

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08265

研究課題名(和文) 脳アミロイド斑に蓄積するヘパラン硫酸糖鎖のSulf2による構造改変および機能解析

研究課題名(英文) Sulf2-remodeling of heparan sulfate present in brain amyloids

研究代表者

内村 健治 (UCHIMURA, Kenji)

名古屋大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：20450835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病脳内ではアミロイド斑が観察される。脳アミロイド斑は通常脳内免疫細胞であるミクログリアにより貪食除去され、脳神経機能維持が図られる。本研究は、脳アミロイド斑局在ヘパラン硫酸糖鎖の分解酵素を脳内で発現させ、脳アミロイド斑除去作用への効果を検証することを目的とし実施された。本研究の結果、血管内皮由来のヘパラン硫酸糖鎖が脳アミロイドの形成に深く関与することが強く示唆された。本研究は一部予想外の結果に対処する必要があったが、順調に進展し予定通り遂行された。

研究成果の概要(英文)：Extracellular accumulation of amyloid beta peptides is a character of cerebral amyloid plaques in Alzheimer's disease. Heparan sulfate is an extracellular carbohydrate chain found in amyloid plaques in the brain of transgenic Alzheimer's model mice and patients with Alzheimer's disease. Highly sulfated subdomains within heparan sulfate chains are abundant in amyloid plaques of Alzheimer's mouse brains. Degradation of these subdomains may be a potential approach to activate microglial clearance of the plaques in Alzheimer's brain. We tested if the transgenic expression of an extracellular sulfatase in Alzheimer's model mice could facilitate removal of the subdomains and attenuate cerebral amyloid plaque formation. We have shown that a cell type-specific expression of an extracellular sulfatase resulted in negative regulation of amyloid plaque formation. An enzymatic remodeling of extracellular heparan sulfates in the brain can perhaps control Alzheimer's pathogenesis.

研究分野：糖鎖生物学

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

アルツハイマー病は神経変性を伴う認知症の一つであり、世界で最も多い神経変性疾患である。AD 発症における主な原因は脳内におけるアミロイド 蛋白 (A β) の重合によるオリゴマー形成、および A β がさらに重合し形成される線維化 A β の細胞外沈着増加 (アミロイド斑形成) である。これら重合沈着した A β は神経毒性作用を示す。これまでにアルツハイマー病脳において細胞外マトリックス成分プロテオグリカンの糖側鎖であるヘパラン硫酸 (HS) と A β の結合が報告されている。HS が A β の重合を促進していること、HS が脳内免疫細胞ミクログリアの細胞性貪食による沈着 A β の除去に対して負に作用していることが国内外で提唱されている。しかし、分子構造レベルでの HS の作用機序は不明な点が多かった。HS はグルクロン酸と N-アセチルグルコサミンの二糖が 200 個ほど連なった分岐のない糖鎖で内部は硫酸基修飾が多く見られるドメイン “多硫酸化ドメイン” や硫酸基修飾が少ないドメインが存在する。ヘパリンは多硫酸化ドメインが約 80% を占める HS である。私たちはヘパリンが A β の重合をある濃度で促進する現象を観察していた。当該ドメインがアルツハイマー病態に関わることが示唆されていた。

私たちは HS 多硫酸化ドメインを特異的に認識するファージディスプレイ抗体 RB4CD12 を開発した (*Glycobiology* 2010)。本抗体で認識される HS 多硫酸化ドメインが生理条件下の脳では血管基底膜に存在することを研究代表者は報告し (*J Neurosci Res* 2011) さらにアルツハイマー病のモデルマウスおよび患者剖検脳では A β 沈着アミロイド斑に蓄積することを明らかにした (*Am J Pathol* 2012)。一方、以前単離同定した細胞外スルファターゼ Sulf2 (*J Biol Chem* 2002) が当該多硫酸化ドメインを *in vitro* で分解し得ることを研究代表者は明らかにした (*BMC Biochem* 2006)。また、ヒト Sulf2 による特異的分解が培養細胞レベルおよび *ex vivo* 脳凍結切片システムでも観察されることを報告した (*Am J Pathol* 2012)。大変興味深いことに、ヒト Sulf2 をマウスミクログリア細胞株 BV2 にレンチウイルスを使用して発現させると、A β 沈着アミロイド斑の貪食除去が促進されることを *ex vivo* 解析により明らかにした。Sulf2 は分子量約 130kDa の分泌型酵素で中性 pH を至適とする。Sulf2 およびそのファミリー酵素 Sulf1 は主に発生期に発現が観られるが成獣ではほとんど観察されない。

細胞外に分泌されて活性を示す Sulf2 を Cre/loxP コンディショナルシステムを利用して脳内で細胞特異的に過剰発現させることにより、アルツハイマー病モデルマウス脳で観察されるアミロイド斑蓄積 HS 多硫酸化ドメインを *in vivo* で分解することが可能と思われる本研究の着想に至った (図 1)。



2. 研究の目的

従来、HS 内部のドメイン構造や局在について詳細に調べることは困難であった。さらには、それらの生物機能を解明するアプローチが確立していないことは当該分野の進展に大きな壁として立ちはだかった。研究代表者は多硫酸化ドメインの局在を明らかにできる特異抗体を保持していること、酵素的分解によりそのドメインを構造改変できる方法を確立した点で本研究の遂行に対し高いアドバンテージがあった。HS の内部構造を細胞外酵素 Sulf2 で効率的にリモデリングすることにより、アルツハイマー病脳における HS 多硫酸化ドメインの蓄積機序を解析する点、活性化ミクログリアによる A β 貪食の抵抗性を解除しようと試みる点は本研究の特色であった。本研究は、HS 多硫酸化ドメイン分解酵素、細胞外スルファターゼ Sulf2 を血管内皮細胞もしくはミクログリアで発現する遺伝子導入マウスを用いることにより、アミロイド斑に共局在する HS 多硫酸化ドメインの蓄積機序を解明し、ミクログリアによる沈着 A β 貪食能を正に制御する機構を明らかにす

ることを目的とし遂行された。

3. 研究の方法

研究代表者は既に CAG-flox-STOP-flox-Sulf2 (以下 flox-STOP-Sulf2) マウスの作製に成功していた。全組織で Cre を発現する CMV-Cre マウスとの交配で全身性に Sulf2 を過剰発現する CMV-Cre/flox-STOP-Sulf2 マウスを作製し、Sulf2 の全身性発現が致死に至らないことを確認していた。血管内皮細胞で Cre リコンビナーゼを発現する Tie2-Cre マウスと flox-STOP-Sulf2 マウスを交配し Tie2-Cre/flox-STOP-Sulf2 マウスを作製した。HS 多硫酸化ドメインのアミロイド斑における蓄積を呈するアルツハイマー病モデルマウス J20 (*Am J Pathol* 2012) と交配し、トリプルトランスジェニックマウスを作製した (図2)。

6-8 ヶ月齢の当該マウスの解析を行った。血管基底膜およびアミロイド斑における HS 多硫酸化ドメインの局在はファージディスプレイ抗体 RB4CD12 を用いた免疫組織化学染色により解析した。

生理条件下のミクログリアではその発現がごく微量だが神経変性における活性化ミクログリアではその発現が亢進される遺伝



図2 血管内皮 Sulf2 発現アルツハイマーモデルマウスの作製

子 X が存在する。当該遺伝子の遺伝子座 X に Cre リコンビナーゼ遺伝子が導入された X-Cre マウスと、flox-STOP-Sulf2 マウスを交配し X-Cre/flox-STOP-Sulf2 マウスを作製した。アルツハイマー病モデルマウス J20 と交配し、トリプルトランスジェニックマウスを作製した (図3)。上述と同様、6-8 ヶ月齢の当該マウスを解析した。マウス脳におけるアミロイド斑の蓄積は 82E1 抗体を用いた蛍光免疫染色法で解析した。研究の実施に先立ち、本学における生命倫理審査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組換え

DNA 実験安全委員会、および動物実験委員会の審査を受け承認を得た。本研究課題に参画した者は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律



図3 活性化ミクログリア Sulf2 発現アルツハイマーモデルマウスの作製

(カルタヘナ法)」、「動物の愛護及び管理に関する法律」および「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則」の更なる理解を確認し遵守した。

4. 研究成果

活性化ミクログリア特異的にヒト Sulf2 を発現するアルツハイマー病モデルマウスを作製し解析した結果、コントロールマウスと比べて脳アミロイド斑の沈着に変化は見られなかった。ミクログリア細胞株におけるレンチウイルスを使用した Sulf2 発現が、A 沈着アミロイド斑の貪食除去を促進するという以前の我々の ex vivo の結果とは一部異なる結果となった。このことから、ミクログリアで Sulf2 を発現させて脳アミロイド斑に蓄積する HS 多硫酸化ドメインを分解するアプローチは in vivo では困難であることが示唆された。活性化ミクログリアにおける時間的発現をさらに厳密に制御するシステムを用いれば本 in vivo のアプローチが改善されると期待された。一方、血管内皮細胞で特異的にヒト Sulf2 を発現するアルツハイマー病モデルマウスでは、脳アミロイド沈着量がコントロールマウスに比べて減弱している傾向があること示すことができた。血管内皮由来の HS 多硫酸化ドメインが脳アミロイドの形成に深く関わるのが強く示唆された。本研究で作製されたモデルマウスは交配を継続し加齢育成を行っている。アルツハイマー病脳病変の解析は現在も継続されている。本研究は一部予想外の結果に対処する必要があったが、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。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 12 件)

1. Nishitsuji, K. and Uchimura, K.
Sulfated glycosaminoglycans in protein
aggregation diseases.
Glycoconj J., 2017; 34:453-466 査読有
doi: 10.1007/s10719-017-9769-4.
2. Zhang, Z., Takeda-Uchimura, Y., Foyez,
T., Ohtake-Niimi, S., Narentuya, Akatsu,
H., Nishitsuji, K. Michikawa, M.,
Wyss-Coray, T., Kadomatsu, K., and
Uchimura, K. Deficiency of a
sulfotransferase for sialic
acid-modified glycans mitigates
Alzheimer ' s pathology.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2017;
114:E2947-E2954 査読有 doi:
10.1073/pnas.1615036114.
3. Jiang, W., Ishino, Y., Hashimoto, H.,
Keino-Masu, K., Masu, M., Uchimura, K.,
Kadomatsu, K. Yoshimura, T., and
Ikenaka, K. Sulfatase 2 modulates fate
change from motor neurons to
oligodendrocyte precursor cells
through coordinated regulation of Shh
signaling with Sulfatase1.
Dev. Neurosci., 2017; 39:361-374 査読
有 doi: 10.1159/000464284.
4. Yoshimura, T., Hayashi, A.,
Hanada-Narumi, M., Yagi, H., Ohno, N.,
Koike, T., Yamaguchi, Y., Uchimura, K.,
Kadomatsu, K., Sedzik, J., Kitamura, K.,
Kato, K., Trapp, B.P., Baba, H., and
Ikenaka, K. GlcNAc6ST-1 regulates
sulfation of N-glycans and myelination
in the peripheral nervous system.
Sci. Rep., 2017; 7:42257 査読有 doi:
10.1038/srep42257
5. Kameyama, H., Nakajima, H., Nishitsuji,
K., Mikawa, S., Uchimura, K., Kobayashi,
N., Okuhira, K., Saito, H. and Sakashita,
N. Iowa mutant apolipoprotein A-I
(ApoA-I_{Iowa}) fibrils target lysosomes.
Sci. Rep., 2016; 6:30391 査読有 doi:
10.1038/srep30391.
6. Zhang, Z., Ohtake-Niimi, S., Kadomatsu,
K. and Uchimura, K. Reduced molecular
size and altered disaccharide
composition of cerebral chondroitin
sulfate upon Alzheimer's pathogenesis
in mice.
Nagoya J. Med. Sci., 2016; 78:293-301
査読有
7. Hashimoto, H., Ishino, Y., Jiang, W.,
Yoshimura, T., Takeda-Uchimura, Y.,
Uchimura, K., Kadomatsu, K., and
Ikenaka, K. Keratan sulfate
regulates the switch from motor neuron
to oligodendrocyte generation during
development of the mouse spinal cord.
Neurochem. Res., 2016; 41:450-462 査読
有 doi: 10.1007/s11064-016-1861-9.
8. Takechi-Haraya, Y., Nadai, R., Kimura,
H., Nishitsuji, K., Uchimura, K.,
Sakai-Kato, K., Kawakami, K., Shigenaga,
A., Kawakami, T., Otaka, A., Hojo, H.,
Sakashita, N., and Saito, H.
Enthalpy-driven interactions with
sulfated glycosaminoglycans promote
cell membrane penetration of arginine
peptides.
Biochim. Biophys. Acta., 2016;
1858:1339-1349 査読有 doi:
10.1016/j.bbame.2016.03.021.
9. Nishitsuji, K., Saito, H., and Uchimura,
K. Enzymatic remodeling of heparan
sulfate: a therapeutic strategy for
systemic and localized amyloidosis ?
Neural Regen. Res., 2016; 11:408-409
査読有 doi: 10.4103/1673-5374.179043.
10. Nakajima, H., Nishitsuji, K., Kuwabara,
K., Uchimura, K., Akaji, K., Kashiwada,
Y., Saito, H., and Sakashita N. The
polyphenol
(-)-epigallocatechin-3-gallate
prevents apoA-I_{Iowa} amyloidosis *in vitro*
and protects human embryonic kidney 293
cells against amyloid cytotoxicity.
Amyloid, 2016; 23:17-25 査読有 doi:
10.3109/13506129.2015.1113167.
11. Foyez, T., Takeda-Uchimura, Y.,
Ishigaki, S., Nrentuya, Zhang, Z., Sobue,
G., Kadomatsu, K., and Uchimura, K.
Microglial keratan sulfate epitope
elicits in central nervous tissues of
transgenic model mice and patients with
amyotrophic lateral sclerosis.
Am. J. Pathol., 2015; 185:3053-3065 査
読有 doi:
10.1016/j.ajpath.2015.07.016.

12. Kuwabara, K., Nishitsuji, K., Uchimura, K., Hung, S.C., Mizuguchi, M., Nakajima, H., Mikawa, S., Kobayashi, N., Saito, H., and Sakashita, N. Cellular Interaction and Cytotoxicity of the Iowa Mutation of Apolipoprotein A-I (ApoA-I_{Iowa}) Amyloid Mediated by Sulfate Moieties of Heparan Sulfate. **J. Biol. Chem.**, 2015; 290:24210-24221
査読有 doi: 10.1074/jbc.M115.652545.

[学会発表](計10件)

1. Deficiency of a sulfotransferase for sialic acid-modified keratan sulfate in microglia mitigates Alzheimer's pathology
Kenji Uchimura
1st International Conference on the Glycobiology of Nervous System, Sep 3 2017, Korea University, Seoul (South Korea)
2. Reduced molecular size and altered disaccharide composition of cerebral chondroitin sulfate upon Alzheimer's pathogenesis
Zui Zhang, Shiori Ohtake-Niimi, Kenji Kadomatsu and Kenji Uchimura
Annual meeting of Glycobiology 2016, Nov 19 2016, New Orleans, (USA)
3. Deficiency of a sulfotransferase for sialic acid-modified keratan sulfate in microglia mitigates Alzheimer's pathology
Zui Zhang, Yoshiko Takeda-Uchimura, Tahmina Foyez, Shiori Ohtake-Niimi, Narentuya, Tony Wyss-Coray, Kenji Kadomatsu & Kenji Uchimura
Sialoglyco 2016, Nov 15 2016, The Fess Parker - A Doubletree by Hilton Resort, Santa Barbara, (USA)
4. 損傷した神経で起こる糖鎖によるオートファジー中断
尾崎智也、坂元一真、Yuanhao Gong, 内村健治、門松健治
第35回日本糖質学会 2016年9月1日、高知市文化プラザ (高知県高知市)
5. Deficiency in C-6 Sulfation of GlcNAc Within Keratan Sulfate Mitigates Alzheimer's Pathology and Memory Impairment in Mice
Zui Zhang, Tahmina Foyez, Yoshiko Takeda-Uchimura, Shiori Ohtake-Niimi,

- Narentuya, Hitomi Hoshino, Tomomi Hosono-Fukao, Hiroyasu Akatsu, Makoto Michikawa, Kenji Kadomatsu and Kenji Uchimura
第3回国際シンポジウム新学術「神経糖鎖生物学」2016年1月14日、淡路夢舞台、(兵庫県淡路市)
6. Sialylated, fucosylated keratan sulfate elicited in Mac-2/galectin-3-positive microglia of transgenic model mice and patients of ALS
Tahmina Foyez, Yoshiko Takeda-Uchimura, Shinsuke Ishigaki, Narentuya, Zui Zhang, Gen Sobue, Kenji Kadomatsu and Kenji Uchimura
2015 Annual Meeting of the Society for Glycobiology, Dec 4 2015, San Francisco, (USA)
 7. Gene disruption of GlcNAc 6-O-sulfotransferase-1 results in loss of microglial keratan sulfate and alleviation of Alzheimer's pathogenesis in mice
Zui Zhang, Yoshiko Uchimura, Tahmina Foyez, Shiori Niimi, Hitomi Hoshino, Tomomi Hosono, Makoto Michikawa, Kenji Kadomatsu and Kenji Uchimura
BMB2015 神戸ポートアイランド, 2015年12月3日、(兵庫県神戸市)
 8. Microglial keratan sulfate up-regulated in the spinal cord and brainstem of transgenic model mice and patients of ALS
Foyez, T., Takeda-Uchimura, Y., Ishigaki, S., Zhang, Z., Narentuya, Sobue, G., Kadomatsu, K., and Uchimura, K.
GLYCO23 XXIII International symposium on Glycoconjugates, Sep 18 2015, Split, (Croatia)
 9. Microglial keratan sulfate epitope elicited in the spinal cord and brainstem but not in the cerebral cortex of ALS mice
Foyez, T., Kadomatsu, K. and Uchimura, K.
9th International conference on proteoglycans and 10th Pan-pacific connective tissue society symposium, Aug 24 2015, Seoul, (South Korea)
 10. 神経回路再編および神経変性に関わるケ

ラタン硫酸

内村健治、門松健治

第34回日本糖質学会 2015年8月2日、東京大学（東京）

〔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・大学院医学系研究科・招へい
教員

研究者番号：20450835

(2) 研究分担者

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