

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21067

研究課題名(和文)細胞外糖鎖による神経細胞極性の制御機構

研究課題名(英文) Extracellular glycans in the brain microenvironment affect neuronal polarity and migration during cortical development

研究代表者

宮田 真路 (Miyata, Shinji)

名古屋大学・生命農学研究科・特任助教

研究者番号：60533792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は胎生期の脳に豊富に存在するコンドロイチン硫酸(CS)プロテオグリカンが神経細胞の移動と極性形成を制御する細胞外環境を作り出すという仮説のもとに行った。その結果、マウス胎仔の脳皮質においては、脳室帯と中間帯に4-硫酸化CSが局在しており、4-硫酸化CSの低下によって神経細胞が皮質板まで到達できず中間帯に留まることが分かった。神経細胞移動に必要な4-硫酸化CSの担体となるプロテオグリカンはneurocanであり、neurocanを含む細胞外マトリクス分子複合体は双極性神経細胞の先導突起周辺に集積して、神経細胞の移動と極性形成に必要な細胞外環境を形成することが示された。

研究成果の概要(英文)：Cortical pyramidal neurons are generated in the ventricular zone (VZ), and migrate through the intermediate zone (IZ) into the cortical plate (CP). In the IZ, a cell-sparse area filled with large amount of the extracellular matrix (ECM) molecules, immature neurons undergo rapid morphological transition from a multipolar to a bipolar shape. However, the function of ECM molecules in this process is largely unknown. We found that sulfation patterns of chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) differ between the IZ and the CP. We knocked down C4ST-1, an enzyme catalyzing 4-sulfation of chondroitin sulfate, by means of in utero electroporation. C4ST-1 knock-down neurons stalled at the IZ with multipolar morphology. We identified neurocan, a central nervous system-specific CSPG, as a major carrier protein of 4-sulfated chondroitin sulfate. These results indicate that 4-sulfated neurocan produced by neurons creates a local microenvironment that promotes the multipolar to bipolar transition.

研究分野：糖鎖神経生物学

キーワード：コンドロイチン硫酸 プロテオグリカン 神経細胞移動 極性形成 脳皮質形成

## 1. 研究開始当初の背景

成体哺乳類の中樞神経系が損傷を受けると、その再生はほとんど不可能である。コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは損傷部位において、活性化したアストロサイトから分泌され、グリア性瘢痕を形成することにより軸索再生を妨げていると考えられている。これまでに、脊髄損傷後に損傷部位にコンドロイチン硫酸鎖分解酵素を注入することで軸索再生が促進され、運動機能が回復することが明らかになっている (Bradbury, E.J. et al. (2002) *Nature* 416, 636-640)。

コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは細胞増殖因子や細胞外マトリクス成分などと相互作用することにより、その機能を発揮している。コンドロイチン硫酸プロテオグリカンとタンパク質との結合特異性は、コンドロイチン硫酸鎖の硫酸化修飾によって決定されると考えられている。主要なコンドロイチン硫酸鎖の硫酸化には、コンドロイチン硫酸鎖を構成する N-アセチルガラクトサミン残基の 4 位および 6 位の硫酸化がある。これまでに申請者は、コンドロイチン硫酸鎖の硫酸化パターンが、生後脳の神経可塑性の制御において、重要な役割をはたすことを明らかにしてきた。生後初期には 6 硫酸化コンドロイチンが多く存在するが、成体になると 4 硫酸化コンドロイチンが増加する。6 硫酸化を担うコンドロイチン 6-O-硫酸基転移酵素 1 (C6ST-1) を過剰発現するトランスジェニック (TG) マウスを用いて研究を行った結果、C6ST-1 TG マウスは臨界期が終了した成体でも強い可塑性を維持することを見出した。さらに、コンドロイチン硫酸鎖の硫酸化パターンの変動が、抑制性神経細胞の一種であるパルプアルブミン陽性細胞を覆っているペリニューロナルネットの形成、およびその細胞の成熟を促す *Otx2* タンパク質の蓄積に必要であることを報告した (Miyata, S. et al (2012) *Nat. Neurosci.* 15, 414-422)。

## 2. 研究の目的

コンドロイチン硫酸鎖は発生期の脳にも多量に存在するが、その機能は不明な点が多い。胎生期の中樞神経系組織から抽出したコンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、神経軸索伸長を促進させることが示しており、この作用にはコンドロイチン硫酸鎖の特定の硫酸化修飾が関与すると考えられている (Sugahara, K., and Mikami, T. (2007) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 536-545)。これらの知見は、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが、軸索再生を正にも負にも制御していることを示しており、損傷神経の効果的な再生のためには、コンドロイチン

硫酸プロテオグリカンが関与する積極的な側面を保ちつつ、軸索再生阻害活性を抑える必要があることを示唆している。

大脳皮質の秩序だった 6 層構造は、発生期において興奮性神経細胞が放射状に移動することで形成される。脳室帯で生まれた神経細胞は中間帯の下部において多数の突起を伸ばしたり縮めたりする、多極性の形態を示す。その後、先導突起と軸索を形成することで、双極性へと形態を大きく変化させ、神経幹細胞の放射状線維に接着することで、皮質板上部にまで放射状に移動する。このような神経細胞の極性形成と移動は、神経回路形成に不可欠である。

以前より、コンドロイチン硫酸鎖に対する抗体は、中間帯、および、サブプレートのマーカーとして広く使われている。神経細胞の形態変化が起こる中間帯は、脳室帯や皮質板に比べ、細胞密度が低く、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンなどの細胞外マトリクス分子が豊富に存在する領域である。そこで本研究では、大脳皮質形成期での神経細胞の極性形成と移動におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの機能を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

胎生期大脳皮質の様々な領域におけるコンドロイチン硫酸の硫酸化構造の分布を調べるために、胎生 16.5 日の大脳皮質をマイクロダイセクションによって、脳表面から、脳室側に向かって 8 等分した。その後、コンドロイチン硫酸の二糖組成解析、および、コンドロイチン硫酸硫酸基転移酵素の発現を RT-PCR によって解析した。

細胞外マトリクス関連遺伝子の発現をショートヘアピン RNA (shRNA) によって低下させるために、胎生 14.5 日のマウス胎仔脳に対して子宮内エレクトロポレーション法によって遺伝子導入を行った。その後、脳切片を作成し免疫組織染色学的手法で解析した。

## 4. 研究成果

胎生期の大脳皮質では、脳室に面した脳室帯および脳室下帯には神経幹細胞、神経前駆細胞が存在し、細胞分裂を終えた未熟な神経細胞は、その上の中間帯で多極性の移動をする。成熟した神経細胞は皮質板に進入し、放射状に移動して最終目的地に到達する。そこで、これらの異なった領域においてコンドロイチン硫酸の硫酸化構造がどのように分布するか調べるために、胎生 16.5 日の大脳皮質をマイクロダイセクションによって、脳表面から、脳室側に向かって 8 等分し、コンドロイチン硫酸二糖組成解析を行った。

コンドロイチン硫酸の総量は脳室側から中間帯に向かって増加するが、中間帯から皮質板に向かって再度低下していた。脳室帯、脳室下帯および中間帯のコンドロイチン硫酸鎖は4硫酸化コンドロイチンが全体の80%以上を占めており、非硫酸化コンドロイチンはわずかに存在するのみであった。一方、皮質板および辺縁帯のコンドロイチン硫酸は半分以上が非硫酸化コンドロイチンであり、4硫酸化コンドロイチンは約30%に過ぎなかった。つまり、皮質板の神経細胞は、脳室帯、脳室下帯および中間帯などの神経幹細胞、未熟神経細胞に比べ低硫酸化コンドロイチン硫酸を合成する可能性が示唆された。この大脳皮質におけるコンドロイチン硫酸硫酸化パターンがC4ST-1の発現パターンと相関しているか、定量的RT-PCRによって調べた。その結果、4硫酸化コンドロイチンの割合とC4ST-1の発現には正の相関関係が見られ、4Sの割合が高い脳室帯、脳室下帯および中間帯では、C4ST-1の発現量も高いが、4Sの割合が低い皮質板では、C4ST-1の発現量も低かった。このことから、大脳皮質におけるコンドロイチン硫酸硫酸化パターンはC4ST-1の発現によって調節されていることが示唆された。

次に、コンドロイチン硫酸の硫酸化を担うコンドロイチン4-O-硫酸基転移酵素1(C4ST-1)の発現をshRNAによって低下させることで、その機能解明を目指し研究を行った。胎生14.5日で子宮内エレクトロポレーションを行い、4日後の胎生18.5日で解析したところ、コントロールの神経細胞はほとんどが皮質板上部に到達していた。一方、C4ST-1に対するshRNAを導入した細胞は多くが中間帯にとどまっていた。shRNAが導入された神経細胞におけるC4ST-1の発現が、実際に*in vivo*で減少しているか確かめた。胎生14.5日の胎児脳に子宮内エレクトロポレーション法で、shRNAを発現させ、2日後に脳を取り出しマイクロダイセクションによって遺伝子が導入された領域を回収し、定量的RT-PCRを行った。その結果、shRNAが導入された領域では、コントロールに比べC4ST-1の発現が約半分に低下していた。一方、C4ST-1と相同性のある、C4ST-2およびD4ST-1の発現には影響が見られなかった。さらに、C4ST-1の発現が減少することで*in vivo*においてコンドロイチン硫酸の硫酸化パターンが変化するのか、473HD抗体染色によって調べた。コントロールの大脳皮質では、脳室下帯と中間帯に反応性が見られたが、shRNAを導入した神経細胞の周囲における473HDの染色性は顕著に低下していた。これらの結果から、C4ST-1に対するshRNAを神経細胞に発現させることで、

*in vivo*においてC4ST-1の発現が減少し、その結果、473HD抗体と反応するコンドロイチン硫酸鎖が減少することが示された。

C4ST-1の発現低下により、神経細胞は中間帯に留まり皮質板に到達できなくなる。脳室帯を抜け出した神経細胞は中間帯の下側で多極性の形態を取り、中間帯の上部に侵入する際に形態を大きく変化させ、二極性の形態になる。そこで、神経細胞が皮質板に進入できないのは、双極性の形態に変化できないためではないかと考え、*in vitro*における分散培養神経細胞の形態を観察した。3日間培養後には、コントロールの神経細胞は、軸索様の一本の長い突起と、樹状突起様の複数本の短い突起を伸ばす、ステージ3の形態をとっていた。C4ST-1の発現を低下させた細胞では、3日後においても、軸索様の長い突起が伸びず、ステージ2の多極性の形態を保っていた。ステージ2からステージ3への移行にコンドロイチン硫酸鎖が必要であることをさらに確かめるため、コントロールの神経細胞をコンドロイチン硫酸分解酵素の存在下で培養したところ、C4ST-1の発現低下と同様の効果が見られた。最長突起の長さ、および、最長突起と二番目に長い突起の比から、コンドロイチン硫酸が減少した細胞では、すべての突起が伸長しないのではなく、軸索様の長い突起が伸びないために、多極性のステージ2から、極性を持ったステージ3に移行できていないことが示された。

神経細胞が合成する主要なコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを生化学的手法によって精製した。質量分析装置を用いて4-硫酸化コンドロイチンの担体タンパク質として、胎生期の脳に一過的に発現するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるneurocanを同定した。C4ST-1の発現低下と同様に、neurocan発現抑制によっても、神経細胞移動と形態変化が阻害された。これらの結果から、中間帯を移動中の未熟な神経細胞は、4-硫酸化コンドロイチン硫酸鎖を持つneurocanを発現しており、それによってつくられる微小環境は、神経細胞の極性形成と正常な大脳皮質の発生に必要であることが示された。

neurocan上のコンドロイチン硫酸の機能を調べるため、7箇所コンドロイチン硫酸付加部位を変異させたneurocanを培養細胞で発現させる実験系を構築した。これを用いた解析から、neurocanが細胞外に分泌されるためにはコンドロイチン硫酸による修飾が必要であることが分かった。次に、neurocanと相互作用する分子の同定を試みた。免疫沈降法と質量分析を組合せた解析の結果、neurocan

の C 末端領域と結合する分子として tenascin C を同定した。また、この相互作用に、neurocan 上のコンドロイチン硫酸は必要ではなかった。tenascin C は神経幹細胞に選択的に発現するが、neurocan 自身は主に移動中の神経細胞に発現していた。

neurocan の N 末端領域にはヒアルロン酸結合ドメインが存在することから、neurocan とヒアルロン酸の相互作用が胎生期の神経細胞移動に関与する可能性がある。発達段階におけるマウス脳の生化学的な解析から、生後脳に比べ、胎生期の脳にはヒアルロン酸量が多いこと、また、胎生後期から生後初期の一定期間にのみ、比較的短鎖(約 200 kDa)のヒアルロン酸が存在することが示された。次に、3 種類のヒアルロン酸合成酵素 (Has1、2、3) の発現を解析した結果、胎生期から生後直後の大脳皮質には、Has2 と Has3 が高発現していた。胎生期の大脳皮質において、ヒアルロン酸は辺縁帯と中間帯上部から皮質板下部に局在しており、これは Has3 mRNA の発現部位と一致していた。免疫組織染色の結果、ヒアルロン酸、neurocan、tenascin C を含む細胞外マトリクス分子複合体は双極性神経細胞の先端突起周辺に集積しており、これが神経細胞の移動と極性形成に必要な細胞外環境を形成することが示された。

#### 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 4 件)

(1) Miyata S, Kitagawa H. Formation and remodeling of the brain extracellular matrix in neural plasticity: Roles of chondroitin sulfate and hyaluronan. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861, 2420-2434, 2017 年, 査読有り, doi: 10.1016/j.bbagen.2017.06.010.

(2) Miyata S, Kitagawa H. Chondroitin sulfate and neuronal disorders. *Frontiers in Bioscience*, 21, 1330-1340, 2016 年, 査読有り <https://www.bioscience.org/2016/v21/af/4460/list.htm>

[学会発表](計 5 件)

(1) 武智美奈, 大島健司, 灘野大太, 松田幹, 宮田真路, マウス大脳皮質の発達におけるヒアルロン酸合成酵素の発現および機能の解析, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月, 神戸

(2) Shinji Miyata, Chihiro Sato, Ken

Kitajima, Hiroshi Kitagawa, Interactions of the extracellular matrix components in the brain microenvironment affect neuronal migration and morphogenesis during cortical development, 第 40 回日本神経科学大会, 2017 年 7 月, 幕張

(3) 武智美奈, 大島健司, 灘野大太, 松田幹, 宮田真路, マウス胎仔大脳皮質における細胞外マトリクス分子ヒアルロン酸の発現および機能の解析, 第 81 回生化学会中部支部会, 2017 年 5 月, 名古屋

(4) Shinji Miyata. Neurocan, a brain chondroitin sulfate proteoglycan, regulates neuronal migration. *BMB2015* (第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会), 2015 年 12 月, 神戸

(5) Shinji Miyata. Sulfation of chondroitin sulfate proteoglycans controls neuronal migration and morphogenesis. 第 38 回日本神経科学大会, 2015 年 7 月, 神戸

[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://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/view/html/100007000\\_ja.html](http://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/view/html/100007000_ja.html)

<https://researchmap.jp/maro/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 真路 (MIYATA, Shinji )  
名古屋大学大学院生命農学研究科・特任助教

研究者番号: 60533792

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし