

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ~ 2011

課題番号：22791371

研究課題名（和文） 脊髄損傷、脊髄腫瘍におけるケラタン硫酸の役割

研究課題名（英文） N-Acetylglucosamine 6-O-Sulfotransferase-1 is crucial enzyme for 5D4-reactive keratin sulfate biosynthesis which elicits expression after spinal cord injury.

研究代表者

安藤 圭 (ANDO KEI)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40566973

研究成果の概要（和文）：脊髄損傷の実験では、GlcNAc6ST-1-/-マウスでは脳損傷部位のグリア性瘢痕形成が抑制され、その結果神経再生が亢進した。下肢機能(BBB scoring, Foot print, Grid test)は有意にGlcNAc6ST-1-/-マウスの方が、野生型マウスと比較し回復が良好であった。In vitro においては cell line に対し、ケラタン硫酸合成に関わる7種類の酵素(b3GlcNAcT-7, GlcNAc6ST-1, 2, 3, 4, b4GalT-4, KSGal6ST-1)のうち in vitro、in vivo において knock-down を行うことで、5D4-reactive ケラタン硫酸合成酵素を同定し、損傷脊髄においては、神経再生、腫瘍においては cell viability を検討する。すでにこれまで、cell line において GlcNAc6ST-2, 3, 4 の Knock-down では 5D4 の発現に変化はなく、GlcNAc6ST-1、KSGal6ST-1 の knock-down により 5D4 の発現は抑制され、cell viability に変化が生じた。脊髄損傷後神経機能回復阻害因子である 5D4-reactive ケラタン硫酸の合成阻害をすることは、脊髄損傷患者にとって神経再生への魅力的な治療手段となりうる。

研究成果の概要（英文）：5D4-reactive KSPGs were decrease as aging in wild type mice CNS, and were loss of expression in GlcNAc6ST-1-/- mice. On the other hand, BCD4-reactive KSPGs were increased as aging in wild type and GlcNAc6ST-1-/- mice CNS. The KS enzyme b3GlcNAcT-7 was also significantly down-regulated not only GlcNAc6ST-1 in CNS of GlcNAc6ST-1-/- mice compared to that of wild type mice. 5D4-reactive KSPGs were decreased for cell lysates of GlcNAc6ST-1 siRNA transfected BV2, although BCD4-reactive KSPGs were not decreased. The enzyme b3GlcNAcT-7 was significantly downregulated not only GlcNAc6ST-1 same as in vivo study. The enzyme significantly down-regulated was only b3GlcNAcT-7. If the ablation of 5D4-reactive KS except for BCD4-reactive KS is possible, better functional recovery may be obtained. Our data suggested that GlcNAc6ST-1 was important enzyme for 5D4-reactive KSPGs biosynthesis, b3GlcNAcT-7 for both 5D4 and BCD4-reactive KSPGs biosynthesis. The data was supported with in vitro study used transfected microglia cell line. Interestingly, GlcNAc6ST-1 may regulate b3GlcNAcT-7 by decrease of own expression. GlcNAc6ST-1 specific down-regulation treatment may be the key in CNS injury.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 総計 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |

研究分野：脊椎外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：GlcNAc6ST-1、脊髄損傷、脊髄腫瘍

1. 研究開始当初の背景

現在の日本では約 10 万人の以上の脊髄損傷患者が麻痺を抱えたまま生活を余儀なくされており、毎年 5000 人以上の患者が脊髄損傷を来し、発生率は若い世代で高く個人と社会に与える肉体的、精神的、経済的負担は極めて大きい。

しかし近年の研究では損傷神経を再生する試みが幾つかなされている。NT-3 やニューロトロフィンなどの神経栄養因子の存在やコンドロイチン硫酸 (CS)、Nogo、MAG、Socs3 などの神経再生抑制因子の発見に伴い脊髄損傷の病態解明が進んできており、臨床応用への展開が期待される。また損傷脊髄における種々の軸索再生阻害因子の機構が解明され、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) はその代表である (Morgenstern et al. Prog Brain Res. 137. 2002)。CSPG をターゲットとした治療介入の報告として英国の J. W. Fawcett のグループが脊髄損傷ラットに対するコンドロイチナーゼ ABC (以下 C-ABC) 投与実験で、下肢の運動機能回復を報告している。しかしいずれも小動物を利用した実験系での解明段階であり、今後は現存する神経栄養因子のさらなる発展及び新しい神経軸索再生抑制因子の発見が急務となっている。そこで我々は新しい神経軸索再生抑制因子および脊髄腫瘍悪性化因子と予測されるプロテオグリカンの 1 種であるケラタン硫酸 (KS) に着目した。

2. 研究の目的

これまで我々はケラタン硫酸 (KS) プロテオグリカン (PG) を中心に細胞外基質についての研究を進め、KS 分解酵素であるケラタナーゼを脊髄損傷を起こしたラットに投与することによって、脊髄機能回復が明らかに改善したという結果を得、また KS は CS と同様に、ヒアルロン酸やテネイシンと結合することにより、固い Perineuronal net を形成しており、physical barrier、molecular barrier として神経再生を阻害しており、周知の PG であるコンドロイチン硫酸 (CS) と同様の神経軸索再生抑制効果をもつことがわかった。しかし、臨床応用あるいは治験へ応用するにあたり、ウイルスを媒体 KS 分解酵素ケラタナーゼは現実的ではなく、脊髄損傷、脊髄腫瘍悪性化に関与するケラタン硫酸、およびその合成に関与するのに critical となる合成酵素の同定が必要となる。本研究の目的は、いまだ未確立の脊髄損傷治療に対する KSPG の合成酵素 (遺伝子) の神経軸索再生抑制効果、役割を調べることであ

3. 研究の方法

ケラタン硫酸プロテオグリカンに関わる 7 種類の合成酵素

(b3GlcNAcT-7, GlcNAc6ST-1, 2, 3, 4, b4GalT-4, KSGal6ST-1) のうち in vitro、in vivo において knock-down を行うことで、5D4-reactive ケラタン硫酸に最も重要な合成酵素を同定し、損傷脊髄において、神経再生、機能回復を検討する。

脊髄損傷モデルの作成として、8 週齢 C57BL6/J の野生型マウスを用い、ネンブタール (50mg/kg) 腹腔内麻酔下に後方より T10 を椎弓切除後、IH-0400 impactor (Neuroscience. idea, Co., Ltd) を用いて 100kdyn にて圧挫モデルを作成する。

運動機能評価として swing test、BBB、Grid test、Foot print analysis を行い、定時刻、double blind にて複数人の検者にて 8 週間観察する。

電気生理学的検査としてネンブタール (50mg/kg) 腹腔内麻酔下に、8 チャンネル筋電図/誘発電位システム Viking IV (Nicolet, Japan) を使用、pick up 電極は 0.3mm ステンレス製動物用双極微小電極 (Nihon Koden, Japan) を用い、Motor Evoked Potential (頸椎刺激、8mV 100 回加算) を測定し、Latency, Duration, Amplitude の差を測定し解析を行う。

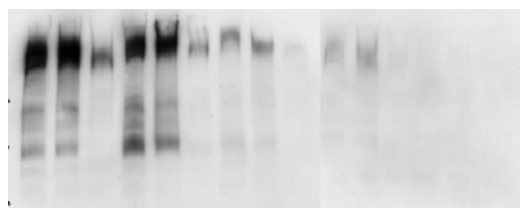
4. 研究成果

ケラタン硫酸 (KS) は N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) とガラクトースの 2 糖が繰り返すグリコサミノグリカンである。そこで我々の教室は、GlcNAc の C6 位の硫酸基を転移する酵素である

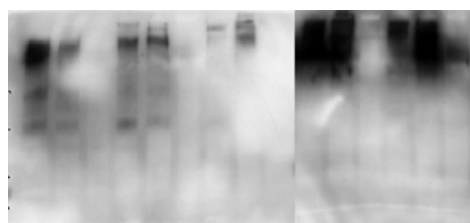
GlcNAc6ST-1 (GlcNAc 6-sulfotransferase-1) を cDNA クローニングし、その欠損マウス (GlcNAc6ST-1^{-/-}) を作成した。脊髄損傷の実験では、GlcNAc6ST-1^{-/-} マウスでは脳損傷部位のグリア性瘢痕形成が抑制され、その結果神経再生が亢進した。下肢機能 (BBB scoring, Foot print, Grid test) は有意に GlcNAc6ST-1^{-/-} マウスの方が、野生型マウスと比較し回復が良好であった。ケラタン硫酸に対する抗体としては現在、disulfation を認識するとされる 5D4 と monosulfation を認識するとされる BCD4 があり、当教室でのデータでは脊髄もしくは脳損傷後に発現が増加するケラタン硫酸は 5D4 の epitope である蛋白であり (BCD4 の発現に変化はみられない)、5D4 が脊髄損傷に関与していると考えられる。

Western blot において、5D4-reactive-KS はマウスの中樞神経において週齢とともに減少

しており、KS は生後間もない時期の中枢神経には存在するものの、成熟するにしたがい減少していく、そして脊髄損傷により発現が認められると考えられた。(図 1)



(図 1:左より 3 列ずつ、組織のみ、組織+ChABC、組織+ChABC+KeratanaseII が生後 1 日、1 週、2 週、4 週、8 週)



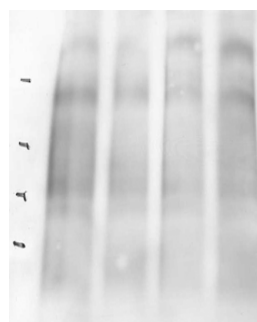
(図 2:左より 3 列ずつ、組織のみ、組織+ChABC、組織+ChABC+KeratanaseII が生後 1 日、1 週、2 週、4 週、8 週)

一方で BCD4-reactive-KS はマウスの中枢神経において週齢とともに明らかに増加していた。(図 2)

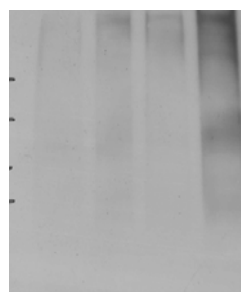
KS 合成酵素においては、b3GlcNAcT-7、GlcNAc6ST-1, 2, 3, 4, b4GalT-4 に明らかな変化を認めなかったものの、KSGal6ST-1 で週齢とともに減少していた。脊髄損傷マウスの損傷部位を損傷後各週齢で取り出し、real-time PCR により増加する合成酵素の同定を行ったところ b3GlcNAcT-7、GlcNAc6ST-1, 2, 3, 4, b4GalT-4 に明らかな変化はなかったものの KSGal6ST-1 の有意な発現増加を認めた。

In vitro においては cell line に対し、ケラタン硫酸合成に関わる 7 種類の酵素 (b3GlcNAcT-7, GlcNAc6ST-1, 2, 3, 4, b4GalT-4, KSGal6ST-1) において knock-down を行った。cell line において western blot を行ったところ、GlcNAc6ST-2, 3, 4 の knock-down では 5D4 の発現に変化はなく、b3GlcNAcT-7、GlcNAc6ST-1、KSGal6ST-1 の knock-down により 5D4 の発現は抑制された。とくに

GlcNAc6ST-1(図 3) よりも b3GlcNAcT-7、KSGal6ST-1(図 4) のほうがより強く発現が抑制されていた。



(図 3:左3列が cell line transfection、右が negative control)



(図 4:左3列が cell line transfection、右が negative control)

同様の transfection を行い、BCD4 の発現をみたところ、GlcNAc6ST-2, 3, 4 の knock-down では 5D4 と同様に BCD4 の発現に変化はなかった。b3GlcNAcT-7 を knock-down したところ BCD4 の発現も減少、GlcNAc6ST-1、KSGal6ST-1 においては発現に変化を認めなかった。

KS 分解酵素であるケラタナーゼを脊髄損傷を起こしたラットに投与することによって、脊髄機能回復が明らかに改善した。

野生型マウスと GlcNAc6ST-1^{-/-}マウスを用い脊髄損傷圧挫モデルを作成し、8 週間のプロトコールを組み下肢機能検査 (BBB scoring, Foot print, Grid test)、電気生理学的検査 (motor evoked potential)、免疫組織学的評価 (HE 染色、蛍光染色、ルクソールファストブルー染色など) で、下肢機能は有意に GlcNAc6ST-1^{-/-}マウスの方が回復がよい結果であり、これは 5D4-reactive-KS の発現低下により、脊髄機能回復が得られたと考えられる。さらに 5D4-reactive-KS の発現に最も重要な合成酵素として KSGal6ST-1 である可能性が考えられた。

脊髄損傷に関与するケラタン硫酸、およびその合成に関与するのに critical となる合成

酵素である KSGal6ST-1 に対する治療を行うことは、脊髄損傷患者にとって神経再生への期待、希望が持てる非常に興味深い、安全で魅力的な治療手段となりうると考える。

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 3 件)

1. Kei Ando, Imagama S, Ito Z, Hirano K, Tauchi R, Muramoto A, Matsui H, Matsumoto T, Sakai Y, Matsuyama Y, Ishiguro N. Differentiation of Spinal Schwannomas and Myxopapillary Ependymomas: MR Imaging and Pathologic Features. J Spinal Disord Tech. in press. 2013. 査読有

2. Kei Ando, Imagama S, Wakao N, Hirano K, Tauchi R, Muramoto A, Kato F, Yukawa Y, Kawakami N, Sato K, Matsubara Y, Kanemura T, Matsuyama Y, Ishiguro N. Examination of the influence of ossification of the anterior longitudinal ligament on symptom progression and surgical outcome of ossification of the thoracic ligamentum flavum: a multicenter study. J Neurosurg Spine. 16:147-153. 2012. 査読有

3. Ito Z, Sakamoto K, Imagama S, Matsuyama Y, Zhang H, Hirano K, Ando K, Yamashita T, Ishiguro N, Kadomatsu K. N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1-deficient mice show better functional recovery after spinal cord injury. J Neurosci. 2010 Apr 28;30(17):5937-47. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

1. Kei Ando, N-Acetylglucosamine 6-O-Sulfotransferase-1 is crucial enzyme for 5D4-reactive keratin sulfate biosynthesis which elicits expression after spinal cord injury. 2011 Annual meeting of Orthopedics Research society. long beach, USA .2011. 1. 13-16

6. 研究組織

(1)研究代表者

安藤 圭 (ANDO KEI)

名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：40566973

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし