

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861161

研究課題名(和文) 脳微小環境分子としての硫酸化糖鎖による神経細胞分化制御と細胞移植治療への応用検討

研究課題名(英文) Roles of sulfated glycosaminoglycans as brain niche constituents on differentiation of neural stem cells

研究代表者

山内 忍 (YAMAUCHI, SHINOBU)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：70433589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞分化制御に関わるグリコサミノグリカン(GAG)の役割を明らかにするため、胎児ラット脳から調製した神経幹細胞、ニューロン、グリア細胞を用いて、各細胞に発現するGAG糖鎖構造の推定をおこなった。GAG糖鎖構造の修飾に関する酵素遺伝子の発現解析の結果、神経幹細胞とその分化後の神経系細胞との間でGAG糖鎖構造全体に著しい構造変化が起きている可能性が明らかになった。この結果は、GAG糖鎖が神経幹細胞の分化過程で構造変化を起こすことで細胞外マトリックス分子や増殖因子等の生理活性分子との相互作用を介して神経幹細胞の分化を制御している可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Glycosaminoglycan (GAG) chains are involved in numerous biological functions in the central nervous systems. However, little is known about the structural changes and functional role of GAG chains in the differentiation of neural stem cells (NSCs). The structural complexity of GAG chains is generated biosynthetically under the control of multiple modification enzymes. Therefore, we examined the structural features of GAG chains synthesized by NSCs and other neural cells by gene expression analysis for multiple GAG-modification enzymes. Our results demonstrated that drastic structural changes of GAG chains occur during the differentiation of NSCs into neurons and glial cells. We thus speculate that the structural changes in GAG may be implicated in the regulation of NSC differentiation through interactions with various extracellular matrix proteins and growth /neurotrophic factors.

研究分野：医歯薬学

キーワード：硫酸化糖鎖 プロテオグリカン 硫酸基転移酵素 脳微小環境 神経幹細胞 神経細胞 グリア細胞
神経分化

1. 研究開始当初の背景

グリコサミノグリカン(GAG)にはコンドロイチン硫酸(CS)/デルマトン硫酸(DS)、ヘパリン硫酸(HS)、ケラタン硫酸(KS)などの種類があり、硫酸化の量や位置の違いにより、多彩な構造的多様性を持つ。通常、GAGはプロテオグリカン(PG)分子に共有結合した多糖側鎖として細胞表面や細胞間隙に存在し、GAG糖鎖構造依存的に様々な成長因子や機能分子との結合を介して細胞微小環境を構築し、組織の恒常性維持に関与している。中枢神経系においても多くのPG分子種が存在し、神経系の発達、損傷、修復の各過程に関与することが明らかとなり、PG分子およびGAGが神経組織の機能発現において重要な役割を果たしているという認識が強まってきた。

近年になり、PG分子種が神経系の組織幹細胞である神経幹細胞にも存在し、PG分子及び特定のGAGが神経幹細胞の増殖、維持過程に影響を与えていること等が報告された。幹細胞の増殖や分化といった生理機能は細胞微小環境において、それを構成する細胞微小環境分子の働きによって調節されていると考えられている。GAGは細胞微小環境構成分子として、その糖鎖構造依存的な様式で様々な機能分子群との結合を調節して細胞機能の発現に関係しているが、神経幹細胞分化過程とGAG糖鎖による細胞微小環境シグナル制御のメカニズムとの関わりについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、GAGが中枢神経系の細胞微小環境において分化シグナル制御因子として作用し、GAG糖鎖構造依存的に神経幹細胞の分化過程を制御していることを明らかにする。これにより、神経疾患や脳損傷に対する再生医療として期待される細胞移植治療の実現に必須となる神経幹細胞の分化誘導調節剤としての新規GAG糖鎖製剤の開発

や特定の神経系細胞の純化に利用可能なGAG糖鎖マーカー確立のための足がかりを作することを目的とした。

3. 研究の方法

PGの生理機能は、PGに共有結合したGAG糖鎖の微細な構造変化による各種細胞外マトリックス分子や増殖因子等の生理活性分子との結合変化を介して発揮される。そして、GAGの微細糖鎖構造の生合成過程には多くの糖鎖修飾酵素(特に、GAG糖鎖の構造多様性を決定付けている硫酸化修飾酵素やエピメラーゼ)が関与している。そこで、胎仔ラット脳、および新生仔ラット脳から調製した神経幹細胞と神経細胞、およびグリア細胞を用いてGAG糖鎖や、GAG糖鎖の微細構造形成に関わる修飾酵素群の発現レベルを生化学的、分子生物学的手法で解析することで、神経幹細胞の分化に伴うGAG糖鎖構造変化を推定し、GAG糖鎖構造依存的な神経幹細胞の分化制御機構を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

(1)神経幹細胞の分化誘導前後のGAG糖鎖修飾酵素の発現解析

胎仔ラット脳からニューロスフィア法を用いて調製した神経幹細胞は、培養液から増殖因子を除いて培養することで分化誘導がおこり神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを含む混合培養系となる。まず、神経幹細胞の未分化性の維持や分化過程に関わるGAG糖鎖構造の手がかりを得ることを試みた。分化誘導前後の神経幹細胞について抗GAG抗体や抗PG抗体を用いたウエスタンブロット分析をおこなった結果、各抗体に対して分化前後で全く異なる反応性を示した。また、微細糖鎖構造形成に関わる糖鎖修飾酵素遺伝子の定量的PCR分析をおこなった結果、分化誘導前後で糖鎖修飾酵素遺伝

子発現に興味深い相違が見られた。

(2) 神経幹細胞、神経細胞、グリア細胞間の GAG 糖鎖修飾酵素の発現解析

次に、神経幹細胞の分化誘導前後に見られた GAG 糖鎖構造変化を示唆する結果が、分化後のどの神経系細胞に起因するものかを調べた。胎仔ラット脳、および新生仔ラット脳から神経幹細胞、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの単離培養系を調製した。オリゴデンドロサイトは NG2 陽性の前駆細胞とミエリン塩基性タンパク陽性の成熟細胞を調製した。各培養系における糖鎖修飾酵素遺伝子群の発現プロファイルを定量的 PCR 分析により詳細に解析した結果、以下のことが明らかになった。CS/DS 糖鎖修飾については、神経幹細胞に比べて、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトで高硫酸化糖鎖単位合成に関わる酵素遺伝子発現に大きな変化が見られ、その傾向はオリゴデンドロサイトで特に強いことがわかった。KS 糖鎖修飾については、神経幹細胞に比べて、ニューロン、およびオリゴデンドロサイトで高硫酸化糖鎖単位合成に関わる酵素の発現変化が大きいことがわかった。HS 糖鎖修飾については、神経幹細胞に比べて、ニューロンで特殊な高硫酸化糖鎖単位合成に関わる酵素の発現変化が特に大きいことがわかった。さらに、特定の HS 糖鎖単位の脱硫酸化に関わる酵素遺伝子発現にも興味深い変化が見られた。

以上の結果から、神経幹細胞の分化に伴い GAG 糖鎖全体がダイナミックに変化することで、GAG 糖鎖が分化過程に対して柔軟な制御システムを与えている可能性が示唆される。

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 3 件)

Kurosu A, Kuroyanagi K, Yamauchi S, Omura K, Saito K. (2016) Sudden Death Caused by Anomalous Origin of the Coronary Artery During Exercise. *Journal of Forensic Sciences*. 61, 548-50.
doi: 10.1111/1556-4029.13004

Hitosugi M, Tsukada C, Yamauchi S, Matsushima K, Furukawa S, Morita S, Nagai T. (2015) An autopsy case of fatal repellent air freshener poisoning. *Legal Medicine*. 17, 360-363.
doi: 10.1016/j.legalmed.2015.04.004.

Hitosugi M, Tsukada C, Yamauchi S, Nagai T. (2014) A case of fatal risperidone poisoning alerts physicians. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 34, 268-269.
doi: 10.1097/JCP.0000000000000048.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

川戸 仁、東田 千絵、一杉 正仁、前田 純子、松村 美穂子、山内 忍、メジカルビュー社、知って得する 100 事例 患者さんトラブル予防・解決 Q&A、2014、213(52-71、190-191、194-197)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

山内 忍（YAMAUCHI SHINOBU）

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：70433589

(2)研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

（ ）

研究者番号：