

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	村上公一
<p>学位論文題目</p> <p>Nerve injury induces the expression of EXT2, a glycosyltransferase required for heparan sulfate synthesis (末梢神経損傷時における糖転移酵素 EXT2 の発現変動)</p> <p>共著者名</p> <p>濤川 一彦, 清水 孝彦, 白澤 卓二, 吉田 成孝, 木山 博資</p> <p>Neuroscience 誌 141 巻 1961 頁～1969 頁 平成 18 年</p> <p>研究目的</p> <p>末梢神経は軸索損傷等の神経傷害に対して、生存・再生し機能回復が可能であるが、脳・脊髄といった中枢神経系では神経傷害に対して脆弱であり、機能回復には至らない。これは医学的問題のみならず、社会的・経済的問題ともなっている。</p> <p>脊髄損傷において神経の再生を阻害する要因の一つとして、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが指摘されている。一方、プロテオグリカンの一種であるヘパラン硫酸プロテオグリカンに関しては、発生段階において FGF や Slit といった神経細胞の分化・軸索投射に関与する分子の機能発現に関与していることが知られている。また成体の中枢神経系においても豊富な発現が認められている。しかし、神経傷害時にどのような機能を有しているかという点に関しては、極少数の報告しかなされておらず、また軸索再生に関して促進的に働くのか、あるいは阻害的に働くのかも定まっていない。</p> <p>本研究では、マウス舌下神経切断モデルを用いて、末梢神経損傷におけるヘパラン硫酸糖転移酵素 EXT2 の発現およびその基質となるヘパラン硫酸プロテオグリカンのコア蛋白質の発現を討した。また EXT2 による合成産物であるヘパラン硫酸グリコサミノグリカン(HS-GAG)の発現に関しても検討した。</p> <p>材料・方法</p> <p>(1) 動物および舌下神経切断</p> <p>生後 6 週の C57BL/6 に対し、ペントバルビタール麻酔下で右側舌下神経を切断した。</p>			

(2) RT-PCR

舌下神経切断マウスから舌下神経核を取り出し、AGPC 法にて総 RNA を抽出した。その後、逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、RT-PCR を行なった。PCR 産物はアガロースゲルにて電気泳動後、臭化エチジウムにて可視化しソフトウェアにて定量評価を行なった。

(3) in situ hybridization

舌下神経切断マウスの脳より 18 μm の新鮮凍結切片を作成し、DIG 標識 cRNA プローブを用いて mRNA の検出を行なった。

(3) 免疫組織化学

舌下神経切断マウスをパラホルムアルデヒドにて灌流固定後、18 μm の脳切片を作成し、抗ヘパラン硫酸モノクローナル抗体 (10E4) にて免疫染色を行なった。

ヘパリチナーゼ処理は、切片を 20 mU ヘパリチナーゼで 37 度、一晚反応させた後、PBS で洗浄し免疫染色に用いた。

成績

1. 損傷舌下神経核における EXT2 の発現の検討

RT-PCR 法により、舌下神経損傷に伴い舌下神経核において EXT2 の発現が上昇することが確認された。一方 EXT2 の family 分子である EXT1 に関しては大きな変動は認められなかった。EXT2 の発現は神経切断後 5 時間から認められ、7 日をピークとして増加し、以降漸減する経過となった。

in situ hybridization 法により、EXT2 を発現する細胞を検討したところ、運動神経細胞において発現が上昇していることが確認された。また時間経過に関しては、RT-PCR 法と同様の結果が得られた。

2. 舌下神経核におけるヘパラン硫酸の発現の検討

抗ヘパラン硫酸モノクローナル抗体を用いて、舌下神経核における HS-GAG の発現を検討したところ、神経切断後 7 日をピークとして発現の上昇が認められた。また神経細胞の細胞膜および細胞外領域が強く染色された。HS-GAG の分解酵素であるヘパリチナーゼで切片を処理したところ、この免疫反応はほぼ完全に消失したことから、この免疫反応が確かに HS-GAG を認識していることが確かめられた。

3. ヘパラン硫酸プロテオグリカンのコア蛋白質の発現の検討

HS-GAG が結合するコア蛋白質のうち、神経系において発現が報告されている代表的な分子に関して、抹消神経傷害時の発現を *in situ hybridization* 法を用いて検討した。その結果、神経細胞においてグリピカン-1 及びシンデカン-1 の発現が神経切断に伴い上昇することが確認された。

考察

ヘパラン硫酸プロテオグリカンは、中枢神経系の発生においては軸索誘導などの機能が報告されているが、一方損傷神経の再生過程における機能に関する知見はほとんど報告されていない。

EXT に関しては、EXT1 ノックアウトマウスにおける中枢神経系の形成不全や視神経の投射異常、EXT2 変異ゼブラフィッシュにおける視神経の投射以上等、神経系の発生に必須であることが報告されているが、神経傷害時の動態・機能に関してはヘパラン硫酸同様ほとんど報告されていない。

グリピカン-1 やシンデカン-1 に関しては、Slit の分布調節や Slit-Robo シグナルに関与していることが知られており、EXT 同様中枢神経系の発生において重要な役割を果たしていることが知られている。

今回我々はマウス舌下神経切断モデルを用いて、末梢神経損傷時にヘパラン硫酸糖転移酵素 EXT2 およびその合成産物である HS-GAG が神経細胞及び神経核において増加していることを見出した。

HS-GAG は FGF-2 など、種々の成長因子の共受容体として機能することが知られており、損傷神経細胞に発現することにより神経細胞の生存に寄与していることが考えられる。またシンデカン-1 は細胞外マトリックスと結合し細胞形態を変化させる機能が知られており、損傷軸索の伸展への関与が示唆される。

以上より、損傷神経で発現上昇する HS-GAG およびそのコア蛋白質が、損傷神経細胞の生存あるいは軸索再生に促進的にはたら可能性が示唆される。

結論

1. 軸索損傷により損傷運動神経細胞において EXT2 の発現が著明に上昇した。

2. 軸索損傷により損傷神経核において HS-GAG が増加した。

3. 軸索損傷により損傷運動神経細胞において、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのコア蛋白質であるグリピカン-1 とシンデカン-1 の発現が上昇した。

以上の結果より、神経損傷により損傷運動神経細胞において EXT2 および HS-GAG の発現が上昇し、同時に HS-GAG の担体となるコア蛋白質としてグリピカン-1 とシンデカン-1 も増加しており、これらが軸索再生に関与していることが示唆された。

引用文献

1. Inatani M, Irie F, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Yamaguchi Y (2003) Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. *Science* 302:1044–1046.
2. Lee JS, von der Hardt S, Rusch MA, Stringer SE, Stickney HL, Talbot WS, Geisler R, Nusslein-Volhard C, Selleck SB, Chien CB, Roehl H (2004) Axon sorting in the optic tract requires HSPG synthesis by ext2 (dackel) and ext13 (boxer). *Neuron* 44:947–960.
3. Liang Y, Annan RS, Carr SA, Popp S, Mevissen M, Margolis RK, Margolis RU (1999) Mammalian homologues of the *Drosophila* slit protein are ligands of the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in brain. *J Biol Chem* 274:17885–17892.

参考文献

1. Chau CH, Shum DK, Chan YS, So KF (1999) Heparan sulphates upregulate regeneration of transected sciatic nerves of adult guinea-pigs. *Eur J Neurosci* 11:1914–1926.
2. Groves ML, McKeon R, Werner E, Nagarsheth M, Meador W, English AW (2005) Axon regeneration in peripheral nerves is enhanced by proteoglycan degradation. *Exp Neurol* 195:278–292.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	村 上 公 一
<p>審査委員長 <u> </u> 渡 部 剛 ㊞</p> <p>審査委員 <u> </u> 吉 田 成 孝 ㊞</p> <p>審査委員 <u> </u> 田 中 達 也 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Nerve injury induces the expression of EXT2, a glycosyltransferase required for heparan sulfate synthesis.</p> <p>(末梢神経損傷時における糖転移酵素 EXT2 の発現変動)</p>			
<p>本論文提出者は、マウス舌下神経切断モデルを用いて、末梢神経損傷後の起始神経核におけるヘパラン硫酸、ヘパラン硫酸糖転移酵素、および、その基質であるプロテオグリカンのコア蛋白質の分布や発現の変動を、免疫組織化学法、in situ hybridization 法、RT-PCR 法で検討した。その結果、舌下神経切断後に起始核神経細胞において、(1)細胞膜および細胞周囲にヘパラン硫酸が集積すること、(2)ヘパリン硫酸の生合成に関わる糖転移酵素のうち、EXT2 の発現が顕著に上昇すること、そして、(3)ヘパリン硫酸と結合しうるコア蛋白質のうち glypican-1 と syndecan-1 の発現が上昇することを見いだした。</p> <p>細胞外基質であるプロテオグリカンのうち、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが神経損傷後の修復過程に影響を与える可能性は以前より指摘されていたが、ヘパリン硫酸プロテオグリカンの同修復過程への関与についてはほとんど検討されていなかった。本研究は、ヘパリン硫酸プロテオグリカンの生合成に関わる分子群が損傷を受けた神経細胞で協調的に誘導されることを初めて明らかにしたものであり、この細胞外基質が神経修復過程を制御・修飾する可能性を強く示唆している。また、この現象は今回解析に用いられた舌下神経切断動物モデルのみならず末梢神経損傷時の修復過程全般で起こる可能性があり、神経の再生医学研究の発展に大きく寄与する発見であると思われる。</p> <p>本研究で用いられた方法の妥当性は、適切な対照実験によって検証されており、論文の記述および図版の質・構成も得られた知見を説明するのに十分なものである。また、本論文の内容および関連領域に関して、論文提出者に試問を行ったところ、適切な応答が得られ十分な学力を有することが示された。</p> <p>以上の結果に基づき、審査委員会は本論文を学位論文として適切なものであると判定した。</p>			