

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390092

研究課題名(和文) 神経再構築における成長因子とマトリックス

研究課題名(英文) Growth factor and extracellular matrix in neural reconstruction

研究代表者

門松 健治 (Kenji Kadomatsu)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80204519

研究成果の概要(和文)：

中枢神経の損傷後の軸索伸長・分枝はほとんど無い。その最も大きな要因は再生阻害因子の誘導である。代表的な阻害因子として今注目されているのがコンドロイチン硫酸である。私たちは本研究で、コンドロイチン硫酸と同等に主役を演じる因子としてケラタン硫酸を見出した。これらの阻害能を得るためにはプロテオグリカンの全てのコンポーネント(ケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸、コアタンパク質)が必要であった。これらのデータは、コアタンパク質によって適切にケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸がプレゼンテーションされることが重要で、それを神経細胞上の受容体が読み取る機構があることを強く示唆する。

研究成果の概要(英文)：

Axonal regeneration/sprouting hardly occur after neuronal injuries, mainly due to induction of inhibitory factors. Chondroitin sulfate is one of most well-known inhibitory factors. We found that keratan sulfate inhibits axonal regeneration/sprouting, and its inhibitory activity is as strong as that of chondroitin sulfate. For the inhibition, all the components of proteoglycans (i.e., keratan sulfate, chondroitin sulfate, core protein) are required. Our data suggest that an appropriate presentation of keratan sulfate and chondroitin sulfate by the core protein is important, and these sugar chains may be read by receptor(s) on neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：ケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸、プロテオグリカン、軸索再生・分枝、神経可塑性、神経損傷、成長因子、脊髄損傷

1. 研究開始当初の背景

「一度傷害を受けた神経軸索は二度と再生しない」これは近代神経科学の父カハールの言葉であるが、中枢神経については今もこのコンセプトは受け入れられている。何故再生しないのかは主に中枢神経細胞の再生能力(内因性)と外から再生を阻害する因子(外

因性)の二つの要因が考えられるが、特に哺乳類成体の中枢神経では後者が効いていることが分かっていた。

これまでにミエリン由来の Nogo, Mag, OMgp などの阻害因子が注目を集めていたが、これらをノックアウトしたマウスでも野生型マウスに比べて軸索再生にほとんど差が

見られないことから、別に重要な分子があることが予測された。最近ではプロテオグリカンに付く長大な糖鎖であるコンドロイチン硫酸 (CS) が強い阻害活性を持ち、その分解で脊髄損傷後の軸索再生・分枝は促進され、神経機能回復も促されることが明らかになった。

プロテオグリカンに付く長大な糖鎖をグリコサミノグリカンというが、これは CS に加えて、ケラタン硫酸 (KS) やヘパラン硫酸が含まれる。特に KS に関してはこれまでにほとんど研究がなく私たちはその機能に興味を持った。

GlcNAc6ST-1 は私たちがクローニングした酵素で、そのノックアウトマウス作成などを通して、この酵素が KS の生合成に必須であることを明らかにしてきた。KS の機能を見るのにこの KS 欠損マウスが使えるのではないかと考えた。

また、私たちは成長因子ミッドカインを研究してきた。この分子は神経細胞の生存や突起伸長に正の働きをすることが分かった。ミッドカインはヘパラン硫酸や CS に結合することも示してきた。中枢神経の細胞外マトリックスは他の組織と比べてプロテオグリカンが豊富に存在することが知られており、ミッドカインとマトリックスの相互作用も神経再構築に関与する可能性があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

神経損傷後あるいは生理的条件下での神経回路の再構築に細胞外マトリックスの糖鎖 (プロテオグリカンに付く KS、CS) がどのような機能を果たすのか、その機構を含めて解明する。また、この状況での成長因子ミッドカインの関わりについて解明する。

3. 研究の方法

神経損傷後の再構築のモデルとして脊髄損傷ならびに神経細胞初代培養を行った。脊髄損傷ではマウス胸髄への圧挫損傷を野生型ならびに KS 欠損マウスに施した。また、KS 分解の効果を見るために、ラット胸髄への圧挫損傷を施し、同時に浸透圧ポンプを用いて KS 分解酵素の損傷部への局所投与を行った。いずれのモデルでも損傷後経時的に運動機能評価、感覚機能評価、神経電気生理学的評価を行うとともに、組織学的解析により軸索再生・分枝やその他の変動を評価した。

In vitro の評価では小脳顆粒細胞の初代培養を主に用いた。プロテオグリカンをコート下培養皿の上に神経細胞を単層培養し、神経突起伸長を計測した。また、プロテオグリカンをスポットし、そのスポットへの神経突起の侵入の度合いを観察した。

また、軸索再生・分枝阻害を担う KS を有

するプロテオグリカン (KSPG) の同定のために初代培養したアストロサイトの活性化を行い KSPG の回収を行い、その質量分析を行った。

4. 研究成果

プロテオグリカン上のKSの合成酵素阻害で軸索再生・分枝が促進され、脊髄損傷で野生型マウスに比べて回復がよいことを示した。さらに、KS分解酵素の投与によっても脊髄損傷後の神経機能回復を促進できることを示すことができた。

KSと同じ2糖繰り返し構造の長大な糖鎖であるCSはこれまでに最もよく知られた軸索再生・分子阻害因子の一つである。KS分解の効果はCS分解の効果と遜色がなかった。さらに両者の組み合わせでは相加・相乗効果は見られなかった。

In vitroの実験では、(1) KS単独では神経突起伸長阻害が起きないことを示した。同様にCS単独でも神経突起伸長阻害は起きなかった。(2) KS、CSの両方を含むプロテオグリカンの混合物によって神経突起伸長阻害が起こるが、KS分解単独あるいはCS分解単独でその阻害効果を抑制できた。また、両者の組み合わせは相加・相乗効果を発揮しなかった。

(3) コアタンパク質の熱変性、あるいはアルブミンの上にKS、CSを共有結合させた人工プロテオグリカンでは神経突起伸長阻害は起きなかった。(4) コアタンパク質、KS、CSの揃ったプロテオグリカンとなって初めて神経突起伸長阻害活性を示すことから、コアタンパク質によるKS、CSの適切なプレゼンテーションが重要であると推察した。この結果は脊髄損傷のin vivoデータとも一致する。しかし特にコアタンパク質の重要性を示すin vivoのデータはなかった。

そこでADAMTS4に注目した。この酵素はアグリカンなどのプロテオグリカンのコアタンパク質を特異的に切断する活性を有する。今回新たにニューロカン、プレビカン、フォスファカンとってプロテオグリカンを分解することを示せた。さらにこの酵素を脊髄損傷部に局所投与すると神経機能回復が促され、軸索再生・分枝も促進されることを見出した。以上により、プロテオグリカンによる軸索再生・分枝阻害機構の一部を明らかにすることができた。

さらに軸索再生・分枝阻害を担うKSを有するKSPGの同定を行った。KSPGはアストロサイトの活性化に伴って産生され、初代培養されたアストロサイトから分泌されるKSPGは確かに神経突起伸長を阻害することを確かめた。これを質量分析し、あるKSPGを同定することに成功した。また、このKSPG

を相互作用する受容体候補を絞り込むことに成功した。

また、成長因子ミッドカインが脊髄損傷後機能回復を促進するデータを得た。ミッドカインとプロテオグリカンの相互作用が神経再構築にどのようなインパクトを与えるかについても今後研究を進展させたい。

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 22 件) (全て査読有)

1. Sumida A, Horiba M, Ishiguro H, Takenaka H, Ueda N, Ooboshi H, Opthof T, Kadomatsu K, Kodama I. Midkine Gene Transfer after Myocardial Infarction in Rats Prevents Remodeling and Ameliorates Cardiac Dysfunction. **Cardiovasc Res.** 86, 113-121 (2010).
2. Ito, Z., Sakamoto, K., Imagama, S., Matsuyama, Y., Zhang, H., Hirano, K., Ando, K., Yamashita, T., Ishiguro, N., Kadomatsu, K. N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1-deficient Mice Show Better Functional Recovery after Spinal Cord Injury. **J. Neurosci.** 30, 5937-5947 (2010).
3. Asano, Y., Kishida, S., Mu, P., Sakamoto, K., Murohara, T., Kadomatsu, K. DRR1 is expressed in the developing nervous system and downregulated during neuroblastoma carcinogenesis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 394, 829-835 (2010).
4. Miwa Y, Yamamoto K, Onishi A, Iwamoto M, Yazaki S, Haneda M, Iwasaki K, Liu D, Ogawa H, Nagasaka T, Uchida K, Nakao A, Kadomatsu K, Kobayashi T. Potential value of human thrombomodulin and DAF expression for coagulation control in pig-to-human xenotransplantation. **Xenotransplantation.** 17, 26-37 (2010).
5. Wakao, N., Imagama, S., Tauchi, R., Muramoto, A., Zhang, H., Natori, T., Takeshita, S., Ishiguro, N., Matsuyama, Y., Kadomatsu, K. Hyaluronan oligosaccharides promote functional recovery after spinal cord injury in rats. **Neurosci. Lett.** 488, 299-304 (2010)
6. Hayashi M, Kadomatsu K, Ishiguro N. Keratan sulfate suppresses cartilage damage and ameliorates inflammation in an experimental mice arthritis model. **Biochem Biophys Res Commun.** Oct 22;401(3):463-8 (2010).
7. Kadomatsu, K. Midkine Regulation of the Renin-Angiotensin System. **Curr Hypertens Rep** 12, 74-79 (2010)
8. Takenaka, H., Horiba, M., Ishiguro, H., Sumida, A., Hojo, M., Usui, A., Akita, T., Sakuma, S., Ueda, Y., Kodama, I., Kadomatsu, K. Midkine prevents ventricular remodeling and improves long-term survival after myocardial infarction. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 296, H462-469 (2009).
9. Yin, J., Sakamoto, K., Zhang, H., Ito, Z., Imagama, S., Kishida, S., Natori, T., Sawada, M., Matsuyama, Y., Kadomatsu, K. Transforming growth factor- β_1 upregulates keratan sulfate and chondroitin sulfate biosynthesis in microglia after brain injury. **Brain Res.** 1263, 10-22 (2009).
10. Mu, P., Nagahara, S., Makita, N., Tarumi, Y., Kadomatsu, K., Takei, Y. Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: Combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. **Int. J. Cancer** 125, 2978-2990 (2009).
11. Kato, N., Yuzawa, Y., Kosugi, T., Hobo, A., Sato, W., Miwa, Y., Sakamoto, K., Matsuo, S., Kadomatsu, K. The E-selectin ligand Basigin/CD147 is responsible for neutrophil recruitment in renal ischemia/reperfusion. **J. Am. Soc. Nephrol.** 20, 1565-1576 (2009).
12. Hobo, A., Yuzawa, Y., Kosugi, T., Kato, N., Asai, N., Sato, W., Maruyama, S., Ito, Y., Kobori, H., Ikematsu, S., Akira Nishiyama, A., Matsuo, S., Kadomatsu, K. The growth factor midkine regulates the renin-angiotensin system in mice. **J. Clin. Invest.** 119, 1616-1625 (2009).
13. Sakakima H, Yoshida Y, Yamazaki Y, Matsuda F, Ikutomo M, Ijiri K, Muramatsu H, Muramatsu T, Kadomatsu K. Disruption of the midkine gene (Mdk) delays degeneration and regeneration in injured peripheral nerve. **J Neurosci Res.** 87, 2908-2915 (2009).
14. Yazaki S, Iwamoto M, Onishi A, Miwa Y, Suzuki S, Fuchimoto D, Sembon S, Furusawa T, Hashimoto M, Oishi T, Liu D, Nagasaka T, Kuzuya T, Maruyama S, Ogawa H, Kadomatsu K, Uchida K, Nakao A, Kobayashi T. Successful cross-breeding of cloned pigs expressing endo-beta-galactosidase C and human decay accelerating factor. **Xenotransplantation** 16, 511-521 (2009).
15. Ishimoto, T., Takei, Y. Yuzawa, Y., Hanai, K., Nagahara, S., Tarumi, Y., Matsuo, S., Kadomatsu, K. Downregulation of monocyte chemoattractant protein-1 involving short interfering RNA attenuates

- Hapten-induced contact hypersensitivity. **Mol. Ther.** 16, 387-395, (2008).
16. Takei, Y., Nemoto, T., Mu, P., Fujishima, T., Ishimoto, T., Hayakawa, Y., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Muramatsu, T., Kadomatsu, K. In vivo silencing of a molecular target by short interfering RNA electroporation: Tumor vascularization correlates to delivery efficiency. **Mol. Cancer Ther.** 7, 211-221 (2008).
 17. Narita, H., Chen, S., Komori, K., Kadomatsu, K. Midkine is expressed by infiltrating macrophages in in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. **J. Vas. Surg.** 47, 1322-1329 (2008).
 18. Tanabe, K., Matsumoto, M., Ikematsu, S., Nagase, S., Hatakeyama, A., Takano, T., Niikura, H., Ito, K., Kadomatsu, K., Hayashi, S., Yaegashi, N. Midkine and its clinical significance in endometrial carcinoma. **Cancer Sci.** 99, 1125-1130 (2008).
 19. Maekawa, F., Minehira, K., Kadomatsu, K., Pellerin, L. Basal and stimulated lactate fluxes in primary cultures of astrocytes are differentially controlled by distinct proteins. **J. Neurochem.** 107:789-798 (2008)
 20. Ikematsu, S., Nakagawara, A., Nakamura, Y., Ohira, M., Shinjo, M., Kishida, S., Kadomatsu, K. Plasma midkine level is a prognostic factor for human neuroblastoma. **Cancer Sci.** 99:2070-2074 (2008)
 21. Kobayashi, T., Liu, D., Ogawa, H., Miwa, Y., Nagasaka, T., Maruyama, S., Li, Y., Onishi, A., Iwamoto, M., Kuzuya, T., Kadomatsu, K., Uchida, K., Nakao, A. Removal of blood group A/B antigen in organs by ex vivo and in vivo administration of ando- β -galactosidase (ABase) for ABO incompatible transplantation. **Transplant Immunol.** 20, 132-138 (2008)
 22. Zhu, Y., Tsuchida, A., Yamamoto, A., Furukawa, K., Tajima, O., Tokuda, N., Aizawa, S., Urano, T., Kadomatsu, K., Furukawa, K. Expression and roles of a xenopus head-forming gene homologue in human cancer cell lines. **Nagoya J. Med. Sci.** 70, 73-82 (2008).

[学会発表] (計 3 件)

1. Kadomatsu, K. Axonal regeneration and proteoglycans. 28th Naito Conference July 27-30, 2010, Shonan, Japan
2. Kadomatsu, K. Midkine: An enigmatic but interesting growth factor. Excellence in midkine research conference. November 4-6, 2010, Sydney Australia

3. Kadomatsu, K. The role of proteoglycans in neural plasticity. The 65th west lake international symposium of Zhejiang University. November. 20, 2010. Hangzhou, China

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

名称: 神経障害に基づく機能不全の改善剤および Rho キナーゼ活性化抑制剤

発明者: 門松健治、その他

権利者: 法人名大、その他

種類: 特許

番号: PTC/JP2008/061834

出願年月日: 2008/6/30

国内外の別: 日本、欧、米、指定国

○取得状況 (計 1 件)

名称: 急性腎障害及び予後推進用バイオマーカー並びにその用途

発明者: 門松健治、その他

権利者: 法人名大、その他

種類: 特許

番号: 4423375

取得年月日: 2009/12/18

国内外の別: 日本

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/biochem/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

門松 健治 (KADOMATSU KENJI)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 80204519

(2)研究分担者

武井 佳史 (TAKEI YOSHIFUMI)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 70362233

今釜 史郎 (IMAGAMA SHIROU)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 40467288

岸田 聡 (KISHIDA SATOSHI)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 20402563

(3)連携研究者 なし