

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430078

研究課題名(和文)細胞外マトリックス糖鎖分子による神経細胞の形態形成制御機構

研究課題名(英文)Role of chondroitin sulfate-E in the modulation of neuronal morphology

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、コンドロイチン硫酸(CS)糖鎖、特にCS-E構造を多く含む糖鎖(CS-E糖鎖)が発達期の神経細胞の形態と機能を制御する分子メカニズムを解明することを目的とした。

CS-E糖鎖で未熟な神経細胞を刺激すると、細胞の接着性や形態が著しく変化する。この変化はCS-AからCS-D糖鎖では認められず、CS-E糖鎖に特異的である。さらに、CS-E糖鎖での刺激は、AktやRbを活性化(リン酸化)し、抗アポトーシス作用を示すことがわかった。以上より、CS-E糖鎖は、発達過程の神経細胞を種々の細胞死刺激から保護していることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Chondroitin sulfate (CS) is a family of extracellular matrix proteins that play important roles in the formation and maintenance of neural network. Although the biological importance of CS is well established in the CNS, the molecular mechanisms underlying the control by CS of neuronal morphology is largely unknown. In this study, we examined the effect of CS on cell morphology of cultured cortical neurons. In addition, the molecular mechanisms by which CS induces the morphological change were investigated. CS polysaccharide enriched in the CS-E sulfation motif induced the sphere formation of cortical neurons. The stimulatory effect of CS-E polysaccharide on sphere formation was completely abolished by a Akt and a Rb inhibitor. In addition, caspase 3 activity was significantly suppressed in CS-E-treated cortical neurons. These results suggest that CS-E sulfation motif is an important structural determinant and neuronal death.

研究分野：神経糖鎖生物学

キーワード：コンドロイチン硫酸 糖鎖分子 細胞外マトリックス 神経細胞 神経細胞死

1. 研究開始当初の背景

コンドロイチン硫酸 (CS) 糖鎖は、プロテオグリカン (PG) の側鎖として細胞外マトリックスに普遍に発現している。コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) は、脊髄損傷や脳の傷害部位に形成されるグリア性瘢痕の構成成分であるため、再生阻害因子として認識されている。しかし近年、CSPG は、傷害部位のみでなく発達段階の脳組織にも発現し、神経幹細胞の増殖や分化、神経回路の形成と安定化などにも密接に関与していることがわかってきた。CSPG による細胞の形態や機能の調節は、コア蛋白質に結合した硫酸化オリゴ糖の CS 糖鎖配列により決定される。CS 糖鎖は、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オリゴ糖である。

本研究を開始する当初、我々は、コンドロイチン硫酸 (CS) -E 構造を多く含む CS-E 糖鎖の刺激が、培養開始 1 日目の未熟な大脳皮質初代培養細胞の形態を著しく変化させることを見出していた。この形態変化は、培養 7 日目の神経細胞では誘導されない。また、CS-A から CS-D 糖鎖の刺激では形態変化は観察されず、CS-E 糖鎖に特異的な変化であった。

作用分子メカニズムの解析から、この形態変化は、CS-E 糖鎖の刺激に応答した過酸化水素 (H_2O_2) 産生を介していた。また、産生された H_2O_2 がシグナル伝達因子として働き、血管内皮増殖因子 (VEGF) 受容体や CRMP (collapsin response mediator protein)-2 の活性を調節していることを示唆する結果も得ていた。

これらの我々が着目している分子メカニズムは、神経の発達を調整する CS 糖鎖の新しい側面を提示できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、コンドロイチン硫酸 (CS) 糖鎖、特に CS-E 構造を多く含む糖鎖 (CS-E 糖鎖) が発達期の神経細胞の形態と機能を制御する分子メカニズムを解明することとした。

具体的には、CS-E 糖鎖の刺激で誘導される細胞凝集塊形成を惹起する分子メカニズムと、凝集塊形成の生理的意義を解明すること目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胎生 14 日目のマウスから大脳皮質初代培養細胞を作製した。培養開始 2 4 時間後に CS-A から CS-E 構造を多く含む糖鎖をそれぞれ培養液に添加し、さらに 2 4 時間培養した。抗 TUJ-1 抗体を用いて免疫細胞染色を行い、染色された細胞の形態変化 (特に細

胞凝集塊の形成) を共焦点顕微鏡で解析した。

(2) CS-E 構造を多く含む糖鎖 (CS-E 糖鎖) の培養液添加で形成される細胞凝集塊の数をカウントし、無処置のコントロール細胞、CS-A から CS-D 糖鎖をそれぞれ培養液に添加して培養した細胞と比較評価を行った。

さらに、各種阻害剤を CS-E 糖鎖と共に培養液に添加し、細胞凝集塊の形成を抑制する阻害剤をスクリーニングすることで、細胞凝集塊形成の際に CS-E 糖鎖により活性化されるシグナル分子の同定を試みた。

(3) 上記 (2) で同定したシグナル分子の活性をウエスタンブロット法 (主にリン酸化) で解析した。

4. 研究成果

(1) CS-E 糖鎖による大脳皮質初代培養細胞の形態変化

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) 構造を多く含む糖鎖を生化学工業株式会社、WAKO 純薬工業から購入し本実験に使用した。

CS 糖鎖の中で、CS-E 構造を多く含む CS-E 糖鎖のみが培養 1 日目の大脳皮質初代培養細胞の形態を著しく変化させた (図 1)。この変化は、培養 7 日目の神経細胞では誘導されなかった。また、CS-A から CS-D 糖鎖では形態変化は観察されず、CS-E 糖鎖に特異的な変化であった。

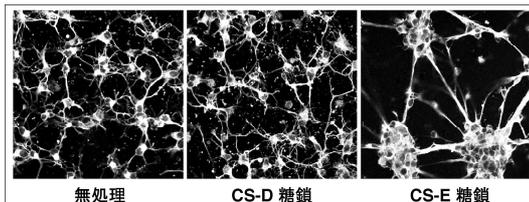


図 1 CS-D あるいは CS-E 糖鎖を培養液に添加して培養したマウス大脳皮質初代培養細胞

胎生 14 日目のマウスより調整した大脳皮質初代培養細胞の培養液に CS-E 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 糖鎖では認められない (図には CS-D と CS-E 糖鎖を添加した際の結果のみを表示)。

(2) 細胞凝集塊形成を誘導する分子メカニズムの解析

CS 糖鎖を培養液に添加して培養して神経細胞の細胞内活性酸素を、細胞膜透過性蛍光指示薬 (CM-H2DCFDA) で標識した。

CS-E 糖鎖を添加して培養した場合には、コントロールに比べて活性酸素産生細胞が増加していた (図 2)。一方、形態変化を示さない CS-D 糖鎖を添加して培養した場合には、活性酸素産生細胞の増加は認められなかった。

また、CS-E 糖鎖による神経細胞の形態変化は、過酸化水素 (H_2O_2) 分解酵素のカタラーゼや、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 受容体のキナーゼ阻害剤を培養液に添加す

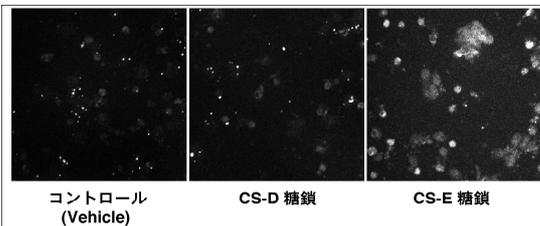


図2 CS-E 糖鎖の活性酸素産生亢進作用
 コンドロイチン硫酸 (CS) を培養液に添加して12時間培養した大脳皮質初代培養細胞内の活性酸素を、細胞膜透過性蛍光指示薬 (CM-H2DCFAD) で標識した。
 CS-E 糖鎖 (1 μg/ml) を培養液に添加して培養した細胞では、コントロールに比べて活性酸素産生細胞の増加が認められた。一方、CS-D 糖鎖 (1 μg/ml) では、活性酸素産生細胞の増加は認められなかった。

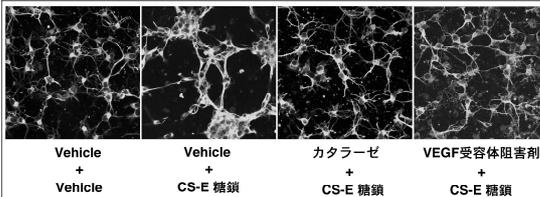


図3 カタラーゼおよびVEGF受容体阻害剤による神経細胞形態変化の抑制
 CS-E 糖鎖による大脳皮質初代培養細胞の形態変化は、カタラーゼあるいは VEGF 受容体のキナーゼ阻害剤の培養液添加により抑制された。

ことで抑制された (図3)。

以上より、CS-E 糖鎖による大脳皮質初代培養細胞の形態変化は、H₂O₂ の産生亢進と VEGF 受容体の活性化を介して誘導されると考えられた。

さらに、カタラーゼ、VEGF 受容体キナーゼ阻害剤の他に、RRD251 (Raf-1 と Rb の結合を阻害し、Rb のリン酸化を抑制)、GW5074 (Raf-1 の阻害剤)、Triciribine (Akt の阻害剤) は、CS-E 糖鎖の刺激による細胞凝集塊形成を抑制することが各種阻害剤を用いた薬理学的実験により確かめられた (図4)。

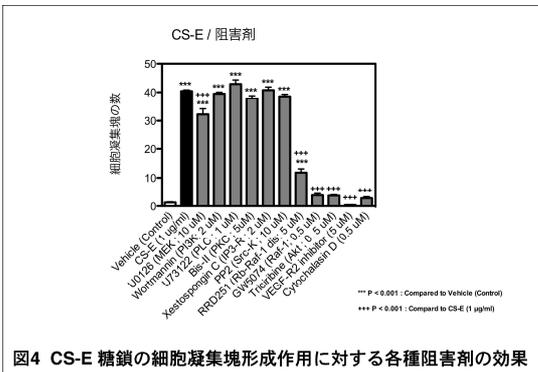


図4 CS-E 糖鎖の細胞凝集塊形成作用に対する各種阻害剤の効果

上記の阻害剤で効果を示したシグナル分子の活性をウエスタンブロット法で確認したところ、CS-E糖鎖の刺激は、AktのThr308、Ser473のリン酸化と、RbのSer807/811のリン酸化を誘導することがわかった。VEGF受容体とRaf-1のリン酸化については、CS-E糖鎖の刺激による活性化(リン酸化)の変化

は確認されなかった。そのため、これら2つの分子の阻害剤(VEGF受容体キナーゼ阻害剤と、Raf-1阻害剤のGw5074)は、非特異的に作用することで細胞凝集塊の形成を抑制したと考えられた。注目すべき点では、Akt阻害剤のTriciribineは、CS-E糖鎖によるAktの活性化(Thr308、Ser473のリン酸化)以外に、Rbの活性化(Ser807/811のリン酸化)も抑制していた。この結果から、CS-E糖鎖は、Akt-Rb経路を活性化して細胞凝集塊形成を誘導していることが示唆された。

また、RbのSer807/811リン酸化は、アポトーシス関連タンパク質Baxの活性化と細胞内局在を調整して細胞死を抑制することが報告されている。さらに、Baxの活性抑制は、網膜細胞の凝集塊形成を誘導する。これらの報告に基づき、まだ予備的結果しか得ていないが、Caspase-3活性化を指標にCS-E糖鎖で刺激した細胞のアポトーシスの度合いを検討したところ、無処理のコントロール細胞に比べて有意に抑制されていることが確認できた。

以上より、CS-E糖鎖は、Akt-Rb経路を介してBaxの活性を制御することで抗アポトーシス作用を示すことが示唆される。

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 1 件)

Kitahara Y, Ohta K, Hasuo H, Shuto T, Kuroiwa M, Sotogaku N, Togo A, Nakamura K, Nishi A. Chronic fluoxetine induces the enlargement of perforant path-granule cell synapses in the mouse dentate gyrus. PLoS One 11, 1-19, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0147307

[学会発表](計 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

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

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

西 昭徳 (NISHI, Akinori)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：50228144

首藤 隆秀 (SHUTO, Takahide)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：70412541

(3) 連携研究者

嶋村 健児 (SHIMAMURA, Kenji)
熊本大学・発生医学研究所・教授
研究者番号：70301140

畠山 淳 (HATAKEYAMA, Jun)
熊本大学・発生医学研究所・助教
研究者番号：90404350

(4) 研究協力者

()