

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23110002

研究課題名（和文）経験依存的神経可塑性におけるプロテオグリカンの認識機構

研究課題名（英文）Mechanisms of proteoglycan-mediated experience-dependent neural plasticity

研究代表者

門松 健治（Kadomatsu, Kenji）

名古屋大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：80204519

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 143,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は硫酸化糖鎖による神経機能制御機構を明らかにすることが目的であった。ケラタン硫酸は軸索再生を阻害し、眼優位性可塑性においては非遮蔽眼と同側の脳皮質視覚野両眼領域のLTPを介して非遮蔽眼からの入力増強を制御していることが示された。また、コンドロイチン硫酸とその受容体PTPRシグマ、LAR（Type II a受容体型チロシンフォスファターゼRPTPに属する）の下流でオートファジー制御を介して、軸索先端の特殊なボール様形状dystrophic endball形成を導き、軸索再生阻害に繋げることを見出した。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed at elucidating regulatory mechanisms of neural functions by sulfated glycans. Keratan sulfate inhibits axon regeneration. In a set of ocular dominance plasticity, keratan sulfate also regulates functional innervation into binocular region from non-deprived eye through regulation of LTP in the critical period. We also found that chondroitin sulfate and its receptors, PTPR and LAR, regulate autophagy, dystrophic endball formation and consequently axon regeneration.

研究分野：神経糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 神経可塑性 受容体 軸索再生

1. 研究開始当初の背景

神経組織の細胞外微小環境は他組織と大きく異なる。他組織の細胞外マトリックスがタンパク質中心であるのに対し、神経組織ではプロテオグリカン、ヒアルロン酸など長大な糖鎖を含む分子で占められる。プロテオグリカンは、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が付いたものである。ケラタン硫酸(KS)鎖が付いたプロテオグリカンをケラタン硫酸プロテオグリカン(KSPG)と呼ぶ。また、コンドロイチン硫酸(CS)が付いたプロテオグリカンをコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)と呼ぶ。これまでCSPGが強力な軸索再生阻害因子であることが分かっていた。私たちは中枢神経のKS欠損マウス作成に成功し、このマウスやKS分解酵素を用いて、脊髄損傷や*in vitro*神経突起伸長などのモデルにより、KSPGが重要な軸索再生阻害因子であることを見出した。CSPG、KSPGによる軸索再生阻害はどのような機構によるものだろうか。この疑問に答えるヒントのひとつとして、スペインの神経解剖学者 Santiago Ramon y Cajal が1世紀前にスケッチした、*dystrophic endball*が挙げられる。損傷した軸索先端は球形のいびつな形を呈するというもので、私たちはこの形成機構に切り込むことで軸索再生機構に迫れないかと考えた。

一方、記憶形成にはシナプス後部におけるAMPA型グルタミン酸受容体が、まず側方に移動することが必須である。興味深いことにAMPA受容体の側方移動は糖鎖による細胞外ネット構造の分解によって促進され、シナプス可塑性も亢進する。このようなシナプス可塑性は眼優位性可塑性や恐怖消去などに代表される経験依存的神経可塑性の基盤の一つとなっている。私たちは、本来は臨界期と呼ばれる若い時期にしか現れない眼優位性可塑性をKS分解酵素によって成体に蘇らせることができることを見出した。

2. 研究の目的

以上の背景を基に、CSPGのCS鎖およびKSPGのKS鎖の機能ドメインが神経細胞の上の受容体に認識されるという作動原理の解明が本研究の目的である。また、KSによるミクログリアの制御の機構解明を行う。さらに、プロテオグリカンによる脳高次機能制御の統合的理解のために、CSのトランスジェニック、欠損マウスの解析や*in vitro*解析を通して、CSによる記憶・学習、情動、軸索再生の制御機構を解明する。

3. 研究の方法

計画班員の小松と眼優位性可塑性に関する共同研究、戸島とKS受容体のシグナル伝達に関する共同研究、総括班研究分担者の田村には合成KS、CSを供与してもらい共同研究を行う。計画班員の北川、柚崎からはそれぞれCS全般と神経細胞内小胞輸送に関して

助言を受ける。

【眼優位性神経可塑性】臨界期と呼ばれる幼弱期マウスの片眼遮蔽により、遮蔽眼と反対側の脳皮質視覚野両眼領域では遮蔽眼からの入力が減り、非遮蔽眼からの入力の増す現象が起きる。これを眼優位性神経可塑性という。CSと同様に、KSもこの可塑性を抑制する機能を有するという予備データに基づいて、KSの発現を臨界期正常マウスとGlcNAc6ST-1欠損マウス(KSが部分的に欠損)で解析し、この可塑性の状態を両マウスで詳細に比較する。

【ALS、EAE、脊髄損傷】ALSモデルSOD1G93Aマウス、多発性硬化症のモデルEAEマウス、および脊髄損傷の3つのモデルを用いてKSのこれらの病態における役割を検討する。

【神経軸索再生】脊髄損傷など中枢神経損傷後の軸索は再生しない。その機構を調べるためには*in vitro*のモデル系が有用である。CSを、濃度勾配を持たせてコートした培養皿の上で後根神経節(DRG)神経を培養すると軸索再生はCS勾配の途中で、*dystrophic endball*形成を伴って止まる。これを利用して、CSによる*dystrophic endball*形成機構を解明する。

4. 研究成果

【眼優位性神経可塑性】免疫組織染色によって、低硫酸化されたKS(GlcNAcのみが硫酸化されGalの硫酸化のない状態)が、臨界期のマウス脳皮質視覚野に発現していることが判った。高硫酸化されたKS(GlcNAc、Gal両方とも硫酸化されたもの)はこの時期には既にほとんど発現していなかった。低硫酸化KSは広く細胞外マトリックスに発現し、特に興奮性神経細胞、抑制性神経細胞の周りには強く発現していた。電顕での解析により、シナプス周囲に(但し、シナプス前部にはない)KSの局在を認めた。KSはプロテオグリカンであるフォスファカンと局在が一致した。

GlcNAc6ST-1欠損マウスではKSの発現が半減するが、臨界期のこのマウスに片眼遮蔽を施した。その結果、遮蔽眼と反対側の脳皮質視覚野両眼領域では遮蔽眼からの入力減ったが(野生型マウスと同じ反応)、非遮蔽眼からの入力が増すことはなかった(野生型マウスとは異なる反応)。野生型で起こる遮蔽眼からの入力が増す現象の一部は、T型カルシウムチャンネルを介したLTPによって説明されるが、GlcNAc6ST-1欠損マウスではこのLTPが起きなかった。以上から、臨界期の脳皮質視覚野両眼領域のKSはT型カルシウムチャンネルを介したLTPを制御することが分かった。

【ALS、EAE、脊髄損傷】SOD1G93AマウスとGlcNAc6ST-1欠損マウスを掛け合わせ、ALSにおけるKSの役割を解析した。GlcNAc6ST-1欠損があるとALSの病態はむ

しる悪化することが判明した。その機構を調べると M1、M2 ミクログリアの polarization が野生型と異なることが分かった。すなわち、病態の早期では M2 ミクログリアが一過性に強く出現し、後期になるに従って M1 ミクログリアが優勢となる。GlcNAc6ST-1 欠損マウスでは早期の M2 ミクログリア出現が十分でなく、その分病態の進行が早くなると解釈できた。

EAE、脊髄損傷でも KS はミクログリアの活性化と密接に関係していた。例えば、Wallerian degeneration は軸索切断に伴って末梢部の軸索が変性する現象であるが、切断部位から遠位部（末梢側）には活性化ミクログリアが出現し、これらのミクログリアは KS を強く発現していた。

脊髄損傷に関連して、CS や KS を担うプロテオグリカンの分解も重要である。特に ADAMTS-4 はアグリカンを初め多くのプロテオグリカン分解することで知られる。ADAMTS-4 の投与により脊髄損傷からの機能回復を促進することができた。また、ヒト歯髄幹細胞の脊髄損傷部位への移植によっても機能回復を促進することができた。

【神経軸索再生】何故、中枢神経軸索は再生しないのか？これには中枢神経の低い再生能力と損傷が誘導する再生阻害因子の2つの理由がある。特に、この一世紀の間、軸索再生因子の探索が精力的に行われた。その結果、中枢神経系の主要な細胞外マトリックス構成成分であるプロテオグリカン上の糖鎖がその代表的責任因子であると同定された。中でも CS は最も強い阻害因子の一つである。ところが同じ硫酸化糖鎖でもヘパラン硫酸 (HS) はむしろ軸索伸長を促進する。CS と HS は同じ受容体 PTPR σ 、LAR (受容体型チロシンフォスファターゼ) を共有することが知られている。にも拘らず、「何故、HS は軸索伸長を促進し、CS は阻害するのか？」これが本研究を推進する原動力になった疑問である。

私たちは、脊髄損傷後、神経損傷にもなって現れる軸索先端の変形 (dystrophic endball) が、ほぼ全ての損傷軸索末端で起こることを確認し、軸索再生阻害機構を知るには、この dystrophic endball 形成機構に迫るべきであると考えた。神経損傷部位には CS が誘導され、in vitro でも CS 濃度勾配の基質上で軸索伸長阻害を見ることができた。この in vitro モデルを活用し、in vivo で見られる損傷軸索末端の特徴的 dystrophic endball 形成を再現できる。面白いことに adult DRG neuron で起こる dystrophic endball 形成は、embryonic DRG neuron では起きなかった。

私たちは、この dystrophic endball 形成が autophagosome の蓄積を伴うことを発見した。この現象は in vivo でも起きた。すなわち、脊髄損傷後、皮質脊髄路の運動神経を BDA ラベルし、損傷した運動神経軸索末端を観察すると LC3 陽性の autophagosome の

著明な蓄積を認めた。

加えて、autophagosome 蓄積の機構も解くことができた。tfLC3 は、LC3 という autophagosome のマーカータンパク質に GFP、RFP という2つの蛍光タンパク質が融合したものである。Autophagosome では GFP、RFP 両方の蛍光が発せられるので黄色の蛍光として検知されるが、lysosome と融合して autolysosome となると pH が下がるために GFP の退光が起こり、赤い蛍光として検知される。これを利用したところ、dystrophic endball では圧倒的に黄色の蛍光を発する小胞で占められ、growth cone と対照的であった。つまり、dystrophic endball では autophagy flux (オートファジー流) が中断されて autophagosome が lysosome と融合できないことを証明した。

そこで、autophagosome と lysosome との融合に特異的な SNARE タンパク質をロックダウンすると dystrophic endball 形成も見られ、軸索伸長が著しく阻害された。さらに、autophagy の初期に重要な Utk1 をロックダウンして autophagosome の蓄積をキャンセルすると dystrophic endball 形成は起きなかった。以上から、autophagy flux 中断は dystrophic endball 形成にとって必要十分条件となることが判った。一方、CS 受容体 PTPR σ をロックダウンするとこれらの現象は解除された。以上から、PTPR σ 下流のオートファジー中断が dystrophic endball 形成の原因になることが示された。

さらに、CS による dystrophic endball 形成を、HS が解除することを見出した。そこで、同じ受容体を共有するにも関わらず「何故、HS は軸索伸長を促進し、CS は阻害するのか？」にアドレスした。田村純一博士 (鳥取大学)、Shang-Cheng Hung 博士 (台湾アカデミアシニカ) と共同し、数年をかけて CS、HS それぞれの様々な硫酸化パターンを網羅した合成糖鎖を作成した。これらを用いて、稀な硫酸化パターン (CS-E) で PTPR σ 、LAR と結合する CS では短い機能ドメインしか天然物には存在しえず、結合する受容体を単量体化に導くものに対して、多様な硫酸化パターンが結合する HS では長い機能ドメインが天然物に存在し受容体を多量体化に導くことを明らかにした。

以上をまとめると、ここまで本研究によって硫酸化糖鎖による軸索再生制御機構を明らかにすることが出来た。本新学術領域が目的とした「糖鎖機能ドメインの同定 受容体の決定 細胞内シグナルの解明」を本研究では達成することができた。すなわち、CS による軸索再生阻害は、CS (CS-E 4糖) \rightarrow PTPR 単量体化 \rightarrow オートファジー中断 \rightarrow dystrophic endball 形成 \rightarrow 軸索再生阻害の軸で制御されていた。HS はこの軸を受容体の多量体化を導くことにより解除した。PTPR 結合特異性を決める硫酸化パターンの出現頻度という偶然が機能ドメインの長さを決

め、この必然により PTPR の集合体形成が制御されることが判った。

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 5 8 件)

Hiroyuki Kamiguchi, Kenji Kadomatsu, Introduction to glyco-neuroscience, Exp Neurol, 査読有, 274(Pt B), 2015, 89

DOI:10.1016/j.expneurol.2015.11.008
Tahmina Foyez, Yoshiko Takeda-Uchimura, Shinsuke Ishigaki, Narentuya, Zui Zhang, Gen Sobue, Kenji Kadomatsu, Kenji Uchimura, Microglial Keratan Sulfate Epitope Elicits in Central Nervous Tissues of Transgenic Model Mice and Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis, Am J Pathol, 査読有, 185(11), 2015, 3053-3065

DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.07.016
Yoshiko Takeda-Uchimura, Kenji Uchimura, Taketoshi Sugimura, Yuchio Yanagawa, Toshisuke Kawasaki, Yukio Komatsu and Kenji Kadomatsu, Requirement of keratan sulfate proteoglycan phosphacan with a specific sulfation pattern for critical period plasticity in the visual cortex. Experimental Neurology, 査読有, 274, 2015, 145-155

DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.08.005
Kenji Kadomatsu, Kazuma Sakamoto, Mechanisms of axon regeneration and its inhibition: roles of sulfated glycans, Arch Biochem Biophys, 査読有, 558, 2014, 36-41

DOI:10.1016/j.abb.2014.06.009
Hiroki Matsui, Tomohiro Ohgomori, Takamitsu Natori, Katsuichi Miyamoto, Susumu Kusunoki, Naoki Ishiguro, Shiro Imagama and Kenji Kadomatsu, Keratan sulfate expression in microglia is diminished in the spinal cord in experimental autoimmune neuritis, Cell Death Dis, 査読有, 4, 2013, e946
DOI: 10.1038/cddis.2013.479

Kenichi Hirano, Tomohiro Ohgomori, Kazuyoshi Kobayashi, Fumiaki Tanaka, Tomohiro Matsumoto, Takamitsu Natori, Yukihiro Matsuyama, Kenji Uchimura, Kazuma Sakamoto, Hideyuki Takeuchi, Akihiro Hirakawa, Akio Suzumura, Gen Sobue, Naoki Ishiguro, Shiro Imagama and Kenji Kadomatsu, Ablation of keratan sulfate accelerates early phase pathogenesis of ALS, PLoS One,

査読有, 8(6), 2013, e66969

DOI: 10.1371/journal.pone

Kazuyoshi Kobayashi, Shiro Imagama, Tomohiro Ohgomori, Kenichi Hirano, Kenji Uchimura, Kazuma Sakamoto, Akihiro Hirakawa, Hideyuki Takeuchi, Akio Suzumura, Naoki Ishiguro and Kenji Kadomatsu, Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia, Cell Death Dis, 査読有, 4, 2013, e525

DOI: 10.1038/cddis.2013.54

Ryoji Tauchi, Shiro Imagama, Takamitsu Natori, Tomohiro Ohgomori, Akio Muramoto, Ryuichi Shinjo, Yukihiro Matsuyama, Naoki Ishiguro and Kenji Kadomatsu, The endogenous proteoglycan-degrading enzyme ADAMTS-4 promotes functional recovery after spinal cord injury, J Neuroinflam, 査読有, 9, 2012, 53

DOI: 10.1186/1742-2094-9-53

Kiyoshi Sakai, Akihito Yamamoto, Kohki Matsubara, Shoko Nakamura, Mami Naruse, Mari Yamagata, Kazuma Sakamoto, Ryoji Tauchi, Norimitsu Wakao, Shiro Imagama, Hideharu Hibi, Kenji Kadomatsu, Naoki Ishiguro and Minoru Ueda, Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms, J. Clin. Invest, 査読有, 122, 2012, 80-90

DOI: 10.1172/JCI59251

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 and Kenji Kadomatsu, Keratan sulfate restricts neural plasticity after spinal cord injury, J. Neurosci, 査読有, 31, 2011, 17091-17102

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5120-10.2011

[学会発表](計 9 件)

Kenji Kadomatsu, Sulfated glycans regulate autophagy and axon regeneration, The 3rd International symposium on Glyco-neuroscience, Jan 14-16, 2016, Awaji YUMEBUTAI (兵庫県淡路市)

Kenji Kadomatsu, Why should we care about glycans in the brain, Society for Glycobiology : Satellite Symposium II Glycans in Neuroscience, Nov 16-19, 2014, Honolulu, USA

Kenji Kadomatsu, Role of keratan sulfate and chondroitin sulfate in axon regeneration, 4th ECMNET Conference, Sep 30- Oct 2, 2014, Antalya, Turkey

Kenji Kadomatsu, The role of sugar chain in microglial polarity, 12th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry August 23-26, 2014 in Kaohsiung (Ta-Kao), Taiwan

Kenji Kadomatsu, Roles of sulfated glycans and autophagy in dystrophic endball formation in the axonal regeneration inhibition, International symposium on Glyco-neuroscience, Jan 9-11, 2014, Awaji YUMEBUTAI (兵庫県淡路市)

Kenji Kadomatsu, Keratan sulfate and neuronal circuit reconstruction, Proteoglycans 2013, August 25-29, 2013, Frankfurt, Germany

Kenji Kadomatsu, Regulation of neural plasticity by sugar chains-towards integration of glyco- and neuro-biology. Neuroscience 2012, September 18, 2012, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

Kenji Kadomatsu, Midkine: at the intersection of neurobiology and cancer, Excellence in midkine research conference, June 28-30, 2012, Istanbul, Turkey

Kenji Kadomatsu, Proteoglycans and neuronal network reconstruction, 7th international conference on proteoglycans, October 16-20, 2011, Sydney, Australia

〔図書〕(計2件)

Kadomatsu K, Glycosaminoglycans: Key Regulator for Recovery from Neuronal Injuries Glycoscience: Biology and Medicine (Taniguchi, N., Endo, T., Hart, G.W., Seeberger, P.H., Wong, C.-H.) Springer 2015. 1569(505-510)

〔その他〕

ホームページ等

<http://shinkei-tosa.net>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門松 健治 (KADOMATSU, Kenji)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80204519