

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21083

研究課題名(和文) 損傷神経における糖鎖によるオートファジー中断

研究課題名(英文) Autophagy disruption by sugar chain in injury neurons

研究代表者

尾崎 智也(Ozaki, Tomoya)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40710588

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、損傷した神経軸索が病態としてみせるdystrophic growth coneについて解析した。まず、損傷したマウス脊髄の損傷部位において、dystrophic growth cone形成に陥った、軸索先端部にオートファゴソーム蓄積が確認できた。また、オートファジーの流れを止めることで、dystrophic growth cone形成を誘導できることも分かった。さらに、in vitro培養系での薬剤スクリーニングにより、合成糖鎖あるいはある化合物の処理は、dystrophic growth cone形成を解除しレスキューできることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Our research analyzed hallmark of injury axon dystrophic growth cone and its formation. This study demonstrated that (i) autophagosomes accumulate in the dystrophic growth cone in vivo injury spinal cord of mouse, (ii) The formation of dystrophic growth cone was induced by gene knockdown of SNARE proteins which work at fusion step between autophagosomes and lysosomes in autophagic flux and (iii) chemically synthesized sugar chain or some compounds can rescue dystrophic growth cone cultured on chondroitin sulfate proteoglycan gradient. These result suggest autophagy as treatment target to axon regeneration failure.

研究分野：神経科学

キーワード：コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 糖鎖 dystrophic growth cone オートファジー中断 軸索再生

1. 研究開始当初の背景

dystrophic growth cone または dystrophic endbal と呼ばれる神経軸索先端部の変性構造が Cajal により見出されて 80 年以上も経過する (Cajal, Degeneration & Regeneration of the Nervous System 1928)。現在においても、この dystrophic growth cone は損傷軸索の見せる病態として考えられている。

傷ついた軸索は、再伸長を試みるが損傷部位に形成されたグリア性瘢痕により、先端部を正常な成長円錐とは異なる、膨大した形態へと変化させる。そして、それ以上の伸長が不可能となる。つまり dystrophic growth cone とは、軸索伸長不能に陥った損傷神経の病態である。

これまでに、glial scar の構成成分であるプロテオグリカン、その糖鎖が dystrophic growth cone 形成の原因分子であることが分かっている。プロテオグリカンは、神経系損傷部位において、濃度勾配を呈して蓄積することも分かっている (Davies et al., *J Neurosci.* 1999)。実際に、神経細胞表面にある分子が、糖鎖受容体として機能する (Shen et al., *Science* 2009, Fisher et al., *J Neurosci.* 2011, Dickendesher et al., *Nat Neurosci.* 2012)。また、糖鎖を標的することで、神経損傷後の軸索再生および機能回復が促進することは、広く認められる事実である (Imagama et al., *J Neurosci.* 2011, Kadomatsu & Sakamoto, *Neurosci. Res.* 2014)。

しかしながら、dystrophic growth cone そのものについては不明な点が多く、これは、私たちが未だに脊髄損傷など神経系損傷を克服できていない事態と無関係ではない。したがって、まず dystrophic growth cone、その形成メカニズムについて理解することが重要であった。これまでに我々は、dystrophic growth cone に起こる、オートファゴソームとリソソームとの融合が阻害、それに付随してオートファゴソーム蓄積を見出しており、さらなる調査を必要としている。

2. 研究の目的

本研究は、dystrophic growth cone を損傷後に神経軸索が陥る病態であると考え、その形成メカニズムの洞察を目的とした。具体的には、糖鎖であるコンドロイチン硫酸 (CS) により引き起こされるオートファジー中断に注目する。このオートファジー中断が、どのように dystrophic growth cone 形成に関わるか解析した。

また、*in vitro* 培養モデルにおいて、脊髄損傷に対する新規治療候補を探索した。培養した dystrophic growth cone をレスキューするか否かを指標に、化合物スクリーニングを試みた。

さらに、すでに *in vitro* 培養モデルにおいて観察できている、dystrophic growth cone

内部でのオートファゴソーム蓄積が、実際に損傷しているマウス脊髄でも観察できるかどうか確認する。

3. 研究の方法

神経軸索の先端は、非常に動的である。そのため、純粋に dystrophic growth cone における生化学的解析は技術的に困難である。そこで、dystrophic growth cone に対し、電子顕微鏡観察、蛍光免疫染色、ライブセルイメージングなどを主な実験アプローチとする。

具体的には、ニューロンを培養し、その軸索先端部において dystrophic growth cone 形成を誘導できる *in vitro* 培養モデルを用いる。ガラス表面に、損傷した神経軸索の再生に対して障壁となる、glial scar の CSPG 濃度勾配を模倣したコーティングを行う。そこに、マウス背根神経節細胞 (DRG ニューロン) を初代培養することで、dystrophic growth cone 形成を誘導できる。この培養モデルを用いて、dystrophic growth cone 内で起こる現象を、ありのまま可視化することで、dystrophic growth cone についての情報を集めた。これまでに、マウス DRG ニューロンを材料に用い *in vitro* 培養モデルで観察された現象、dystrophic growth cone 内部でのオートファゴソーム蓄積について、*in vivo* においての検証を試みた。また、dystrophic growth cone 形成に関わる細胞内メカニズムを、DRG ニューロンにおける遺伝子ノックダウンを行うなどして解析した。さらに、dystrophic growth cone を解除する条件を探索した。

4. 研究成果

本研究では、脊髄損傷マウスモデルを使い、*in vivo* においても、dystrophic growth cone 内にオートファゴソームが蓄積するか検証した。その結果、実際のマウス脊髄での損傷部位において、Glial scar 内にある神経軸索の先端部にオートファゴソームが蓄積することを観察できた (図 1)

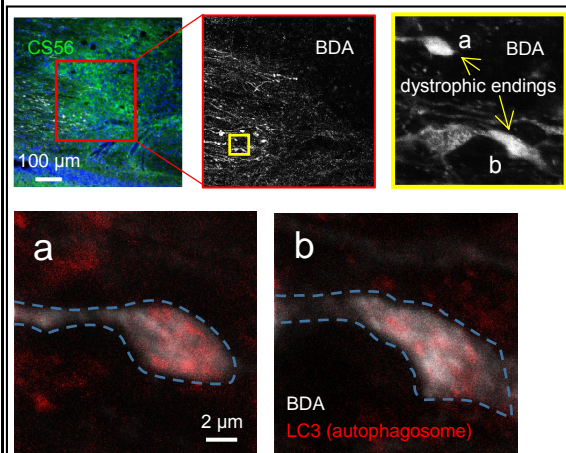


図 1 マウス脊髄損傷部位において観察される軸索先端内オートファゴソーム

次に、DRG ニューロンにおいて、オートファゴソームとリソソームの融合ステップで働く SNARE タンパク質の遺伝子ノックダウンは、dystrophic growth cone の表現型が誘導されか否か解析した。その結果、少なくとも 1 種類の SNARE タンパク質の遺伝子ノックダウン下において、軸索伸長は阻害され、

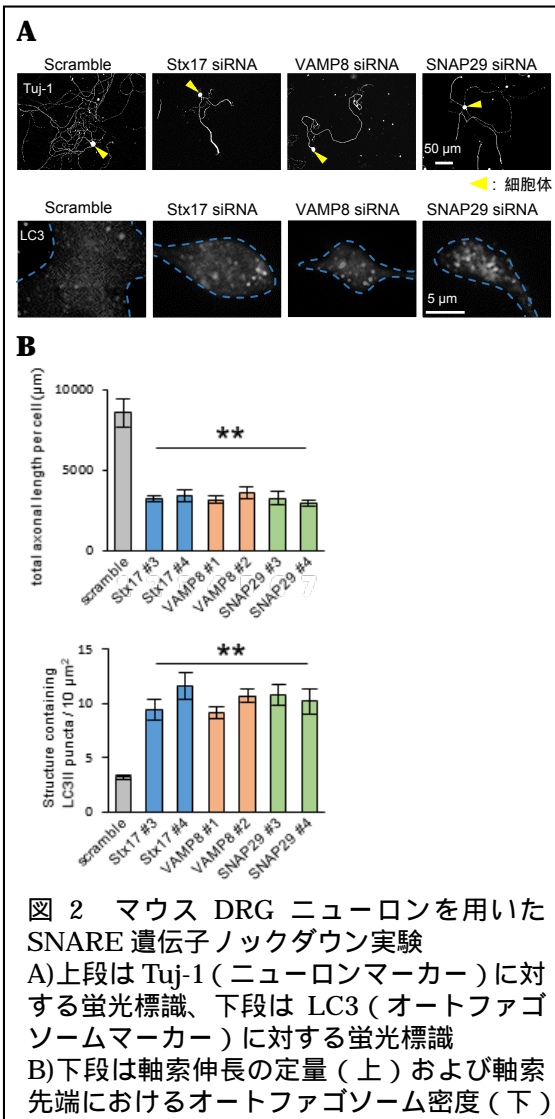


図 2 マウス DRG ニューロンを用いた SNARE 遺伝子ノックダウン実験
A) 上段は Tuj-1 (ニューロンマーカー) に対する蛍光標識、下段は LC3 (オートファゴソームマーカー) に対する蛍光標識
B) 下段は軸索伸長の定量 (上) および軸索先端におけるオートファゴソーム密度 (下)

先端部にはオートファゴソームが蓄積した。つまり、dystrophic growth cone 形成が誘導されることが認められた (図 2)。

さらに、dystrophic growth cone を解除する条件を探索した。まず、合成糖鎖によるレスキューを試みた。CSPG 濃度勾配上に培養した DRG ニューロンに合成糖鎖を処理すると、いくつかの合成物は、dystrophic growth cone をレスキューする効果を示した (図 3)。

この Glial scar の CSPG 濃度勾配を模倣した培養モデルを用いることで、ハイスループットではないものの、dystrophic growth cone をレスキューする化合物のスクリーニングができる。実際に、dystrophic growth cone をレスキューするポテンシャルを示す化合物を見出した (図 4)。

本研究では、損傷した神経軸索が病態としてみせる dystrophic growth cone について解

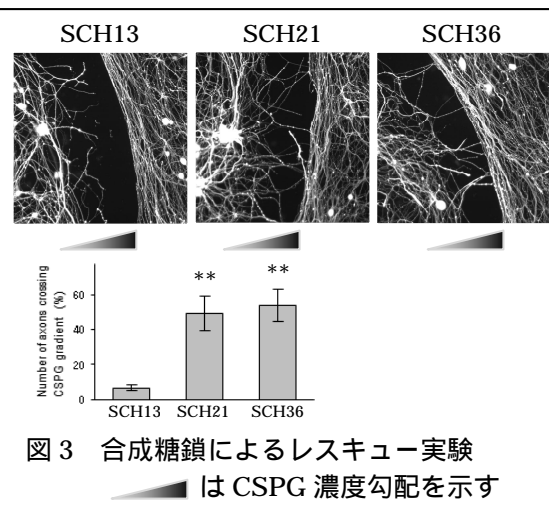


図 3 合成糖鎖によるレスキュー実験
▲ は CSPG 濃度勾配を示す

析した。まず、損傷したマウス脊髄の損傷部位において、dystrophic growth cone 形成に陥った、軸索先端部にオートファゴソーム蓄積が確認できた。また、オートファジーの流れを止めることで、dystrophic growth cone 形成を誘導できることも分かった。さらに、in vitro 培養系での薬剤スクリーニングにより、合成糖鎖あるいはある化合物の処理は、dystrophic growth cone 形成を解除し、レスキューできることを見出した。

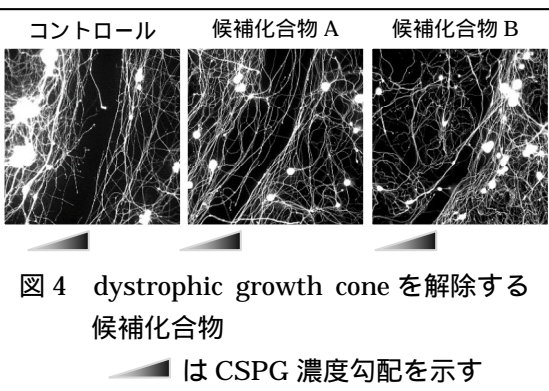
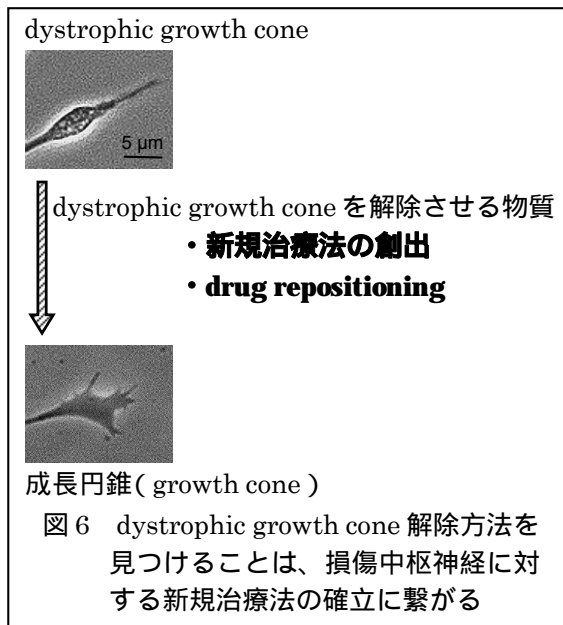
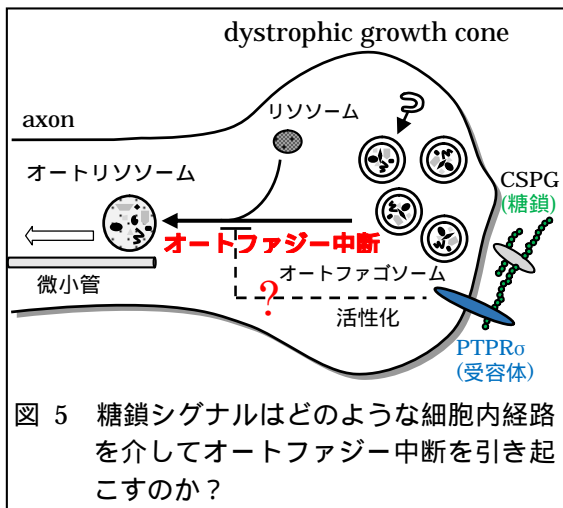


図 4 dystrophic growth cone を解除する候補化合物
▲ は CSPG 濃度勾配を示す

現在は、これらの結果の一部については、Nature chemical biology 誌に投稿・リバイズ中である。また、今後の展望として、糖鎖によるオートファジー中断をどのような細胞内経路を介するか明らかにしたい (図 5)。これまでの先行研究によって、dystrophic growth cone 形成過程において、受容体型チロシン脱リン酸化酵素である receptor protein tyrosine phosphatase (PTPR) が CS 鎖の受容体として機能することが分かっている (Shen et al., Science 2009, Lang et al., Nature 2015)。しかしながら、PTPR の基質といった下流シグナルについては不明である。今後は、糖鎖シグナルが、どのような細胞内機構でオートファジー中断を引き起こすのか、その実態に迫りたい。そして、損傷脊髄の治療戦略として糖鎖や dystrophic growth cone と標的にすることの可能性を吟味し、新規治療法の創出に繋げる。

さらに、本研究で、見出した dystrophic growth cone をレスキューするポテンシャルを示した化合物について、動物実験を行い、脊髄損傷を治療できるか、後肢の運動機能回復の度合いを評価して検証していく。そして、ヒト中枢神経の損傷に対する新規治療戦略の創出に繋げたい(図6)。



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 0 件)

[学会発表](計 5 件)

- 尾崎智也、坂元一真、Yuanhao Gong、門松健治 . Autophagy disruption and axon regeneration failure by chondroitin sulfate .第 41 回神経科学大会 ,2018 年 7 月 26-29 日 , 神戸 , ポスター発表
- 尾崎智也、坂元一真、Yuanhao Gong、内村健治、門松健治 .Sugar chain signals lead

to autophagy disruption and axon regeneration failure . 第 40 回神経科学大会 ,2017 年 7 月 26-29 日 , 横浜 , ポスター発表

- 尾崎智也、坂元一真、Yuanhao Gong、内村健治、門松健治 . 損傷した神経で起こる糖鎖によるオートファジー中断 . 第 35 回日本糖質学会年会 ,2016 年 9 月 1 日 , 高知 , 口頭発表

- 尾崎智也、坂元一真、Yuanhao Gong、内村健治、門松健治 . A proteoglycan gradient induce autophagy disruption and axon regeneration failure . 第 39 回日本神経科学大会 ,2016 年 7 月 22 日 , 横浜 , ポスター発表

- 尾崎智也、坂元一真、Yuanhao Gong、内村健治、門松健治 . Chondroitin sulfate proteoglycan gradients disrupt autophagy and inhibit axon regeneration. Toyama University International Symposium - Asian Network for Neuroscience- 2016 年 7 月 20 日 , 富山 , 招待講演

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾崎 智也 (OZAKI, Tomoya)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40710588

