

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20700318

研究課題名 (和文) コンドロイチン硫酸による神経損傷再生の制御機構

研究課題名 (英文) Regulation of neuronal regeneration by chondroitin sulfate

研究代表者

外角 直樹 (SOTOGAKU NAOKI)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：60368884

研究成果の概要 (和文)：コンドロイチン硫酸 (CS) は、神経細胞の接着や突起伸展を制御している細胞外糖鎖分子である。本研究では、神経幹細胞の接着や分化を変化させる CS 糖鎖構造と、その作用分子機構について検討した。その結果、CS-E 構造を多く含有する糖鎖分子が、培養神経幹細胞の細胞接着性を著しく変化させることを見出した。さらに、CS-E 構造により接着性の変化した細胞では、主要組織適合抗原クラス I (MHC-I) やある種のケモカインなどで mRNA の発現上昇が認められた。

研究成果の概要 (英文)：Chondroitin sulfate (CS) is an important component of the cell surface and extracellular matrix in the central nervous system. CS is divided into at least four subclasses, known as CS-A, CS-C, CS-D and CS-E, on the basis of the sulfation patterns of their major disaccharide units. The CS-E polysaccharide, but not CS-A, CS-C or CS-D polysaccharide, was changed cell adhesion of neural stem cells. Several genes including *H2-Q6* (histocompatibility 2, class I antigen) and *CCL12* (chemokine (C-C motif) ligand 12) were enhanced mRNA levels in CS-E polysaccharide-treated neural stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経再生・神経可塑性

1. 研究開始当初の背景

コンドロイチン硫酸 (CS) は、神経細胞表面や細胞外マトリックスの主要成分であり、細胞の増殖や分化、神経回路の形成、神経再生を制御している。脊髄損傷や脳の傷害部位には、損傷を受けた神経の軸索伸展を阻害するグリア性瘢痕が形成される。CS は、グリア性瘢痕の構成成分であるため、神経再生の調節因子と考えられている。

CS の構造は、グルクロン酸と N-アセチルガラクトサミンからなる二糖類を基本骨格とする。この基本二糖類は、分子内の硫酸基結合の位置や数の違いにより、CS-A~E の 5 つのタイプに分類される。CS の作用は、基本二糖類の組み合わせ (糖鎖配列) により大きく異なる。しかしながら、CS は、神経組織からの精製や化学合成が困難であり、生理活性を示す部分の糖鎖配列・構造はほとんど決定されていないのが現状である。

2. 研究の目的

神経の損傷に応答して損傷部位周辺に発現誘導されるコンドロイチン硫酸 (CS) の糖鎖配列を決定し、その配列を持つ CS の神経再生制御機構を明らかにすることを目的とした。

この目的を達成するため、本研究では以下の研究項目を計画している。

- ① CS 糖鎖配列認識抗体を用いた神経損傷部位周辺に発現誘導される糖鎖配列の決定
- ② 決定された配列と同配列の合成 CS 鎖の神経細胞に対する作用の解析
- ③ 損傷部位周辺の CS 鎖の量や作用を制御した場合の神経再生効果の解析

3. 研究の方法

今回の研究費補助金では、神経幹細胞の増殖、分化、接着を制御する CS 糖鎖配列とその作用分子機構について培養神経幹細胞を用いて解析した。

(1) 神経幹細胞の接着、増殖、分化を制御する CS 糖鎖配列の解析

胎生 14 日のマウス終脳から神経幹細胞を調整し、単層培養法で培養した。培養開始 24 時間後に生化学工業 (株) より購入した CS-A から CS-E (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) や、蛋白質合成阻害剤をそれぞれ培養液に添加した。CS 添加 24 時間後に 4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、抗 Nestin 抗体、細胞系譜特異抗体で免疫細胞染色を行い、染色された細胞の形態変化や分化様式を共焦点顕微鏡で観察した。

(2) 接着性変化を制御する遺伝子-蛋白質の網羅的解析

(1) の結果、CS-E を培養液に添加した神経幹細胞で著しい接着性変化が観察されたため、CS-E で刺激した細胞で発現が変動する遺伝子を DNA マイクロアレイと定量リアルタイム PCR により解析した。

(3) CS 糖鎖配列の作用分子機構の解析

(2) で見出した発現変動遺伝子によりコードされる蛋白質を介した分子機構を、RNA 干渉法、阻害剤を用いた薬理的解析、免疫染色法により検討した。

4. 研究成果

(1) 神経幹細胞の接着性を変化させる CS-E 含有糖鎖

CS-E を添加して培養した細胞では、

著しい接着性変化が観察された（図1）。この接着性変化は、CS-A からCS-D を添加して培養した細胞では観察されなかった。また、予め蛋白質合成阻害剤を添加して培養した細胞では、CS-E 添加による接着性変化は起こらなかった（図1）。

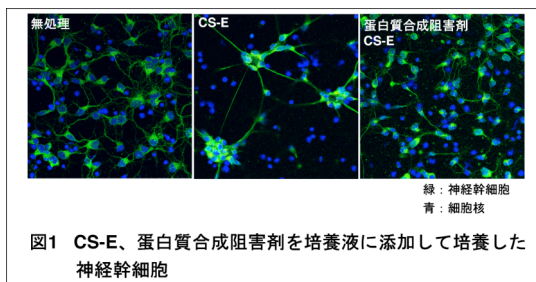


図1 CS-E、蛋白質合成阻害剤を培養液に添加して培養した神経幹細胞

これらの結果から、CS-E は、新たに蛋白質合成を誘導し、培養神経幹細胞の接着性を変化させたことが示唆された。

(2) CS-E 刺激により発現変動を示す遺伝子の解析

CS-E の刺激で発現が変動する遺伝子、その遺伝子がコードする蛋白質を同定するためにDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った（表1）。

表1 CS-E の培養液添加により神経幹細胞で発現が2.5倍以上増加した遺伝子

遺伝子	発現量変化
RIKEN cDNA 1700001J03gene	5.50
histocompatibility 2. Q region locus 6	5.19
scinderin	4.47
dihydropyrimidine dehydrogenase	4.15
chemokine (C-C motif) ligand 12	3.64
PHD finger protein 8	3.60
phospholipase A2 group X	3.24
Kruppel-like factor 1	3.21
signal-regulatory protein beta 1	2.84

(3) 接着性を変化させる分子機構の解析

RNA 干渉法 (siRNA) や蛋白質阻害剤による薬理的解析により、CS-E

の刺激で発現変動を示した遺伝子-蛋白質を介した分子機構について検討した。

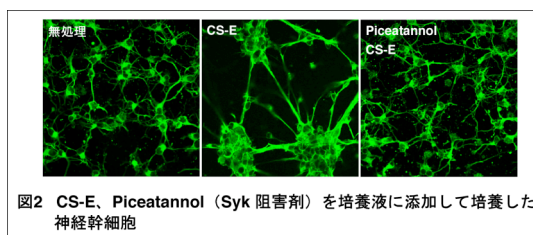


図2 CS-E、Piceatannol (Syk 阻害剤) を培養液に添加して培養した神経幹細胞

図2に示すように、Piceatannol (Spleen tyrosine kinase; Syk 阻害剤) を培養液に添加することで、CS-E による接着性変化は抑制された。

Syk は、膜表面受容体 signal-regulatory protein beta 1(表1)の下流分子である。即ち、CS-E が signal-regulatory protein beta 1 の発現を誘導し、この受容体を介したシグナルが細胞の接着性を変化させたことを示唆する。詳細な分子機構は、現在解析中である。

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1件)

- ① Nish A, Kuroiwa M, Miller DB, O' Callaghan JP, Bateup HS, Shuto T, Sotogaku N, Fukuda T, Heintz N, Greengard P, Snyder GL. Distinct roles of PDE4 and PDE10A in the regulation of cAMP/PKA signaling in the striatum. J Neurosci. 28: 10460-10471, 2008.

[学会発表] (計3件)

- ① 松井一真、外角直樹、西 昭徳：摂食調節ペプチドによる中脳ドーパミン神経細胞の突起伸展作用
第50回 日本顕微鏡学会九州支部総会
2008.12.6. (久留米)

- ② 外角直樹、西 昭徳：神経突起伸展を促進するコンドロイチン硫酸糖鎖配列とその作用分子機構

第 28 回 日本糖質学会年会 2008. 8. 18 - 21. (筑波)

- ③ 外角直樹、西 昭徳：ドーパミン神経の突起伸展を促進するコンドロイチン硫酸糖鎖配列とその作用分子機構)

第 31 回 日本神経科学大会 2008. 7. 9 - 11. (東京)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kurume-u.ac.jp/med/phram/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

外角 直樹 (Sotogaku Naoki)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：60368884

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()