

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592161

研究課題名(和文) 脊髄損傷修復の阻害機構の制御：コンドロイチン硫酸基 KO マウスと治療への新素材応用

研究課題名(英文) Regulation of the chondroitin sulfate and recovery systems from the spinal cord injury.

研究代表者

武内 恒成 (Takeuchi, Kosei)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・客員研究員

研究者番号：90206946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：成体における中枢神経系の軸索再生は殆ど起こらないとされ、脊髄損傷にも根本治療法がまだ無い。最大の原因は中枢神経損傷部において急激に発現するコンドロイチン硫酸が、再生阻害因子として再生をブロックすることに依る。このコンドロイチン硫酸転移酵素の遺伝子改変マウスを作製した。このマウスの脊髄損傷モデルは、これまで報告されたどのマウスよりも優れた機能回復を示した。CS糖構造だけではなく、別の糖発現バランスを変えることが劇的な回復の原因であり再生治療に向けた絶妙な創薬ターゲットでもあった。この分子の生体内ノックダウンによる再生治療にも成功し、iPS細胞応用などとの併用による再生方針にも繋がりがつつある。

研究成果の概要(英文)：Extracellular factors that inhibit axon growth and intrinsic factors that promote it affect neural regeneration. Therapies targeting any single gene have not yet simultaneously optimized both types of factors. Chondroitin sulphate (CS), a glycosaminoglycan, is the most abundant extracellular inhibitor of axon growth. Here we show that mice carrying a gene knockout for CS N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (T1), a key enzyme in CS biosynthesis, recover more completely from spinal cord injury than wild-type mice and even chondroitinase ABC-treated mice. Taken together, our results indicate that regulation of a single gene, T1, mediates excellent recovery from spinal cord injury by optimizing counteracting effect of axon regeneration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊髄損傷 再生医療 グリコサミノグリカン

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷の治療に向けて、神経幹細胞や iPS 細胞/ES 細胞の移植による治療が謳われ多くの試みがなされつつある。しかし脊損後には、損傷炎症に続いて生じるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)の発現上昇が神経の再生を阻害し、その後損傷部の Cavitations を取り囲むように生じる線維性瘢痕が完全に神経再生をブロックしてしまう。この初期過程で、A): コンドロイチン硫酸は本当に神経再生を阻害しているのか？再生阻害能はコンドロイチン硫酸基にあるのか、そのコアタンパク質にあるのか？その作用機構は？ B): 線維性瘢痕の形成は、コンドロイチン硫酸の発現やグリア性瘢痕の形成とリンクし相関はあるのか？さらに、C): 神経再生治療に向けてコンドロイチン硫酸などの抑制因子を如何に人為的に制御すべきか、を明らかにすることは、脊髄損傷治療においては非常に重要であるにも関わらず、未解明な点が多かった。

2. 研究の目的

脊髄損傷の治療に向けて、神経幹細胞や iPS 細胞/ES 細胞の移植による治療が謳われ多くの試みがなされつつある。しかし脊損後には、損傷炎症に続いて生じるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)の発現上昇が神経の再生を阻害し、その後損傷部の Cavitations を取り囲むように生じる線維性瘢痕が完全に神経再生をブロックしてしまう。この初期過程で、A): コンドロイチン硫酸は本当に神経再生を阻害しているのか？再生阻害能はコンドロイチン硫酸基にあるのか、そのコアタンパク質にあるのか？その作用機構は？ B): 線維性瘢痕の形成は、コンドロイチン硫酸の発現やグリア性瘢痕の形成とリンクし相関はあるのか？さらに、C): 神経再生治療に向けてコンドロイチン硫酸などの抑制因子を如何に人為的に制御すべきか、を明らかにすることは、脊髄損傷治療においては非常に重要であるにも関わらず、未解明な点が多い。

申請者はこの問題点に直接答えるために、コンドロイチン硫酸基の生合成経路に重要な2つの酵素(糖転移酵素)CSGalNacT1 および CSGalNacT2 それぞれの遺伝子欠損マウスを世界に先駆けて作製した(Takeuchi et al. *Biochem. J* (2010))。

さらに、脊髄損傷モデルマウス作成系も完備し、この KO マウスを駆使した解析を開始している。上記の問題点 A)、B)については、申請者は次のような予備的な研究結果を既に得ている中で研究課題を設定した。

1) CSGalNacT1 単独の KO マウスでも、野生型マウスと比べてコンドロイチン硫酸基の量が約 1/2 まで減少している(*Biochem J* 2010)。

2) CSGalNacT1 単独 KO マウスは脊髄損傷後数週間、野生型マウスよりも損傷後修

復が早く、後肢回復、筋電図解析などからも圧倒的に高い回復を示した。

3) 組織化学的な解析からは CSGalNacT1 KO では、脊髄損傷領域の線維性瘢痕の面積が減少しており、免疫組織像と神経トレーサー実験からは神経軸索再生が認められた。

3. 研究の方法

本研究では、コンドロイチン硫酸基の神経再生阻害メカニズムの詳細を明らかにし、この分子を中心とした新しいバイオマテリアル材料を用いた人為的な再生環境の操作を脊髄損傷モデルで行う。これを踏まえ、臨床応用に展開するための基盤となる研究を行うことを計画した。

1) T1/T2 ダブル KO は胎生致死のため、CSGalNacT1KO マウス成体において、脊髄領域のみで部位特異的に CSGalNacT2 遺伝子の knock down (以下 KD) を行い、脊髄損傷修復度を解析する。ここから、コンドロイチン硫酸は本当に神経再生を阻害しているのか、再生阻害能はコンドロイチン硫酸基にあるのか、そのコアタンパク質にあるのかを直接的に明らかにできる。

2) CSGalNacT1 単独 KO および T1 KO・T2KD マウスにおいて、脊髄損傷時のコンドロイチン硫酸・ヘパラン硫酸合成系などすべての関連酵素の発現量の変化(図1)、NG2 やフォスファカンなどの全コアタンパク質の発現変動を解析する。コンドロイチン硫酸基を中心とした脊髄損傷時の分子発現制御システムを明らかにする。

3) ゲルスポンジ・バイオマテリアルを用いた脊髄領域特異的な遺伝子ノックダウン(KD)実験、さらにコンドロイチナーゼを結合させた徐放性マトリックスとしての効果も検討する。のダブル KO 等と同様の効果が得られるか、基礎データも検証するとともに、応用を目指す。

4. 研究成果

A): コンドロイチン硫酸(CS)は本当に神経再生を阻害しているのか？ B): 線維性瘢痕の形成は、コンドロイチン硫酸の発現やグリア性瘢痕の形成とリンクし相関はあるのか？ さらに、C): 神経再生治療に向けてコンドロイチン硫酸などの抑制因子を如何に人為的に制御すべきか？を明らかにする目的で、申請者は、コンドロイチン硫酸基の生合成経路に重要な2つの糖転移酵素 CSGalNacT1 および CSGalNacT2 の遺伝子欠損マウスを世界に先駆けて作製した(Takeuchi et al. *Biochem. J* (2010))。脊髄損傷モデルマウス作成系にて解析、以下の結果を得た。(Takeuchi et al. *Nature Communication* (2013))

(1) CSGalNacT1 KO マウスは、野生型マウスと比べてコンドロイチン硫酸基の量が発生過程では約 1/2 まで減少している

(Biochem J 2010)。脊髄損傷時のような急性期障害の場合、つまりコンドロイチン硫酸の急激な発現を必要とする際には、このT1K0マウスでは3割程度のコンドロイチン硫酸の発現低下のみを認めた。T2K0マウスでは急性期の発現低下はほとんど認められなかった。(2) CSGalNacT1 K0マウスは脊髄損傷後数週間で、野生型マウスよりも損傷後修復が早く、後肢回復、筋電図解析など生理機能解析すべてにおいて圧倒的に高い回復を示した。これはこれまで報告されているどのK0マウスよりも劇的な回復であった。たしかにコンドロイチン硫酸そのものが再生阻害をしていることを直接に証明することができた。さらにこれらK0マウスはこれまで最も回復が認められていたCS切断酵素であるChABC(コンドロイチナーゼ)投与マウスよりも(CS発現量は残っているにもかかわらず)回復するという驚くべき結果を示した。

(3) 組織化学的な解析からはCSGalNacT1 K0では、脊髄損傷領域の線維性瘢痕の面積が減少しており、かつ初期の反応性グリア細胞の患部への集積も早く、グリア性・線維性瘢痕ともに縮小していた。免疫組織像と神経トレーサー実験からは、これまで認められている如何なる修復よりも早い神経軸索再生が認められた。つまり、損傷部縮小のための治療効果があることが伺えた。線維性瘢痕形成とコンドロイチン硫酸発現も確かに相関しており、これらの制御は重要であることが明らかとなった

(4) CSGalNacT1 K0により、CS合成を抑えともう一方のグリコサミノグリカン合成系であるヘパラン硫酸(HS)の合成誘導昂進が起こっていた。これらすべての合成酵素の発現昂進が認められるのみならず(mRNA, 酵素の発現ともに)、本来ほとんど発現のないヘパラン硫酸の発現が(ドットプロット、免疫組織化学、糖鎖科学分析ともに)認められた。ヘパラン硫酸は従来、神経軸索伸長の促進因子として報告されている。そのため、本来発現していないヘパラン硫酸合成誘導が惹起されることにより、T1K0マウスではより積極的な劇的な神経再生をしていることを明らかにした(*Nature Communication* (2013))。つまりCSGalNacT1は脊髄損傷など神経再生治療において絶妙な治療ターゲットとなることを見出した。また、コンドロイチン硫酸がグリア細胞遊走などの炎症に関わること、グリコサミノグリカンの発現制御機構が想像以上に動的なものであることが伺え、今後の大きな研究の転換点ともなり得ると考える。

また、このノックアウトマウスを契機にコンドロイチン硫酸の中樞神経系発生初期に関わる根本機能解析が可能であること、そのための糸口も掴むことができた(*Neuron* : 81, 814-829, (2014)、*Nature Neuroscience* : 16(11) 1556-1566 (2013))

さらに申請者は、脊髄損傷部患部にDDS用のスポンジを留置し、さらに核酸医薬(siRNA)デリバリー能に優れたアテロコラーゲンを徐放剤とすることで、脊髄損傷部の部位特異的な遺伝子ノックダウンに成功した。この系により、CSGalNacT1 K0マウスを用いた脊髄損傷実験からある程度の生理機能回復を認めることができた。治療方向性としても創薬ターゲットとしてもこれら酵素群は有効であり、今後臨床応用を睨んだ研究展開を可能とすることができた。

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件)

Pioneering Axons Regulate Neuronal Polarization in the Developing Cerebral Cortex.

Takashi Namba, Yuji Kibe, Yasuhiro Funahashi, Shinichi Nakamuta, Tetsuya Takano, Takuji Ueno, Akiko Shimada, Sachi Kozawa, Mayumi Okamoto, Yasushi Shimoda, Kanako Oda, Yoshino Wada, Tomoyuki Masuda, Akira Sakakibara, Michihiro Igarashi, Takaki Miyata, Catherine Faivre-Sarrailh, Kosei Takeuchi, Kozo Kaibuchi

Neuron : 81, 814-829, (2014) (査読有)

Chondroitin sulphate N-acetyl galactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury.

Kosei Takeuchi, Nozomu Yoshioka, Susumu Higa-Onaga, Yumi Watanabe, Shinji Miyata, Yoshino Wada, Chika Kudo, Masayasu Okada, Kentaro Ohko, Kanako Oda, Toshiya Sato, Minesuke Yokoyama, Natsuki Matsushita, Masaya Nakamura, Hideyuki Okano, Kenji Sakimura, Hitoshi Kawano, Hiroshi Kitagawa, Michihiro Igarashi

Nature Communications : 4, 2740 (2013) (査読有)

Point Mutation in Syntaxin-1A Causes Abnormal Vesicle Recycling, Behaviors, and Short Term Plasticity.

Yumi Watanabe, Norikazu Katayama, Kosei Takeuchi, Tetsuya Togano, Rieko Itoh, Michiko Sato, Maya Yamazaki, Manabu Abe, Toshiya Sato, Kanako Oda, Minesuke Yokoyama, Keizo Takao, Masahiro Fukaya, Tsuyoshi Miyakawa, Masahiko Watanabe, Kenji Sakimura, Toshiya Manabe, Michihiro Igarashi

The Journal of Biological Chemistry : 288(48) 34906-34919 (2013) (査読有)

TAG-1-assisted progenitor elongation streamlines nuclear migration to optimize subapical crowding.

Mayumi Okamoto, Takashi Namba, Tomoyasu Shinoda, Takefumi Kondo, Tadashi Watanabe, Yasuhiro Inoue, Kosei Takeuchi, Yukiko Enomoto, Kumiko Ota, Kanako Oda, Yoshino Wada, Ken Sagou, Kanako Saito, Akira Sakakibara, Ayano Kawaguchi, Kazunori Nakajima, Taiji Adachi, Toshihiko Fujimori, Masahiro Ueda, Shigeo Hayashi, Kozo Kaibuchi, Takaki Miyata
Nature Neuroscience : 16(11) 1556-1566 (2013) (査読有)

Masuda T., Sakuma C., Taniguchi M., Kanemoto A., Yoshizawa M., Satomi K., Tanaka H., Takeuchi K., Yaginuma H., Shiga T. : Development of the dorsal ramus of the spinal nerve in the chick embryo: A close relationship between development and expression of guidance cues.
Brain Research 1480: 30-40 (2012)
(査読有)

[学会発表](計 20 件)

(シンポジウム・招待講演)

1. 武内恒成、本多敦子、伊藤泰行、峯田克彦、五十嵐道弘
神経極性決定に關与する 4 回膜貫通 glycoprotein M6a の機能解析
「第 36 回日本分子生物学会年会、2013/12/3、(神戸国際展示場(兵庫))」

2. 武内恒成、吉岡望、比嘉進、川野仁、五十嵐道弘
グリコサミノグリカン発現制御による神経再生・発生
第 118 回日本解剖学会総会 2013/3/28-3/30
サンポートホール高松・香川国際会議場

3. 武内恒成
Brain development abnormality and axon regeneration in the mice lacking in the enzymes synthesizing chondroitin sulfate.
「第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会」2012/5/28-5/31 (神戸国際センター)

(一般講演)

(2013 年)

1. 武内恒成、吉岡望、岡田正康、五十嵐道弘
CSGAINACT1, an Enzyme Required for Chondroitin Sulfate Synthesis, is Critical to Recovery from Neural Injury
「Neuroscience2013、2013/11/10、(San Diego

Convention Center (サンディエゴ・アメリカ))」

2. 武内恒成

New trial of gene knockdown system by the siRNA-absorbent silk sponge to recovery from spinal cord injury
「AMWC(Advanced Materials World Congress 2013)、2013/9/18、(イズミル・トルコ))」

3. 吉岡望、比嘉進、武内恒成、五十嵐道弘
コンドロイチン硫酸合成酵素欠損マウスにおける神経発生・発達異常
「第 86 回日本生化学会大会 2013/9/12、(パシフィコ横浜(神奈川))」

4. 武内恒成、

Abnormal brain development/maturation in mice lacking in chondroitin sulfate - synthesizing enzymes
「ECMNET(European cooperation in science and technology)、2013/9/11 (Hotel Remes (オパレニカ・ポーランド))」

5. 河寄麻実、野住素広、武内恒成、五十嵐道弘
神経成長円錐マーカー分子 GAP43 新規リン酸化ドメインとその認識抗体の応用
「第 35 回神経組織培養研究会、2013/6/30(ホテル阪急エキスポパーク(大阪))」

6. 河寄麻実、武内恒成、野住素広、五十嵐道弘
成長円錐における網羅的なリン酸化タンパク質の探索
「Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会、第 56 回日本神経化学会大会、第 23 回日本神経回路学会大会) 2013/6/22 (国立京都国際会館(京都))」

7. 吉岡望、武内恒成、岡田正康、和田芳野、川野仁、五十嵐道弘
コンドロイチン硫酸合成酵素欠損マウスにおける神経発生・発達異常
「Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会、第 56 回日本神経化学会大会、第 23 回日本神経回路学会大会) 2013/6/22 (国立京都国際会館(京都))」

8. 吉岡望、武内恒成、五十嵐道弘
Brain development/ maturation in mice lacking in chondroitin sulfate synthesizing enzymes
「25th 国際神経化学学会(ISN)/米国神経化学学会(ASN) (ISN2013 Glial Satellite) 2013/4/19 (Hotel El Castellano(カンクン・メキシコ))」

(2012年)

1. 武内恒成、吉岡望、渡部裕美、川寄麻実、和田芳野、五十嵐道弘
コンドロイチン硫酸の発現制御による神経再生機構

「第 85 回日本生化学会大会」
2012/12/14~12/16 (福岡国際会議場・マリンメッセ福岡)

2. 吉岡望、武内恒成、阿相皓晃、黒田純子、五十嵐道弘、川野仁
損傷脳におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの産生メカニズム

「第 35 回日本神経科学大会」2012/9/18~9/21 (名古屋国際会議場)

3. 候旭濱、武内恒成、五十嵐道弘、杉山清佳

コンドロイチン硫酸はマウス視覚野においてOtx2取り込みと臨界期可塑性を制御する

「第 35 回日本神経科学大会」2012/9/18~9/21 (名古屋国際会議場)

4. 松下夏樹、松下佐知、武内恒成、八十島安伸、東山繁樹

Cre/loxP組換え依存の標的遺伝子ノックダウン誘導のためのレンチウイルスベクターシステム

「第 35 回日本神経科学大会」2012/9/18~9/21 (名古屋国際会議場)

5. 武内恒成、吉岡望、川野仁、五十嵐道弘
Axon regeneration in the mice lacking in the enzymes synthesizing chondroitin sulfate.

8th Forum of neuroscience 2012/7/14-18 (Barcelona, Spain)

6. 武内恒成

Brain development abnormality and axon regeneration in the mice lacking in the enzymes synthesizing chondroitin sulfate..

2nd Annual Conference of COST Action ECMNet
“ Brain extracellular matrix in health and disease 2012/7/12-13 (Barcelona, Spain)

7. 武内恒成、吉岡望、比嘉進、渡邊裕美、五十嵐道弘、川野仁

プロテオグリカン合成系の調節による神経損傷修復機構

「第 35 回日本神経科学大会」2012/9/18~9/21 (名古屋国際会議場)

8. 木部祐士、難波隆志、舟橋靖広、中牟田信一、武内恒成、貝淵弘三

イムノグロブリン様細胞接着分子による生体内での軸索形成制御

「第 35 回日本神経科学大会」2012/9/18~9/21 (名古屋国際会議場)

〔図書〕(計 1件)

仲嶋一範、北村義浩、武内恒成 (3者共同編集) (編著)

「遺伝子導入プロトコール - 発現解析とRNAi 実験 -

(編集企画を担当 及び 分担執筆 (武内恒成) pp25-31, pp38, pp246-247 (第2章・5章を担当)全 251P.) 羊土社 (2012. 7. 15 発刊)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1件)

名称: 抗GAP43抗体

発明者: 武内恒成 河寄麻実 五十嵐道弘

権利者: 新潟大学

種類: 国際出願特許

番号: PCT/JP2012/077163

出願年月日: 2012年10月19日

国内外の別: 海外

取得状況 (計 1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〕

新聞報道 (新潟日報、朝日新聞など)

2013年11月13日

6. 研究組織

(1)研究代表者

武内 恒成 (Takeuchi Kosei)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員
(愛知医科大学・医学部・教授)

研究者番号: 90206946

(2)研究分担者

無し ()

(3)連携研究者

無し ()