

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15363

研究課題名（和文）糖鎖によるオートファジー中断機構を狙った損傷神経新規治療法の基盤研究

研究課題名（英文）Research on novel therapy for damaged nerves targeting the mechanism of autophagy interruption by sugar chains

研究代表者

尾崎 智也（Tomoya, Ozaki）

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

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、損傷した神経軸索の病態であるdystrophic endballについて、その形成メカニズムの一端であるCS/PTPR⁻-cortactin-autophagy中断という細胞内経路の存在と機能を実証した。dystrophic endballを培養し解析したところ、(i)dystrophic endballではcortactinのリン酸化が抑制されていることが観察された。またgrowth coneにおいて、(ii)cortactin遺伝子のノックダウンがdystrophic endballの表現型を惹起した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、dystrophic endball形成を担うCS/PTPR⁻-cortactin-autophagy中断という細胞内経路の存在と機能を実証した。本研究は、100年近く前にCajalが残した謎を解き明かし、神経科学分野、糖鎖研究および受容体型phosphataseの研究分野にインパクト与えた。また本研究が見出した、損傷神経の軸索末端部でのCS/PTPR⁻-cortactin-autophagy中断という細胞内イベントは、脊髄損傷など神経損傷に対する新規の治療点を提案するものである。今後は新たに見出した治療点候補について、理解を深め、動物実験での評価に移っていく予定である。

研究成果の概要（英文）： This study demonstrates the existence and function of an intracellular pathway, CS/PTPR⁻-cortactin-autophagy interruption, which is part of the formation mechanism of the pathology of damaged neuronal axons, in the dystrophic endball.

When dystrophic endballs were cultured and analyzed, we have observed that (i) phosphorylation of cortactin was inhibited in dystrophic endballs. And, we have seen that (ii) knockdown of cortactin gene triggered dystrophic endball phenotypes in growth cone.

研究分野：神経生理学、神経病理学

キーワード：軸索損傷 dystrophic endball コンドロイチン硫酸 オートファジー中断 cortactin

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

損傷した脊髄組織の損傷部には、グリア性瘢痕 (glial scar) が形成され、そこには濃度勾配を呈したコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG : Chondroitin sulfate proteoglycan) が蓄積する (Davies et al., *J Neurosci.* 1999)。その CSPG 上の糖鎖、コンドロイチン硫酸 (CS) は、再伸長を試みる神経軸索の再伸長を阻害する。その際、先端には腫大した異常形態が観察される (図 1)。この損傷神経の異常形態は、80 年より前に、Cajal に見出されており (Cajal, *Degeneration & Regeneration of the Nervous System* 1928)、dystrophic endball と呼ばれる。また、糖鎖を標的とすることで、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 (Sakamoto & Kadomatsu, *Biochim. Biophys. Acta.* 2017)。

Dystrophic endball に関する情報は少なく、形成メカニズムは分かっていない。これまでの先行研究によって、dystrophic endball 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 σ (PTPR σ) 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 σ の基質といった下流シグナルについては不明である。本研究では、この糖鎖シグナルが、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 endball 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。

2. 研究の目的

本研究では、損傷した軸索の病態である dystrophic endball について、その形成メカニズムを洞察する。上述したように、dystrophic endball 形成は、軸索先端での CS 鎖と PTPR σ の結合が引き金となる。また、dystrophic endball の表現型として、オートファジー中断によるオートファゴソーム蓄積がある。本研究では、この CS 鎖-PTPR σ とオートファジー中断を結ぶ細胞内シグナルを明らかにする。研究代表者らは、すでに PTPR σ の基質分子として、オートファジー中断へとつながる可能性のある分子について検証を始めている。cortactin (コータクチン) は、細胞内で、オートファゴソームとリソソームとの融合する際に機能する分子として知られている (Hasegawa et al., *EMBO J* 2016)。その機能は、チロシン残基のリン酸化により制御される。リン酸化されると活性化し、オートファジーを正常に進行させる。本研究では、コータクチンが CS 鎖-PTPR σ とオートファジー中断を結ぶ分子かどうかを検証する。

さらに本研究では、その CS 鎖-PTPR σ とオートファジー中断を結ぶ細胞内シグナル経路上の分子が、損傷神経の治療標的になり得るか評価していく。例えば、合成糖鎖やオートファジー関連分子の活性を変える物質など。in vitro において効果が認められる物質に関しては、脊髄損傷マウスを作製し解析する。本研究の完成は、損傷神経を治療する手立てとして、新たな標的にオートファジーを提案するものになる。

3. 研究の方法

これまでの研究成果で、dystrophic endball 形成には、オートファジー中断が深く関わることは証明できている。本研究では、CS 鎖受容が、どのようにオートファジー中断に行き着くのか、その細胞内メカニズムを解明に挑んだ。さらには、糖鎖-オートファジーという経路において、損傷神経に対する治療のための標的分子の発見を目指した。

まずは、dystrophic endball 形成を担う PTPR σ 基質としての cortactin についての評価を行った。CS 鎖-PTPR σ とオートファジー中断を結ぶ細胞内シグナルを明らかにするため、まず、脱リン酸化酵素である PTPR σ の基質を探索した。濃度勾配を呈した CSPG 上に培養することで、軸索伸長を阻害し、dystrophic endball 形成を誘導できる培養モデル (Tom et al., *J. Neurosci.* 2004) を用いて、dystrophic endball を培養し、cortactin を候補として、cortactin のリン酸化レベルを、免疫染色により検出し比較した。dystrophic endball およびラミニン上に培養された正常な成長円錐 (growth cone) について染色シグナルを解析、比較した。

次に、cortactin の遺伝子ノックダウンにより、dystrophic endball 形成が惹起されるか否か検証した。growth cone に対し、レンチウイルスベクター発現システムを使い cortactin 遺伝子ノックダウンを施し、先端部の形態、軸索伸長、オートファゴソームの密度について数値化し解析した。

さらに、CS の受容体である PTPR σ の脱リン酸化酵素活性を欠損した phosphatase dead 変異体 PTPR σ を CS 濃度勾配上に培養された dystrophic endball に発現させ、その効果を観察した。

本研究期間を通じて、in vitro 培養系を用いて治療薬候補薬剤の探索を行ってきた。dystrophic endball に、合成糖鎖、糖鎖結合物質、オートファジー制御物質など様々な薬剤を処理し、CS 濃度勾配のバリアーを乗り越えて伸長した軸索をカウントし、薬剤の効果を評価した。

4. 研究成果

growth cone および dystrophic endball 内の cortactin のリン酸化について解析したところ、dystrophic endball ではリン酸化 cortactin は減少していた (図1)。この結果は、dystrophic endball 形成に cortactin の機能変化が関わることを示唆すると考えた。

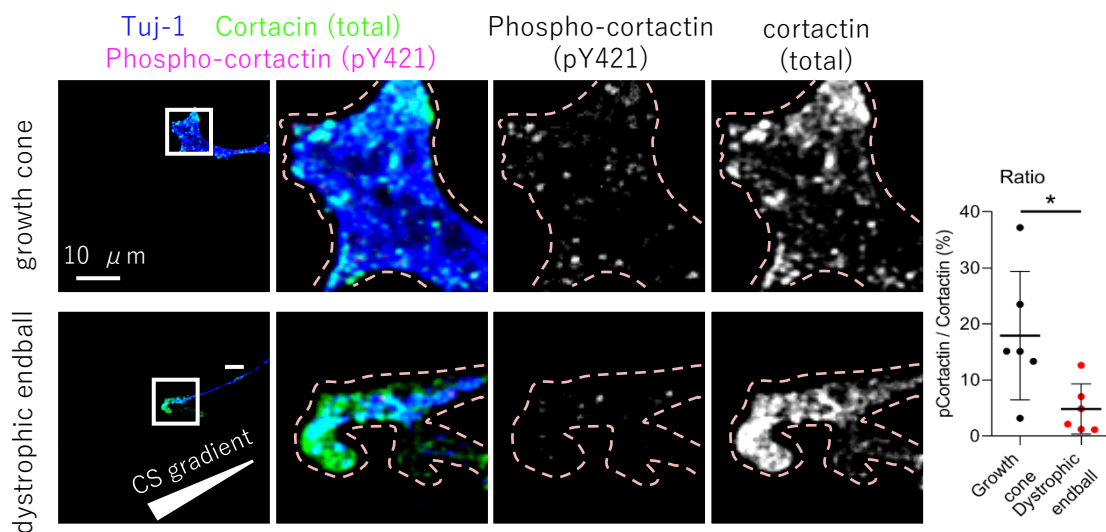


図1 growth cone および dystrophic endball における cortactin のリン酸化の解析

次に、cortactin 遺伝子のノックダウンが dystrophic endball の表現型を惹起するかどうか評価した結果、cortactin 遺伝子のノックダウンにより神経軸索の伸長が阻害されることが観察できた (図2 A)。また、軸索先端部における形態は腫大し、オートファゴソムの貯留が認められた (図2 B)。ここまでの結果は、cortactin が脊髄損傷などの軸索損傷の治療点となることを示している。

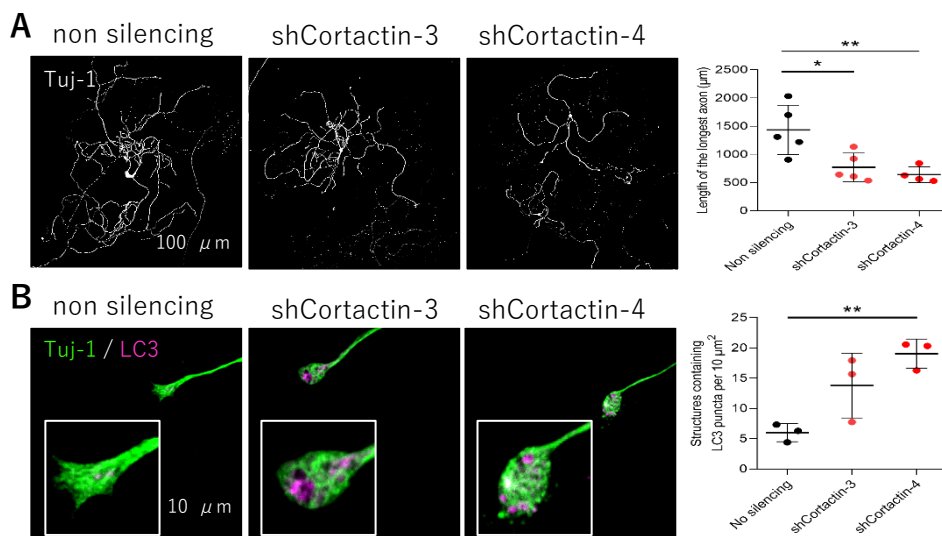


図2 cortactin 遺伝子ノックダウンの効果

さらに、神経細胞の膜上で働く CS の受容体である PTPR σ の脱リン酸化酵素活性を欠失させた phosphatase dead 変異体を作製し、dystrophic endball に発現させると、CS バリアーを乗り越え伸長する神経軸索が有意に増加する結果も得られた (図3)。ここまでに得られた実験結果とまとめた論文は、2019年に Nature Chemical Biology 誌に受理された (Sakamoto* Ozaki* et al., Nat. Chem. Biol. 2019 *equal contribution)。この論文は、100年近く前に Cajal によって見出された dystrophic endball を詳細に解析し、内部にオートファゴソムが蓄積すること、その形成にオートファジー中断が関わることを示し、このオートファジーの破綻には、糖鎖がアクティブリガンドとして受容体型 phosphatase に作用し cortactin という基質の機能を制御するという学術的インパクトを与えるものとなった。

一方で、上述したように本研究期間を通じて、*in vitro* 培養系を用いて治療薬候補薬剤の探索を行ってきた。dystrophic endball に、合成糖鎖、糖鎖結合物質、オートファジー制御物質など様々な薬剤を処理し、CS 濃度勾配のバリアーを乗り越えて伸長した軸索をカウントし、薬剤の効果を評価した。その中で、糖鎖に結合できる物質が dystrophic endball を強くレスキューした (未発表データ)。この結果をもとに、脊髄損傷マウスモデルを作製し、治療実験を試みたところ、その物質はマウスにおける、脊髄損傷による後肢運動機能を改善させた (未発表データ)。驚くべきことに、この物質は既存薬として、すでにヒトに使われている。しかも、受傷後1週間

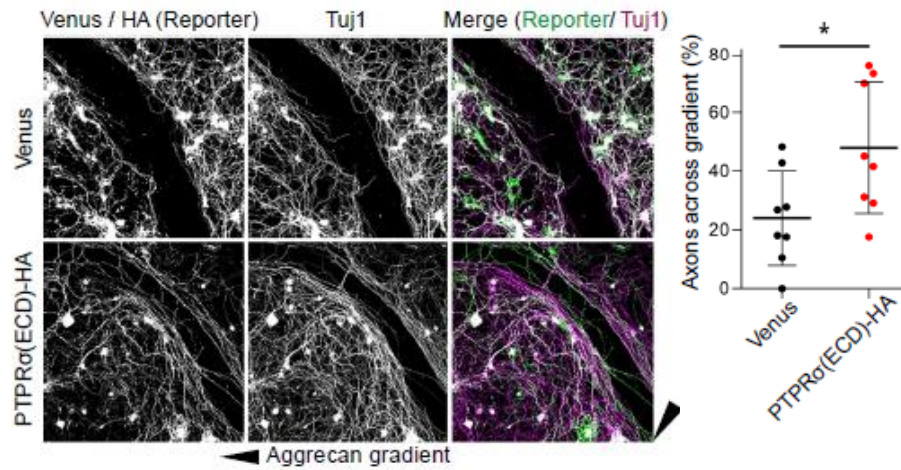


図3 PTPR α の脱リン酸化酵素活性を欠損した phosphatase dead 変異体 PTPR α による dystrophic endball のレスキュー実験

後に全身性の投与（尾静脈からの投与）で、治療効果が見られる（未発表データ）。今後は、既存薬である糖鎖結合物質（名称は特許申請のため伏せる）が示す治療効果、治療機序を理解するため、実験を進めていく。また、本研究で、新たに見出した cortactin という損傷軸索における治療点候補について、理解を深め、動物実験での評価に移っていく予定である。例えば、cortactin のリン酸化をコントロールすることで、dystrophic endball をレスキューするか検証し、レスキュー効果が見られれば治療実験へと進む予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakamoto Kazuma, Ozaki Tomoya, Ko Yen-Chun, Tsai Cheng-Fang, Gong Yuanhao, Morozumi Masayoshi, Ishikawa Yoshimoto, Uchimura Kenji, Nadanaka Satomi, Kitagawa Hiroshi, Zulueta Medel Manuel L., Bandaru Anandaraju, Tamura Jun-ichi, Hung Shang-Cheng, Kadomatsu Kenji	4. 巻 15
2. 論文標題 Glycan sulfation patterns define autophagy flux at axon tip via PTPR -cortactin axis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 699 ~ 709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-019-0274-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 尾崎智也、坂元一真、Yuanhao Gong、門松健治
2. 発表標題 コンドロイチン硫酸が引き起こすオートファジー中断と軸索再生不全
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾崎智也、坂元一真、Yuanhao Gong、門松健治
2. 発表標題 Chondroitin sulfate disrupts autophagy and inhibits axon regeneration after neuronal injury
3. 学会等名 第48回北米神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾崎智也、坂元一真、Gong Yuanhao、門松健治
2. 発表標題 Chondroitin sulfate disrupts autophagy and inhibits axon regeneration via PTPR cortactin axis
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎智也, 坂元一真, Gong Yuanhao, 門松健治
2. 発表標題 Chondroitin sulfate disrupts autophagy flux and inhibits axon regrowth via PTPR -cortactin axis
3. 学会等名 第9回 名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoya Ozaki, KazumaSakamoto, YuanhaoGong, Kenji Kadomatsu
2. 発表標題 A glycan disrupts autophagy flux and inhibits axon regrowth via PTPR -cortactin axis
3. 学会等名 第1回CIBoGリトリート(第12回NAGOYAグローバルリトリート)(国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----