

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500422

研究課題名(和文) 損傷後の中枢神経系における TGF-β の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of TGF-beta in the injured central nervous system

研究代表者

川野 仁 (KAWANO, Hitoshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・研究員

研究者番号：20161341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳損傷部における transforming growth factor-β1 (TGF-β1) の機能を明らかにする目的で以下の実験を行った。マウスの脳損傷部に各種の糖鎖分解酵素を投与した結果、コンドロイチン硫酸が切断された中脳ドーパミン軸索の再生阻害に働き、コンドロイチン硫酸の異性体であるデルマトン硫酸が線維性瘢痕の形成に関与することを見出した(Li et al., 2013)。損傷部におけるデルマトン硫酸の発現はTGF-β1により誘導されることから、線維性瘢痕の形成に対するTGF-β1の作用はデルマトン硫酸を介すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The role of chondroitin sulfate (CS) and dermatan sulfate (DS) was examined in mice after transection of nigrostriatal dopaminergic pathway and treatment with of glycosaminoglycan degrading enzymes. Two weeks after injury, fibrotic and glial scars were formed around the lesion and transected axons did not regenerate beyond the lesion. Injection of chondroitinase B, which degrades DS, into the lesion site completely suppressed the fibrotic scar formation, reduced the glial scar and promoted the regeneration of dopaminergic axons. In contrast, injection of chondroitinase AC, a CS-degrading enzyme, did not suppress the fibrotic scar formation, but promoted the axonal regeneration. These results first demonstrate that DS and CS play different functions after CNS injury: DS is involved in the lesion scar formation and CS inhibits axonal regeneration (Li et al., 2013).

研究分野：神経再生

キーワード：神経再生 線維性瘢痕 TGF-beta コンドロイチン硫酸 デルマトン硫酸

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の中枢神経系では損傷後の軸索再生がほとんど起こらない。その理由として、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを始めとする種々の再生阻害因子の存在が挙げられてきた。

線維性癒痕は中枢神経系の損傷後、髄膜の線維芽細胞が損傷部に侵入・増殖し、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを分泌して形成する、いわば「カサブタ」のようなものである。

われわれは2005年から2008年まで、マウスおよびラット脳に損傷を加え、その後種々の薬剤や細胞を脳内に投与することで線維性癒痕の形成を阻害する実験を行った。すると線維性癒痕の形成されない状態では切断された中脳ドーパミンニューロンの軸索が再生することを見出し、線維性癒痕が中枢神経系における軸索再生の主要な阻害因子であることを報告してきた。

そこで次に、線維性癒痕の形成メカニズムを調べる以下の実験を行い、線維性癒痕の形成に transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) の関与を示す一連の研究成果を得た。

- (1) マウス損傷脳で TGF- 受容体 mRNA の局在を in situ ハイブリダイゼーション法により調べ、TGF- β 受容体が線維性癒痕を形成する髄膜由来の線維芽細胞に特異的に発現することを見出した (Komuta et al., , 2010)。
- (2) 髄膜の線維芽細胞と脳のアストロサイトの共細胞培養に TGF- β 1 を添加し、線維性癒痕様の細胞凝集塊を作成することに成功した (Kimura-Kuroda et al., 2010)。この細胞塊は線維性癒痕とよく似た細胞構築と遺伝子発現を示し、強力な軸索伸長阻害作用を示した。これは培養系における世界初の脳損傷モデルである。
- (3) TGF- β 1 の機能阻害剤をマウスの脳損傷部へ連続的に投与すると、線維性癒痕の形成が抑制され、中脳ドーパミンニューロンの軸索が再生した (Yoshioka et al., 2011)。

以上の結果は、中枢神経系の損傷後に発現が増加する TGF- β 1 が線維性癒痕の形成に重要な役割を果たすことを示している。

2. 研究の目的

上記のように、線維性癒痕の形成に TGF- β 1 が関与することが示されたが、TGF- β 1 の機能の詳細については不明な点が多い。本研究では特に以下の二つの点について実験的に

明らかにすることを目的とした。

- (1) TGF- β 1 のグリコサミノグリカンの発現に対する作用の解明:

グリコサミノグリカンにはコンドロイチン硫酸とその異性体であるデルマタン硫酸があるが、損傷脳におけるデルマタン硫酸の機能はまったく不明である。マウスの脳損傷部に各種の糖鎖分解酵素を投与し、2種類の糖鎖の機能を明らかにするとともに、TGF- β 1 との機能的関連を調べる。

- (2) 線維性癒痕の形成過程における TGF- β 1 の作用の解明

線維性癒痕の形成過程には、線維芽細胞の移動、増殖、凝集、細胞外マトリックスの発現増加などが順次行われるが、TGF- β 1 が各過程にどのように関与しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) まず脳損傷後における、コンドロイチン硫酸とデルマタン硫酸の機能を調べる実験を行った。マウス脳損傷部にデルマタン硫酸を分解する酵素であるコンドロイチナーゼ B と、コンドロイチン硫酸を分解する酵素であるコンドロイチナーゼ AC を投与し、2週間後に脳の組織標本作製して、線維性癒痕の形成と神経再生を解析する。
- (2) 末梢組織における癒痕形成には血小板由来成長因子 (PDGF) が関与している。そこで線維芽細胞の増殖、移動、凝集、細胞外マトリックス (ECM) の発現の各過程に対する PDGF と TGF- β 1 の作用を培養系を用いて比較する。また、マウス脳の損傷部へ PDGF の機能阻害剤を投与し、線維性癒痕の形成に対する効果を調べる実験を行い、TGF- β 1 の作用と比較する。

4. 研究成果

- (1) マウス脳の損傷モデルにおいてコンドロイチン硫酸とその異性体であるデルマタン硫酸の機能を調べた。デルマタン硫酸を分解するコンドロイチナーゼ B をマウス脳損傷部に投与すると、線維性癒痕の形成が抑制され、神経再生が促進された。これに対して、コンドロイチン硫酸を分解する酵素であるコンドロイチナーゼ AC を脳損傷部に投与すると、線維性癒痕は形成されたが、コンドロイチン硫酸が有意に減少し、神経再生が促進された。

ラット新生仔の髄膜線維芽細胞の培養系に TGF- β 1 を投与すると、線維性癍痕様の細胞凝集塊が形成されるが、事前にコンドロイチナーゼ B を投与すると、細胞凝集塊の形成が阻止された。またコンドロイチナーゼ AC を投与すると、細胞凝集塊は形成されるが、その突起伸長阻害作用は抑制された。以上の脳損傷モデルマウスと細胞培養系を用いた実験結果より、デルマタン硫酸が癍痕形成に、コンドロイチン硫酸が神経再生の阻害に機能すること示された。中枢神経系におけるデルマタン硫酸の機能的意義を明らかにしたので世界初であり、以上の研究成果は、2013 年に Journal of Neurotrauma 誌に掲載された。

- (2) 培養系を用いて線維芽細胞の増殖、移動、凝集、細胞外マトリックス (ECM) の発現の各過程に対する PDGF と TGF- β 1 の作用を調べた。すると、PDGF は線維芽細胞の増殖と移動に、TGF- β 1 は凝集と ECM の発現を促進することが分かった。以上の結果は PDGF は癍痕形成の初期の段階に、TGF- β 1 は後期の段階に関与することを示唆している。そこで、PDGF の生理作用を明らかにする目的で、マウスの脳損傷部へ PDGF の機能阻害剤を投与する実験をおこなった。100 nM の阻害剤の投与により、線維性癍痕の形成は完全に抑制され、切断されたドーパミン線維の再生が見られた。PDGF も TGF- β 1 と同様に線維性癍痕の形成に関与することが初めて示された。

今後、脳損傷モデル動物と細胞培養系を用いて、さらに線維性癍痕の形成における TGF- と PDGF の機能的な重要性を明らかにする予定である。

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 9 件)

Takeuchi K, Yoshioka N, Higa Onaga S, Watanabe Y, Miyata S, Wada Y, Kudo C, Okada M, Ohko K, Oda K, Sato T, Yokoyama M, Matsushita N, Nakamura M, Okano H, Sakimura K, Kawano H, Kitagawa H, Igarashi M: Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. Nature Communications. 2013 ; 4 : 2740. (11 pages) 査読あり doi: 10.1038/ncomms3740.

Ohtaka-Maruyama C, Hirai S, Miwa A, Heng JI, Shitara H, Ishii R, Taya C, Kawano H, Kasai M, Nakajima K, Okado H: RP58 regulates the multipolar-bipolar transition of newborn neurons in the developing cerebral cortex. Cell Reports, 2013 ; 3(2):458-471 査読あり doi:10.1016/j.celrep.2013.01.012

Li HP, Komuta Y, Kimura-Kuroda J, van Kuppevelt TH, Kawano H: Roles of chondroitin sulfate and dermatan sulfate in the formation of a lesion scar and axonal regeneration after traumatic injury of the mouse brain. J. Neurotrauma, 2013 ; 30 (5): 413-425 査読あり doi:10.1089/neu.2012.2513

Takano T, Tomomura M, Yoshioka N, Tsutsumi K, Terasawa Y, Saito T, Kawano H, Kamiguchi H, Fukuda M, Hisanaga S: LMTK1/AATYK1 is a novel regulator of axonal outgrowth that acts via Rab11 in a Cdk5-dependent manner. J. Neurosci. 2012 ; 32(19) : 6587-6599 査読あり doi:10.1523/JNEUROSCI.5317-11.2012

Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Kuroda Y, Hayashi M, Kawano H: Nicotine-like Effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons of neonatal rats. Plos One, 2012 ; 7(2) : e32432 査読あり doi:10.1371/journal.pone.0032432

Yoshioka N, Asou H, Hisanaga S, Kawano H: The astrocytic lineage marker calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1 (Camsap1): Phenotypic heterogeneity of newly born Camsap1-expressing cells in injured mouse brain. J Comp Neurol. 2012 ; 520(6) : 1301-1317 査読あり doi:10.1002/cne.22788.

[学会発表](計 19 件)

Kawano H, Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Li HP and Takeuchi K: The fibrotic scar is a major impediment for axonal regeneration after traumatic brain injury. 10th World Congress on Brain Injury. San Fransisco, USA, 2014 年 3 月 22 日

Kawano H, Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Li HP and Takeuchi K: The fibrotic scar is a major impediment for axonal regeneration after traumatic brain

injury. 34th Annual Meeting of Australian Neuroscience Society. Adelaide, Australia, 2014年1月30日

Komuta Y, Kimura-Kuroda J, Kawano H: Postnatal development of the fibrotic scar formation: an in vitro study. FENS 2012、Barcelona, Spain , 2012年7月

Takeuchi K, Higa-Onaga S, Yoshioka N, Kudo C, Kawano H, Igarashi M: Axon regeneration in the mice lacking in the enzymes synthesizing chondroitin sulfate. FENS 2012、Barcelona, Spain , 2012年7月

Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Kuroda Y, Hayashi M, Kawano H: Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. FENS 2012、Barcelona, Spain , 2012年7月

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川野 仁 (KAWANO, Hitoshi)
公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・研究員
研究者番号：20161341

(2)研究分担者

黒田純子 (KURODA, Junko)
公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・研究員
研究者番号：20142151