

23. ECM 糖鎖による神経発生・可塑性・再生の分子機序

五十嵐 道弘

新潟大学 大学院医歯学総合研究科 分子細胞医学専攻 シグナル伝達

Key words : コンドロイチン硫酸, 神経可塑性, ペリニューロナルネット (PNN), アグレカン, Otx2

緒言

コンドロイチン硫酸 (CS) は、細胞外基質の構成成分として広範に存在するグリコサミノグリカン糖鎖である。神経系では、この分子はペリニューロナルネット (perineuronal nets: PNN) と呼ばれる部位に集積する。PNN は 19 世紀には発見されていた構造体であるが、その意義は長い間、わからなかった。今世紀になって、PNN はシナプス周囲を取り巻く、グリコサミノグリカンに富んだ糖鎖・蛋白質複合体であることが明確になり、また一方でシナプス可塑性を調節する因子であることがわかってきた¹⁾。一方、神経成長及び再生の観点からは、CS は最も多量かつ強力な軸索成長の抑制因子であり、特に中枢神経系の神経損傷部位に生ずる瘢痕が CS を作って損傷部位を最小化し、副作用として軸索再生が阻害される。

われわれは CS の神経系に関する多様な意義にアプローチするため、CS 合成の律速酵素と考えられる CSGalNAcT1 (T1) のノックアウトマウス (KO) を作製して、軸索再生を検討した結果、CS 合成低下による顕著な修復を認めた²⁾。この結果は、CS 合成の神経系での調節に T1 が深くかかわっていることを意味する。

本研究では神経可塑性に CS が関わることを明確にするため、T1KO を用いて代表的な神経可塑性である大脳視覚野の眼優位可塑性³⁾ の開始・維持に関する CS の役割を解析した。

方法

C57BL/6 で確立した T1KO マウスを用いて、臨界期と呼ばれる時期にマウスの片眼を遮蔽して視覚を奪い、それに基づく大脳皮質視覚野の PNN やその領域の CS 定量、視覚の入力依存性を解析した。さらに既に臨界期を調節することが知られている転写因子の Otx2 との生化学的な関連性を調べた。

結果

T1 mRNA は 1 次視覚野 (V1) で発現している (図 1A)。臨界期発現開始時 (P16)、ピーク時 (P28-30) では維持され、成熟脳 (> P60) では減少した (図 1B)。片眼遮蔽時 (DR) は上昇する。大脳皮質においては T1KO で CS は半減し (図 1C)、PNN を標識するレクチン WFA で定量化すると、PNN は II/III 層、IV 層で大量に存在するが (図 1E)、T1KO で極端に減弱した (図 1F)。ANOVA (C, D), t-test (G); ***p < 0.001; ** p < 0.01, * p < 0/05. scale bar: 200 μ m.

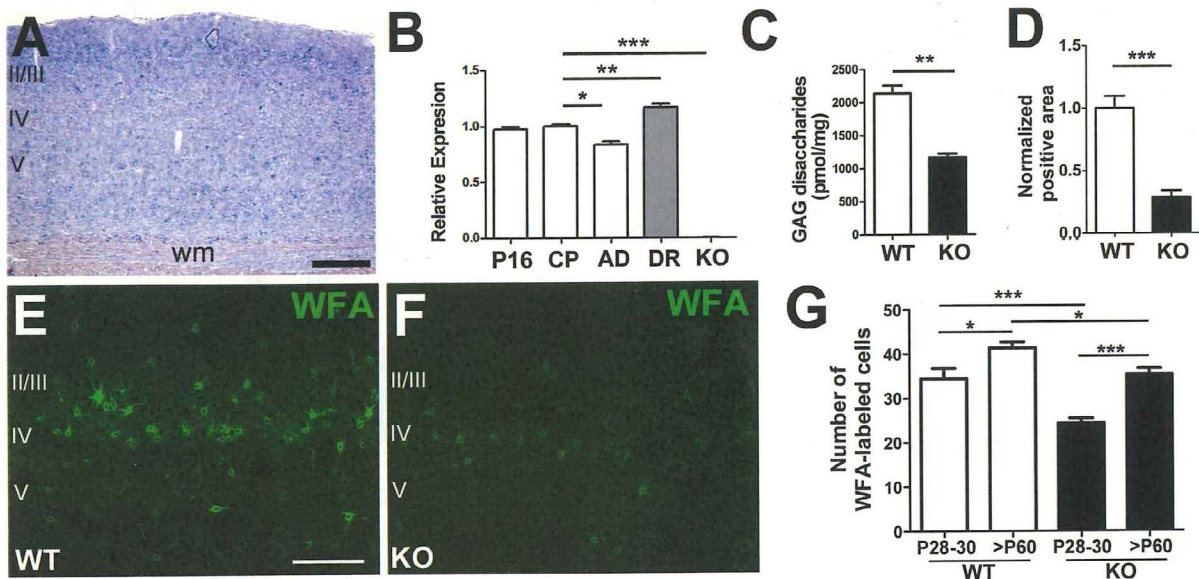


図1. TIKOにおけるCS量とPNN

(A, B) 発生期のT1 mRNA (A: マウス視覚野)と定量 (B: 臨界期 (CP, P28-P30)、成体 (AD, > P60))。Dark-rearing (DR)で発現上昇II/III、VI、and V、脳の各層、Wm、白質。(C-G) CS減少の定量。TIKOでのCS半減 (C)とWFA陽性領域の減少 (D-G)。

TIKOでは片眼遮蔽による眼優位可塑性の開始は、明らかに阻害されており (図2a)、成熟脳でも薬物的な復活は生じない。

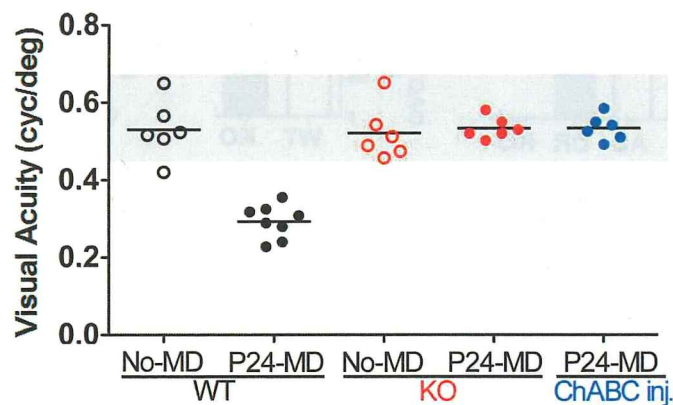


図2a. 片眼 (MD) 遮蔽時の眼優位可塑性
眼優位性の変化。

視覚可塑性の生ずる証拠である眼優位性の偏りは消失した (図2b)。これらの結果は、CS合成が正常な視覚臨界期可塑性の開始に必須であることを示している。

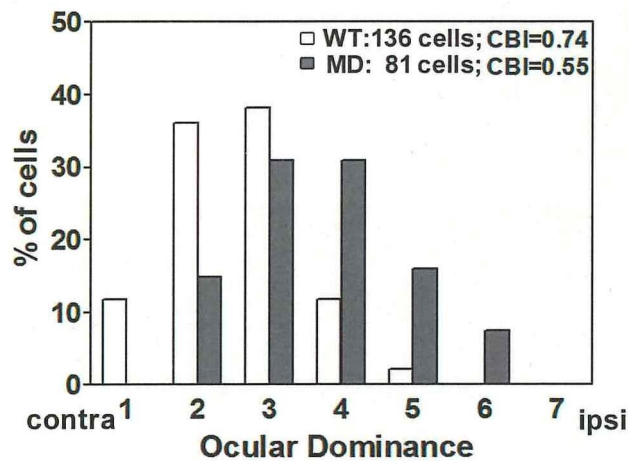


図 2b. 眼優位性のシフト

眼優位性のシフトは WT の MD グループで生ずるが、T1 KO では生じない。

T1KO における視覚野では、PNN の合成およびそこに集積する CS 結合分子のアグレカンを有意に減少し (図 3A-3B)、生化学的な定量でも確認された (図 3C-3D)。t-test; ***p < 0.001; ** p < 0.01. Scale bar: 10 μ m.

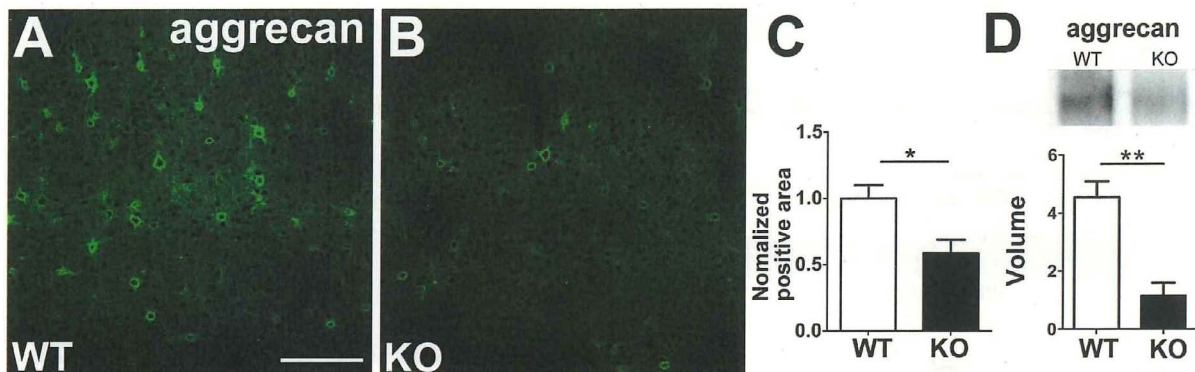


図 3. CSPG-アグレカンの役割

(A-D) T1KO での視覚野アグレカンの発現減少 (A: WT B: T1KO) とその定量化 (C, D)。

免疫沈降実験によって、Otx2 と アグレカンは共沈した (図 4A)。これらは視覚野 PNN で共存していた (図 4B)。この関係性は、T1KO では非常に減弱していた (図 4B)。Otx2 の T1KO における集積は、臨界期 (P28-P30) に非常に減弱した (図 4D-E)。細胞内に Otx2 を含有する細胞数も T1KO で減少した (図 4D)。これらの結果は、CS 合成は Otx2 とアグレカンの相互作用に必須だという考えを支持するものである。t-test; ***p < 0.001; ** p < 0.01. Scale bar: 50 μ m.

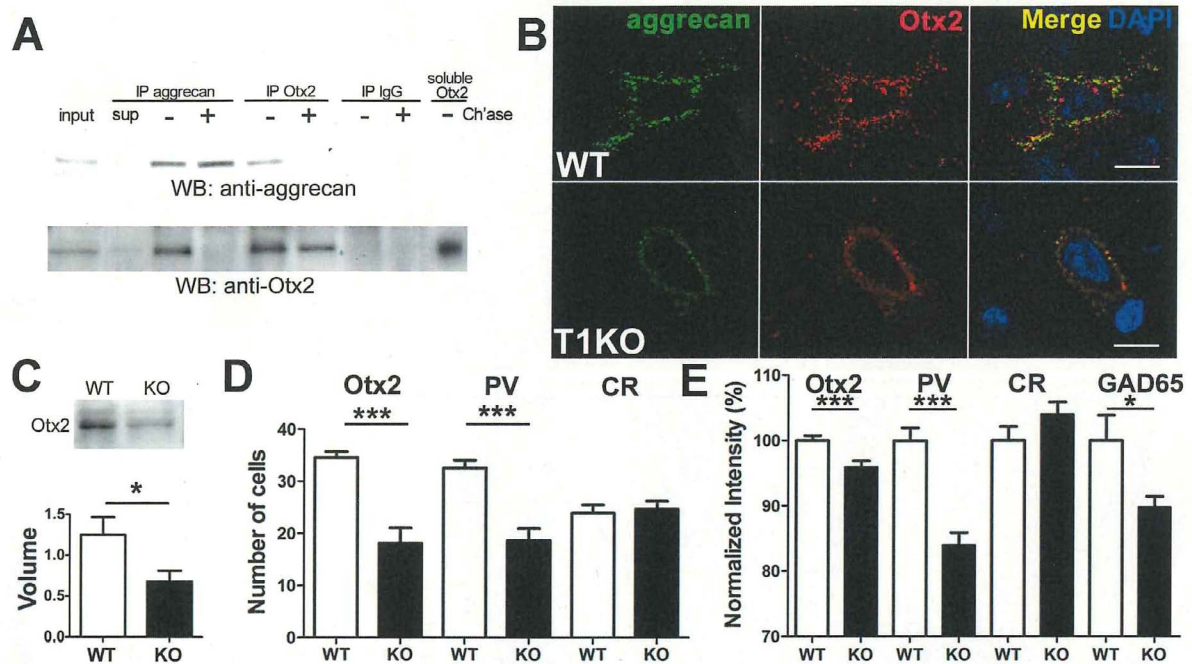


図4. Otx2 の役割

(A) Aggrecan/ Otx2 の共免疫沈像。(B) Otx2 (red) と aggrecan (green) 野共存。(C) Otx2 の T1 KO における減少。(D) Otx2、PV 細胞の T1 KO における減少。(E) Otx2、PV 細胞、Calretinin (CR) 陽性細胞と GAD65 の定量。T1KO での Otx2、PV 細胞、GAD65 が有意に減少した。

考 察

CS は可塑性の停止信号 (ブレーキ) としてのみ働くと思定されていたが、今回の結果で 臨界期の誘発の分子装置であることを証明した。CS の双方向性のこの作用は Otx2 と深く関連し、PV 細胞機能の上昇が生ずることを見出した。すなわち、本研究では T1 が PNN での CS 量を規定して、CSPG を構成する aggrecan も介して Otx2 を取り込み、これが PV 細胞の機能を高めて眼優位可塑性を生ずる、ということを示した。

既に PNN の濃縮は脳内の種々の領域で、T1KO での減弱を認めており、これに基づく行動の異常も明らかにしている。CS 合成が関与する種々の脳高次機能と神経可塑性の分子機構をさらに追究していく。またこのマウスの使用によって、新しい CS 合成代謝経路が見出されつつあり⁴⁾、これらの結果も CS の意義の解明に寄与するものと考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、新潟大学医歯学系の杉山清佳准教授および渡辺裕美助教、愛知医科大学医学部の武内恒成教授、福島県立医科大学医学部の吉岡望助教、神戸薬科大学薬学部の北川裕之教授である。

文 献

- 1) 五十嵐 道弘 (2014) ECM 糖鎖の動的調節機構と臓器機能の危機管理能力. 生体の科学 65: 606-612
- 2) Takeuchi K, Yoshioka N, Higa Onaga S, Watanabe Y, Miyata S, Wada Y, Kudo C, Okada M, Ohko K, Oda K, Sato T, Yokoyama M, Matsushita N, Nakamura M, Okano H, Sakimura K, Kawano H, Kitagawa H, Igarashi M. Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. Nat Commun. 2013;4:2740. doi: 10.1038/ncomms3740. PMID: 24220492.
- 3) Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, Hensch TK. Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. Cell. 2008 Aug 8;134(3):508-20. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.054. PMID: 18692473.

- 4) Izumikawa T, Sato B, Mikami T, Tamura J, Igarashi M, Kitagawa H. GlcUA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl(2-O-phosphate) is the preferred substrate for chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-1. J Biol Chem. 2015 Feb 27;290(9):5438-48. doi: 10.1074/jbc.M114.603266. Epub 2015 Jan 7. PMID: 25568321.