP は挫滅 4 日後には消失したが、3 週後に再出現し、4 週から 7 週にかけてなだらかな改善を認めた。この経時変化は WT、GalNacT (-/-) の 2 群間で同様であり、振幅、潜時共に有意な差を認めなかった。
- 4) 以上より、in vivo では複合ガングリオシドの発現が無くても末梢神経の分化、発生が可能であり神経再生も可能であることが示唆された。

2. MAG の神経突起進展抑制効果における複合ガングリオシドの役割

複合ガングリオシド、MAG の相互作用の消失による神経再生への影響を in vitro で検討する目的で、GalNacT ノックアウトマウスの小脳顆粒細胞 (以下 GGN) と MAG の接着実験を試みた。

1) 小脳顆粒細胞神経突起伸展に及ぼす MAG の影響の検討

- a) GalNacT 欠失マウス (以下 GalNacT (-/-) および GD3 合成酵素欠失マウス (以下 GD3S (-/-) の CGN と MAG との相互作用を in vitro で検討した。即ち、生後約 1 週のノックアウトマウス由来の CGN を単離、初代培養し MAG-Fc 融合蛋白と 24 時間孵置後 neurofilament に対する抗体で CGN を染色し神経突起の長さを計測した。
- b) 野生型においては従来報告されている通り MAG による神経突起進展抑制作用が見られたが、GalNacT (-/-) 由来の CGN においてはこの神経突起進展抑制作用は認められなかった。
- c) GD3S (-/-) 由来の CGN では神経突起進展抑制作用は認められるものの、その程度は野生型よりも小さかった。

2) 小脳顆粒細胞と MAG との接着の検討

- a) MAG-Fc 融合蛋白の Fc portion に対する抗体により MAG の CGN に対する binding を検討した。
- b) 野生型においては CGN の神経突起、細胞表面上に顆粒状に MAG の染色が認められ、抗 GT1b 抗体によって示される GT1b の局在と一致していた。
- c) 一方 GalNAcT^{-/-}由来の CGN においては GT1b の染色性は認められず、MAG の binding も野生型に比べ大幅に低下していた。
- d) GD3S^{-/-}由来の CGN は野生型と同様の MAG 結合パターンを示したが、部分的な神経突起進展抑制作用を示すに留まった。
- e) 以上の成績は、GalNAcT^{-/-}が MAG の ligand である GT1b や GD1a 全てを欠失していることや GD3^{-/-}は GD1a を含む a-series のガングリオシドが残されていることを考慮すると細胞接着引いては神経再生において、ガングリオシドが MAG の ligand として重要な役割を担っている可能性を示唆するものと考えられる。