

平成 23 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究 C  
研究期間：2008 ～ 2010  
課題番号：20500314  
研究課題名（和文）  
脳に分布する新規細胞外マトリックス構造の組織化学的解析  
研究課題名（英文）  
DACs, novel matrix structure composed of chondroitin sulfate proteoglycan in the brain  
研究代表者  
辰巳 晃子（ Kouko Tatsumi ）  
奈良県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90208033

研究成果の概要（和文）：脳に最も多く存在する細胞であるアストロサイトは、多様なサブタイプを持つ不均一な集団である。私達はコンドロイチン硫酸で修飾される新たなサブタイプのアストロサイトを発見し、これをDACs (Dandelion Clock-like Structure) と名付けた。DACsは哺乳類(マウス・ラット・ヒト・ブタ等)の成熟脳では保持されるものの鳥類(アイガモ)では観察されず、脳の高次機能との関連が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We found a novel CSPG-containing extracellular matrix structure in the adult cerebral cortex and named it Dandelion clock-like structure (DACs) for its morphology reminiscent of dandelion clock. Immunohistochemical analysis showed that DACs is produced by a novel specific subset of astrocytes and is conserved among the species higher than rodents. These findings suggested that DACs participate in higher function of brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
21 年度	700,000	210,000	910,000
22 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総 計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：アストロサイト・コンドロイチン硫酸・DACs

1. 研究開始当初の背景: 脳におけるプロテオグリカンの役割の研究過程で、コンドロイチン硫酸の糖鎖を認識するモノクローナル抗体により脳の広範囲にわたって非常に特徴的な構造物が検出されることを見出した。

2. 研究の目的: これらの新しい構造物の正体を知り、脳機能との関連を解明する。

3. 研究の方法: DACs は、コンドロイチン硫酸の糖鎖を認識するモノクローナル抗体

(CS56/IgM 抗体)により検出された構造物である。これらの構造物の正体を解明するために、

(1)DACS 微細構造を観察し、脳内の各種細胞との関連を免疫組織化学的に解析する。

(2)DACS の個体発生と系統発生について、その発生時期や動物種間での保存について解析する。

(3)脳の病的状態のモデルマウスを作成してDACs の動態について観察し、その機能を解析する。

(4)DACs を構成するコンドロイチン硫酸を特定するために、脳組織からCS56抗体で検出されるタンパクを精製しクロマトグラフィ法により解析を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1)DACsの正体

①電子顕微鏡学的解析により、DACsはアストロサイトである事が明らかになった。しかし、現在使用されているいかなるアストロサイトマーカーとも共存しない(GFAP, s100beta, glutamine synthetase)。そこでGLASTやPSD95抗体による免疫組織化学的解析の結果、DACsの先端部が一部GLASTやPSD95とオーバーラップする事が判った。この事から、このアストロサイトはシナプス部に接触する部分が特に強くコンドロイチン硫酸により修飾されている事が判った。

②このアストロサイト(DACS) はCS56抗体で検出される。CS56抗体のほかにCS-AやCS-C抗体、更にdelta4S, delta6S, delta0S抗体で染色を行ったところ、CS-CではDACs様の形態が染色されたがCS-Aでは検出されなかった。これらの事から、DACsはCS-6Sエпитープを持つコンドロ

イチン硫酸で修飾されるアストロサイトである事が明らかになった。

##### (2)個体発生と系統発生

DACSは哺乳類(マウス・ラット・ヒト・ブタ等)の成熟脳では保持されているが、鳥類(アイガモ)では観察できなかった。又、マウスの発生過程において3週齢頃に大脳皮質に現れ、神経細胞のcritical periodとの相関関係を示した。

##### (3)病的状態の脳におけるDACs

①大脳視覚野の眼優位可塑性とDACsの関連を確認するために、出生後両眼を摘出したマウスとコントロールマウスとでDACsの形成について比較したが、形成時期や数・大きさ等に差が認められなかった。

②stub injury, cryo-injuryで損傷脳を作成した。その後DACsの形成を観察したが、損傷の影響を受けなかった。又、リポポリサッカライド(LPS)を脳内にインジェクション炎症を誘導した脳でもDACs構造に変化は見られなかった。

③アレキサンダー病モデルマウス(GFAP過剰発現)、リーラーマウス(神経細胞の構築に異常を呈する)の大脳皮質においてもDACsの構築に異常は見られなかった。

##### (4)タンパクの同定

DACSを構成するコンドロイチン硫酸を特定するために、脳組織からCS56抗体で検出されるタンパクを精製しクロマトグラフィ法により解析を行った。その結果、細胞外マトリックスを構成するテネインファミリーの一つであるテネインR(TNR) が候補に挙がった。抗TNR抗体(R&D社製とBD社製)を用いて染色を行ったところ、この2社の抗体は異なる染色性を示した。これは抗体の認識部位の相違によるものと思われる。そこ

でTNRのfibronectin type III-like ドメインを認識する部位をターゲットとしてRNA probeを作成し、CS56抗体による免疫染色を行った脳切片上で、TNRの in situ hybridizationを行った。その結果、CS56陽性の細胞にTNR mRNAの発現が見られた。この結果よりDACsは細胞外マトリックスであるテネインファミリーの一つであるテネインR (TNR)陽性のアストロサイトである事が明らかになった。

DACSの機能については今後の研究課題である。

#### 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 2 件)

- ① Tatsumi K, Hayashi N, Okuda H, Yoshikawa M, Ishizaka S, Miyata S, Manabe T, Wanaka A. DACS, novel matrix structure composed of chondroitin sulfate proteoglycan in the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 364(2):410-5, 2007(査読有)
- ② Horii-Hayashi N, Okuda H, Tatsumi K, Ishizaka S, Yoshikawa M, Wanaka A. Localization of chondroitin sulfate proteoglycan versican in adult brain with special reference to large projection neurons. *Cell Tissue Res.* 334(2):163-77, 2008(査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 和中明生、辰巳晃子、堀井-林謹子、奥田

洋明:成熟脳の新しい細胞外基質構造 DACSについて

第313回 大阪大学神経科学懇話会、2007(大阪)

- ② 辰巳晃子、堀井-林謹子、奥田洋明、和中明生: DACS, a novel matrix structure composed of chondroitin sulfate proteoglycan in the brain.

第51回 日本神経化学会総会(シンポジウム), 2008(富山)

- ③ 辰巳晃子・林 謹子、奥田洋明、宮田清司、眞部孝幸、和中明生: DACS, novel matrix structure composed of chondroitin sulfate proteoglycan in the brain.

第31回日本神経科学大会, 2008(東京)

[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

辰巳晃子 (Kouko Tatsumi)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：9020803

### (2) 研究分担者

和中明生 (Akio Wanaka)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90210989

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：