

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：2011 ~ 2012

課題番号：23790360

研究課題名（和文）

中枢神経系の可塑性を制御する糖鎖暗号の解読

研究課題名（英文）

The role of keratan sulfate regulating neural network rearrangement

研究代表者

大箆 友博 (OHGOMORI TOMOHIRO)

名古屋大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：80584755

研究成果の概要（和文）：

申請者の所属する研究室では、脊髄損傷後の軸索再生過程においてグリコサミノグリカンの1種であるケラタン硫酸がコンドロイチン硫酸と同じ土俵で、軸索再生を強力に阻害する効果を持つことを明らかにしていた。これを受けて申請者は本研究で、軸索再生を阻害するKS/CSPGの同定と神経細胞によるKS/CSPGの認識機構を明らかにすることを目標に掲げた。損傷を受けた脊髄組織、成長因子によって活性化されたアストロサイトから精製したKS/CSPGを各種カラムクロマトグラフィーで精製し、ショットガンプロテオミクス法で網羅的に同定した。その結果、当該KS/CSPGがホスファカンであることが明らかになった。また興味深いことに脳神経発達期に当たる生後1日齢の脳組織から精製されたKS/CSPGも同様に軸索伸長阻害効果を有していた。このKS/CSPGもホスファカンであることが同定されたことから、損傷後の軸索再生阻害と神経ネットワーク発達期の軸索ガイダンス機構ではホスファカンが共通した機構で神経細胞に認識されている可能性が考えられた。さらに、培養細胞で作製したKSを有するリコンビナントホスファカンは軸索再生を阻害し、KS鎖が結合する領域を欠損させたホスファカンは軸索再生阻害効果が弱いことから、神経細胞はホスファカン上のKS鎖を強く認識して軸索再生阻害を引き起こしているものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We have revealed that keratan sulfate (KS), which is a kind of glycosaminoglycan, strongly inhibits the neurite outgrowth as well as chondroitin sulfate (CS). In this study, I aimed the identification of KS/CSPG and the evaluation of the mechanism recognizing KS/CSPG by neurons. KS/CSPGs were isolated from the injured spinal cords and reactive-astrocytes stimulated by the growth factors using column chromatography, and were identified by the shot-gun proteomics method. Phosphacan was mainly identified as the inhibitory KS/CSPG. Interestingly, the inhibitory KS/CSPG isolated from postnatal 1 day rat brain was also identified as phosphacan. Therefore, I suggest that the injured neurons and developing neurons recognize KS/CSPG in the common manner. In addition, the recombinant KS-bearing phosphacan strongly inhibited the neurite outgrowth, and the deletion of KS binding domain of phosphacan ameliorated the neurite outgrowth. From these result, I suggest that neurons strongly recognize keratan sulfate on phosphacan and inhibit neurite outgrowth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：神経糖鎖生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：脊髄損傷・神経可塑性・プロテオグリカン

1. 研究開始当初の背景

交通事故、スポーツ事故、脳挫傷などで損傷を受けた中枢神経の軸索は、末梢神経とは異なり再生しないと言われている。長年の研究から、その理由は成熟神経細胞の再生能力が低いこと、損傷神経周辺部の微小環境に存在する再生阻害物質の存在（ミエリン Debris やグリア性瘢痕）の2点に帰着している。とりわけ後者のうち中枢ミエリン由来の阻害因子については、Nogo、MAG、OMgp の3種の分子が代表的な役割を担っているとされてきた。ところが最近、これら3種の分子を欠損したマウスやミエリン由来の阻害因子に対する受容体 PirB を欠損したマウスでは、脊髄損傷後の機能回復がほとんど起こらないことが報告された (*Neuron* 66 663-670, 2010、*J. Biol. Chem.* 286 1876-83, 2011)。従って、ミエリン由来の阻害因子による軸索再生阻害は極めて限定的なものであり、主たる軸索再生阻害因子が別に存在すると考えられる。神経損傷時には損傷部位周辺の活性化したグリア細胞からプロテオグリカンやヒアルロン酸などの分子が多数放出され、グリア性瘢痕が形成される。プロテオグリカン (PG) はコアタンパク質に、2糖の繰り返し構造を持つ長大な糖鎖（グリコサミノグリカン；GAG）が付いたものであり、中でもコンドロイチン硫酸 (CS) 鎖が付いたコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) が代表的なプロテオグリカンである。神経損傷部位周辺で産生された PG は様々なタンパク質と複合体を形成し、破壊された細胞外マトリックス構造の修復や成長因子の捕捉などを行う。このように、損傷した結合組織はプロテオグリカンによって修復されるが、同時に切断された軸索の再生を阻害するという負の側面を持ち合わせている (*Nature* 416 636-640, 2002、*J. Neurosci.* 26 7405-7415, 2006)。申請者は、このグリア性瘢痕に蓄積された PG が軸索再生を阻害する真の軸索再生阻害因子であると考えている。実際、申請者の所属研究室では、脳に発現したグリコサミノグリカンの一種であるケラタン硫酸 (KS) に焦点を当て、損傷後の軸索再生阻害メカニズムの解明に取り組んできた。その結果、KS 鎖を欠損させたマウスでは、脳損傷後のグリア性瘢痕が形成されないこと、脊髄損傷後に顕著な軸索再生効果を認めることを明らかにした。 (*Glycobiology* 16 702-710, 2006、*J. Neurosci.* 30 5937-5947, 2010)。一方で脳神経発達期におけるプロテオグリカンの発現は時間的にも空間的にも精密に

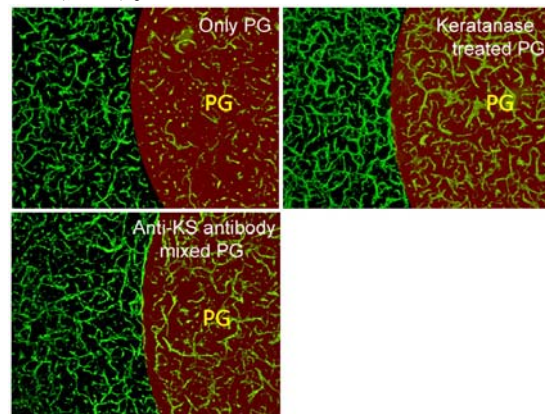
制御されている。この場合、プロテオグリカンは異常な神経ネットワーク形成を避けるための軸索ガイダンス分子として働いている。申請者は、プロテオグリカンによる損傷後の軸索再生阻害機構と発達期の軸索ガイダンス機構には共通した機構が存在すると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

背景の項に示した様に、神経可塑性を制御するプロテオグリカンは KS/CSPG であると考えられる。本研究では軸索再生を阻害する真の KS/CSPG を正確に同定することを第一目標に掲げた。同定されたプロテオグリカンが真なる軸索再生阻害分子であるかどうかを解明するために、リコンビナントプロテオグリカンを作製することで確認する。プロテオグリカン上の KS 鎖が軸索再生に必要なか否かは、当該プロテオグリカンの KS 鎖結合領域を欠損させた変異型プロテオグリカンを用いて解析する。

3. 研究の方法

本研究をスタートする前に、生後1日齢のラット脳組織から精製したプロテオグリカン混合物は、KS 鎖依存的にラット小脳顆粒細胞の軸索伸長を阻害することを見出していた (図1)。

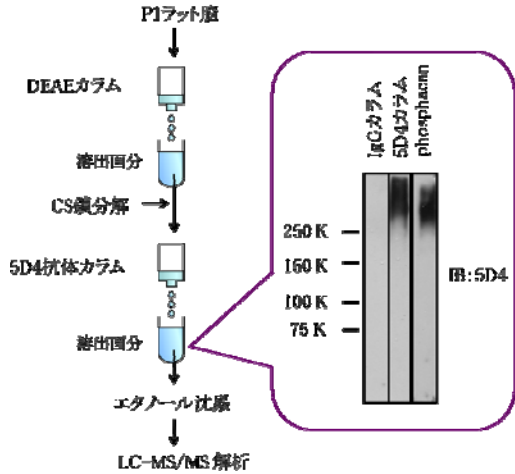


▲図1 KS鎖依存的におこる軸索再生阻害

そこで、このプロテオグリカン混合物から 5D4 抗体を用いて KS/CSPG の精製を行い、ショットガンプロテオミクス法で同定した (図2)。この手法によって約17種類のタンパク質が候補分子として同定された。申請者はその中からホスファカンが有力な候補分子であると推測した。

4. 研究成果

研究方法の項にも記載した通り、哺乳1日齢のラットプロテオグリカン画分に含まれる主たるKS/CSPGはホスファカンであり、選択的に5D4抗体カラムに結合することを明らかにした。



▲図2 ホスファカンは5D4カラムに特異的に結合する。

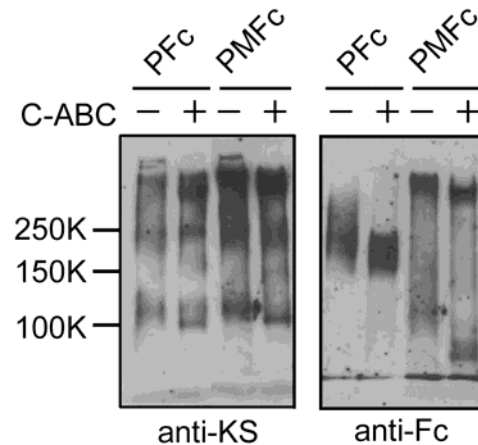
さらに申請者が所属する研究室では反応性アストロサイトから分泌されるKS/CSPGが軸索伸長を阻害することを見出していた。そこで、当該KS/CSPGの精製も同様に行い、ショットガンプロテオミクス法を用いて同定した。複数のタンパク質が同定されたが、ホスファカンが最も高いスコアで同定された(図3)。この結果はホスファカンが真なる軸索再生阻害因子であることを強く示唆するものである。

Name	Score
Phosphacan	1480
Neurocan	1048
Actin, cytoplasmic 1	660
Actin, aortic smooth muscle	268
Tublin alpha-1A chain	263
Tublin alpha-2A chain	250
Biglycan	239
Keratin, type 1 cytoskelton	236
Keratin, type 2 cytoskelton	220
Tublin beta-4B chain	199
Histone H4	159

▲図3 活性化アストロサイト由来KS/CSPGはホスファカンである。

次にホスファカンが真なる軸索再生阻害分子であるか否かを明らかにするため、タグ融合型リコンビナントホスファカンの作製を

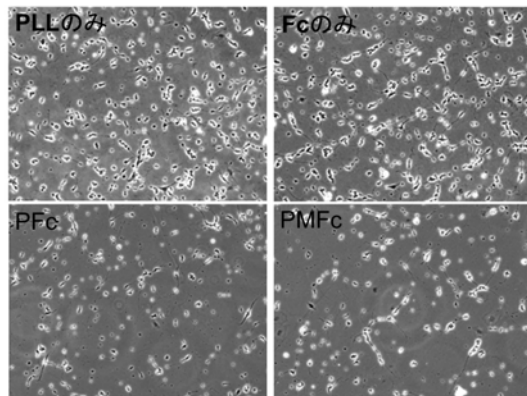
試みた。Fc融合型ホスファカンの発現ベクター(PMFc)を構築し、COS-1細胞に対して強制発現した。培養上清からFc融合型ホスファカンを精製し、抗KS抗体(5D4)でイムノブロットを行った。その結果精製したホスファカンはKS鎖を有していることが明らかになった。また、このホスファカンはコンドロイチナーゼABC処理によって分子量が低下することから、コンドロイチン硫酸も有していることが明らかになった。一方で、KS鎖が結合すると推測される領域を欠損させたホスファカン(PFc)をCOS-1細胞に対して強制発現させると5D4抗体に対する反応性が失われた。興味深いことにこのホスファカンはコンドロイチナーゼABC処理によって分子量が低下することから、コンドロイチン硫酸を有していると考えられた(図4)。すなわち、ホスファカン上におけるコンドロイチン硫酸とケラタン硫酸の結合部位は異なる可能性が示唆された。



▲図4 KS鎖とCS鎖を両方持つ

最後にCOS-1細胞から精製されたCS鎖とKS鎖の両者をもつホスファカン、CS鎖を持つがKS鎖をもたないホスファカンを用いて、小脳顆粒細胞に対する軸索伸長阻害効果を調べた。両者ともにFcのみをコートした場合に比べ軸索伸長阻害活性を有していた。興味深いことに、CS鎖とKS鎖の両者を持つホスファカンは、CS鎖のみを持つホスファカンに比べ軸索伸長阻害活性が強いことが明らかになった(図5)。この結果はホスファカン上のCS鎖が軸索伸長を阻害するという先行研究を支持するだけでなく、ホスファカン上のKS鎖がCS鎖に匹敵する軸索伸長阻害因子であることを新たに報告するものである。

▲図5 KSを持つホスファカンは、KSをも



たないホスファカンに比べて小脳顆粒細胞の軸索伸長を強く阻害する。

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6件)

1. Kazuyoshi Kobayashi, *Shiro Imagama, *Tomohiro Ohgomori, Kenichi Hirano, Kenji Uchimura, Kazuma Sakamoto, Akihiro Hirakawa, Hideyuki Takeuchi, Akio Suzumura, Naoki Ishiguro, Kenji Kadomatsu, Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia *Cell Death and Disease* 4 e525 * **Equally contributed to this work** 査読有

2. *Tomohiro Ohgomori, Tomohisa Nanao, Akinori Morita, Masahiko Ikekita, Asn⁵⁴-linked glycan is critical for functional folding of intercellular adhesion molecule-5 *Glycoconjugate Journal* 29 (1) 47-55 (2012) * **Corresponding Author** 査読有

3. Ryoji Tauchi, Shiro Imagama, Tomohiro Ohgomori, Takamitsu Natori, Ryuichi Shinjo, Naoki Ishiguro, Kenji Kadomatsu, ADAMTS-13 is produced by glial cells and upregulated after spinal cord injury *Neuroscience Letters* 517 1-6 (2012) 査読有

4. Ryoji Tauchi, Shiro Imagama, Takamitsu Natori, Tomohiro Ohgomori, Akio Muramoto, Ryuichi Shinjo, Yukihiro Matsuyama, Naoki Ishiguro, Kenji Kadomatsu, The endogenous proteoglycan-degrading enzyme ADAMTS-4 promotes functional recovery after spinal cord injury *Journal of Neuroinflammation* 9: 53 (2012) 査読有

5. Tomohiro Matsumoto, Shiro Imagama, Kenichi Hirano, Tomohiro Ohgomori, Takamitsu Natori, Kazuyoshi Kobayashi, Akio Muramoto, Naoki Ishiguro, Kenji Kadomatsu, CD44 expression in astrocytes and microglia is associated with ALS progression in a mouse model *Neuroscience Letters* 520 115-120 (2012) 査読有

6. Shiro Imagama, Kazuma Sakamoto, Ryoji Tauchi, Ryuichi Shinjo, Tomohiro Ohgomori, Zenya Ito, Haoqian Zhang, Yoshihiro Nishida, Nagamasa Asami, Sawako Takeshita, Nobuo Sugiura, Hideto Watanabe, Toshihide Yamashita, Naoki Ishiguro, Yukihiro Matsuyama, Kenji Kadomatsu, Keratan Sulfate Restricts Neural Plasticity after Spinal Cord Injury *The Journal of Neuroscience* 31(47) 17091-17102 (2011) 査読有

[学会発表] (計13件)

国内学会

1. 大籠友博 Ablation of keratan sulfate accelerates early phase pathogenesis of ALS. 第5回 NAGOYA グローバルリトリート 大府、2013年2月 (口頭発表・ポスター)

2. 大籠友博、平野健一、小林和克、名取貴光、内村健治、門松健治 筋萎縮性側索硬化症とケラタン硫酸 第35回日本神経科学大会 名古屋 2012年9月 (ポスター)

3. 大籠友博、門松健治 ALS発症に関わるミクログリア活性化とケラタン硫酸の決定的相関 包括脳夏のワークショップ 仙台 2012年7月 (ポスター)

4. 大籠友博、門松健治 ALS発症に関わるミクログリアの活性化とケラタン硫酸の決定的相関 名古屋大学ー生理学研究所共同シンポジウム 岡崎 2012年5月 (ポスター)

5. 大籠友博 ALSとケラタン硫酸 第4回 NAGOYA グローバルリトリート 大府 2012年2月 (ポスター)

6. 大籠友博 ALSとケラタン硫酸 第9回日本糖鎖科学コンソーシアム 名古屋 2011年11月 (招待講演)

7. 大籠友博、名取貴光、坂元一真、門松健治 神経ネットワークの再編成を制御するケラタン硫酸プロテオグリカンの役割 第30回日本糖質学会年会 長岡 2011年7月

(ポスター)

8. 大籠友博 中枢神経に発現する新規ケラタン硫酸プロテオグリカンの同定 第3回 NAGOYA グローバルリトリート 大府 2011年2月 (ポスター)

国際学会

1. Kazuyoshi Kobayashi, Tomohiro Ohgomori, Shiro Imagama, Zenya Ito, Kei Ando, Kenichi Hirano, Tomohiro Matsumoto, Kenji Kadomatsu, Naoki Ishiguro; Keratan sulfate in neurodegenerative disease. **Orthopedics Research Society**, San Antonio Texas, USA, Feb. 2013 (Poster).

2. Tomohiro Ohgomori, Kenji Kadomatsu; Amyotrophic lateral sclerosis and keratan sulfate. **The 4th Global COE International Symposium**, Nagoya, Nov. 2012 (Poster).

3. Kenichi Hirano, Tomohiro Ohgomori, Shiro Imagama, Kenji Kadomatsu; Amyotrophic lateral sclerosis and keratan sulfate. **Annual a meeting of Society for Neuroscience**, New Orleans, Louisiana, USA, Oct. 2012 (Poster).

4. Hiroki Matsui, Kenji Kadomatsu, Tomohiro Ohgomori, Takamitsu Natori, Shiro Imagama, Zenya Ito, Kei Ando, Kenichi Hirano, Ryoji Tauchi, Akio

Muramoto, Tomohiro Matsumoto, Naoki Ishiguro; The role of keratan sulfate in experimental autoimmune neuritis. **Orthopedics Research Society**, San Francisco California, USA, Feb. 2012 (Poster)

5. Tomohiro Ohgomori, Takamitsu Natori, Kazuma Sakamoto, Tahmina Foyez, Junichi Ukai, Kenji Kadomatsu; Identification of novel keratan sulfate proteoglycans in central nervous system. **31th Naito Conference**, Sapporo, Sep, 2011 (Poster).

〔図書〕 (計1件)

東京理科大学 科学教養雑誌「科学フォーラム」やわらかな脳を作り出すタンパク質 “ICAM-5” に結合した糖鎖の構造と機能の解明

著者: 大籠友博 2011年1月号

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大籠 友博 (OHGOMORI TOMOHIRO)
名古屋大学・医学系研究科・研究員
研究者番号: 80584755

(2) 研究分担者 (なし)

(3) 連携研究者 (なし)