

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700440

研究課題名（和文）コンドロイチン硫酸合成酵素欠損マウスにおける脊髄損傷後の機能回復

研究課題名（英文）Functional recovery of spinal cord injury in the chondroitin sulfate-synthesizing enzymes

研究代表者

Higa Onaga Susumu (Higa Onaga Susumu)

新潟大学・医歯（薬）学総合研究科・研究員

研究者番号：90535337

研究成果の概要（和文）：コンドロイチン硫酸(CS)合成酵素 CSGalNAcT1 (T1), T2 のノックアウトマウス(KO)の解析を行って以下の結果を得た。1) T1-KO については脊髄損傷の圧挫モデルを確立し、T1-KO での機能的回復が非常に高率に起こっていることを証明した。2) T1-KO マウスの視覚可塑性を解析したところ、臨界期が形成されないことが明らかとなった。3) T1 ヘテロマウスについては、社会的行動テストでは活動量が亢進しており、社会的アプローチも低下している可能性が示唆され、社会行動性の異常を結論付けるものであった。4) ダブルノックアウト(DKO)は致死的であるという結論に到達した。

研究成果の概要（英文）： I analyzed the CNS of CSGalNAcT1(T1)-knockout mice (T1-KO). 1) I postulated the compression model of spinal cord injury in T1-KO, and demonstrated better recovery in the functional and the histological aspects from SCI. 2) The neural plasticity of the visual cortex showed that the critical period was not formed in T1-KO. 3) T1 heterozygous mice showed the hyperactive social behavior and the lower social approach, indicating the abnormal higher functions in T1-KO. 4) T1/T2-double knockout mice (DKO) were lethal at the embryonic stage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

コンドロイチン硫酸(CS)は細胞外基質として非常に重要な物質であり、その合成には CSGalNAcT1 (T1)が最も重要な段階で関係している。ノックアウトマウス(KO)作製技術を用いて、報告者は既に T1-KO マウスを作成済みで、その解析では CS 量が最も豊富な骨端軟骨の発生が異常になっていることを報告した(Higa et al., Biochem J 2010)。一方、この系では CS 量が軟骨で半減し、発生途上の中枢神経でも 30%程度の減少がみられた。

従って、この系は CS の中枢神経の意義解明に有用であることが強く推定される状況であった。既に一部の研究を始めており、その端緒となる部分は CS の重要性を見出すに十分と思われたが、まだ定量性が十分でない状況であった。

2. 研究の目的

CS の中枢神経系での機能を、T1-KO および、必要に応じて CSGalNAcT2(T2)-KO を用いて解析する。当該マウスは、CS 含量が 30-50%

程度減少しているが、その減少は CS が高濃度集積している部位で非常に影響が大きい傾向があるので、成熟することができ、成体でも解析可能である。しかしながら、微視的、機能的には種々の異常が認められるため、本研究課題には最適の材料である。従って、これらの解析を通じて CS の生理的機能が解明することが期待できた。

3. 研究の方法

T1-KO はすでに樹立してあり、これは軟骨の発達異常が軽微にあって体長の減少がある以外、大きな異常が見出されず、またこの系は十分に繁殖可能であるため、解析が容易である。よって、神経系の解析にも最適であると考えてこれを解析した。中枢神経系の解析として、脊髄損傷実験、視覚可塑性、行動実験、発生の解析を行った。

4. 研究成果

コンドロイチン硫酸 (CS) 合成酵素 CSGalNacT1 (T1), T2 のノックアウトマウス (KO) の解析 (作成法を図 1 に示した) を行って以下の結果を得た。

(1) 脊髄損傷実験：T1-KO については脊髄損傷の圧挫モデルを確立し (図 2 参照)、T1-KO での機能的回復が非常に高率に起こっていることを証明した。すなわち、BMS スコア、筋電図、落下実験のいずれでも運動機能の圧倒的な回復が認められた (たとえば図 3 参照)。5HT 染色の結果から組織化学的にも再生繊維の存在が立証され、5 倍以上の 5HT 末端の増加が見出された (図 4 参照)。損傷領域の癩痕サイズは有意に減少し、反応性グリアのマーカー分子である GFAP 染色の減少から、反応性グリアのサイズも減少したことが見出された。解析した T1-KO では CS の量が 25% 減少していた (たとえば図 5 参照)。これらは CS 分解酵素コンドロイチナーゼ処理とは明らかに異なる結果であった。但し、脊髄損傷の効率的修復はその理由だけではなく、ヘパラン硫酸の発現上昇によっても明らかに支持されていることを見出した (新潟大学・武内准教授との共同研究)。

(2) 神経可塑性との関連性：T1-KO マウスの視覚可塑性を解析したところ、臨界期が形成されないことが電気生理学的解析から明らかとなった。この系で、GABA 作動薬の diazepam を投与すると、臨界期の形成は生じており、また視力に相当する VEP (visual evoked potential) に異常は認められなかった。一方、このマウスでは視覚野の PNN がマーカーとなる lectin-WFA の染色で著明に減少していることが証明された (図 6 参照)。さらに視覚野での CS 量はほぼ半減している

ことが分かった。これらの結果は、GT1-KO により CS 量が減少して PNN への蓄積が起これず、それに基づいて臨界期の発現が生じないことを意味すると考えられる。これまで CS は臨界期の終了のみに影響すると信じられてきたが、CS の減少は PNN の形成やそれに基づく臨界期の開始にも大きく作用することが初めて見出された。このように臨界期の開始・終了の双方に関係する因子はこれまで報告されておらず、CS の作用機序として全く新しいものと考えられた (新潟大学・杉山准教授との共同研究)。

(3) 行動解析：T1 ヘテロマウスについては、記憶学習、感覚、運動、不安様行動、うつ様行動には有意差は見られなかったが、社会的行動テストでは活動量が亢進しており、社会的アプローチも低下している可能性が示唆され、社会行動性の変化に有意の異常を結論付けるものであった。これは T1-KO の高次機能の異常を強く示唆するものであり、ヘテロマウスですでに有意な異常が見られたことから、以上の結果は、ホモマウスの行動解析でさらなる大きな変化が明示できるものと思われた。(生理学研究所・高雄准教授との共同研究)。

(4) 発生異常：T1-KO, T2-KO の 2 点を作成することに成功したが、T2-KO は脊髄損傷でもほとんど改善はなかった。また CS 産生量も減少は組織化学的にも見出されていない。T1-KO では大脳皮質の層形成異常が見出された。従って、さらなる解析のために双方の交配によりダブルノックアウト (DKO) を作製した。DKO マウスは致死的であるという結論に到達した。

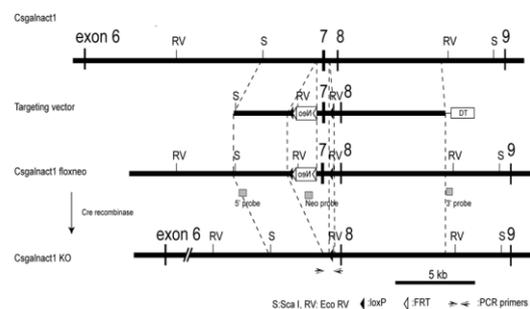


図 1： ノックアウトマウス作成のストラクチャー

T1, T2 とも活性に必須の DXD モティーフをコードするエクソンを除去する形で作成された。フレームシフトが残るため、正しい活性を持った酵素は全く生じないことを確認

している。



図2： 脊髄損傷モデルの作成

正常および遺伝子改変マウスについて、ラミネクトミー法で脊髄を開放し、これにインパクターで損傷を与えて脊髄損傷の圧挫モデルを作成した。

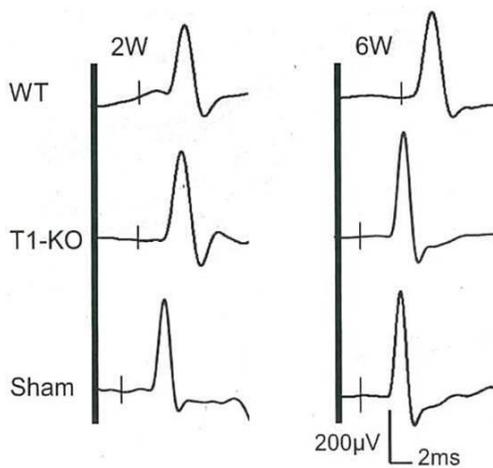


図3：筋電図の回復

脊髄損傷により、通常は運動神経の再生が生じず、筋電図も反応性が小さい（WT）が、T1-KOでは大きな電位回復が認められ、神経の再生が機能的に生じている可能性を強く示している。

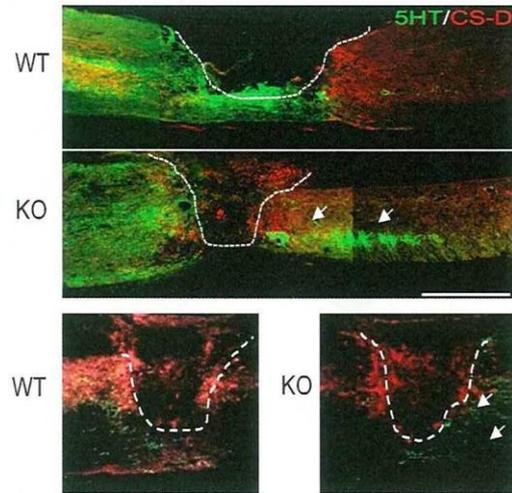


図4： セロトニン作動性軸索の再生

セロトニン (green) で標識した軸索端は、野生型では全く損傷部位を超えていないが、T1-KOにおいては広い範囲で損傷部位を超えていることが示され、再生が生じていると考えられる。

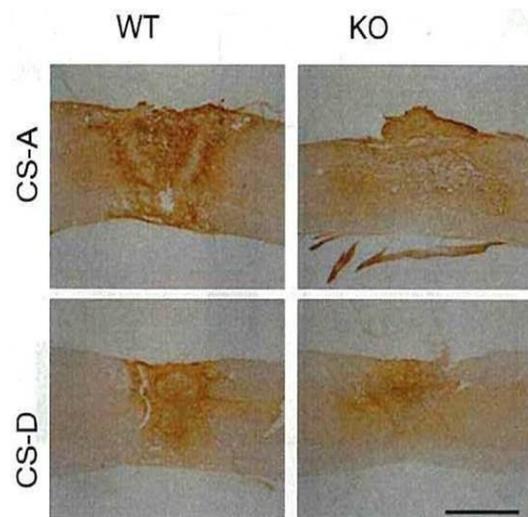
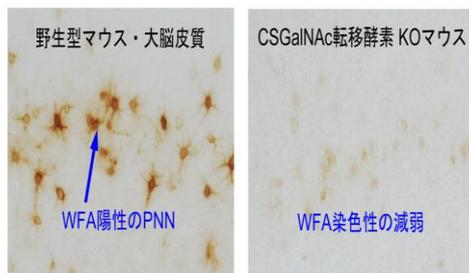


図5：損傷部位におけるCS合成の減弱

抗原性の異なる2種類の抗体CS-A, CS-Dで認識される、損傷部位のCS産生量はいずれも減少している。生化学的な解析から、当該の部位では少なくとも30%程度のCS合成低下が明確に認められている。



CSGalNAc転移酵素KOマウスでのPNNマーカー染色性の減弱

図6： PNNの視覚野における局在の異常
PNNは正常ではWFAによって強く認識される(左)が、T1-KOではほとんど認識できず、CSの集積が認められないことを強く示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕現時点で投稿中のため、なし

〔学会発表〕(計7件)

(1) 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年3月30日 香川国際会議場(香川県高松市)

(2) 武内恒成、比嘉進、吉岡望、渡部裕美、川崎麻実、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年12月15日 マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

(3) 武内恒成、比嘉進、工藤千佳、渡邊裕美、五十嵐道弘 Mice lacking in an enzyme involved in chondroitin sulfate synthesis shows better recovery from spinal cord injury. Annual Meeting of Society for Neuroscience 2011 2011年11月14日 ワシントンコンベンションセンター(アメリカ合衆国・ワシントンDC)

(4) 武内恒成、比嘉進、吉岡望、工藤千佳、川野仁、五十嵐道弘 コンドロイチン硫酸合成酵素ノックアウトマウスは脊髄損傷回復が早い 第54回日本神経化学会大会 2011年9月26日 瑠璃光(石川県加賀市)

(5) 武内恒成、比嘉進、川野仁、北川裕之、五十嵐道弘 コンドロイチン硫酸合成に関する遺伝子改変マウスの神経系発生解析 第84回日本生化学会大会 2011年9月23日 国立京都国際会館(京都府京都市)

(6) Kosei Takeuchi, Susumu Higa, Hitoshi Kawano, Michihiro Igarashi

Brain development abnormality and axon regeneration in the mice lacking in the enzymes synthesizing chondroitin sulfate 8th IBRO World Congress of Neurosciences 2011年7月15日 バッソ要塞(イタリア共和国・フィレンツェ)

(7) 武内恒成、比嘉進、北川裕之、渡邊裕美、川野仁、五十嵐道弘 コンドロイチン硫酸合成酵素KOマウスにおける機能解析 第30回日本糖質科学会年会 2011年7月11日 ハイブ長岡(新潟県長岡市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Higa Onaga Susumu (Higa Onaga Susumu)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・研究員

研究者番号：90535337

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし