

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 5 月 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791353

研究課題名（和文） 転写因子 OASIS による神経軸索伸展抑制機構の解析と再生医療への応用の可能性

研究課題名（英文） OASIS, a CREB/ATF-family transcription factor, modulate transcription of C6ST1 gene and chondroitin sulfation.

研究代表者

奥田 洋明（OKUDA HIROAKI）

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40453162

研究成果の概要（和文）：

大脳皮質損傷時において、損傷周囲では活性化アストロサイトにより CSPG を含むグリア瘢痕が形成され、また小胞体ストレスが負荷されることにより転写因子 OASIS が機能する。そこで OASIS と CSPG 発現の関与を検討した。OASIS KO マウスでは CSPG の硫酸化糖鎖の顕著な染色性の低下が認められ、さらに CSPG に硫酸基を供与する硫酸基転移酵素である C6ST1 の発現が低下していた。また、OASIS は C6ST1 遺伝子のイントロンに結合して転写を促進することが認められた。以上の結果より、OASIS はアストロサイトにおいて C6ST1 の発現に関与し、CSPG の糖鎖修飾を調節している可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In the central nerve system, ER stress is implicated in a wide range of disorders including ischemic injury and neurodegenerative disorder. Both mRNA and protein levels of OASIS were elevated in the injured cortex and correlated closely with those of reactive astrocyte. Reactive astrocyte, which constitute a major cellular component of glial scar, enmesh the lesion site and produce anti-regenerative molecules such as chondroitin sulphate proteoglycans (CSPGs). We have analyzed the mRNA levels of the CS-glycosaminoglycan synthesizing enzymes using OASIS knockout mice. Expression of chondroitin 6-sulfotransferase 1 (C6ST1) is increased in cortical stub injury in wild type mice, but is not in OASIS knock out mice. Furthermore, OASIS bound to the first intron region and promoted transcription of C6ST1. These results suggest that OASIS may be involved in CSPG production through the transcription of C6ST1 in astrocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

成熟哺乳動物の中樞神経系が疾病や外傷などにより損傷を受けた場合、切断された神

経軸索は損傷部位を越えて伸長・再生すること出来ないため、神経機能の回復は極めて難しい。しかしながら、神経細胞は損傷により軸索再生能力を消失している訳ではなく、問題は損傷部周囲の環境である。損傷部周囲では活性化アストロサイトによりグリア瘢痕が形成される。これは組織修復の一連の反応であり、炎症細胞を凝集し、損傷によって破壊された血液脳関門を再構築する役割を果たしている。また、活性化アストロサイトは過剰な興奮性神経伝達物質の取り込みや神経栄養因子を産生し、神経細胞に保護的に働く。しかしその一方、反応性アストロサイトはコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) などの軸索再生の阻害因子を産生・分泌して、分子のかつ物理的障壁を形成する。従って、損傷部位周囲の環境、特にグリア瘢痕を形成する活性化アストロサイトの性質を制御することにより、損傷後の神経軸索の伸展を促進させ、神経機能の回復を促すことが出来ると考えられる。実際、損傷時に産生される CSPG の糖鎖を除去する酵素を用いることにより、損傷部位を越えて神経軸索が伸展し、神経機能の回復が認められる (Bradbury et al., Nature 2002, 416:636-640; Silver and Miller, Nature rev. Neuro. 2004, 5:146-156)。これらの結果より、損傷後の神経軸索の伸展には CSPG の糖鎖を制御することが重要であると考えられている。

2. 研究の目的

我々は以前、これら損傷周囲の反応性アストロサイトにおいて誘導される転写因子として OASIS (Old Astrocyte Specifically-Induced Substance) を同定した (Nikaodo et al., Brain Res Mol Brain Res. 2002, 108:129-138; Kondo et al., Nat Cell Biol. 2005, 7:186-194)。OASIS は CREB/ATF family に属する転写因子で、小胞体ストレスセンサーとして機能する。通常、OASIS は小胞体の膜に局在するが、細胞に小胞体ストレスが付加されると切断され、N 末端が核内に移行し、シャペロン蛋白質などの転写を促進することにより、小胞体ストレスを解除し細胞を保護する。我々はこの OASIS ノックアウトマウスにおいて CSPG の産生が低下していることを明らかとしている。CSPG の硫酸化糖鎖を認識する抗体 (anti-CS56 抗体) を用いて免疫染色を行ったところ、OASIS ノックアウトマウスにおいて顕著にシグナルの低下が認められた。この結果から OASIS を介した小胞体ストレスシグナルが、CSPG の産生に関与する可能性が示唆される。

また、予備検討の段階だが、OASIS が CSPG に硫酸基を付加する硫酸基転移酵素の発現を調節している可能性を示すデータが得ら

れている。これは上記の CS56 抗体を用いた結果を支持するものであり、CSPG が神経軸索伸展抑制を示すには硫酸基が極めて重要であることが報告されていること (Properzi et al., Eur J Neurosci. 2005, 21:378-390) からも、転写因子 OASIS が CSPG の産生を介して神経軸索の伸展阻害に関与する可能性が考えられる。従って本研究の目的としては、第一に活性化アストロサイトでの CSPG の産生に転写因子 OASIS の関与を検討すること、第二に OASIS を標的とした再生医療への応用の可能性を検討した。

3. 研究の方法

本申請では期間内に以下の3点について検討して、活性化アストロサイトの神経軸索伸展抑制作用への転写因子 OASIS の関与を解明する予定であった。

(1) 転写因子 OASIS の標的遺伝子を探索し、OASIS の CSPG の産生・機能への関与を解析する。

(2) OASIS ノックアウトマウスを用いて、損傷後の神経突起伸展およびグリア瘢痕の形成、神経機能再生の指標としての運動機能を解析する。

(3) OASIS 結合配列を有する decoy 配列を用いて、神経機能再生における decoy 配列の有効性を検討する。

(1) ① 大脳皮質損傷時における CSPG 合成酵素群の発現の解析および OASIS の標的遺伝子の探索

予備検討において OASIS ノックアウトマウスでは抗 CS-56 抗体を用いた免疫染色のシグナルの低下が認められた。抗 CS-56 抗体は硫酸化修飾された特定の糖鎖を認識することから、OASIS ノックアウトマウスでは CSPGs を産生する上で重要な3群のタンパク質 (コアタンパク質、糖鎖合成酵素、硫酸基転移酵素) のどれかに発現異常があると考えられる。従って野生型および OASIS ノックアウトマウスを用いて、通常時および脳損傷時における3群の mRNA 発現の変動を Real time RT-PCR を用いて詳細に解析した。

脳損傷モデルとしては stub-injury モデルを用いた。方法としては頭皮を切開し、頭蓋骨表面を露出させた後、ブレッグマより -2mm、-2mm の位置の頭蓋骨を削り取り、直径 1mm の針を 2mm の深さで刺すことにより作成する。このモデルは簡便性および反応の再現性ともに優れており、損傷周囲において OASIS の発現上昇が認められることを確認してい

る。野生型と比較して OASIS ノックアウトマウスのみで発現が抑制、または上昇した遺伝子を OASIS の標的候補遺伝子とした。

②In vitro 系を用いての OASIS の標的候補遺伝子の発現解析

①にて得られた OASIS の標的候補遺伝子が実際にアストロサイトで発現・変動しているかをアストロサイト系の株化培養細胞である C6 グリオーマ細胞やアストロサイトの単離培養の系を用いて検討した。C6 グリオーマ細胞の系では thapsigargin などの薬剤を添加することにより小胞体ストレスが惹起され、OASIS が核内に移行して転写因子として機能することが判明している。実際、損傷周囲の活性化アストロサイトにおいては小胞体ストレスが負荷されている (Kondo et al., Nat Cell Biol. 2005, 7(2):186-194)。OASIS の siRNA を用いて内在性 OASIS の発現を低下させた後、OASIS が機能する状況下での標的候補遺伝子の発現変動を real-time PCR を用いて検討した。

また、活性化アストロサイトでは小胞体ストレス以外にも免疫系など様々なシグナルが動いているので、他の刺激でも OASIS や OASIS 標的候補遺伝子の変動するかを検討した。

アストロサイトの単離培養の系では、野生型および OASIS ノックアウトマウスの生後年齢 1 日のマウス大脳皮質よりアストロサイトを培養した。この培養アストロサイトに thapsigargin などの薬剤を処理した時の OASIS 標的候補遺伝子の変動を検討した。

以上の検討によりアストロサイトにおける OASIS 標的候補遺伝子の発現変動を解析した。

③OASIS による標的遺伝子の転写活性の検討

標的候補遺伝子が実際に OASIS による調節を受けているか否かをルシフェラーゼアッセイにより解析した。OASIS が結合する配列としては ERSE (ER stress response element)、CRE (cyclic-AMP response element) および UPRE (unfolded protein response element) 配列が報告されている。そこで標的候補遺伝子のプロモーターがこれらの OASIS 結合配列を持ちうるのか、データベースを用いて検索を行った。また、第 1 イントロンや第 2 イントロンに転写因子が結合してエンハンサー活性を持つということが知られているため、検索はプロモーターのみではなくイントロンの領域も行った。OASIS 結合配列が存在した場合、その上流から転写開始部位までをレポーターベクターに組み込み、OASIS の発現ベ

クターとともに用いて、転写活性を解析した。さらに OASIS 結合配列を欠失または変異させたレポーターベクターを作成して詳細に解析した。また OASIS の DNA 結合能をゲルシフトアッセイやクロマチン免疫沈降法を用いて解析した。

4. 研究成果

平成 22 年度は以下の 2 点を行った。

(1) 大脳皮質損傷時における CSPG 合成酵素群の発現の解析および OASIS の標的遺伝子の探索

(2) In vitro 系を用いての OASIS の標的候補遺伝子の発現解析

最初に OASIS ノックアウトマウスを用いて、大脳皮質における糖鎖の発現分布を免疫染色により比較検討した結果、特定の硫酸化糖鎖を認識する抗 CS56 抗体の染色において、野生型と比べ OASIS KO マウスでは顕著な染色性の低下が認められた。CS56 抗体は硫酸化されたコンドロイチン糖鎖を認識することから、OASIS KO マウスの CSPG は硫酸基の修飾に異常が認められる可能性が示唆された。従って、次に CSPG に硫酸基を供与する硫酸基転移酵素群の発現の差を RT-PCR により検討したところ、大脳皮質損傷時では C6ST1 の発現上昇が認められるが、OASIS KO マウスでは発現の抑制が認められた。また、脳内に存在するプロテオグリカンのコアタンパク質の発現量には変化が認められなかった。さらに、OASIS をノックダウンした C6 glioma 細胞においても vivo と同様に C6ST1 の発現低下が認められた。以上の結果より、OASIS はアストロサイトにおいて C6ST1 の発現に関与し、CSPG の糖鎖修飾を調節している可能性が考えられる。

平成 23 年度は転写因子 OASIS の標的遺伝子 C6ST1 の転写活性の解析を行った。

OASIS が結合する配列としては ERSE (ER stress response element)、CRE (cyclic-AMP response element) および UPRE (unfolded protein response element) 配列が報告されている。そこで C6ST1 のプロモーターがこれらの結合配列を持ちうるのか、データベースを用いて検索を行った結果、CRE 配列に類似した配列がいくつか認められたため、その上流から転写開始部位までをレポーターベクターに組み込み、OASIS の発現ベクターとともに用いて、ルシフェラーゼアッセイによる転写活性を解析した。その結果、プロモーター部位には OASIS による転写調節部位は認められず、第 1 イントロンにおいてエンハンサ

一活性を持つことが認められた。さらに OASIS 結合配列を欠失または変異させたレポーターベクターを作成して詳細に解析したが、詳細な結合部位は同定できなかった。また、OASIS の DNA 結合能をゲルシフトアッセイにより検討したが、同様に詳細な結合部位は同定できなかった。また、平成 23 年度に行う予定だった OASIS ノックアウトマウスを用いた *in vivo* の実験系はマウスの繁殖効率が悪いいため、予定より遅れており、繁殖が軌道に乗り次第、取り掛かる予定である。

以上の結果より、OASIS は C6ST1 の第 1 イントロンでエンハンサー活性を持ち、発現を調節している可能性がある。

昨年度の結果も考慮すると、OASIS はアストロサイトにおいて CSPG の糖鎖修飾を調節している可能性が示される。これは、活性化アストロサイトでの CSPG の産生に OASIS を介した小胞体ストレスシグナルが関与する、即ち、グリア瘢痕の形成において新たなシグナル伝達の経路を提示できるものである。損傷時の活性化アストロサイトでの CSPG の産生およびその後の神経軸索伸展阻害に関しては多くの報告がなされているが、CSPG 産生の機構を解析した論文はほとんどない。我々が提示する転写因子 OASIS を介した CSPG 産生のシグナルは、独創的なものであり、損傷時の基礎的なメカニズムの解明に大変意義のあることと考えられ、また、神経再生治療の方法に新たな可能性を提示するものである。

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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥田 洋明 (OKUDA HIROAKI)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：4 0 4 5 3 1 6 2