

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 22 日現在

機関番号： 37104
 研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2010 ～ 2011
 課題番号： 22700401
 研究課題名（和文）神経再生を制御するコンドロイチン硫酸の糖鎖構造と作用分子機構
 研究課題名（英文）Sulfation patterns and molecular mechanisms of Chondroitin sulfate polysaccharide in regulating the neuronal regeneration
 研究代表者
 外角 直樹（SOTOGAKU NAOKI）
 久留米大学・医学部・講師
 研究者番号： 60368884

研究成果の概要（和文）：コンドロイチン硫酸（CS）は、神経細胞の接着や突起伸展を制御している細胞外糖鎖分子である。本研究では、神経細胞の接着や形態を変化させる CS 糖鎖構造と、その作用分子機構について検討した。その結果、CS-E 構造を多く含有する糖鎖（CS-E 含有糖鎖）が、培養神経細胞の形態を著しく変化させることを見出した。さらに、CS-E 含有糖鎖による形態変化は、VEGF 受容体を介した eNOS と Raf-1/Rb シグナルの活性化により引き起こされることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Chondroitin sulfate (CS) is an important component of the cell surface and extracellular matrix in the central nervous system. CS is divided into at least four subclasses, known as CS-A, CS-C, CS-D and CS-E, on the basis of the sulfation patterns of their major disaccharide units. The CS-E polysaccharide, but not CS-A, CS-C or CS-D polysaccharide, was changed cell adhesion and morphology of cultured neuronal cells. The action of CS-E polysaccharide is mediated through VEGF receptor/eNOS and VEGF receptor/Raf-1/Rb signalings.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：幹細胞生物学・再生・修復

1. 研究開始当初の背景

現在、世界の神経再生研究は、主として2つのアプローチで進められている。1つは、

iPS細胞やES細胞から分化誘導した神経幹細胞やニューロンを神経の損傷・変性部位に移植し、失われた細胞を補うというものである。

もう1つは、薬剤投与などにより内在性神経幹細胞を活性化し、その増殖や分化を促すというものである。しかしながら、移植細胞の生着や挙動、神経幹細胞の増殖や分化は、細胞の周辺環境である細胞外マトリックス分子により変化する。そのため、神経再生医療の実現には、移植細胞や内在性神経幹細胞の周囲に発現する細胞外マトリックス分子の機能解明が不可欠である。

コンドロイチン硫酸 (CS) は、硫酸化パターンの異なる5種類の基本二糖類 (CS-A から CS-E) が様々な組み合わせで数十から二百程度重合した直鎖状硫酸化ムコ多糖である。損傷後の成体マウスの脳において、CS は損傷部位周囲で発現が増加する。また、発達過程のマウス脳室において CS は、神経幹細胞の表層や周囲に発現し、神経幹細胞の増殖や分化を制御していると考えられている。この発現パターンから、CS は神経の発達と再生を制御する重要な細胞外マトリックス糖鎖分子であると考えられる。しかしながら、CS は、巨大で複雑、不均一な分子であるため、中枢組織からの精製が困難で神経の発達や再生過程で作用する活性糖鎖構造と分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

iPS 細胞や ES 細胞から誘導した神経幹細胞を損傷部位に移植した場合、細胞の生着や分化は、移植部位の環境に大きく左右される。コンドロイチン硫酸 (CS) は、神経損傷にตอบสนองして発現が誘導される細胞外糖鎖分子である。また、応募者は、CS が分子内の硫酸基結合部位の違いによる微細な構造変化で、神経細胞の接着や突起伸展を変化させることを見出している。そこで、本研究では、損傷部位で神経幹細胞の生着や分化を制御する CS 糖鎖構造と、その構造により惹起される分子シグナルを明らかにし、再生医療へ展開するための研究基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

今回の研究費補助金では、神経細胞の接着

性や形態を制御する CS 糖鎖配列とその作用分子機構について初代培養神経細胞を用いて解析した。

(1) 培養神経細胞の形態を制御する CS 糖鎖配列の解析

胎生14日のマウス大脳皮質から初代培養神経細胞を調整した。培養開始24時間後に生化学工業(株)より購入したCS-AからCS-E (1 µg/ml) をそれぞれ培養液に添加した。CS 添加24時間後に細胞を固定し、抗 TuJ1 抗体で免疫細胞染色を行い、染色された細胞の形態を共焦点顕微鏡で観察した。

(2) CS-E 含有糖鎖により惹起される分子シグナルの解析

CS-E 含有糖鎖の培養液添加より引き起こされる形態変化が、どのような分子メカニズムを介して誘導されるのかを、RNA 干渉法、阻害剤を用いた薬理的解析、免疫染色法を組み合わせて解析した。

4. 研究成果

(1) 培養神経細胞の形態を変化させる CS-E 含有糖鎖

CS-E を添加して培養した細胞では、著しい形態変化が観察された (図1)。この変化は、CS-A から CS-D を添加して培養した細胞では観察されなかった。

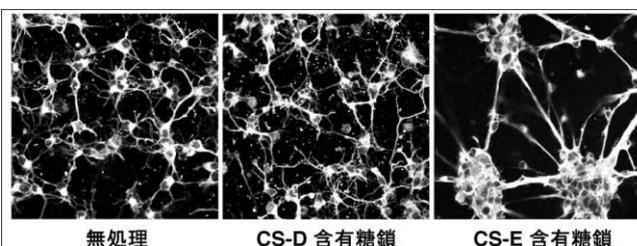


図1 CS-D あるいは CS-E 含有糖鎖を培養液に添加して培養した神経細胞

胎生14日のマウスより調整した初代培養神経細胞の培養液にCS-E含有糖鎖を添加すると、劇的な形態変化を起こす。この変化はCS-AからCS-D含有糖鎖では認められない (図にはCS-DとCS-E含有糖鎖を添加した際の結果のみを表示)。

(2) CS-E 含有糖鎖により惹起される分子シグナルの解析

各種阻害剤を予め培養液に添加しておき、その後 CS-E 含有糖鎖を添加した場合に形態変化が認められるかを観察することにより、形態変化を引き起こすシグナル分子の同定を試みた。

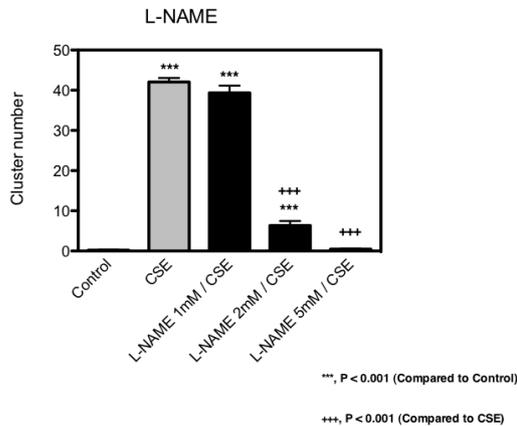


図2 CS-E 含有糖鎖による形態変化は一酸化窒素合成酵素阻害剤(L-NAME)により抑制される

各種阻害剤の形態変化抑制効果は、CS-E 含有糖鎖により形成させる細胞凝集塊を数えることで評価した。

図2に示すように、CS-E 含有糖鎖の培養液添加により引き起こされる形態変化（細胞凝集塊形成）は、一酸化窒素合成酵素の阻害剤である L-NAME を培養液に添加することで抑制された。また、CS-E を添加して 24 時間後の培養液中の一酸化窒素含量は、糖鎖を添加しないコントロール細胞に比べて約 3 倍程度増加していた。さらに、神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 欠損マウスの胎児から初代培養細胞を調整し、CS-E 含有糖鎖による形態変化を検討したところ、同様の形態変化が観察され、この変化も L-NAME 添加により抑制された。

一酸化窒素合成酵素には、nNOS の他に内皮細胞型の eNOS、誘導型の iNOS が存在する。nNOS 欠損マウスから調整した培養神経細胞の eNOS mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で測定したところ、正常マウスと同程度の発現を認めた。また、培養初代培養細胞の eNOS 発

現を免疫染色法で確認したところ、形態変化を示した多くの細胞は、Tuj1 陽性かつ eNOS

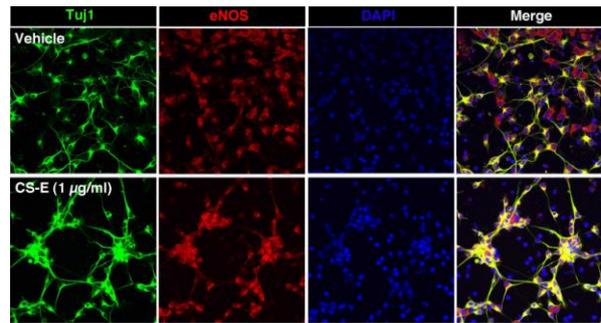


図3 内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) 陽性の神経細胞は CS-E の培養液添加により著しい形態変化を示す陽性の神経細胞であった (図3)。

さらに、胎生期 (E14) マウスの脳では Tuj1 陽性細胞に eNOS が発現しているのに対して、成体マウスの脳では Tuj1 陽性細胞に eNOS の

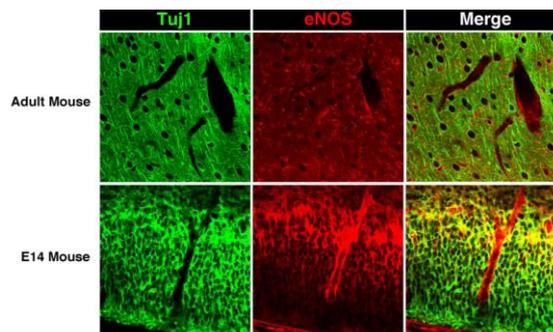


図4 胎生期 (E14) マウスの脳では eNOS が神経細胞にも発現している発現はほとんど認められなかった (図4)。

以上より、胎生期の神経細胞は、eNOS 陽性の内皮細胞の特性を有することが考えられ、CS-E 含有糖鎖による形態変化は、eNOS 活性化により誘導されたことが示唆された。

内皮細胞を VEGF で処理すると、eNOS が刺激され、細胞同士が連結して CS-E 含有糖鎖で神経細胞を刺激した場合と非常に良く似た索状構造を形成する。そこで、CS-E 含有糖鎖による eNOS 活性化の上流分子として VEGF シグナルに着目し、VEGF 受容体の阻害剤を培養液に添加した場合の CS-E 含有糖鎖の効果を検討した。

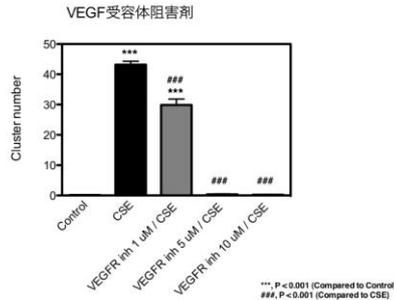


図5 CS-E による形態変化は VEGF 受容体阻害剤の培養液添加で抑制される

本研究で使用了初代培養神経細胞は、VEGF を産生、分泌し、さらに、VEGF 受容体も発現していることは免疫染色法により確認できた。また、図5に示すように、CS-E 含有糖鎖による形態変化(細胞凝集塊形成)は、VEGF 受容体の阻害剤により抑制された。

CS-E 含有糖鎖が VEGF と特異的に結合することは、Kuppevelt らのグループに報告されている(ten Dam GB et al. 2007)。また、プロテオグリカン糖鎖であるヘパリンには、VEGF と結合して内皮細胞の索状構造形成を増強する作用を有する(Ashikari-Hada S et al 2006)。これらの報告と、本研究の結果より、CS-E 含有糖鎖は、神経細胞が産生した VEGF と結合し、オートクライン的あるいはパラクライン的にその作用を増強することにより著しい形態変化を引き起こしたと考えられる。

VEGF 受容体を介して活性化されるのは、Ras/Raf/MEK/ERK、PI3K/Akt、PLC/PKC などの細胞の増殖や生存、遺伝子発現を制御シグナルである。本研究でも、CS-E 含有糖鎖により活性化される VEGF 受容体の下流シグナルを検討する目的で、MEK 阻害剤、PI3K 阻害剤、PLC 阻害剤の効果を検討したが、どの阻害剤も CS-E 含有糖鎖による形態変化を抑制しなかった。しかし、高濃度の MEK 阻害剤を使用した場合に、形態変化の減弱作用が認められた。また、MEK の上流分子である Raf-1 の阻害剤は、CS-E 含有糖鎖による形態変化を有意に抑制した(図6)。さらに、網膜芽細胞腫タンパク質(Rb)は、Raf-1 と結合すること

により転写活性因子 E2F の抑制機能がなくなる。これにより細胞周期の促進や血管新生が誘導されることが報告されている。

Raf-1 と Rb の結合を阻害する RRD251 を培養液に添加すると、CS-E 含有糖鎖による細胞凝集塊形成は有意に抑制された(図6)。

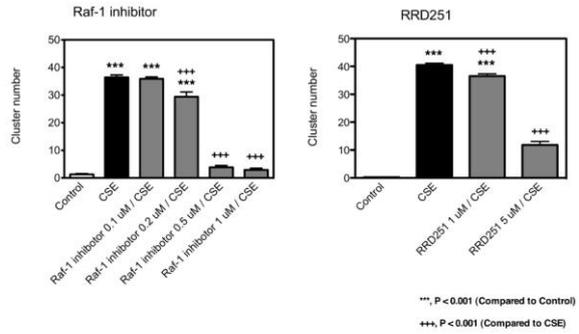


図6 CS-E含有糖鎖による形態変化はRaf-1阻害剤、RRD251の培養液添加で抑制される

以上より、CS-E 構造は、神経細胞の形態を劇的に変化させ、神経発達や損傷後の再生を制御する可能性が示唆された。さらに、この形態変化は、VEGF 受容体を介した eNOS と Raf-1/Rb シグナルの活性化により引き起こされると考えられる。損傷部位での CS-E 発現、CS-E により惹起されるシグナルを抑制した場合の神経再生効果については現在検討中である。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計1件)

① 外角直樹. ストレス科学事典(日本ストレス学会、パブリックヘルスリサーチセンター監修、分担執筆)実務教育出版、東京、2011.

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: うつ病治療のための併用剤

発明者：西 昭徳、外角直樹、首藤隆秀、
黒岩真帆美、宮川剛、小林克典、
Paul Greengard

権利者：西 昭徳

種類：特許

番号：61/466,157

出願年月日：2011.4.20

国内外の別：米国

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kurume-u.ac.jp/med/phram/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

外角 直樹 (Sotogaku Naoki)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：60368884

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：