

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590349

研究課題名(和文)細胞外スルファターゼによる細胞貪食抵抗性ヘパラン硫酸糖鎖の分解と制御

研究課題名(英文)Enzymatic degradation of heparan sulfate subdomains that are accumulated in cerebral amyloid plaques

研究代表者

内村 健治(Uchimura, Kenji)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：20450835

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)：アルツハイマー病発症の物質基盤であるアミロイド ペプチド(A β)は細胞外において重合沈着し、アミロイド斑と呼ばれる不溶性の蓄積物を脳内で形成する。本研究は、細胞外スルファターゼSulf-2の作用によりA β に結合するヘパラン硫酸糖鎖を分解しそれに付随するアミロイド斑除去の促進を個体レベルで解析する事を目的とし遂行された。我々はアルツハイマー病モデルマウス脳凍結切片を用いた実験から、活性型Sulf-2発現によるアミロイド斑A β 貪食作用の促進を明らかにした。本研究は順調に進展し予定通り遂行された。

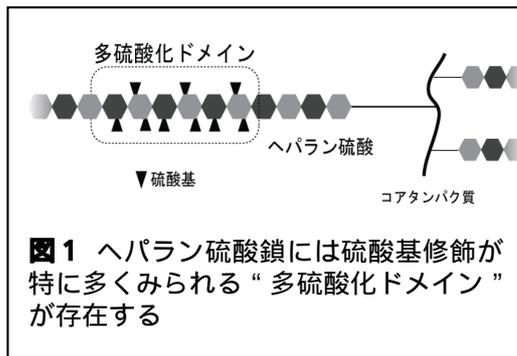
研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is characterized by cerebral amyloid plaques, which are formed by extracellular accumulation of amyloid beta peptides. Heparan sulfate is an extracellular sugar chain found in amyloid plaques in the brain of transgenic AD mouse models and patients with AD. Heparan sulfate subdomains abundant in amyloid plaques of AD mouse brain sections were substantially degraded by Sulf-2, an extracellular endosulfatase. Ectopic expression of Sulf-2 facilitated amyloid clearance mediated by phagocytotic cells, which were cultured with AD mouse brain sections in an ex vivo phagocytosis assay. These results suggest that AD pathogenesis could be regulated by an enzymatic remodeling of extracellular heparan sulfate in AD brains.

研究分野：医化学一般

キーワード：糖鎖 酵素 生体分子 脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病発症における主な原因は脳内におけるアミロイドタンパク(A)重合沈着の増加である。重合沈着したAは神経毒性作用を示す。通常、脳内貪食細胞の一種であるミクログリアによる作用やタンパク分解酵素の分解活性によりAは除去されるが、アルツハイマー病の進行にともないこれらの作用が減弱する。これまでにアルツハイマー病において細胞外マトリクス成分プロテオグリカンの糖鎖であるヘパラン硫酸糖鎖とAの結合が報告されている(Snow, Kimataら, *Neuron* 1994)。ヘパラン硫酸糖鎖が沈着Aと共局在し、細胞貪食へ抵抗性を示していることが国内外で提唱されている。ヘパラン硫酸糖鎖は200個ほど糖が連なった構造を示し、内部は硫酸化が多く見られるドメインや硫酸化が少ないドメインが存在する(図1)。なかでも、硫酸基修飾

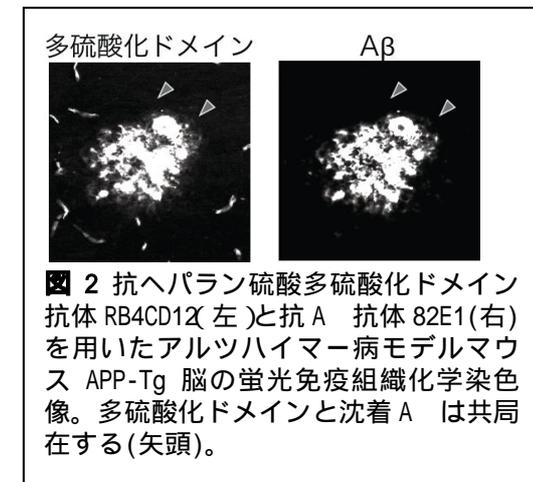


が多く見られる“多硫酸化ドメイン”はタンパク分子と結合し分解酵素などから守り安定性を制御することも報告されている。ヒト変異型アミロイド前駆タンパク質を発現するアルツハイマー病モデルマウスAPP-Tgは、加齢育成に伴って脳内における沈着Aの蓄積量増加を示す。沈着Aに局在するヘパラン硫酸糖鎖の構造解析から、ヘパラン硫酸糖鎖内部の“多硫酸化ドメイン”が多く沈着Aに存在することが明らかになった(図2)。申請者らは“多硫酸化ドメイン”が病変の進行にともない蓄積増加していることも明らかにした(Uchimuraら *Am J Pathol* 2012)。

一方、我々は以前単離同定した細胞外スルファターゼ Sulf-2 が当該多硫酸化ドメインを分解できることを明らかにした(Uchimuraら *BMC Biochem* 2006; Hossainら *Glycobiology* 2010; Hosono-Fukaoら *J Neurosci Res* 2011)。Sulf-2 を使用し脳内沈着Aと共局在するヘパラン硫酸糖鎖多硫酸化ドメインを分解することが可能と思われた。さらに、ヘパラン硫酸糖鎖が示す沈着A細胞貪食への抵抗性の解除が期待された。以上のことから、Sulf-2 処理によるヘパラン硫酸多硫酸化ドメインの分解およびA貪食除去の促進が可能であることが強く示唆され、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

アルツハイマー病脳においてヘパラン硫酸糖鎖と重合沈着A分子は複合体を形成している。ヘパラン硫酸糖鎖は脳内細胞による



A分子の貪食に抵抗性を示す。細胞外スルファターゼ Sulf-2 によりヘパラン硫酸糖鎖を分解することが沈着A貪食除去に促進的に働くか否かを培養細胞レベルおよび個体レベルの実験系により明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞レベル実験

レンチウイルス発現システムにより Sulf-2 を過剰発現させたミクログリア細胞株BV2およびMG5を培養した。蛍光標識したイムノグロブリンB220と共培養し、一定時間培養後にミクログリア細胞を回収した。蛍光標識イムノグロブリンを貪食したミクログリア細胞の割合を蛍光顕微鏡下で検鏡し貪食能を定量した。Sulf-2 を発現させないコントロールと比較した。脳内A沈着を呈するAPP-Tgマウス脳の凍結切片を作製しスライドガラスに固定した。これを細胞培養ディッシュに沈め Sulf-2 を過剰発現させたミクログリア細胞株BV2およびMG5を一定数播種した。細胞にA沈着を一定時間貪食させ、取り出した切片について切片に残っているA沈着を蛍光免疫染色により定量した。貪食率を計算し Sulf-2 を発現させないコントロールと比較した。

(2) 個体レベル実験

活性型 Sulf-2 遺伝子の上位に loxP 配列で挟まれた STOP 配列カセットをトランスジェニックに含むトランスジェニックマウス系統を作製した。当該マウスは常法に従ってコンストラクトベクターDNAの胚へのマイクロインジェクションによりファウンダーを作製した。貪食細胞特異的 Cre マウスは市販のものを購入した。A沈着を呈するAPP-Tgマウスと交配し、Sulf-2 を貪食細胞で強発現しA沈着を呈するトリプルトランスジェニックマウスを作製した。当該マウス脳内において、Sulf-2 酵素タンパクが予想通り強発現して

いるかどうかの確認を実施した。アルツハイマー病脳病変の評価を行った。研究の実施に先立ち、本学における倫理委員会による厳正中立な審査を受け、研究実施計画の承認を得た。本研究課題は本学設置の遺伝子組換え生物実験安全委員会、実験動物利用者委員会および動物実験倫理委員会の審査を受け承認を得た。

4. 研究成果

活性型 Sulf-2 および不活性型 Sulf-2 をミクログリアで発現させるレンチウイルス発現システムを構築することに成功した。力価の高いレンチウイルスの作製が順調に行き Sulf-2 発現ミクログリア細胞株が安定して得られるシステムを構築出来た。Sulf-2 の発現と同時に緑色蛍光タンパク質 GFP を発現させるベクターを構築することにより、発現細胞を蛍光で標識することを可能にした。これらレンチウイルスをマウスミクログリア細胞株に感染させ貪食能を測定した結果、活性型もしくは非活性型 Sulf-2 を発現させることで細胞自体の貪食能には影響を及ぼさないことが確認された。一方、我々はアルツハイマー病モデルマウス脳凍結切片を用いた実験から、活性型 Sulf-2 発現によるアミロイド斑 A 貪食作用の促進を明らかにした。コンディショナルに脳内の貪食細胞で Sulf-2 を発現するダブルトランスジェニック系統を得ることに成功した。また、当該マウスとアルツハイマーモデル APP-Tg との交配によりトリプルトランスジェニックマウスを作製した。交配を継続し加齢育成を行った。アルツハイマー病脳病変の解析は現在も継続している。本研究は順調に進展し予定通り遂行された。本研究の成果は将来アルツハイマー病の治療戦略に応用できる可能性がある。パーキンソン病やプリオン病といった他のタンパク異常蓄積を伴う神経変性疾患の研究発展にも貢献が期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Uchimura, K. The Sulfs: Expression, purification and substrate specificity. Chapter 31, In *Glycosaminoglycans: Methods in Molecular Biology*. K. Balagurunathan, U.R. Desai and H. Nakato, editors. Humana Press, New York. 401-412, (2015) 査読有 DOI:10.1007/978-1-4939-1714-3_31
2. Uchimura, K. Keratan sulfate: Biosynthesis, structures and biological functions. Chapter 30, In *Glycosaminoglycans: Methods in Molecular Biology*. K. Balagurunathan,

U.R. Desai and H. Nakato, editors. Humana Press, New York. 389-400, (2015) 査読有 DOI: 10.1007/978-1-4939-1714-3_30.

3. Uchimura, K. Carbohydrate (N-acetylglucosamine-6-O) sulfotransferase 2 (CHST2). In *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*. 2nd ed. N. Taniguchi, K. Honke and M. Fukuta, H. Narimatsu, Y. Yamaguchi, T. Angata, editors. Springer, 997-1004, (2014) 査読有 <http://www.springer.com/us/book/9784431542391>
4. Hoshino, H., Foyez, T., Ohtake-Niimi, S., Takeda-Uchimura, Y., Michikawa, M., Kadomatsu, K., and Uchimura, K. KSGal6ST is essential for the 6-sulfation of galactose within keratan sulfate in early postnatal brain. *J. Histochem. Cytochem.*, 62: 145-156, (2014) 査読有 DOI: 10.1369/0022155413511619
5. Patnode, M.L., Cheng, C.W., Chou, C.C., Singer, M.S., Elin, M.S., Uchimura, K., Crocker, P.R., Khoo, K.H., and Rosen, S.D. Galactose-6-O-sulfotransferases are not required for the generation of Siglec-F ligands in leukocytes or lung tissue. *J. Biol. Chem.*, 288: 26533-26545, (2013) 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M113.485409
6. Patnode, M.L., Yu, S.Y., Cheng, C.W., Ho, M.Y., Tegesjö, L., Sakuma, K., Uchimura, K., Khoo, K.H., Kannagi, R., and Rosen, S.D. KSGal6ST generates galactose-6-O-sulfate in high endothelial venules but does not contribute to L-selectin-dependent lymphocyte homing. *Glycobiology*, 23: 381-94, (2013) 査読有 DOI: 10.1093/glycob/cws166
7. 内村健治 “ホーミングレセプター” L-セレクチンが認識する細胞表面硫酸化糖鎖 *生化学* 85: 244-252, (2013) 査読有 <http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2013/06/85-04-03.pdf>
8. 坂元一真、内村健治、門松健治 硫酸化糖鎖と神経回路再編 *実験医学* 31:

40-45, (2013) 査読有
<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758103312/>

9. 小林基弘、内村健治 硫酸化糖鎖と炎症病理と臨床 31: 861-867, (2013) 査読有
http://www.bunkodo.co.jp/byori_35/magazine_detail_4.html
10. Hosono-Fukao, T., Ohtake-Niimi, S., Hoshino, H., Britschgi, M., Akatsu, H., Hossain, M. M., Nishitsuji, K., van Kuppevelt, T. H., Kimata, K., Michikawa, M. Wyss-Coray, T., and Uchimura, K. Heparan sulfate subdomains that are degraded by Sulf accumulate in cerebral amyloid β plaques of Alzheimer 's disease: evidence from mouse models and patients.
Am. J. Pathol., 180: 2056-2067, (2012) 査読有
DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.01.015

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Deficiency in C-6 sulfation of GlcNAc within keratan sulfate mitigates Alzheimer 's pathology and memory impairment in mice
Shiori Ohtake-Niimi, Yoshiko Takeda-Uchimura, Tahmina Foyez, Hitomi Hoshino, Makoto Michikawa, Kenji Kadomatsu and Kenji Uchimura
Annual meeting of Glycobiology 2014, Nov 17, 2014, Honolulu (USA)
2. Functional analysis of keratan sulfate and sulfotransferases expressed in the brain of Alzheimer disease model mice
Tahmina Foyez, Yoshiko Uchimura, Shiori Niimi, Hitomi Hoshino, Makoto Michikawa and Kenji Kadomatsu and Kenji Uchimura
第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 18 日, 京都国際会館 (京都府京都市)
3. 神経回路再編および神経変性に関わる細胞外硫酸化糖鎖
内村健治, 門松健治
第 36 回日本生物学的精神医学会 第 57 回日本神経化学会大会 合同年会 2014 年 9 月 2 9 日, 奈良県新公会堂 (奈良県奈良市)
4. Structure and function of keratan sulfate expressed in the brain of Alzheimer disease model mice
Tahmina Foyez, Yoshiko Uchimura, Shiori Niimi, Hitomi Hoshino, Makoto

Michikawa, Kenji Kadomatsu and Kenji Uchimura

第 33 回日本糖質学会 2014 年 8 月 1 1 日, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)

5. Characterization and analysis of the 5D4-reactive keratan sulfate expressed in the central nervous system of SOD1^{G93A}, an ALS model mouse
Kenji Uchimura, Tahmina Foyez and Kenji Kadomatsu
Annual meeting of Glycobiology 2013, Nov 20, 2013, St. Petersburg, (USA)
6. アルツハイマー病モデルマウス脳内に発現するケラタン硫酸糖鎖の構造機能解析
新美しおり, 星野瞳, タミナフォエズ, マーカスブリチギ, 門松健治, 道川誠, トニーワイスコレイ, 内村健治 第 32 回日本認知症学会 2013 年 11 月 9 日キッセイ文化ホール (長野県松本市)
7. 神経変性疾患の組織病変に伴い発現するケラタン硫酸糖鎖抗原の解析
内村健治, Tahmina Foyez, 門松健治
第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
8. Analysis of keratan sulfate expressed in central nervous tissues of an ALS model mouse
Tahmina Foyez, Kenji Uchimura, Kenji Kadomatsu
第 32 回日本糖質学会 2013 年 8 月 7 日大阪国際交流センター (大阪府大阪市)
9. 変異 SOD1 遺伝子トランスジェニックマウス脊髄に発現する 5D4 ケラタン硫酸糖鎖抗原の解析
Kenji Uchimura, Tahmina Foyez, Kenji Kadomatsu
第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 15 日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
10. Heparan sulfate S-domains that are degraded by Sulf accumulate in cerebral amyloid beta plaques of Alzheimer 's disease, Evidence from mouse models and patients
Tomomi Fukao-Hosono, Shiori, Niimi-Ohtake, Hitomi Hoshino, Tony Wyss-Coray and Kenji Uchimura
Annual meeting of Glycobiology 2012, Nov 12, 2012, San Diego, (USA)

〔その他〕

教室ホームページアドレス

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/biochem/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

内村 健治 (UCHIMURA, Kenji)
名古屋大学 大学院医学研究科 特任准
教授
研究者番号 : 2 0 4 5 0 8 3 5

(2) 研究分担者

門松 健治 (KADOMATSU, Kenji)
名古屋大学 大学院医学研究科 教授
研究者番号 : 8 0 2 0 4 5 1 9