

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09326

研究課題名(和文) 神経新生を促進するヘパリン親和性増殖因子の最適シグナルクロストーク探索

研究課題名(英文) An investigation for optimal signal crosstalk in heparin binding growth factor promoting neurogenesis

研究代表者

平澤 恵理 (Arikawa-Hirasawa, Eri)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50245718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヘパリン親和性増殖因子群は肝細胞増殖因子(HGF)を代表に神経変性疾患の治療標的の一つとして期待されるが、臨床応用実現化に向けては解決すべき問題が多い。本研究は、細胞外マトリックスのヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)を治療標的とし、HGF活性局在と他のヘパリン親和性増殖因子との“シグナルクロストーク”の最適化による成体神経新生制御方法開発を目指した。成体神経新生を制御するFGF-2を代表とするヘパリン親和性増殖因子/ヘパラン硫酸鎖の調整には糖鎖の改変が重要と考えた。成体神経新生領域である脳室下帯と海馬のサンプルを使って2糖解析を進め、硫酸化など糖鎖修飾の特性を示した。

研究成果の概要(英文)：Heparin affinity growth factor group is expected as one of therapeutic targets for neurodegenerative diseases typified by hepatocyte growth factor (HGF), but there are many problems to be solved to realize clinical application. In this study, we aim to develop an adult neurogenesis control method by targeting heparan sulfate proteoglycan (HSPG) in the extracellular matrix and optimizing GF activity localization and "signal crosstalk" with other heparin affinity growth factors. Modification of sugar chain was considered important for preparation of heparin affinity growth factor / heparan sulfate chain typified by FGF - 2 which controls adult neurogenesis. We proceeded with disaccharide analysis using samples of the adventitial neurogenic region, the subventricular zone and the hippocampus, and showed characteristics of sugar chain modification such as sulfation.

研究分野：神経内科

キーワード：ヘパラン硫酸プロテオグリカン ヘパリン親和性増殖因子 成体神経新生 糖鎖 硫酸化 細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

ヘパリン親和性増殖因子群は肝細胞増殖因子(HGF)を代表に神経変性疾患の治療標的の一つとして期待されるが、臨床応用実現化に向けては解決すべき問題が多い。申請者は細胞外マトリックス(ECM)が組織特異的にシグナル局在を担う機構に着目してきた。特に、多くの増殖因子に強い親和性を示すヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)に注目し、*HSPG2* (パールカン)に関する研究ではノックアウトマウスの作成から、ヒト疾患の同定まで世界をリードする研究成果を上げてきた (Arikawa-Hirasawa et al. *Nature Genetics*, 1999 and 2001, *Nature Neuroscience* 2002)。脳機能とHSPGについても研究を進め、成体神経新生領域に存在する新規基底膜構造 fractone がHSPG のヘパラン硫酸鎖を介して神経幹細胞の運命を制御するニッチ構造であることを示した (Kerever et al *Stem Cells* 2007 Douet V et al *Neurosci Lett.* 2012 and *Cell Prolif.* 2013)。申請者は、これまでの国内外の HGF 研究成果と神経内科領域での治療への期待を踏まえ、HGF 同様にヘパリン親和性を持つ増殖因子(GF)はECMによりその局在や活性化の程度を制御され、相乗的に機能するのではないかと考えた。そこで ECM による成長因子活性制御の研究との関連性、重要性を認識し本構想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、細胞外マトリックスの HSPG を治療標的とし、GF 活性局在と他のヘパリン親和性増殖因子との“シグナルクロストーク”の最適化による成体神経新生制御方法開発のための基礎研究を遂行することを目的とした。特に本研究課題では、シグナル分子局在の見える化を行い、機能の同定とそれを制御する機構を検討した。

3. 研究の方法

多因子が相補的/競合的に働くシグナルの“クロストークの場”の可視化と各因子の下流シグナルの特性・可変性を調査した。具体的方法を示す。

(1) GF とHSPG の局在を可視化する3Dイメージング方法

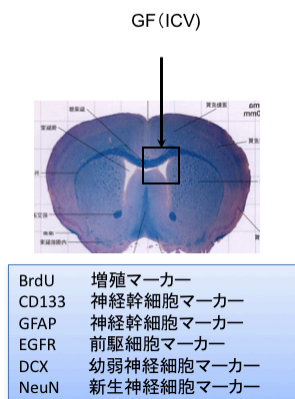
- *in vivo*, *in vitro* で分子局在を観察するため、蛍光標識リコンビナントタンパク質を作成。
- 標識リコンビナントタンパク質の活性を確認。
- 標識リコンビナントタンパク質と ECM 組織の結合・親和性を確認。
- パールカン、アグリン、18 型コラーゲン、シンデカン、グリピカンの各 HSPG 分子種の共局在を免疫染色で示す。
- ヘパラン硫酸鎖抗体免疫染色にて糖鎖の共局在を示す。

(2) 成体神経新生における GF の機能

解析

- ・ *In vitro* 解析-Neurosphere 培養実験
神経幹細胞増殖能アッセイ
神経細胞分化アッセイ
成体神経新生を模倣する系と
Neurosphere 法を用いた。
- ・ *In vivo* 解析-脳室内投与実験
GF の脳室内投与後神経新生(神経幹細胞の維持と増殖、神経細胞への分化)を定量した。細胞マーカー下記に示す。

脳室内投与(ICV) 実験で用いる細胞分化マーカー

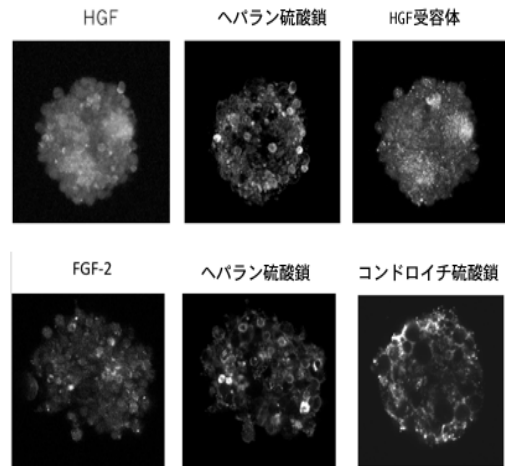


4. 研究成果

本研究期間内に、多因子が相補的/競合的に働くシグナルの“クロストークの場”の可視化と各因子の下流シグナルの特性・可変性を調査した。今後の機能解析に向けて、GF下流シグナルが伝達の分子局在のダイナミクスを検証するため、*in vitro*の系ではHGF、FGF、SHH、HSPGを蛍光ラベルし、

神経幹細胞の特性を示すNeurosphere法を用いてその局在を3Dイメージングで可視化することに成功した。図に解析例を示す。

図 HGF FGFの局在様式



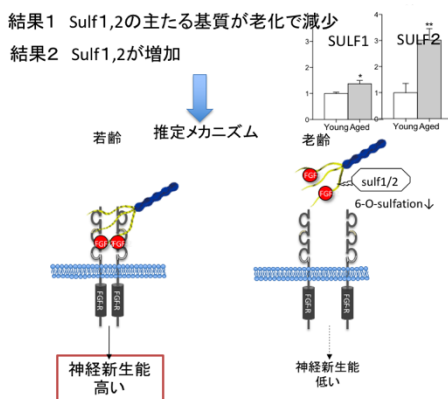
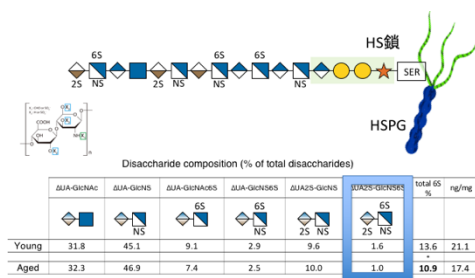
HGF/c-Met(HGF受容体)/HS鎖、FGF2/HS鎖共局在の違いを示す。HGF、FGF-2はヘパラン硫酸鎖と共局在するが、コンドロイチン硫酸鎖とは共局在しなかった。HGFにおいて、ヘパラン硫酸鎖と共局在しない部分を確認したところ、HGF受容体(c-MET)と共局在していることがわかった。受容体に結合しないGFがHS鎖に結合している可能性が示唆された。

*In vivo*の系でも、透明化した脳を2光子顕微鏡で撮影し、3次元構築し解析する系を確立した。ヘパリン親和性増殖因子の一つFGF2によるneurogenesisシグナルを*in vivo*で解析し、下流シグナルの変化と加齢の関連性を調査した。神経疾患治療の標的の一つに成体神経新生があるが、これを制御するFGF-2を代表とするヘパリン親和性増殖因子/ヘパラン硫酸鎖の調整には糖鎖の改変

が重要であると考え、成体神経新生能と硫酸化など糖鎖修飾の関連性を調査した。その成果を学会報告及び、論文報告した (Yamada et al J Neurochem 2017)。

成体神経新生領域である脳室下帯と海馬のサンプルを使って2糖解析を進め、硫酸化など糖鎖修飾の特性を示し、さらに若齢サンプルと老化サンプルと比較検証した。その結果老化により、細胞外で機能する新規細胞外スルファターゼ Sulf 1/2の発現が増加し、基質となる糖鎖が減少していることを見出し、ヘパリン親和性増殖因子と受容体の結合性を制御する硫酸化パターンが老化神経新生領域において重要な機能制御因子の一つであることを示した。

次に示す図は本研究論文の結果のまとめである。



さらに、脱細胞脳組織にヘパリン硫酸鎖とコンドロイチン硫酸鎖を分解する酵素処理を施し、ヘパリン親和性増殖因子と糖鎖の変化による神経細胞とグリア細胞の増殖分化の変化を解析する条件を検証した(未発表データ)。

これらの結果は、ヘパリン親和性増殖因子(成長因子)が、ECMの種類や糖鎖修飾により、その局在や活性化の程度を制御されること示唆している。さらに異なる種類のヘパリン親和性増殖因子がECMによる成長因子活性制御を介して、互いに影響しあい、相乗的に機能するの可能性も示しており、今後の検討課題と考えられた。

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 13 件)

- 1 Kerever A, Kamagata K, Yokosawa S, Otake Y, Ochi H, Yamada T, Hori M, Kamiya K, Nishikori A, Aoki S, Arikawa-Hirasawa E. See-through Brains and Diffusion Tensor MRI Clarified Fiber Connections: A Magnetic Resonance in Medical Sciences . 14:159-162, 2015(査読あり)
- 2 Kerever A, Yamada T, Suzuki Y, Mercier F, Arikawa-Hirasawa, E Fractone aging in the subventricular zone of the lateral ventricle Journal of Chemical Neuroanatomy; 66-67:52-60, 2015(査読あり)

- 3 Kamagata K, Kerever A, Yokosawa S, Otake Y, Ochi H, Hori M, Kamiya K, Tsuruta K, Tagawa K, Okazawa H, Aoki S, Arikawa-Hirasawa E. Quantitative Histological Validation of Diffusion Tensor MRI with Two-Photon Microscopy of Cleared Mouse Brain. Magn Reson Med Sci. 2016 Mar 30. (査読あり)
- 4 Yamada T, Kerever A, Yoshimura Y, Suzuki Y, Nonaka R, Higashi K, Toida T, Mercier F, Arikawa-Hirasawa E Heparan sulfate alterations in extracellular matrix structures and fibroblast growth factor-2 signaling impairment in the aged neurogenic niche. J Neurochem. 2017 Aug;142(4):534-544. (査読あり)
- 5 Irie R, Kamagata K, Kerever A, Ueda R, Yokosawa S, Otake Y, Ochi H, Yoshizawa H, Hayashi A, Tagawa K, Okazawa H, Takahashi K, Sato K, Hori M, Arikawa-Hirasawa E, Aoki S. The Relationship between Neurite Density Measured with Confocal Microscopy in a Cleared Mouse Brain and Metrics Obtained from Diffusion Tensor and Diffusion Kurtosis Imaging. Magn Reson Med Sci. 2017 Dec 7. (査読あり)
2. Taihei Yamada, Aurelien Kerever, Yusuke Yoshimura, Yuji Suzuki, Kyouhei Higashi, Toshihiko Toida and Eri Arikawa-Hirasawa Age-Associated Changes in Heparan Sulfate Structures Impair FGF-2 Signaling in Neurogenesis Gordon Research Conference: Proteoglycans. NH Andover, 2016年7月10日～15日(国際学会)
3. Aurelien Kerever Eri Arikawa-Hirasawa Immunohistochemical analysis of ECM structures in postnatal brain development of a mouse model of autism NH Andover, 2016年7月10日～15日(国際学会)
4. 吉村祐輔, 山田泰平, ケレベール オーレリアン, 東恭平, 戸井田敏彦, 服部信孝, 平澤恵理 マウス成体神経新生領域の老化におけるヘパラン硫酸鎖の変化 2016年5月18-21日(神戸)

6. 研究組織

(1)研究代表者

平澤恵理(HIRASAWA Eri)
順天堂大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号:50245718

(3)連携研究者

木全弘治(KIMATA Koji)
研究者番号:10022641
愛知医科大学・大学院医学研究科・特任教授

佐々隆子(SASAKI Takako)
大分大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号:30133193

ケレベール オーレリアン(KEREVER Aurelien)
順天堂大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号:70623594

[学会発表](計15件)

1. Aurelien Kerever Taihei Yamada, and Eri Arikawa-Hirasawa Extracellular matrix aging in mouse hippocampus 第38回日本神経科学大会 神戸 平成27年7月28日