様　式　C－１９、F－１９、Z－１９　(共通)

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ５ 月 １６ 日現在

機関番号：１３９０１
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2012～2013
課題番号：２４８９００８４
研究課題名（和文）神経軸索再生を阻害するフォスファカン受容体の同定

研究課題名（英文）Identification of receptors for phosphacan which inhibit axonal regeneration

研究代表者
坂元　一真（Sakamoto, Kazuma）

名古屋大学・高等研究院（医）・特任助教

研究者番号：６０６１２８０１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,000,000円、（間接経費）　　600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の準備として、高純度の組換えフォスファカンをイオン交換法、ゲル濾過法を用いて精製した。このフォスファカンを細胞培養皿状にグラジエント状に固層化したところ、成体後根神経節細胞に再生停止軸索の構造学的特徴であるDystrophic endballを誘導した。さらにこの系を用いて、オートファジーがDystrophic endball形成に関与する可能性を見出した。
表面プラズモン共鳴を用いてフォスファカンとPTPsigmaおよび LARとの結合を調べたところ、コンドロイチン硫酸・ケラタン硫酸双方に依存的に結合することを明らかにした。さらに新規受容体候補としてPTPzetaを見出した。

研究成果の概要（英文）：Highly purified recombinant phosphacan was purepared using anion exchange and gel filtration chromatography. Increasing gradient of recombinant phosphacan induced dystrophic endball, a morphological marker for regeneration stopping axons, to cultured dorsal root ganglion neurons. Using electron microscope and immunocytochemistry, autophagosomes were found in dystrophic endball, suggesting that autophagy is an essential cellular event for formation of dystrophic endball.
Surface plasmon resonance assay revealed that phosphacan strongly bound to PTPsigma and LAR which are known as receptors for chondroitin sulfate. Surprisingly, interaction between phosphacan and PTPsigma or LAR was two-phase manner, and not only chondroitin sulfate but also keratan sulfate were involved in interaction. Free keratan sulfate sugar also bound to PTPsigma and LAR.
PTPzeta, another member of receptors tyrosine phosphatase, was also identified to be involved in inhibition of axonal regeneration.

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：プロテオグリカン　コンドロイチン硫酸　ケラタン硫酸　神経軸索　再生

１．研究開始当初の背景

我々の末梢神経軸索は再生するが、脳や脊髄といった中枢神経系を走行する神経軸索は、外傷などにより一度切断を受けると二度と再生することはない。この結果、神経回路は非可逆的に断絶され、麻痺といった深刻な後遺症をもたらす。これは中枢神経系に特有な軸索再生阻害因子が存在するためである。現在では、プロテオグリカンと呼ばれる分子群が主要な阻害因子であると広く理解されている。プロテオグリカンはコアプロテインと呼ばれるタンパク質領域に、コンドロイチン硫酸・ケラタン硫酸などのグリコサミノグリカンと呼ばれる硫酸化糖鎖が共有結合した構造を持っている。これら硫酸化糖鎖を酵素学的に切断することにより、中枢神経損傷後の軸索再生・分枝、および神経学的機能回復が促進されることが相次いで報告されてきたが、プロテオグリカンを認識する神経細胞上の機構や、細胞内シグナル系については充分に理解されておらず、中枢神経損傷疾患の克服には未だ大きな壁がある。

２．研究の目的

中枢神経損傷後には、反応性アストロサイトを中心としたグリア性瘢痕において、多様なプロテオグリカンが産生増強されるが、研究代表者はその中で特にフォスファカンと呼ばれるが神経軸索再生を強く阻害することを見出した。フォスファカンはコンドロイチン硫酸・ケラタン硫酸の両方を同時に持つキメラ型プロテオグリカンで、軸索再生阻害活性は両者に依存する。これは生体内での反応と同じである。しかしながら、神経細胞のフォスファカン認識機構は未だ不明である。本研究ではこの点の解明を目指す。特に軸索再生阻害に関わる神経細胞上のフォスファカン受容体複合体を明らかにすることを目標とする。

３．研究の方法

(1)組換えフォスファカン精製方法の確立

一般にプロテオグリカンは巨大分子であり、また長大なグリコサミノグリカン鎖が生体物質としての取り扱いを難しくしている。そこで本研究計画を円滑に遂行するため、組換えフォスファカンの高効率かつ高純度な精製方法の確立を目指した。COS-1 培養細胞株にフォスファカン発現プラスミドをトランスフェクションし、培養上清から、陰イオン交換法・ゲル濾過法を用いて精製した。さらにその生化学的構造を決定した。

(2) フォスファカンによる Dystrophic endball 形成活性の評価とその細胞内イベントの解析

損傷により切断を受けた神経軸索は、グリア性瘢痕におけるプロテオグリカン濃度勾配の中で Dystrophic endball と呼ばれる変性構造を形成することが以前より知られており、現在この変性構造の形成こそが、再生停止の主要な病因であると考えられている。本研究ではフォスファカンの Dystrophic endball 活性を検討した。(1)で調整した組換えフォスファカンを用い、細胞培養皿表面上に、グリア性瘢痕を模倣したフォスファカン濃度勾配を作製した。ここに成体ラットより採取した脊髄後根神経節細胞を播種し、フォスファカン濃度勾配に侵入した軸索先端部の挙動をタイムラプスイメージングにより解析した。さらにその微細構造および細胞生物学的特性を透過型電子顕微鏡・免疫染色法により解析した。

(3)フォスファカンとコンドロイチン硫酸受容体との相互作用の検討

上述のようにフォスファカンはコンドロイチン硫酸・ケラタン硫酸を同時に側鎖に持つ。近年受容体型チロシンフォスファターゼに属する分子である PTPσ・LAR がコンドロイチン硫酸受容体であることが報告された。そこでまず、フォスファカンとこれらコンドロイチン硫酸受容体との相互作用を、表面プラズモン共鳴（SPR）を用いて検討した。His タグを付加した PTPσ・LAR 細胞外ドメインをリガンドとして、抗 His 抗体を固層化したセンサーチップ CM5 上に添加し、ここにさらに組換えフォスファカンをアナライトとして添加し、センサーグラムの変動を計測した。

(4)新規受容体の探索

PTPσ・LAR は受容体型チロシンフォスファターゼに属するが、リガンド非存在下では他の受容体型チロシンフォスファターゼ分子と 2 量体を形成し、リガンド結合により解離するモデルが一般に受入られている。このとき、2 量体形成下ではチロシンフォスファターゼ活性は抑制され、解離に伴い酵素活性が活性化されるという分子スイッチとして働くとされる。PTPσ・LAR と 2 量体を形成し、軸索再生阻害活性を関与する他の受容体型チロシンフォスファターゼを探索した。上記(2)で述べた Dystrophic endball 形成アッセイをベースに、受容体ノックアウトマウスより得られた後根神経節細胞を使用し検討した。

４．研究成果

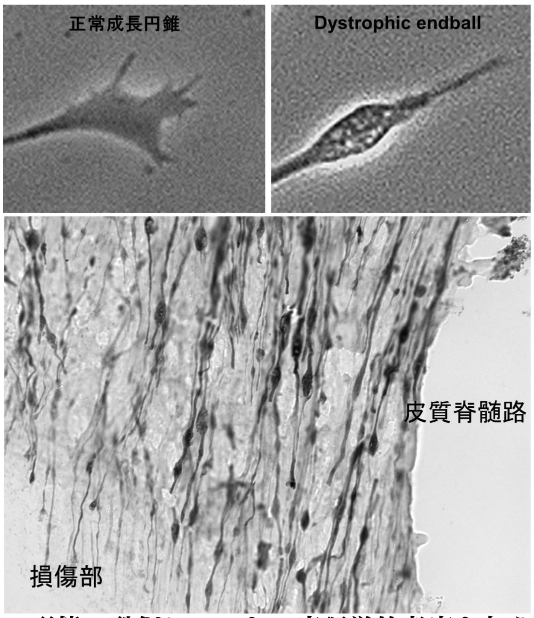
(1)組換えフォスファカンの精製

ラットフォスファカン発現プラスミドを COS-1 細胞に強制発現させ、1 週間の培養の後、培養上清を集めた。これを DEAE 陰イオン交換樹脂により粗精製し、さらに Sephacryl S300HR ゲル濾過担体を用いて高分子量の単一ピークを分取した。両クロマトグラフィーには AKTA purifier FPLC システムを用いた。この結果、高純度の組換えフォスファカンを得ることができた。この組換えフォスファカンがコンドロイチン硫酸・ケラタン硫酸を持つことを Western Blot および高速液体クロマトグラフィーにより確認することができた。

(2)フォスファカンはDystrophic endballを誘導する

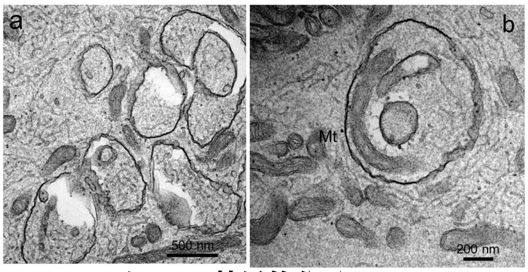
(1)により得られた組換えフォスファカンをガラス細胞培養皿上に濃度勾配を持たせて固層化した。ここにラット成体後根神経節細胞を播種し、4日間の培養の後、観察した。一部の神経軸索がフォスファカン濃度勾配に逆らうように伸長を試みていたが、そのほぼすべてが伸長を停止していた。その先端部は大きく腫大し、多数の空胞を蓄えていた（図1上パネル）。この様子をタイムラプスイメージングで観察すると、軸索先端部は大きな運動能を依然保持しているものの、前進と後退を繰り返すのみで、結果としてトータルの伸長が不可能であることが確認できた。またラット脊髄損傷半切モデルにおいても、損傷部皮質脊髄路において同様の軸索変性構造が確認された（図1下パネル）。この様子はすでに報告のある Dystrophic endball

図1



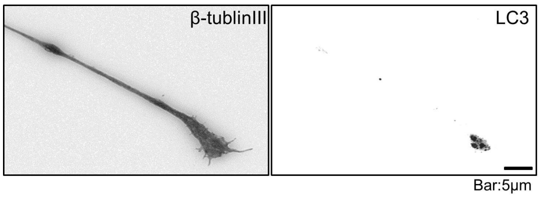
の形態に酷似していた。病理学的考察を与えるため、透過型電子顕微鏡による観察を行ったところ、これら空胞がオートファゴソームである可能性が浮上した（図2）。そこでオ

図2



ートファゴソーム特異的分子マーカーLC3 の免疫染色を行ったところ、Dystrophic endball 内に多数のドット状の特異的染色を得た（図3）。このことから、オートファジーが Dystrophic endball の形成に関与することが強く示唆された。

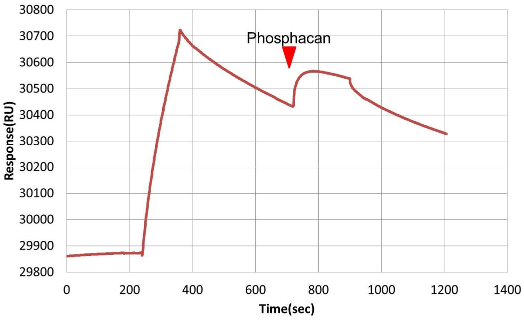
図3



(3)フォスファカンとコンドロイチン硫酸受容体との相互作用の検討

上記手法を用いて、フォスファカンとコンドロイチン硫酸受容体との相互作用を検討したところ、特異的結合を観察することができた（図4）。さらに結合・解離の様子を詳細に検討したところ、少なくともフォスファカン上の 2 つのモチーフが PTPσとの相互作用に関与している可能性を見出した。そこで次に、コンドロイチン硫酸・ケラタン硫酸の関与を調べたところ、コンドロイチン硫酸はもとより、ケラタン硫酸も結合に関与していることが判明した。さらに遊離ケラタン硫酸糖鎖も PTPσ・LAR と相互作用することも確認した。

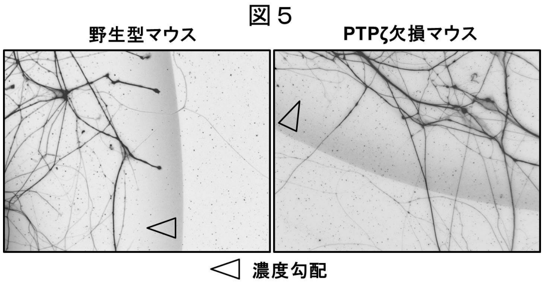
図４



(4)新規受容体の探索

プロテオグリカン・フォスファカンによる神経軸索再生阻害に関わる膜表面分子として PTPζを同定した。前述のように、野生型マウス由来神経細胞はプロテオグリカン濃度勾配上でDystrophic endballを形成する。ところが PTPζノックアウトマウス由来神経細胞は Dystrophic endball を形成せず、濃度勾配を越えて伸長することを確認した（図５）。PTPζとフォスファカンはスプライシングバリアントの関係であるが、今後この両者の関係について検討していく必要がある。

図５



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７件）
①Kadomatsu K, Bencsik P, Görbe A, Csonka C, Sakamoto K, Kishida S, Ferdinandy P.
“Therapeutic potential of midkine in cardiovascular disease.”
Br J Pharmacol. 巻 171 査読有 2014 年 頁 936-944 DOI: 10.1111/bph.12537.
②Kadomatsu K, Sakamoto K.
“Sulfated glycans in network rewiring and plasticity after neuronal injuries.”
Neurosci Res. 巻 78 査読有 2014 年 頁 50-54 DOI:なし
③Matsui H, Ohgomori T, Natori T, Miyamoto K, Kusunoki S, Sakamoto K, Ishiguro N, Imagama S, Kadomatsu K.
“Keratan sulfate expression in microglia is diminished in the spinal cord in experimental autoimmune neuritis.”
Cell Desth Dis. 巻 4 査読有 2013 年 頁なし DOI: 10.1038/cddis.2013.479.
④Hirano K, Ohgomori T, Kobayashi K, Tanaka F, Matsumoto T, Natori T, Matsuyama Y, Uchimura K, Sakamoto K, Takeuchi H, Hirakawa A, Suzumura A, Sobue G, Ishiguro N, Imagama S, Kadomatsu K.
“Ablation of keratan sulfate accelerates early phase pathogenesis of ALS.”
PLoS One. 巻 8 査読有 2013 年 頁なし DOI: 10.1371/journal.pone.0066969.
⑤Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, Hirakawa A, Takeuchi H, Suzumura A, Ishiguro N, Kadomatsu K.
“Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia.”
Cell Death Dis. 巻 4 査読有 2013 年 頁なし
DOI:10.1038/cddi.2013.54.
⑥Kishida S, Mu P, Miyakawa S, Fujiwara M, Abe T, Sakamoto K, Onishi A, Nakamura Y, Kadomatsu K.
“Midkine promotes neuroblastoma through Notch2 signaling.”
Cancer Res. 巻 73 査読有 2013 年 頁 1318-1327
DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-3070.
⑦Sakamoto K, Kadomatsu K.
“Midkine in the pathology of cancer, neural disease, ad inflammation.”
Pathol Int. 巻 62 査読有 2012 年 頁 445-455
DOI: 10.1111/j.1440-1827.2012.02815.x.

〔学会発表〕（計７件）
①Kazuma Sakamoto, Tomoya Ozaki, Yuanhao Gong, Kenji Kadomatsu
“Autophagy is involved in formation of dystrophic endball”
International Symposium on Glyco-Neuroscience
2014 年 1 月 9 日-11 日 淡路夢舞台国際会議場・淡路市
②坂元一真
「オートファジーによる神経変性・軸索再生阻害機構の解明」
第 7 回オートファジー研究会・第 1 回新学術領域「オートファジー」班会議
2013 年 12 月 19 日-21 日 ヤマハリゾートつま恋・掛川市
③Kazuma Sakamoto, Kenji Kadomatsu
“The role of 6-sulfation of Galactose residues of keratan sulfate in Phosphacan-mediated axonal growth inhibition”
第 5 回新学術領域「神経糖鎖生物学」班会議
2013 年 7 月 23 日-25 日 ラフォーレ琵琶湖・守山市
④Kazuma Sakamoto, Kenji Kadomatsu
“Phosphacan is the major inhibitor for axonal regeneration after injury”
Neuro2013
2013 年 6 月 20 日-23 日 国立京都国際会館・京都市
⑤坂元一真
「Phosphacan が中枢神経損傷後軸索再生阻害因子の本体である」
第 4 回新学術領域「神経糖鎖生物学」班会議
2013 年 1 月 15 日-17 日 青島パームビーチホテル・宮崎市
⑥Kazuma Sakamoto
“Keratan sulfate inhibits axonal regeneration after injury”
The 4th International Symposium “Global COE Symposium on Neuro-Tumor Biology and Medicine”
2012 年 11 月 15 日-16 日 ウェスティングナゴヤキャッスル・名古屋市
⑦Kazuma Sakamoto
“Keratan sulfate inhibits axonal regeneration after injury”
The 35th Annual meeting of the Japan Neuroscience Society
2012 年 9 月 18 日-21 日 名古屋国際会議場・名古屋市

〔図書〕（計１件）
①坂元一真、内村健治、門松健治
羊土社 実験医学増刊 第三の生命鎖糖鎖の機能と疾患 2013 年 頁 214(40-45)

〔その他〕
ホームページ等
ReaD & Researchmap
http://researchmap.jp/kazumasakamoto

６．研究組織
(1)研究代表者
坂元 一真（SAKAMOTO Kazuma）
名古屋大学・高等研究院（医）・特任助教
研究者番号：６０６１２８０１