

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590108

研究課題名(和文) 中枢神経系におけるシアル酸の病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Pathophysiological significance of sialic acid in CNS

研究代表者

久恒 昭哲 (Hisatsune, Akinori)

熊本大学・大学院先端機構・特任准教授

研究者番号：50347001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系疾患では、髄液中や血清中シアル酸値が上昇する。そこで、本研究ではこれまで不明であったシアル酸の病態生理学的な意義の解明を最終の目的とし、以下の検討を行った。1) ミクログリアの機能に対するシアル酸の作用について検討した結果、細胞膜上シアル酸の切断遊離によって、炎症性因子の発現が著明に亢進した。

2) 神経細胞に対するシアル酸の影響について検討したところ、シアル酸の切断遊離が神経突起の伸長反応を優位に促進させた。3) 脳内における脱シアル酸化の影響を検討した結果、活性化ミクログリアが観察され、神経細胞数は有意に減少した。すなわち脳内での脱シアル酸化が、神経細胞が障害する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sialic acid is increased in serum and spinal fluid of CNS disease patients. Therefore to examine effects of sialic acid in pathophysiological situation, following are examined: 1) An effect of sialic acid on a function of microglia was performed. Desialylation on microglia induced significant expressions of inflammatory cytokines. 2) An effect of sialic acid on function of neuron was performed. Desialylation on neuron required for significant neurite outgrowth by neurite inducers. 3) An effect of desialylation in the brain was performed. Desialylation induced significant microglial activation and neuronal loss, indicating that desialylation induced neuronal damage which might be correlated with CNS disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・薬理系薬学

キーワード：シアル酸 神経細胞 ミクログリア

## 1. 研究開始当初の背景

シアル酸は、カルボキシル基とアミノ基を持つ特殊な9炭糖であり、カルボキシル基により陰性に荷電している。単体のほか、糖タンパク質や糖脂質の構成成分として細胞膜表面のオリゴ糖の末端に存在し、糖複合体の物理的な性質に大きく影響する。

糖複合体のシアル酸修飾は、シアル酸付与酵素であるシアリルトランスフェラーゼと、シアル酸切断する加水分解酵素シアリダーゼによって調節される。生合成過程においてシアル酸を付与するシアリルトランスフェラーゼに比べて、瞬時にオリゴ糖のシアル酸を切断放出し、シアル酸修飾レベルを変化させるシアリダーゼは、瞬間的に細胞機能を調節できると考えられる。実際に、糖鎖修飾された機能分子においてシアル酸の有無は、分子間や細胞間の結合性や相互作用を大きく変化させ、インシュリンなどによるシグナル伝達や、炎症性細胞の貪食機能を制御する。哺乳類のシアリダーゼは、4種類のアイソフォームが存在し、それらは定常状態において細胞質内やリソソーム、細胞膜上に局在する。ところが、興味深いことに、炎症性細胞においてリポ多糖などの病原性因子によって細胞外にシアリダーゼが放出され、酵素活性を発揮することが示された (Amith, *Glycoconj J*, 2009)。さらに申請者は、ATP によって、炎症性細胞のシアリダーゼが細胞外に放出され、その活性が亢進することや (未発表データ)、シアリダーゼを外因性に肺上皮細胞やグリア細胞に処置すると、炎症性サイトカインの産生が著明に亢進することを見出した (Kuroiwa and Hisatsune, *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 未発表データ)。すなわちこれらは、炎症状態において炎症性細胞などから放出されるシアリダーゼが、炎症状態の病態形成に寄与することを強く示唆する。

ところで、細菌やウイルスによる感染症や、関節リウマチなどの慢性炎症性疾患、さらには悪性腫瘍や膠原病などにおいて、血清中シアル酸量が著しく増加し、有熱期間が長いとより高値を示す。また中枢神経系疾患においても、髄液中シアル酸量が著しく上昇する (Mochel, *Brain*, 2009, Mochel, *Ann Neurol*,

2009)。非感染状態においても血清中および髄液中シアル酸量が上昇することから、炎症状態において放出される内因性シアリダーゼがオリゴ糖のシアル酸に作用し、血清中および髄液中シアル酸量の増加させることが予想できるが、シアル酸が血清中および髄液中に存在する生理学および病態生理学的な意義は未だ全く分かっていない。特にシアル酸代謝異常であるシアリドーシスは、重篤な神経症状を呈することから、中枢神経系細胞におけるシアル酸の挙動は、極めて重要であるといえる。

## 2. 研究の目的

中枢神経系疾患時に上昇するシアル酸が、グリア細胞や神経細胞の機能に影響する可能性を考え、中枢神経系におけるシアル酸の生理的および病態生理学的役割の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

・培養細胞を用いて、各種機能性分子の遺伝子およびタンパク質発現をリアルタイム PCR 法や Western blot により評価する。また、それら細胞の挙動について、トランスウエルなど適切な装置を用いて評価するとともに、免疫組織学的手法を用いてそれらに関わる機能分子の局在を同定する。

・疾患モデル動物：C57BL/6、Balb/c マウスなど用いて、疾患モデル動物を作製し (すでに方法は確立済み) 評価に用いる。

## 4. 研究成果

### 1) ミクログリアに対する作用

ミクログリアは、炎症性因子の産生や死細胞の貪食などにより、脳内の環境を整える役割を担っている。そこでミクログリアの機能に対するシアル酸の作用について検討した結果、シアル酸はミクログリアにおける各種炎症性因子の発現には影響なかった。また、細胞膜上シアル酸の切断遊離による影響について検討した結果、シアル酸切断酵素シアリダーゼによって classical activation 時に機能する炎症性因子の発現が亢進した。一方で、alternative activation 型のマーカー遺伝子の発現は全く亢進しなかった。従って、脱シアル酸によって classical activation 型のミクログリアへと活性化されていることが示唆された。

### 2) 神経細胞に対する作用

神経細胞の細胞膜表面には、数多くのシアル酸複合糖蛋白質、糖脂質が存在している。しかし、それらの詳細な機能や調節機序は未だ不明である。そこで、神経細胞に対するシアル酸の影響について検討したところ、神経突

起の伸長反応に対して、シアル酸単独では効果を示さなかった一方で、シアル酸代謝酵素シアリダーゼの活性が寄与することが分かった。

### 3) 疾患モデル動物に対する作用

パーキンソン病などの中枢疾患では、ミクログリアの活性化を伴う炎症性反応が観察される。そこで、脳内における脱シアル酸化が各種細胞に対してどのように影響するか検討した。シアリダーゼの脳内微量投与の結果、活性化ミクログリアが観察され、神経細胞数は有意に減少した。これらから、ミクログリアにおける脱シアル酸化は、ミクログリアが活性化を経て、神経細胞が障害する可能性が示唆された。

### 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)

① Suppression of CXCL2 upregulation underlies the therapeutic effect of the retinoid Am80 on intracerebral hemorrhage in mice. Matsushita H, Hijioka M, Ishibashi H, Anan J, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Shudo K, Katsuki H. J Neurosci Res. 2014 Mar 21. (Epub ahead of print, 査読有)

Nitric oxide mediates selective degeneration of hypothalamic orexin neurons through dysfunction of protein disulfide isomerase. Obukuro K, Nobunaga M, Takigawa M, Morioka H, Hisatsune A, Isohama Y, Shimokawa H, Tsutsui M, Katsuki H. J Neurosci. 2013 Jul 31;33(31):12557-68. (査読有)

MRI-based analysis of intracerebral hemorrhage in mice reveals relationship between hematoma expansion and the severity of symptoms. Matsushita H, Hijioka M, Hisatsune A, Isohama Y, Iwamoto S, Terasawa H, Katsuki H. PLoS One. 2013 Jul 2;8(7):e67691. (査読有)

Nitric oxide/soluble guanylyl cyclase signaling mediates depolarization-induced protection of rat

mesencephalic dopaminergic neurons from MPP<sup>+</sup> cytotoxicity. Kurauchi Y, Hisatsune A, Isohama Y, Sawa T, Akaike T, Katsuki H. Neuroscience. 2013 Feb 12;231:206-15. (査読有)

$\alpha 7$  Nicotinic acetylcholine receptor agonist attenuates neuropathological changes associated with intracerebral hemorrhage in mice. Hijioka M, Matsushita H, Ishibashi H, Hisatsune A, Isohama Y, Katsuki H. Neuroscience. 2012 Oct 11;222:10-9. (査読有)

Natural and synthetic retinoids afford therapeutic effects on intracerebral hemorrhage in mice. Matsushita H, Hijioka M, Hisatsune A, Isohama Y, Shudo K, Katsuki H. Eur J Pharmacol. 2012 May 15;683(1-3):125-31. (査読有)

Caffeic acid phenethyl ester protects nigral dopaminergic neurons via dual mechanisms involving haem oxygenase-1 and brain-derived neurotrophic factor. Kurauchi Y, Hisatsune A, Isohama Y, Mishima S, Katsuki H. Br J Pharmacol. 2012 Jun;166(3):1151-68. (査読有)

Orexin neurons in hypothalamic slice cultures are vulnerable to endoplasmic reticulum stress. Michinaga S, Hisatsune A, Isohama Y, Katsuki H. Neuroscience. 2011 Sep 8;190:289-300. (査読有)

Therapeutic effect of nicotine in a mouse model of intracerebral hemorrhage. Hijioka M, Matsushita H, Hisatsune A, Isohama Y, Katsuki H. J Pharmacol Exp Ther. 2011 Sep;338(3):741-9. (査読有)

[学会発表](計 8 件)

延永 瑞希、小袋 加奈絵、倉内 祐樹、久恒 昭哲、関 貴弘、筒井 正人、香月 博

志 High fat diet induces pathological change in hypothalamic orexin neurons 第 8 7 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日～21 日、宮城県仙台市仙台国際センター他

松下 英明、肱岡 雅宣、石橋 勇人、阿南 順平、倉内 祐樹、久恒 昭哲、関 貴弘、首藤 統一、香月 博志 Endogenous retinoid signaling after intracerebral hemorrhage in mice 第 8 7 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日～21 日、宮城県仙台市仙台国際センター他

坂本 唯真、江川 奈生、堀江 一郎、久恒 昭哲、香月 博志、磯濱 洋一郎 AQP5 expression enhances cytokine/chemokine expression by inflammatory stimuli in airway epithelial cells. 第 8 7 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日～21 日、宮城県仙台市仙台国際センター他

上松哲大、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志 マウス炎症性ドパミンニューロン変性モデルにおけるフェルラ酸の神経保護効果の解析 第 6 6 回日本薬理学会西南部会、2013 年 11 月 16 日、福岡県福岡市福岡大学

肱岡雅宣、松下英明、石橋勇人、久恒昭哲、磯濱洋一郎、香月博志内包領域での軸索障害を焦点とした脳内出血病態進行メカニズムの解析、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27 日～30 日、神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

Tatsuya Fujibayashi, Yuki Kurauchi, Akinori Hisatsune, Yoichiro Isohama, Hiroshi Katsuki Mechanisms of retinoid-induced nNOS upregulation and neurite elongation in SH-SY5Y cells., 第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日～23 日福岡県福岡市 福岡国際会議場

Hideaki Matsushita, Masanori Hijioka, Hayato Ishibashi, Akinori Hisatsune, Yoichiro Isohama, Koichi Syudo, Hiroshi Katsuki Effects of dexamethasone and renoic acid receptor agnoist Am80 on acute inflammation following intracerebral hemorrhage in mice., 第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日～23 日福岡県福岡市 福岡国際会議場  
久恒昭哲，笠田高志，高橋周平，磯濱洋一郎，香月博志 脱シアル酸は、ミクログリアを活性化させる、第 31 回日本糖質学会、2012 年 9 月 17 日～20 日、鹿児島県鹿児島市 鹿児島市民文化ホール

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久恒昭哲 (HISATSUNE, Akinori)  
熊本大学・大学院先端機構・特任准教授  
研究者番号：50347001

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：