



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

Title	神経細胞死および神経再生における硫酸化糖鎖の役割(内容と審査の要旨(Summary))
Author(s)	長瀬, 春奈
Report No.(Doctoral Degree)	博士(工学) 連創博甲第50号
Issue Date	2020-03-25
Type	博士論文
Version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/79351">http://hdl.handle.net/20.500.12099/79351</a>

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名（本籍）	長瀬 春奈（愛知県）		
学位の種類	博士（工学）		
学位授与番号	甲第 50 号		
学位授与日付	令和 2 年 3 月 25 日		
専攻	創薬科学専攻		
学位論文題目	神経細胞死および神経再生における硫酸化糖鎖の役割 (The role of sulfation of glycosaminoglycans on neuronal cell death and nerve regeneration)		
学位論文審査委員	(主査) 教授	横川 隆志	
	(副査) 教授	丹羽 雅之	
	(副査) 准教授	大橋 憲太郎	
	(副査) 教授	森田 洋子	

### 論文内容の要旨

アルツハイマー病とパーキンソン病は、患者数が最も多い神経変性疾患であり、社会の高齢化が進むにつれ受療率も上昇している。しかし、神経変性疾患を完治させる治療法は未だ確立されておらず、疾患が進行する詳しいメカニズムも解明されてない。それ故、神経脱落における細胞死および細胞保護機構の解明、また神経再生を予測する新規標的分子の同定が求められている。これらの疾患は、進行性の神経変性を特徴としており、酸化ストレスを含む複数の因子が神経細胞死に関与することが示唆されている。硫酸化糖鎖は、細胞外マトリックスの主要な成分であり、神経細胞死において重要な役割を担うとともに、神経再生にも関与することが示唆されている。

本研究では、硫酸化糖鎖の阻害剤である塩素酸ナトリウムおよび $\beta$ -D-xylosideを使用して、マウス海馬由来HT22細胞のグルタミン酸誘導性オキントーシスおよびエラスチン誘導性フェロトーシスなどの内因性酸化ストレスを伴う細胞死に対する硫酸化糖鎖の役割を明らかにした。また、神経再生に関与する硫酸化糖鎖の解析方法を確立し、硫酸化糖鎖結合タンパク質を解析した。

(1) 内因性酸化ストレス誘導性細胞死に対するヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸の役割硫酸化は、細胞外グリカン、タンパク質上のチロシン残基、およびステロイドホルモンにおいて共通の修飾であり、多種多様なシグナル伝達経路で重要な役割を担っている。塩素酸ナトリウムは、細胞の硫酸化反応における高エネルギー硫酸ドナーである 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfateの形成を競合的に阻害する。HT22細胞を塩素酸ナトリウムで処理したところ、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)およびコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)の硫酸化が減少し、グルタミン酸およびエラスチンにより誘導される細胞死が増悪された。また、 $\beta$ -D-xylosideによりHSPGおよびCSPGの生合成を阻害した際にも同様の結果が得られた。

この結果は、細胞外マトリックスの硫酸化糖鎖がオキントーシスおよびフェロトーシスに影響を与えたことを示唆する。さらに、塩素酸ナトリウムは、オキントーシスとフェロトーシスによる細胞死の過程において重要な活性酸素種の産生と $Ca^{2+}$ の流入を促進した。興味深いことに、塩素酸ナトリウムは酸化

ストレスの引き金となるグルタチオン量には影響を及ぼさなかった。ウェスタンブロット解析では、塩素酸ナトリウムがエラスチン誘導性の c-Jun N 末端キナーゼのリン酸化を促進し、細胞ストレス誘導シグナルを優先的に活性化することが明らかとなった。これらの知見は、硫酸化糖鎖が、海馬由来神経細胞株のオキシトシスおよびフェロトシスに対する神経保護の重要な要素であることを示した。

#### (2) マウス脳切片における 硫酸化糖鎖結合タンパク質のプロテオーム解析

CS-A(4硫酸) やCS-E(4,6硫酸)は、軸索再生や損傷のシグナル伝達に関与することが報告されている。神経再生に伴う新規標的分子を探索するために、軸索再生に抑制的または促進的に働く硫酸化糖鎖の解析方法を確立し、マウス脳切片における硫酸化糖鎖結合タンパク質をプロテオーム解析した。まず、糖鎖に対する抗体がIgMであり、バックグラウンドが高くなってしまいう理由で硫酸化糖鎖の評価が困難なことから、硫酸化糖鎖用にウェスタンブロット法を改良した。改良したウェスタンブロット法で検出されたバンドから、CSPGであるプレビカンが検出されたため、抗体のCSPG特異的な結合を確認した。次に、ビオチン化CS-Aをプローブとして利用し、CS-A結合物質のマウス脳内における局在を解析した。その結果、CS-A結合物質は、海馬や小脳の神経細胞に高発現していることが明らかとなった。次に、質量分析によりCS-A結合物質を探索した。その結果、41種類のタンパク質がCS-Aに結合し受容体として機能する可能性を有したタンパク質として検出された。これらの中には、細胞膜や細胞外マトリックスに存在するタンパク質が多く含まれていた。以上の結果より、改良した硫酸化糖鎖用ウェスタンブロット法とビオチン化CS-Aを用いた分析法は、他の硫酸化糖鎖においても解析ツールとして有用であり、神経再生に伴う新規標的分子の発見に貢献することが期待できる。

本研究により、内因性酸化ストレスを伴う神経細胞死に対する硫酸化糖鎖の保護作用が明らかとなり、さらに、神経再生に関連する新規の硫酸化糖鎖結合分子を探索することができた。

### 論文審査結果の要旨

硫酸化糖鎖は、神経再生において重要な役割を担うとともに、神経細胞死にも関与することが示唆されている。硫酸化は、細胞外グリカン、タンパク質上のチロシン残基、およびステロイドホルモンにおいて共通の修飾であり、多種多様なシグナル伝達経路で重要な役割を担っている。マウス海馬由来 HT22 細胞は、グルタミン酸およびエラスチンによって細胞内活性酸素種の増加による細胞死が誘導されるため、神経細胞の内因性酸化ストレスモデルとして広く用いられている。申請者は、硫酸化供与体の生成阻害剤である塩素酸ナトリウムで HT22 細胞を処理したところ、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) およびコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) の硫酸化が減少し、オキシトシスおよびフェロトシスが増悪されることを見出した。また、 $\beta$ -D-xyloside により HSPG および CSPG の生合成を阻害した際にも同様の結果が得られた。これらの結果は、細胞外マトリックスの硫酸化がオキシトシスおよびフェロトシスに影響を与えることを示唆する。さらに、塩素酸ナトリウムは、オキシトシスとフェロトシスによる細胞死の過程において重要な活性酸素種の生成と  $Ca^{2+}$  の流入を促進した。しかし、塩素酸ナトリウムは酸化ストレスの引き金となるグルタチオン量には影響を及ぼさなかった。ウェスタンブロット解析では、塩素酸ナトリウムがエラスチン誘導性の c-Jun N 末端キナーゼのリン酸化を促進し、細胞ストレス誘導シグナルを優先的に活性化することが明らかとなった。これらの知見は、硫酸化糖鎖が、オキシトシスおよびフェロトシスに対する神経保護の重要な標的であることを示している。

コンドロイチン4硫酸やコンドロイチン4,6硫酸は、軸索再生や損傷のシグナル伝達に関与することが報告されている。申請者は、神経変性に伴う新規標的分子を探索するために、軸索再生に抑制的または促進的に働く硫酸化糖鎖の解析方法を確立し、マウス脳切片における硫酸化糖鎖結合タンパク質をプロテオーム解析した。ビオチン化コンドロイチン4硫酸をプローブとして作製し、コンドロイチン4硫酸結合物質のマウス脳内における局在を解析した結果、海馬および小脳の神経細胞に高発現していることを明らかにした。質量分析によるコンドロイチン4硫酸結合物質の探索を行なった結果、41種類のタンパク質がコンドロイチン4硫酸に結合し受容体として機能する可能性が示唆された。今後、コンドロイチン4硫酸結合タンパク質を特徴付けることにより、神経再生を促進する新規化合物の発見に寄与することが期待できる。

本知見は、細胞外マトリックスの主要な成分である硫酸化糖鎖が神経保護的に機能することを証明し、神経再生に関わるコンドロイチン4硫酸結合タンパク質の候補を同定したもので、神経変性疾患の病態解明に貢献することが期待できる。こうした観点より、本論文は学術的価値が極めて高く、博士学位論文に値するものと判定した。

### 最終試験結果の要旨

長瀬春奈さんの学位論文は、細胞外マトリックスの主要な成分である硫酸化糖鎖が神経保護的に機能することを証明し、神経再生に関わるコンドロイチン4硫酸結合タンパク質の候補を同定したものである。審査付き論文としても公表済みで、本論文が学位論文として価値のある内容であることを確認した。公聴会においては、学位論文の内容に関する事項、すなわち、硫酸化糖鎖が細胞外環境に与える影響の詳細、硫酸化糖鎖による内因性酸化ストレス誘導性細胞死抑制作用機構、コンドロイチン4硫酸結合タンパク質による神経再生機構などに関して諮問を行った。申請者からは十分な内容の回答が得られたので、博士（工学）の学位に適するものと判断し、最終試験に合格したと判定した。

### 論文リスト

Nagase H, Katagiri Y, Oh-hashii K, Geller HM, Hirata Y, Reduced sulfation enhanced oxytosis and ferroptosis in mouse hippocampal HT22 cells, Biomolecules 2020, 10, 92.  
【Impact Factor: 4.694, CiteScore: 5.72】