

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590132

研究課題名(和文) 神経再生治療の実現に向けたコンドロイチン硫酸による神経突起伸長制御機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of regulatory roles of chondroitin sulfate chains in neurite outgrowth for neuro-regenerative therapies

研究代表者

三上 雅久(MIKAMI, TADAHISA)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20330425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：コンドロイチン硫酸(CS)は、あらゆる組織の細胞外マトリックスに分布する多機能分子であり、障害を受けた成体脳において軸索再生を阻害する分子として振る舞う一方、神経突起の伸長を促進する分子としての一面も併せもつ。最近我々は、CSレセプター分子の存在を世界で初めて同定し、“CSが細胞外シグナル分子として、特定の細胞分化を制御する”という新しいコンセプトを打立てた。本研究では、神経再生医療への応用を指向したCSによる神経突起伸長制御機構の解明を試みた。

研究成果の概要(英文)：Chondroitin sulfate (CS) is a multifunctional molecule that is widely distributed in extracellular spaces. In central nervous system, the pathological features of CS as major axon growth inhibitory molecules have attracted much attention, whereas several CS preparations have profound stimulatory effects on neurite outgrowth. Recently, our group demonstrated the existence of CS receptor molecules for the first time, and established a new concept that CS can act as a dynamic extracellular signaling molecule that trigger intracellular signaling cascades. Therefore, this project was to investigate the molecular mechanisms for the CS-mediated regulation in neurite outgrowth for neuro-regenerative therapies.

研究分野：生化学・分子生物学・糖鎖生物学

キーワード：コンドロイチン硫酸 受容体 神経突起伸長 細胞外シグナル分子 シグナル伝達 発現制御

1. 研究開始当初の背景

CS は、代表的な硫酸化グリコサミノグリカン (GAG) 多糖の一つであり、コアとなるタンパク質に共有結合したプロテオグリカン (CSPG) として中枢神経系や骨・軟骨組織をはじめ、あらゆる組織の細胞表面や細胞外マトリックスに分布している。CSPG は、その普遍性ゆえ、細胞の増殖、分化、形態形成など様々な生命現象に関与するが、特に最近では、外傷性障害を受けた成体脳において、再生軸索の伸長を阻害する原因分子として、神経再生医療の観点から脚光を浴びている。実際、バクテリア由来の CS 分解酵素 (コンドロイチナーゼ ABC、ChABC) を用いて、脳の損傷部位に高発現する CS を除去すると、CSPG による軸索伸長阻害作用が消失することから、悪玉分子の実態は、その CS 鎖部分であり、CS の発現量調節の重要性が提唱されている。しかし、CS は必ずしも神経突起の伸長を阻害するわけではなく、高度に硫酸化された構造をもつ一部の CS には、初代培養神経細胞の神経突起伸長をむしろ促進する働きがある。実際、CS-E という高硫酸化 CS を塗布した基質上で海馬神経細胞を培養すると、軸索様の長い神経突起の伸長が促進され、CS-E とは異なる高硫酸化 CS である CS-D では、樹状突起様の短い突起が複数本観察される。このような相異なる CS の作用の違いは、生合成過程で産み出される CS の発現量の違いや構造多様性に起因すると考えられている。しかしながら、硫酸化構造の違いに基づく各 CS による神経突起の伸長制御がどのような分子メカニズムを介して発揮されるかはよくわかっていない。

2. 研究の目的

最近申請者らは、神経細胞上に発現する細胞接着分子の一つである contactin-1 (CNTN-1) が、CS-E を認識するレセプターとして機能し、CS-E による神経突起伸長が、CS レセプター分子を介する細胞内シグナル伝達経路の活性化により引き起こされることを世界で初めて明らかにした。この発見は、CS 自身がリガンドとして直接的に機能し、細胞外から特定のシグナル伝達を制御することを意味し、CS の神経回路網形成・再編における機能発現メカニズムの全容を明らかにしてゆく上で、極めて重要なコンセプトである。そこで、本研究では、CS の細胞外シグナル分子としての機能的側面に着目し、神経系に発現する機能的 CS レセプター分子のさらなる探索とそれらにより発動するシグナル伝達経路の同定を行い、神経再生医療への応用を指向した CS による神経突起伸長制御機構の解明を試みる。

3. 研究の方法

新たな CS レセプター候補分子の絞り込みを行うため、CS-E レセプターである CNTN-1 の類縁分子や、イムノグロブリンスーパーフ

ァミリーに属する分子群の組換えタンパク質と様々な CS (CS-A~CS-E) との結合親和性を、表面プラズモン共鳴を利用したバイオセンサー (BIAcore) を用いて評価した。本評価系では、高硫酸化 CS である CS-D および CS-E の少なくともいずれかに高い結合親和性を示す分子を CS レセプター候補分子とし、その妥当性を評価した。

具体的には、エレクトロポレーション法により、CNTN-1 または CS レセプター候補分子に対する shRNA ベクターを初代培養海馬神経細胞に導入し、当該分子のノックダウンによる神経細胞の高硫酸化 CS に対する応答性の変化 (神経突起の形態や伸長の程度など) を調べた。また、得られた効果が、当該分子に依存した効果であるかを、それぞれの分子に対する中和抗体を用いた機能阻害実験によっても検証した。さらに、CNTN-1 や CS レセプター候補分子の機能的関連性を明らかにする目的で、神経細胞の形質膜上における局在を免疫染色により調べた。

また、高硫酸化 CS 依存的な神経突起伸長が、CNTN-1 の神経突起伸長シグナルを仲介する細胞内分子の機能攪乱によって影響されるかについても検討した。

4. 研究成果

これまでに、CS-D と CS-E を共存させた基質上の神経細胞の形態観察から、CS-D には、CS-E 誘導性の神経突起の伸長を打ち消す効果があることを見出している。そこで、CS-D による作用発現機構の解明を目的として、CNTN-1 または CS レセプター候補分子の一つ (候補分子) を海馬神経細胞でノックダウンし、CS-D または CS-E 基質上で培養した場合における神経突起の形態を観察した。その結果、CS-E による神経突起の伸長は、CNTN-1 ならびに今回着目した候補分子のノックダウンにより有意に抑制されたが、CS-D 基質上での神経突起の伸長は、CNTN-1 のノックダウンにのみ影響を受け、むしろ促進傾向にあることが判明した。同様の形態変化は、それぞれの分子に対する中和抗体を添加した神経細胞においても観察された。また、BIAcore による相互作用解析から、当該候補分子が CS-E のみに高い結合親和性を示したのに対し、CNTN-1 は、CS-D および CS-E の両者に同等の強い結合親和性を示すことがわかった。これらの知見より、CS-D による CS-E 依存性の神経突起伸長促進作用の抑制は、少なくとも CNTN-1 を介して発揮されると考えられた。

実際、免疫染色による各分子の局在性の解析から、神経突起の伸長開始段階における高硫酸化 CS の識別には、神経細胞の細胞体周辺部と神経突起の起始部に多く局在する CNTN-1 が関与し、CS-D または CS-E による競合的な相互作用を介して神経突起の伸長を抑制的または促進的に制御している可能性が考えられた。一方で、今回着目した候補

分子は、伸長途中の軸索に多く分布していたことから、CS-E 介在性の神経突起伸長をさらに促進される上で重要な役割を果たしていると考えられた。また、CNTN-1 の神経突起伸長シグナルを仲介する細胞内分子のドミナントネガティブ体の過剰発現によって、CS-E 依存性の神経突起伸長が有意に抑制されることもわかった。これらの結果は、CS の硫酸化や、CS レセプター分子下流の細胞内シグナル伝達経路をコントロールすることにより、神経突起の伸長が制御可能であることを裏付ける結果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Tadahisa Mikami, Shinji Koyama, Yumi, Yabuta, Hiroshi Kitagawa. Chondroitin sulfate is a crucial determinant for skeletal muscle development/regeneration and improvement of muscular dystrophies. *J. Biol. Chem.* 287(46) 38531-38542 (2012) DOI: 10.1074/jbc.M111.336925. 査読有

Tadahisa Mikami, Hiroshi Kitagawa. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim. Biophys. Acta* 1830(10) 4719-4733 (2013) DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.06.006. 査読有

Tomomi Izumikawa, Sato Ban, Tadahisa Mikami, Jun-ichi Tamura, Michihiro Igarashi, Hiroshi Kitagawa. GlcUA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl(2-O-phosphat e) is the preferred substrate for chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-1. *J. Biol. Chem.* 290(9) 5438-5448 (2015) DOI: 10.1074/jbc.M114.603266. 査読有

Toshiyasu Koike, Tadahisa Mikami, Miharu Shida, Osami Habuchi, Hiroshi Kitagawa. Chondroitin sulfate-E mediates estrogen-induced osteoanabolism. *Sci. Rep.* 5, 8994 (2015) DOI: 10.1038/srep08994. 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

三上雅久, 安永大輝, 玉置祐樹, 北川裕之 平成 24 年度包括型脳科学研究推進ネットワーク 夏のワークショップ(2012 年 7 月 26 日, 仙台)“コンドロイチン硫酸による神経突起伸長の制御機構の解析”

三上雅久, 安永大輝, 玉置祐樹, 北川裕之 新学術領域「神経糖鎖生物学」第 4 回領域会議(2013 年 1 月 15~17 日, 宮崎)“コンドロイチン硫酸鎖による神経突起伸長制御とその作用発現機構の解析”

三上雅久, 玉置祐樹, 志田美春, 友廣彩夏, 北川裕之 新学術領域「神経糖鎖生物学」2013 年夏の班会議(2013 年 7 月 23~25 日, 滋賀)“コンドロイチン硫酸による神経突起伸長・極性形成制御とその作用発現機構の解析”

三上雅久, 小山慎司, 藪田ゆみ, 北川裕之 第 86 回日本生化学会大会(2013 年 9 月 11~13 日, 横浜)“コンドロイチン硫酸鎖による骨格筋分化・再生過程の制御”

志田美春, 三上雅久, 北川裕之 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会(2013 年 10 月 12 日, 京田辺)“コンドロイチン硫酸による神経突起伸長制御に関する糖鎖受容体の解析”

友廣彩夏, 木村祐介, 三上雅久, 北川裕之 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会(2013 年 10 月 12 日, 京田辺)“コンドロイチン硫酸の神経突起伸長作用を仲介する細胞内シグナル伝達の解析”

三上雅久 第 39 回日本応用酵素協会研究発表会(2013 年 11 月 18 日, 大阪)“高硫酸化コンドロイチン硫酸による神経突起伸長制御機構の解析”

友廣彩夏, 志田美春, 三上雅久, 北川裕之 第 36 回日本分子生物学会年会(2013 年 12 月 3~6 日, 神戸)“コンドロイチン硫酸鎖による神経細胞の極性形成制御機構の解析”

Tadahisa Mikami, Miharu Shida, Ayaka, Tomohiro, Hiroshi Kitagawa. International Symposium on Glyco-neuroscience (2014.01.09-11 Awaji). "Highly sulfated chondroitin sulfates regulate neuronal polarity formation."

志田美春, 友廣彩夏, 三上雅久, 北川裕之 日本薬学会第 134 年会(2014 年 3 月 27~30 日, 熊本)“高硫酸化コンドロイチン硫酸鎖による神経突起の伸長制御機構の解析”

志田美春, 友廣彩夏, 三上雅久, 田村純一, 北川裕之 第 61 回日本生化学会近畿支部例会(2014 年 5 月 17 日, 京都)“コンドロイチン硫酸受容体を介した神経細胞の極性形成過程の制御機構の解析”

志田美春, 友廣彩夏, 三上雅久, 武内恒成, 北川裕之 新学術領域研究「統合的神経機能の制御を標的とした糖鎖の作動原理解明」第 7 回非公開班会議(2014 年 5 月 25~27 日, 掛川)“極性形成過程におけるコンドロイチン硫酸受容体を介した神経突起伸長制御機構の解析”

志田美春, 三上雅久, 北川裕之 第 87 回日本生化学会大会(2014 年 10 月 15~18 日, 京都)“コンドロイチン硫酸の発現により制御される軟骨分化過程の解析”

Tadahisa Mikami, Miharu Shida, Hiroshi Kitagawa. SFG & JSCR 2014 Joint Annual Meeting-Satellite II: Glycan in Neuroscience (2014.11.16 Honolulu). "Highly sulfated chondroitin sulfate chains regulate neuronal polarity formation."

Tadahisa Mikami, Miharu Shida, Hiroshi Kitagawa. SFG & JSCR 2014 Joint Annual Meeting (2014.11.17-19 Honolulu). "Highly sulfated chondroitin sulfate chains regulate

neuronal polarity formation."

〔図書〕(計4件)

三上雅久, 北川裕之 「コンドロイチン硫酸による骨格筋分化・再生過程の制御」実験医学増刊(羊土社) 第三の生命鎖糖鎖の機能と疾患 31(10) pp52-57, 225 (2013)

Tadahisa Mikami, Hiroshi Kitagawa. Glycosaminoglycans: their modes of action for a possible new avenue for therapeutic intervention. in Glycoscience: Biology and Medicine (Taniguchi N., Endo T., Hart G.W., Seeberger, P.H., Wong C.H. eds., Springer, Japan) .pp 511-517, 1569 (2014)

Tadahisa Mikami, Hiroshi Kitagawa. Glycan structure and neural plasticity. in Sugar Chains (Taniguchi N., Suzuki T., Ohtsubo K., eds., Springer, Japan) pp107-126, 295 (2015)

Shunji Tomatsu, Tsutomu Shimada, Pravin Patel, Robert Mason, Tadahisa Mikami, Hiroshi Kitagawa, Adriana M Montano, Tadao Orii. (2015) □Chondroitin and keratan sulfate. □Sulfated Polysaccharides, (Nova Science Publishers) 印刷中

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: SKELETAL MUSCLE REGENERATION PROMOTER

発明者: Hiroshi Kitagawa, Tadahisa Mikami

権利者: Seikagaku Corporation

種類: 国際特許

番号: PCT/JP2012/073794

出願年月日: 2014年4月22日

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

三上 雅久 (MIKAMI TADAHISA)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 20330425