

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590221

研究課題名(和文) 神経再生を阻害する糖鎖修飾メカニズムの解析と人為制御

研究課題名(英文) Sugar modification system that inhibits regeneration of injured CNS neurons

研究代表者

和中 明生 (Wanaka, Akio)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90210989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：反応性アストロサイトに発現するOASIS転写因子のノックアウトマウスでは神経再生阻害性コンドロイチン硫酸の発現が野生型に比して弱いことを見出した。コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)の産生の過程で働く種々の因子について野生型とKOマウスで比較したところ硫酸基転位酵素であるC6ST-1がKOマウスで低下していた。C6ST-1のゲノムにおいて第一イントロンにはOASISの認識配列であるCREが複数存在し、人工転写アッセイでこのCREを欠いたものではOASISによるC6ST-1の発現が低下することから、OASISはC6ST-1の制御をすることで神経再生阻害に働くものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We found that chondroitin sulfate proteoglycan expression is reduced in the OASIS-knockout mouse as compared to the wild type mouse. We screened that target genes of OASIS transcription in the CSPG production pathway and found that C6ST-1, an enzyme that transfers sulfate moieties to CSPG, was a potential candidate. By artificial transcription assay system, we examined whether C6ST-1 transcription is regulated by OASIS or not. The first intron of the C6ST-1 genome contained several CRE (OASIS binding site) and deletion of those CREs reduced C6ST-1 transcription. Taken together, we concluded that OASIS inhibits neuronal regeneration by regulating C6ST-1 activities in the injured central nervous system.

研究分野：神経解剖学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：OASIS コンドロイチン硫酸 神経再生 アストロサイト 転写調節 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系においては一旦損傷が起こると傷ついた神経細胞は再生しないというのが、定説として長らくあった。しかし近年損傷部位の環境を人為的に整えることで損傷した神経細胞の軸索が再び伸びて、神経回路を復活させることが出来るという報告が数多くなされてきている。神経再生を阻害する環境の代表的な物としては大きく分けて以下の二つが挙げられる。第一はオリゴデンドロサイトの表面分子群である Nogo、MOG などが軸索を排除する働きを持っている。第二は損傷部位で活性化するアストロサイトが分泌するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンに代表される再生阻害性の細胞外基質である。後者に関しては神経損傷部位にコンドロイチン鎖を消化する酵素である Chondroitinase ABC を注入すると神経再生が促されるという実験結果が報告されて以来、再生治療への期待が高まっている。

2. 研究の目的

1) 我々が単離同定した転写調節因子 OASIS は損傷脳において活性化アストロサイトに強く発現する特徴を有する。脊髄或いは大脳皮質に機械的損傷を加えたモデルでは OASIS 遺伝子、蛋白の発現上昇が認められる。我々はこの OASIS のノックアウトマウス(以下 KO マウス)を既に作成しているため、まずこの KO マウ

スと野生型マウスの脳損傷に対する反応性の違いを組織化学的に、或いは生化学的に検証することを目的とした。

2) KO マウスにおけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(以下 CSPG)の発現が野生型に比べて低下していることが認められたので、次にこの低下が何に起因するものかについて CSPG の産生プロセスに関わる分子群の発現を KO マウスと野生型マウスで比較検討し、OASIS の標的となる可能性のある分子(群)を検索した。

3) OASIS の標的分子の候補が同定された(C6ST-1、詳細は後述)ので、この分子の転写調節メカニズムを調べる目的でゲノム遺伝子を単離し、転写調節に関わると考えられる部位の塩基配列を決定、これを基に人工転写アッセイ系を作成し、OASIS が直接この候補遺伝子の転写調節を行っているか否かについて検討した。

3. 研究の方法

1) 脳損傷の作成。

KO マウス或いは野生型マウスの頭皮を切除解放し、頭蓋骨を歯科用ドリルで削って薄くし、19ゲージの滅菌注射針を刺入することで、大脳皮質に再現性良く機械的損傷を作成した。

2) CSPG の発現解析

CSPG の糖鎖を認識するモノクロー

ナル抗体 CS56 を用いて KO マウス、野生型マウスの損傷部位を中心に免疫組織化学的に CSPG の発現局在を比較検討した。

また損傷脳部位を摘出した後に蛋白を抽出、Chondroitinase ABC で処理した後に SDS-PAGE ゲルに展開、PVDF 膜に蛋白を転写した後に、

6S 抗体（酵素処理されたコンドロイチン硫酸鎖を特異的に認識する抗体）を使ってウエスタン解析を行い定量化した。

3) CSPG の産生経路に関わる因子群のスクリーニング。CSPG の産生経路はコア蛋白、糖転移酵素、硫酸基転移酵素、など多種の因子からなる。これら因子の遺伝子をリアルタイム PCR 法を用いて KO マウスと野生型マウスの損傷部位で発現量の変化を比較検討した。

4) 候補因子の転写調節機構の解析。上記のスクリーニングで候補とされた遺伝子(群)の転写に OASIS が関わっているかについて、候補遺伝子のゲノム DNA を単離し、転写に関わると考えられる領域を絞り込んだ上で、レポーター遺伝子と結合させて、細胞に OASIS 遺伝子と共に発現させて、レポーター蛋白の定量評価により転写活性を検討した。

4. 研究の成果。

1) OASIS ノックアウトマウスにおける CSPG 染色の低下。

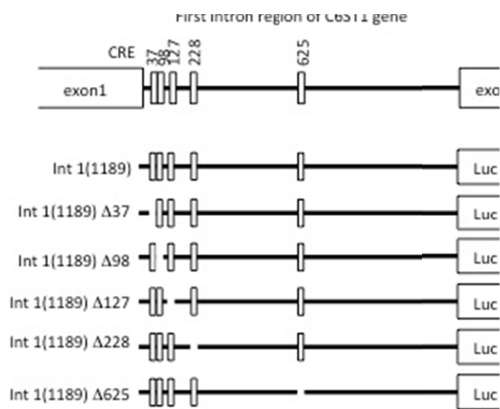
CS56 抗体を用いた免疫組織化学法では KO マウスと野生型マウスの脳損傷部位の染色に明らかな差が認められた。CS56 抗体は糖鎖を認識する抗体であるため、この抗体による染色性の低下は CSPG のコア蛋白の酸性低下、CSPG の糖鎖修飾の低下のいずれか或いは両方の低下の可能性が考えられた。ウエスタンブロットングにおいては主なコア蛋白の発現低下は認められなかったので、糖鎖修飾に異常がある可能性が考えられた。

2) 糖鎖修飾酵素群のスクリーニング
糖鎖修飾に関わる因子として、糖鎖を伸張するための糖転移酵素、糖鎖に硫酸基を付加する硫酸基転位酵素などがある。

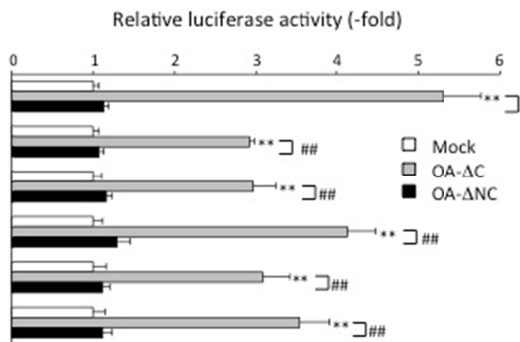
このような因子群(35 因子)をリアルタイム PCR で発現解析を行った。KO マウスと野生型マウスの脳損傷部位から mRNA を抽出し、逆転写酵素により cDNA を合成、これを基に各因子の遺伝子発現を比較検討したところ、C6ST-1 遺伝子が KO マウスで有意に発現低下していることを見出した。すなわち C6ST-1 遺伝子が OASIS により発現調節されている可能性が考えられた。C6ST-1 は CSPG の糖鎖の 6 位の部分に特異的に硫酸基を付加する機能を有する酵素である。しかし直接 OASIS が C6ST-1 の発現調節をしているか否かについては確証はないので次に C6ST-1 のゲノム遺伝子を用いた人工転写アッセイを行った。

3) C6ST-1 のゲノム解析
C6ST-1 のゲノムのうち、転写に関わると

考えられる 5' 上流約 4kb と第一エクソン、第一イントロンを含む断片を PCR を用いて単離した。シーケンス解析を行ったところ、5' 上流には OASIS が結合する可能性が高い cAMP response element (CRE) が存在せず、実際にルシフェラーゼをつないだ人工転写アッセイ系においても OASIS による発現上昇は認められなかった。そこで次に第一イントロンに着目し、シーケンス解析を行った。第一イントロンには下図に示すように 5 個 CRE が存在していた。



これら CRE を欠失させたミュータント（上図の 37、98、127、228、625）を用いて転写アッセイを行った。



OA- C を共発現させた際のルシフェラーゼ活性が（上図の灰色のバー）がコントロールに比して明らかに低下したことから、

これら CRE が強調して C6ST-1 の転写調節を行っていることが明らかとなった。

5. 主な論文発表等

雑誌論文

- 1) Okuda H, Tatsumi K, Morita S, Shibukawa Y, Korekane H, Horii-Hayashi N, Wada Y, Taniguchi N, Wanaka A. Chondroitin sulfate proteoglycan tenascin-R regulates glutamate uptake by adult brain astrocytes. **J. Biol Chem.** 2013 in press. 査読有
- 2) Kawakami M, Okuda H, Tatsumi K, Kirita T, Wanaka A. Inhibition of Wnt/beta-catenin pathway by Dickkopf-1 affects midfacial morphogenesis in chick embryo. **J. Biosci. Bioeng.** 2013 in press. 査読有
- 3) Morita S, Tatsumi K, Makinodan M, Okuda H, Kishimoto T, Wanaka A. Geissoschizine Methyl Ether, an Alkaloid from the Uncaria Hook, Improves Remyelination after Cuprizone-induced Demyelination in Medial Prefrontal Cortex of Adult Mice. **Neurochem. Res.** 2013 in press. 査読有
- 4) O uji Y, Ishizaka S, Nakamura-Uchiyama F, Wanaka A, Yoshikawa M. Induction of inner ear hair cell-like cells from Math1-transfected mouse ES cells. **Cell Death Dis.** 2013 4:e700, (epub ahead). 査読有
- 5) Makinodan M, Okuda-Yamamoto A, Ikawa D, Toritsuka M, Takeda T, Kimoto S, Tatsumi K, Okuda H, Nakamura Y, Wanaka A, Kishimoto T. Oligodendrocyte plasticity with an intact cell body in vitro. **PLoS One.** 2013 8:e66124 (epub ahead) 査読有
- 6) Morita S, Hourai A, Miyata S. Changes in pericytic expression of NG2 and PDGFRB and vascular permeability in the sensory circumventricular organs of adult mouse by osmotic stimulation. **Cell Biochem Funct.** 2013 Apr 29. doi: 10.1002/cbf.2971. [Epub ahead of print] 査読有
- 7) Mannari T, Morita S, Furube E, Tominaga M, Miyata S. Astrocytic TRPV1 ion channels detect blood-borne signals in the sensory circumventricular organs of adult mouse brains. **Glia.** 2013 61(6):957-971. 査読有
- 8) Morita S, Ukai S, Miyata S. VEGF-dependent continuous angiogenesis in the median eminence of adult mice. **Eur J Neurosci.** 2013 37(4):508-518. 査読有
- 9) Iseki K, Hagino S, Nikaido T, Zhang Y, Mori T, Yokoya S, Hozumi Y, Goto K, Wanaka A, Tase C. Gliosis-specific transcription factor OASIS coincides with proteoglycan core protein genes in the glial

- scar and inhibits neurite outgrowth. **Biomed Res.** 2012 33(6):345-353. 査読有
- 10) Matsuyoshi H, Takimoto K, Yunoki T, Erickson VL, Tyagi P, Hirao Y, Wanaka A, Yoshimura N. Distinct cellular distributions of Kv4 pore-forming and auxiliary subunits in rat dorsal root ganglion neurons. **Life Sci.** 2012 91(7-8):258-263. 査読有
- 11) Morita S, Miyata S. Different vascular permeability between the sensory and secretory circumventricular organs of adult mouse brain. **Cell Tissue Res.** 2012 349(2):589-603. 査読有
- 12) Sugimoto C, Morita S, Miyata S. Overexpression of IgLON cell adhesion molecules changes proliferation and cell size of cortical astrocytes. **Cell Biochem Funct.** 2012 30(5):400-405. 査読有
- 13) Kimoto S, Okuda A, Toritsuka M, Yamauchi T, Makinodan M, Okuda H, Tatsumi K, Nakamura Y, Wanaka A, Kishimoto T. Olanzapine stimulates proliferation but inhibits differentiation in rat oligodendrocyte precursor cell cultures. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 2011 35(8):1950-1956. 査読有
- 14) Murakami T, Hino S, Nishimura R, Yoneda T, Wanaka A, Imaizumi K. Distinct mechanisms are responsible for osteopenia and growth retardation in OASIS-deficient mice. **Bone.** 2011 48(3):514-523. 査読有
- 15) Horii-Hayashi N, Yoshikawa M, Matsusue Y, Ishizaka S, Nishi M, Wanaka A. Environmental stimulation changes tissue-type plasminogen activator activity in the adult mouse hippocampus. **Neurochem Int.** 2011 58(1):1-4. 査読有
- 16) Asai H, Morita S, Miyata S. Effect of pleiotrophin on glutamate-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. **Cell Biochem Funct.** 2011 29(8):660-665. 査読有
- 17) Miyata S, Morita S. A new method for visualization of endothelial cells and extravascular leakage in adult mouse brain using fluorescein isothiocyanate. **J Neurosci Methods.** 2011 202(1):9-16. 査読有
- 18) Taniguchi Y, Inoue N, Morita S, Nikaido Y, Nakashima T, Nagai N, Okada K, Matsuo O, Miyata S. Localization of plasminogen in mouse hippocampus, cerebral cortex, and hypothalamus. **Cell Tissue Res.** 2011 343(2):303-317. 査読有

学会発表

(1)辰巳晃子: Voluntary exercise promotes astroglialogenesis from Olig2 cells in the subthalamic nucleus of adult mouse : 第 116 回日本解剖学会総会第 88 回日本生理学会合同(震災により誌上開催) 2011,3/28 ~ /30、

パシフィコ横浜

(2)辰巳晃子: Voluntary exercise promotes astroglialogenesis from Olig2 cells in some nuclei of the basal ganglia of adult mouse : 第 54 回日本神経化学会 2011,9/26 ~ /28、加賀山代

(3)辰巳晃子: Voluntary exercise promotes astroglialogenesis from Olig2 cells in some nuclei of the basal ganglia of adult mouse : 第 117 回日本解剖学会総会 ~2012,3/26 ~ /28、山梨大学

(4)辰巳晃子: Inhibition of astrocyte metabolisms in the basal ganglionic nuclei lowers voluntary motor activities in adult mice : 第 118 回日本解剖学会総会 2013,3/28 ~ /30、香川国際会議場(高松)

(5)辰巳晃子: Astrocytic morphologies in the basal ganglionic nuclei are closely related to motor activities in adult mice. 第 36 回日本神経科学大会、第 56 回日本神経化学会大会、第 23 回日本神経回路学会 合同学会 2013,6/20 ~ /23、京都国際会議場

(6)辰巳晃子: 神経活動にともなうアストロサイトの形態変化. 第 119 回日本解剖学会総会・シンポジウム(グリア細胞研究の最前線)2014,3/27 ~ /30、自治医科大学

6. 研究組織

- 1) 研究代表者
和中 明生 (Wanaka Akio)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90210989
- 2) 研究分担者
辰巳 晃子 (Tatsumi Kouko)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 90208033

奥田 洋明 (Okuda Hiroaki)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40453162