

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670426

研究課題名(和文) 神経幹細胞ニッチ機能における細胞外マトリックス老化の分子基盤的研究

研究課題名(英文) Analyses for extracellular matrix in neuronal stem cell niche of aged brain

研究代表者

平澤 恵理 (Arikawa-Hirasawa, Eri)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50245718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳室下帯は成体神経新生領域の一つである。我々は神経新生を支える神経幹細胞ニッチとして脳室下帯に存在する基底膜様構造“fractone”の機能を解明している。老齢マウスでのfractoneの変化を細胞外マトリックス分子の免疫染色及び透過型電顕(TEM)により形態学的に解析した。細胞外マトリックス分子の発現に大きな変化はなかった。脳室下帯の基底膜ニッチ構造fractoneの大きさが有意に増大し、数が有意に減少していた。fractoneの免疫染色において、10E4抗体(生化学工業)で認識される糖鎖がfractoneと脳室下帯の血管基底膜で特異的に発現していたが、老化脳ではこの発現が減少した。

研究成果の概要(英文)：The subventricular zone (SVZ) is one of the area for neurogenesis in adult brain. In the SVZ neurogenic niche, specialized extracellular matrix (ECM) structures, fractones contact neural stem cells. We previously showed that heparan sulfate proteoglycan in the fractones regulate the growth factor activity and promote neurogenesis. We analyze the effect of aging on structure of fractones and composition of ECM molecules. Here, we report that fractone size significantly increased but fractone number significantly decreased with aging. Furthermore, we observed that the heparan sulfate chains contained in fractones were changed with aging. These results suggest that the change of morphology and specific composition of sugar chain in fractones may be related to decrease in neurogenesis in the aged SVZ.

研究分野：神経内科

キーワード：成体神経新生 細胞外マトリックス ヘパラン硫酸鎖 老化

1 研究開始当初の背景

近年の iPS 細胞研究の成果等により、細胞治療の実現化も急速に進んでいる。細胞移植治療及び内在性組織幹細胞を誘導する“*in situ* 細胞治療”において、細胞の運命を制御する細胞外環境の重要性はこれまで以上に認識されてきた。老化個体における組織再生力を維持するため、細胞と細胞外環境の両者の老化を制御することが重要である。老化マトリクソーム (マトリックス集合体) は、骨粗鬆症等で“量と質”の違いとして興味を広がっているが、その実態は不詳である。申請者は、2005 年より、**fractone** の発見、命名者であるハワイ大学 Mercier 博士と共同研究を開始し神経新生を支える脳室下帯に存在する神経幹細胞ニッチ “fractone” の機能を解明して来た (Kerever et.al *StemCells* 2007, Mercier & Arikawa-Hirasawa *NeuroscienceLetters* 2012, Douet V et al *NeuroscienceLetter* 2012)。これまでの研究では、**fractone** に存在するヘパラン硫酸鎖が FGF 等の成長因子を局在させ、その下流シグナルを制御することを示してきた。一方成体脳においても新たな神経細胞が生まれる能力があり、成体神経新生能と称されるが、老化により、神経新生能が低下することが知られている。その分子基盤はまだ十分に解明されていない。

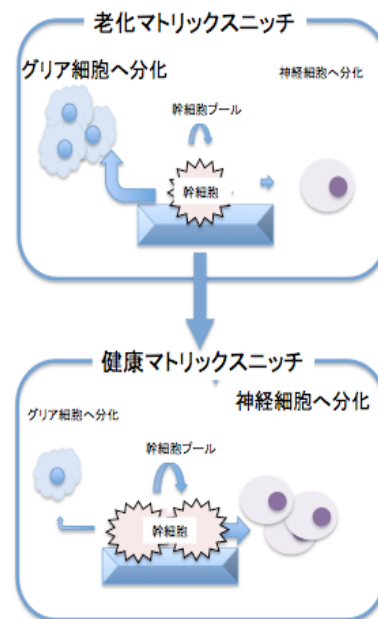
2. 研究の目的

本研究では脳室下帯の神経新生ニッチ構造である基底膜様構造 **fractone** の変化と神経新生能の関連性を調査することを目的とした。個体の高齢化の中で組織再生能力を維持するためには、細胞の老化と細胞外環境で

ある細胞外マトリックスの老化の両者を制御する必要がある。しかし、老化によるマトリクソーム変性の分子基盤は不明の点が多い。脳組織を例に挙げ、老化による(1)細胞外マトリックスの構造(2) 細胞外マトリックス構成分子種(3) 細胞外マトリックス構成分子の翻訳後修飾 (糖鎖修飾・蛋白糖化最終生成物 AGEs) (4) 細胞外マトリックスに結合するサイトカインの4つの変性過程を解析し、組織新生・再生の至適環境の探索を目的とする。

本研究課題の中では、特に糖鎖修飾の変化による増殖因子 (FGF2 など) の結合性や下流シグナルの変化を解析することを目指した。

図1 老化ニッチ環境 を 健康ニッチ環境へ



これにより、将来的に老化マトリックスニッチを健康マトリックスニッチ環境に改変する方法を検討し、高齢者の再生医療分野に貢献したい。

3. 研究の方法

- ① 若齢マウスとして10-11週 C57BL6 マウスを老齢マウスとして2歳マウスを実

験に用いた。

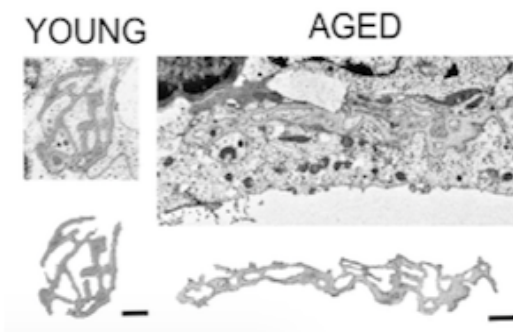
- ② 成体神経新生領域の一つである脳室下帯を若齢群、老齢群マウスで解析した。
- ③ 細胞外マトリックスの形態学的変化を蛍光顕微鏡的解析及び電子顕微鏡的解析観察する。
- ④ 構成細胞外マトリックス分子種の変化を免疫組織化学染色、ウェスタンブロット、リアルタイム PCR で解析する。
- ⑤ 構成細胞外マトリックス分子の翻訳後修飾の老化による変化を糖鎖抗体を用いた免疫組織化学染色及 2 糖解析などを用いた生化学的解析で検討する。
- ⑥ 結合するサイトカインの変化 (FGF2 など) を *in vitro* , *in vivo* で解析する。

4. 研究成果

細胞外マトリックス分子 (ラミニン、パールカン、コラーゲン、ナイドジェン等) 免疫染色及び透過型電顕 (TEM) により老齢マウスでの **fractone** の形態学的変化解析を行った。基底膜細胞外マトリックス分子の発現に大きな変化はなかった。電顕で観察された **fractone** の形態、大きさは変化していた (図 2)。

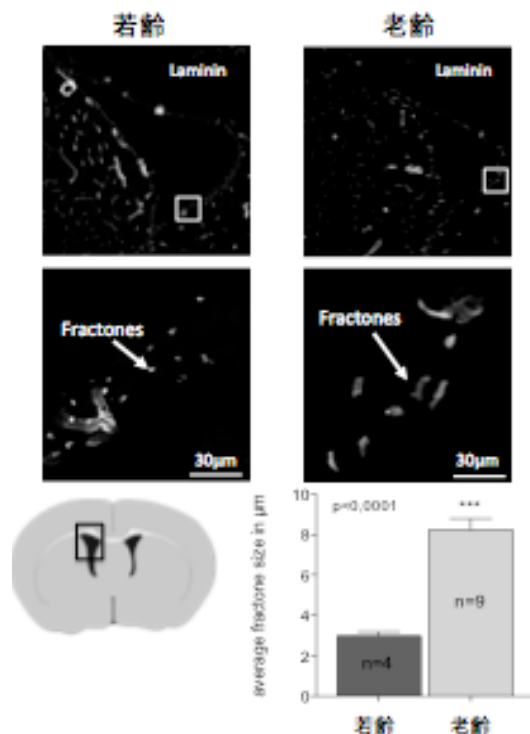
図 2 透過型電顕 (TEM) での **fractone**

(文献 Kerever et al 2015 より)



この結果を受けて、脳室下帯に存在する **fractone** をラミニン免疫染色でラベルし、サイズと数を調査した。結果を図 3 に示す。ラミニンでラベルしたマウス脳室下帯の基底膜ニッチ構造 **fractone** の解析では、大きさが有意に増大し、数が有意に減少していた (図 3)。

図 3 laminin でラベルした **fractone** の解



析

次に **fractone** をヘパラン硫酸鎖を認識する糖鎖抗体を定量したところ、ヘパラン硫酸鎖全体を認識する 3G10 では若齢、老齢を比較し、著変なかったが、10E4 抗体、JM403 抗体 (生化学工業 図 4 参照) では、老化脳では免疫組織学的定量値が減少した。特殊な糖鎖修飾が変化していることが示唆された。また、脳室下帯をグリアと神経幹

細胞を認識する GFAP 抗体と 10E4 抗体で染色、3D 構築したところ、老齢マウスにおいても細胞の突起が fractone と接触していることが観察された (図 5)。

図 4 ヘパラン硫酸鎖の構造

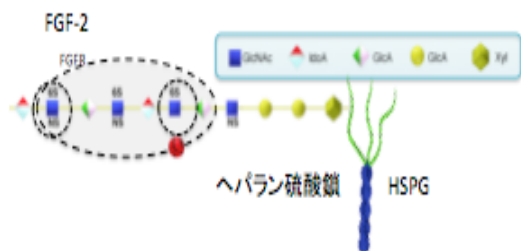
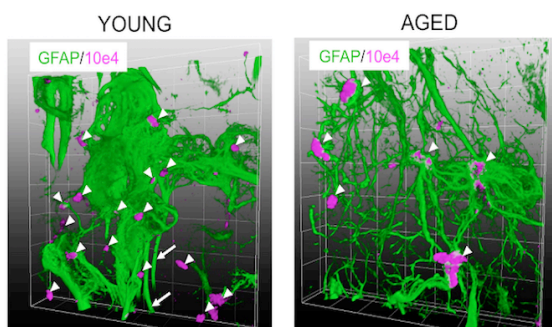


図 5 Fractone と神経幹細胞の接触



(文献 Kerever et al 2015 より引用)

以上の結果より、老齢マウスでは神経新生ニッチ機能をもつ基底膜様構造 fractone における発現分子種には大きな変化はないものの、その形態、サイズ、数に変化が観察されることがわかった。さらに、成長因子と結合するヘパラン硫酸鎖の修飾に変化があることを観察し、論文報告した (Kerever et al 2015 in press)。現在糖鎖の生化学的分析を進め、成長因子との結合性の変化が、神経幹細胞の運命を制御するシグナルネットワークにどのように影響するかを調査開始している。

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 11 件) 全て査読あり

- 1 Kerever A, Yamada T, Suzuki Y
Mercier F, Arikawa-Hirasawa E
Fractone aging in the subventricular zone of the lateral ventricle" has been accepted for publication in Journal of Chemical Neuroanatomy. In press
- 2 Kerever A, Kamagata K, Yokosawa S, Otake Y, Ochi H, Yamada T, Hori M, Kamiya K, Nishikori A, Aoki S, Arikawa-Hirasawa E.
See-through Brains and Diffusion Tensor MRI Clarified Fiber Connections: A Preliminary Microstructural Study in a Mouse with Callosal Agenesis.
- 3 Iwata S, Ito M, Nakata T, Noguchi Y, Okuno T, Ohkawara B, Masuda A, Goto T, Adachi M, Osaka H, Nonaka R, Arikawa-Hirasawa E, Ohno K. A missense mutation in domain III in HSPG2 in Schwartz–Jampel syndrome compromises secretion of perlecan into the extracellular space Neuromuscul Disord. 2015 May 8. pii: S0960-8966(15)00153-4. doi: 10.1016/j.nmd.2015.05.002. [Epub ahead of print]
- 4 Furuya N, Ikeda SI, Sato S, Soma S, Ezaki J, Trejo JA, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, Hattori N, Ueno T. PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance

- contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy*. Apr;10(4):631-41 2014
- 5 de Vega S, Suzuki N, Nonaka R, Sasaki T, Forcinito P, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y. A C-terminal fragment of fibulin-7 interacts with endothelial cells and inhibits their tube formation in culture. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Jan 27
- 6 Ning L, Kurihara H, de Vega S,* Ichikawa-Tomikawa n, Xu Z, Nonaka R, Kazuno S, Yamada Y, Miner JH, Arikawa-Hirasawa E, Laminin α 1 regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the TGF β pathway *The American Journal of Pathology* . 2014 Jun;184(6):1683-94
- 7 Nonaka R, Iesaki T, de Vega S, Daida H, Okada T, Sasaki T, and Arikawa-Hirasawa E Perlecan deficiency causes endothelial dysfunction by reducing the expression of endothelial nitric oxide synthase. *Physiological Reports* 2015 Jan 27;3(1). pii: e12272.
- 8 Suzuki N, Numakawa T, Joshua Chou J, de Vega S, Mizuniwa C, Sekimoto K, Adachi N, Kunugi N, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y, Akazawa C. Teneurin-4 promotes cellular protrusion formation and neurite outgrowth through focal adhesion kinase signaling. *FASEB J* Mar;28(3). : 1386-97.2014
- 9 Kerever A, Mercier F, Nonaka R, de Vega S, Oda Y, Zalc B, Okada Y, Hattori N, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E, Perlecan is required for FGF-2 signaling in the neural stem cell niche. *Stem Cell Res* 2013, 12: 492-505.
- 10 Nakazawa N, Miyahara K, Okawada M, Yamataka A, Suzuki R, Akazawa C, Tomikawa-Ichikawa N, Arikawa-Hirasawa E. Laminin-1 promotes enteric nervous system development in mouse embryo. *Pediatr Surg Int* 2013, 29: 1205-1208.
- 11 Douet V, Arikawa-Hirasawa E, Mercier F. Fractone-heparan sulfates mediate FGF-2 stimulation of cell proliferation in the adult subventricular zone *Cell Prolif* 2013, 46: 137-145.
- [学会発表] (計 9 件)
- 1 Risa Nonaka, Takafumi Iesaki, Susana de Vega, Yoshihiko Yamada, Eri Arikawa-Hirasawa . The role of the extracellular matrix protein Perlecan in the arterial wall. *Experimental Biology* 4.26-30 2014 San diego, USA
- 2 Risa Nonaka, Takafumi Iesaki, Susana de Vega, Yoshihiko Yamada, Eri Arikawa-Hirasawa . The role of the extracellular matrix protein Perlecan in the arterial wall. *Experimental Biology* 4.26-30 2014 San diego, USA
- 3 平澤 恵理、岩田 哲、野中 里紗、服部 信孝、中田 智彦、伊藤 美佳子、大野 欽司 Schwartz-Jampel 症候群の原因遺伝子、パールカンの機能部

- 分欠損変異の機能解析第 55 回日本神経学会学術大会 2014.5.21-24 (福岡)
- 4 野中 里紗、家崎 貴文、Susana de Vega、Aurelien Kerever、山田 吉彦、平澤 (有川) 恵理 大動脈構造や機能におけるパールカンの役割 第 46 回日本結合組織学会・第 61 回マトリックス研究会合同学術集会 2014.6.7-8(名古屋)
- 5 Risa Nonaka, Takafumi Iesaki, Susana de Vega., Aurerien Kerever, Yoshihiko Yamada, Eri Arikawa-Hirasawa Role of Perlecan in the Structural Integrity and Function of the Aorta. Gordon Research Conference on proteoglycan 2014.7.6-11 New Hampshire, USA
- 6 Eri Arikawa-Hirasawa "Role of Perlecan in Neurogenesis and Ageing" Gordon Research Conference on proteoglycan 2014.7.6-11 New Hampshire, USA
- 7 Takenori Inomata, Toru Matsunaga, Nobuyuki Ebihara, Akira Murakami, Eri Arikawa-Hirasawa Perlecan-deficient Mutation Impairs Homeostasis and Wound Healing in Mouse Corneal Epithelium Gordon Research Conference on proteoglycan 2014.7.6-11
- 8 Arikawa-Hirasawa E., Douet V, Alarcon VB, Kerver A, Mercier F, Fractone niche for neuroepithelial and neural stem cell proliferation: From early brain development to adult subventricular zone Society for Neuroscience annual meeting Nov 9-13 2013 San Diego CA USA
- 9 Kerver A , Yamada Y, Nonaka R, Mercier F, Arikawa-Hirasawa E. Age-related alteration of extracellular matrix in the subventricular zone of the lateral ventricles. Society for Neuroscience annual meeting Nov 9-13 2013 San Diego CA USA

[その他]

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/rojinsei_shikkan/senryaku.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平澤恵理 (HIRASAWA ERI)

順天堂大学医学研究科 准教授

(研究者番号 : 50245718)