

主論文の要旨

Ablation of Keratan Sulfate Accelerates Early Phase
Pathogenesis of ALS

〔ケラタン硫酸の欠損は筋萎縮性側索硬化症の早期病態形成を促進する〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻

運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：西田佳弘 准教授)

平野 健一

【背景】

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、上位・下位運動神経を特異的に傷害する神経変性疾患で、生命を脅かすものである。発症・進行には、神経細胞自律的と非自律的メカニズムの両方必要であるが、非自律的な機序にはミクログリアが重要である。多くのタンパク質が病態形成に関与しているが、ALSの病因は未解明な部分が多く、予防や治療方法はない。特にこの疾患における糖鎖の役割はほとんど解明されていない。

ミクログリアの分類には諸説あるが、活性化ミクログリアは炎症と抗炎症の二重機能を持つというのが一般的な理解である。すなわち、炎症分子を発現する M1 と、抗炎症分子を発現する M2 である。この分類は極めて単純化したものだが、生体内ではこの2つの状態を行き来していると思われる。

コンドロイチン硫酸(CS)は、長い糖鎖(GAG: glycosaminoglycan)であり、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)は軸索再生やシナプスの可塑性を強力に阻害する。ケラタン硫酸(KS)は別のGAGで、KS特異的抗体5D4によって認識される。KSは3Galβ1-4GlcNAcβ1の繰り返しで構成され、GlcNAc(N-アセチルグルコサミン)のC6残基は常に硫酸化されているが、Gal(ガラクトース)のC6残基硫酸化には多様性がある。GlcNAc6ST-1によるGlcNAcの硫酸化は、KS合成に必須であり、GlcNAc6ST-1欠損(GlcNAc6ST-1^{-/-})マウスではKSが発現しない。興味深いことにこのKS欠損は中枢神経に限定的である。我々は最近、KSもCSと同等に軸索再生を阻害することを発見した。一方で、神経変性疾患におけるGAGの役割はほとんど解明されていない。今回、ALSの早期病態形成におけるKSの役割について報告する。

【対象と方法】

ALSモデルマウスとしてSOD1^{G93A}を、コントロールとして非トランスジェニックマウス(non-Tg)を用いた。KSを発現しないALSモデルマウスとしてSOD1^{G93A}GlcNAc6ST-1^{-/-}を用いた。まず、SOD1^{G93A}とnon-Tgの比較を行った。腰髄におけるKSの発現を免疫染色・Western blotで比較した。次にSOD1^{G93A}とSOD1^{G93A}GlcNAc6ST-1^{-/-}の比較を同様に行った。表現型をrotarod(15rpm, 20rpm)テストの成績、寿命によって比較した。

【結果】

KSは生後24週のSOD1^{G93A}の腰髄では灰白質中心に、顕著な発現が見られたが、同月齢のnon-Tgでは発現がみられなかった(Figure 1A、B)。

SOD1^{G93A}マウスにおけるWestern blotによる明らかなKSの発現確認は生後18週からであるが、軽度の発現は12週から既に確認され、病期進行に伴って増加した(Figure 2A)。特に12週ではKSが運動神経の存在する前角部分に認められた(Figure 2B)。

次にKSを発現する細胞を同定するため、5D4と細胞特異的マーカーを用いて二重免疫染色を行った。Iba1陽性細胞(ミクログリア)と5D4の共染色が確認された(Figure

3A-C)。GFAP(アストロサイト、Figure 3D-F)、NG2(オリゴデンドロサイト前駆細胞、Figure 3G-I)、MAP2(神経細胞、data not shown)との共染色は確認されなかった。

さらに、24 週マウスの脊髄から CD11b ビーズを用いて回収したミクログリア上の KS 発現量は、SOD1^{G93A} 由来のミクログリアの方が顕著に高かった (Figure 3J,K)。KS 合成は Figure 3L に示す様に複数の糖転移酵素によって制御されるが、SOD1^{G93A} の脊髄では 83GlcNAcT-7, GlcNAc6ST-2, KSGal6ST の発現が有意に増加していた (Figure 3M)。以上から、KS は一部のミクログリア上で選択的に増加すると考えられた。

KS の発現はヒト ALS 患者の脊髄凍結切片 5 例(2 例は家族性、3 例は孤発性 : Figure 4E)でも確認された。

ALS 病態形成における KS の役割を調べるために、GlcNAc6ST-1^{-/-}マウスとの交配を行い、表現型を比較した。予測通り、SOD1^{G93A}GlcNAc6ST-1^{-/-}の脊髄において KS 発現は確認されなかった (Figure 5A,B)。24 週 SOD1^{G93A}GlcNAc6ST-1^{-/-}の脊髄ミクログリアの発現量・形態は、SOD1^{G93A} と同等であった。ところが驚くべきことに、SOD1^{G93A}GlcNAc6ST-1^{-/-}は有意に寿命が短縮した (Figure 6B)。また、15rpm, 20rpm の rotarod performance も有意に低下した (Figure 6C,D)。以上から KS の欠損によって、ALS 病態形成の促進が起こると考えられた。

SOD1^{G93A}GlcNAc6ST-1^{-/-}における寿命短縮のメカニズムを調べるために、SOD1^{G93A}における 5D4 と M1 マーカーである CD86 の時間空間的発現を検討した。12 週では、KS⁺CD86⁻ と KS⁺CD86⁺とも存在するが、KS⁺CD86⁻が主であった (Figure 7A-D)。KS⁺CD86⁺の割合は病期進行とともに増加するが、最後まで KS⁺CD86⁻は存在した (Figure 7E-K)。24 週マウス脊髄由来のミクログリアを用いたフローサイトメトリー解析では、SOD1^{G93A}において、CD86⁻・CD86⁺ともに増加していた (Figure 7L)。CD86⁺の大部分は KS⁺で CD86⁻も多くが KS⁺であった (Figure 7M)。24 週 SOD1^{G93A}において、KS⁺CD86⁻の割合は KS⁺CD86⁺に匹敵するものであった。

さらに SOD1^{G93A}では病期進行に伴い M1 マーカー (CD86, IL-1β, TNF-α, NOX2) の mRNA 発現が増加した (Figure 8A-D)。SOD1^{G93A}GlcNAc6ST-1^{-/-}でも同様の M1 マーカーの発現上昇がみられた (Figure 8A-D)。一方 SOD1^{G93A}における M2 マーカー (CD206, arginase1, Ym1, IL-4) の発現は、12~15 週で一過性に増加した (Figure 8E-H)。SOD1^{G93A} GlcNAc6ST-1^{-/-}ではこの発現上昇が有意に抑制されていた。

M1 ミクログリア (CD86⁺) は病期進行に伴い、SOD1^{G93A}、SOD1^{G93A}GlcNAc6ST-1^{-/-}の両方で増加していた (Figure 7, 9)。一方、SOD1^{G93A}における M2 ミクログリア (CD206⁺) は 15 週で顕著にみられるが、SOD1^{G93A}GlcNAc6ST-1^{-/-}では減少していた (Figure 10)。この結果は mRNA 発現レベルと概ね一致する。

KS⁺細胞の大部分は 12 週で CD86⁻であるが (Figure 7A-D)、この KS⁺CD86⁻が、後の様々な極性を持つ細胞の起源となっている可能性がある。免疫染色によると、15 週では、KS⁺CD86⁻は CD206 を発現しておらず、CD206⁺細胞は KS⁻であった (Figure 11)。我々のデータをまとめると、KS⁺CD86⁻が直接 KS⁻CD206⁺ミクログリアに極性を変え

るか、間接的に他のタイプの細胞が KS⁺CD206⁺ミクログリアに極性を変えるように影響を与える可能性がある。

【考察】

生体高分子は主に核酸・ポリペプチド・糖鎖の3つから構成され、糖鎖は重要な生物学的機能を持つ。神経組織における糖鎖の役割の多くは未解明であり、本研究は神経変性疾患の病態形成における糖鎖の役割を証明した最初の研究である。

KS⁺ミクログリアが SOD1^{G93A} において増加することを発見した。当初 SOD1^{G93A}GlcNAc6ST-1^{-/-}では病態形成が抑制されると予測したが、むしろ病態形成が加速され、寿命が短縮した。この表現型は病態形成早期の一過性 M2 マーカーの発現上昇が抑制されることと関連している。これらの M2 マーカーが抗炎症作用と密接に関連していることを考慮すると、KS は ALS 初期の病態形成において抑制性の役割を果たしていると思われる。早期では SOD1^{G93A}GlcNAc6ST-1^{-/-}において M2 ミクログリア(CD206⁺)が、顕著に少ない。一方で、M1 ミクログリア(CD86⁺)は同等であった。ALS の早期において KS⁺細胞の大部分は CD86⁻であり、これが重要な役割を担っている可能性が高い。KS は抗炎症状態への極性変化を促進していると推測するが、他の細胞タイプの機能に影響する可能性もある。

我々の研究から、CS など他の糖鎖にも KS の役割が一般化できるかどうかという疑問が生じる。CSPG が ALS モデルの神経細胞に蓄積するという報告はある。これらの CSPG は活性化アストロサイトによって産生されるが、機能は不明である。本研究はミクログリアに発現する KS の重要性を示した。ミクログリアの極性に関しては、神経損傷後のグリア瘢痕内の CSPG によって活性化され、神経保護機能を示すというのは興味深い。KS、CS を含めた分子間の相互作用は ALS などの神経変性疾患の病態解明の糸口となる可能性がある。さらに、KS 合成酵素の発現も付随して上昇するので、これらの酵素を規定するメカニズムの研究によっても ALS 診断/治療に有用な糸口が見つかる可能性がある。

【結語】

KS を欠損した ALS マウスは通常の ALS マウスに比べて病態形成が早く寿命が短縮した。KS は早期に運動ニューロン周囲のミクログリアに限局して発現し始める。この時期に、M2 マーカー (mRNA、タンパク質) が一過性に増強するが、KS の欠損によってこれが抑制された。さらに、ミクログリアにおける KS 発現はヒト ALS 背髄でも同定された。本研究は KS が ALS の病態の初期において抑制性の重要な役割を果たしていることを示唆しており、治療介入の新しい標的となり得る。