

氏名(本籍)	志田 美春 (大阪府)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博第 42 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 8 日
学位授与の条件	学位規程第 4 条第 1 項該当者
学位論文の題名	高硫酸化コンドロイチン硫酸鎖による神経突起形成機構の解析
論文審査委員	主査 教授 小西 守周 副査 教授 北川 裕之 副査 教授 力武 良行 副査 教授 長谷川 潤

論文内容の要旨

コンドロイチン硫酸 (CS) 鎖は直鎖状の硫酸化糖鎖であり、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として、あらゆる組織の細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在する。近年、CS 鎖は、特有の構造多様性を存分に発揮することにより、様々な生命現象を制御することが矢継ぎ早に報告されており、脚光を浴びている(1,2)。一方で、CS 鎖が多く生命現象を制御する理由は謎に包まれたままである。

特に中枢神経系 (CNS) においては興味深いことに、CS 鎖は、成体期において損傷後の軸索再生を阻害する(3,4)一方で、発生期において神経回路網の形成や神経可塑性の発現・維持に重要な役割を果たしていることが報告されている(4,5)。またこうした CS 鎖の一見矛盾した挙動は、硫酸化パターンの異なる CS 鎖がそれぞれ異なる機能を発揮することに起因する可能性が示唆されている。

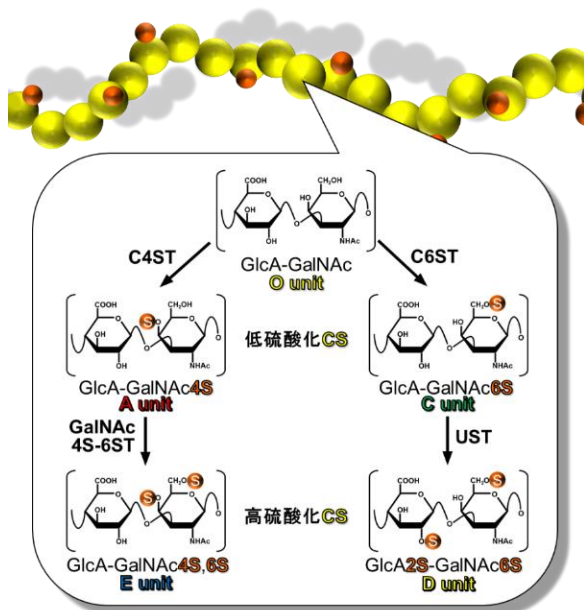


Fig. 1 CS 鎖の主要な二糖単位

CS 鎖は GlcA および GalNAc を構成糖とする二糖単位が直鎖状に数十回ほど重合した構造を基本骨格に有する。CS 鎖の非硫酸化二糖単位である O unit の大半は、C4ST または C6ST によりモノ硫酸化二糖単位である A または C unit に変換され、これらを多量に含有する CS 鎖は低硫酸化 CS と呼ばれる。モノ硫酸化二糖単位の一部は、その後さらに GalNAc4S-6ST または UST によりジ硫酸化二糖単位である E または D unit に変換され、これらを多量に含有する CS 鎖は高硫酸化 CS と呼ばれる。構造中の“S”は硫酸基を示し、2S、4S、6S は、それぞれ 2 位、4 位、6 位のヒドロキシ基が硫酸基に置換された構造を示す。GlcA、グルクロン酸；GalNAc、N-アセチルガラクトサミン；C4ST、コンドロイチン 4-O-硫酸基転移酵素；C6ST、コンドロイチン 6-O-硫酸基転移酵素；GalNAc4S-6ST、N-アセチルガラクトサミン 4-硫酸 6-O-硫酸基転移酵素；UST、ウロノシル 2-O-硫酸基転移酵素。

CS鎖の硫酸化パターンは、二糖単位の構成糖であるグルクロン酸 (GlcA) または *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基における硫酸基の数に基づき、モノ硫酸化二糖単位およびジ硫酸化二糖単位の 2 種類に大別される。さらに、各々硫酸基の位置に基づき、前者は A unit [GlcA-GalNAc(4-O-sulfate)] および C unit [GlcA-GalNAc(6-O-sulfate)]、後者は D unit [GlcA(2-O-sulfate)-GalNAc(6-O-sulfate)] および E unit [GlcA-GalNAc(4,6-O-disulfate)] に小別される(1,6) (Fig. 1)。

これまでに所属研究室を中心とした研究により、ジ硫酸化二糖単位を多量に含有する高硫酸化 CS は、海馬神経細胞に対して顕著な神経突起伸長促進作用を示すことが見出されている(7-9)。対照的に、モノ硫酸化二糖単位を多量に含有する低硫酸化 CS は、成体期の CNS における主要な再生阻害分子として振る舞う(3,4)。つまり、CNS において高硫酸化 CS の生理活性は、低硫酸化 CS の生理活性とは一線を画することから、CNS 疾患領域において、高硫酸化 CS の医療応用に多大なる期待が寄せられている。

この医療応用の実現のためには、高硫酸化 CS の神経突起伸長促進活性における分子機構の解明が喫緊の課題である。現在、この分子機構モデルとして、「サイトカインのリザーバー」および「CS 受容体のリガンド」の 2 つが提唱されている(1,10) (Fig. 2)。これらの分子機構モデルは、高硫酸化 CS の神経突起伸長促進活性のみならず、CS 鎖の多彩な機能を包括的に理解するための分子基盤を探る有効な手がかりとして重要視されている。そこでこれら 2 つの分子機構モデルに着目し、CNS における高硫酸化 CS の神経突起伸長促進活性の分子機構を追究した。

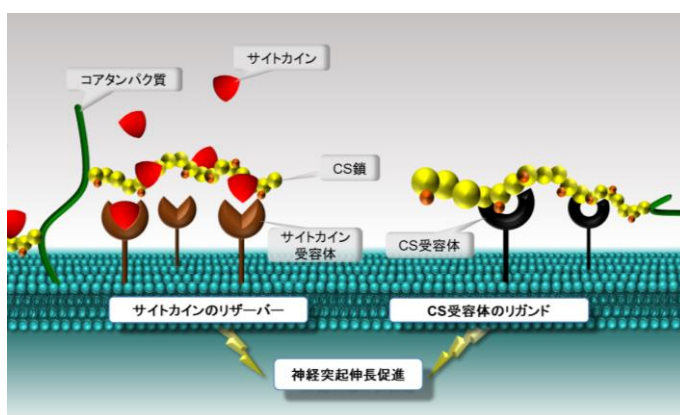


Fig. 2 高硫酸化 CS の神経突起伸長促進活性における 2 種類の分子機構モデル
CS鎖はコアタンパク質に共有結合したプロテオグリカン (PG) として、細胞膜の表面や細胞外マトリックスに存在する。「サイトカインのリザーバー」モデル (左) では、高硫酸化 CS は、分泌された微量のサイトカインを捕獲し、サイトカイン受容体に効果的に提示する。その結果、サイトカインにより制御される生理機能を制御する。一方で、「CS 受容体のリガンド」モデル (右) では、高硫酸化 CS は、細胞膜表面に存在する CS 受容体 (特定の細胞接着分子など) に結合し、細胞内シグナル伝達経路を活性化する。よって、CS 受容体の種類や構成により、神経突起の伸長に対してポジティブあるいはネガティブな応答性を示す。

1. 硫酸化フコース分枝を有する CS 三糖の神経突起伸長促進活性の解析

CNS において高硫酸化 CS の一つである E unit を多量に含有するイカ由来の CS 鎖 (CS-E) は、「サイトカインのリザーバー」として機能することにより、強力な神経突起伸長促進活性を示すことが解明されている(1,6,11,12)。一方で、棘皮動物に由来する特徴的なフコース分枝を有する CS 鎖 (FCS) は、CS-E と同様の CS 鎖骨格を有し、様々な生理活性を示すことが報告されている(13-17)。しかし FCS の活性として、CS-E に特有の神経突起伸長促進活性は見出されていなかった。さらに興味深いことに FCS は、CS 鎖骨格にフコース分枝を有するため、CS 分解酵素であるコンドロイチナーゼ ABC (ChABC) による酵素消化に対して難消化性を示す(18,19)。よって、FCS の新規活性の発現における分子機構の解明により、CS-E を代替する比較的長半減期のシード分子として、

FCS の新たな有用性が見出せると期待された。

本章において著者は、代表的なナマコであり、CS 鎖骨格に E unit を比較的少量に含有するマナマコ *Apostichopus japonicus* 由来の FCS に着目し、本 FCS が CS-E と同様に神経突起伸長促進活性を有することを見出した。さらに、糖鎖の合成オリゴ糖を用いて、CS-E 介在性の神経突起伸長促進活性におけるフコース分枝構造との相関解析、および FCS の神経突起伸長促進活性における最小機能単位の同定を試みた(20)。

1-1. *A. japonicus* 由来 FCS は硫酸化フコース分枝を有する CS-E アナログである

単離精製した *A. japonicus* 由来の FCS の CS 鎖骨格の硫酸化パターンを、市販の CS 鎖標品である CS-C および CS-E と比較分析するために、各々の CS 分解酵素処理により得られた不飽和 CS 二糖単位を蛍光標識し、HPLC で分析した。その結果、注目すべきことに、FCS の CS 鎖骨格に含まれる主要な硫酸化パターンは E unit であり、次いで C unit が多かった。また、FCS の CS 鎖骨格に含まれる E unit の割合は、神経突起伸長活性を示す CS-E と比較すると少なかったが、神経突起伸長活性を示さない CS-C に比べ明らかに多いことから、神経突起伸長促進活性の発現には十分であると考えられた。

1-2. *A. japonicus* 由来 FCS はイカ由来 CS-E と同等の神経突起伸長促進活性を有する

単離精製した FCS の神経突起伸長促進活性を評価するため、FCS、または市販の CS 鎖標品である CS-C および CS-E を、poly-L-ornithine (PLO) コートしたチャンバースライドにコートし、それらの基質上で海馬神経細胞を 24 時間培養したのち、各神経細胞の最長神経突起長を計測した。その結果、*A. japonicus* 由来 FCS 介在性の神経突起伸長促進活性は、イカ軟骨由来 CS-E に匹敵した。これらのことから、*A. japonicus* 由来 FCS は神経突起伸長活性を有する CS-E アナログとして振る舞うだけでなく、その活性の発現において、フコース分枝が E unit の代償的機能を担うと示唆された。

1-3. *A. japonicus* 由来 FCS の神経突起伸長促進活性の最小機能単位は FCS 三糖である

合成オリゴ糖を用いた研究から、CS-E 介在性の神経突起伸長活性発現においては、CS-E 四糖が最小機能単位であることが示されている(21)。よって FCS 介在性の神経突起伸長促進活性において、フコース分枝が E unit の代償的機能を担うと仮定すると、フコース分枝を有する E unit である FCS 三糖が CS-E 四糖と同様に神経突起伸長促進活性を有する最小機能単位であると推定された。よって、仮説の検証のための FCS 三糖として、化学合成した 2,4-O-ジ硫酸化体のフコース分枝を有する E unit (FCS-tri) (22)を用い、まずいくつかのコート濃度における神経突起伸長活性の濃度依存性を解析したところ、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において最大活性を示した。次に 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、FCS-tri および、3 種類の CS オリゴ糖 (CS-C-di, CS-E-di および CS-E-tetra) の神経突起伸長促進活性を比較検討した (Fig. 3 A)。その結果、FCS-tri は、PLO、および *A. japonicus* 由来 FCS の主要構成 CS 二糖単位に相当する CS-C-di および CS-E-di と比較して、有意な神経突起伸長促進活性が認められた。このことから 2,4-O-ジ硫酸化フコース分枝が *A. japonicus* 由来 FCS 介在性の神経突起伸長促進活性における重要構造であり、FCS-tri が FCS の神経突起伸長促進活性の最小機能単位であると

示唆された。さらに、FCS-tri の神経突起伸長促進活性は、CS-E 介在性の神経突起伸長促進活性の最小機能単位である CS-E-tetra と同等であった。これらの知見から、FCS-tri 中の 2,4-O-ジ硫酸化フコース分枝は E unit の機能を模倣していることが明らかとなった。

1-4. FCS-tri 介在性の神経突起伸長促進活性は BDNF シグナル伝達経路を介する

海馬神経細胞における CS-E 介在性の神経突起伸長促進活性は神経栄養因子の一つである BDNF のシグナル伝達経路を活性化することに起因することが報告されている。よって、*A. japonicus* 由来 FCS および FCS-tri 介在性の神経突起伸長促進活性も BDNF シグナル伝達経路の活性化に起因すると期待された。そこで次に、BDNF に対する中和抗体を用い、CS-E および *A. japonicus* 由来 FCS、および各々に対応する合成オリゴ糖である CS-E-tetra および FCS-tri 介在性の神経突起伸長促進活性に及ぼす影響を検討した。

CS-E および *A. japonicus* 由来 FCS、CS-E-tetra、FCS-tri のいずれにおいても、isotype control (ctrl) と比較して抗 BDNF 抗体の添加では、神経突起伸長促進活性が有意に低下した (Fig. 3 B)。このことから、FCS および FCS-tri 介在性の神経突起伸長促進活性は BDNF シグナル伝達経路の活性化を介する可能性が示唆された。

以上の知見から、FCS および FCS-tri は神経突起伸長促進活性を有し、その活性発現は CS-E お

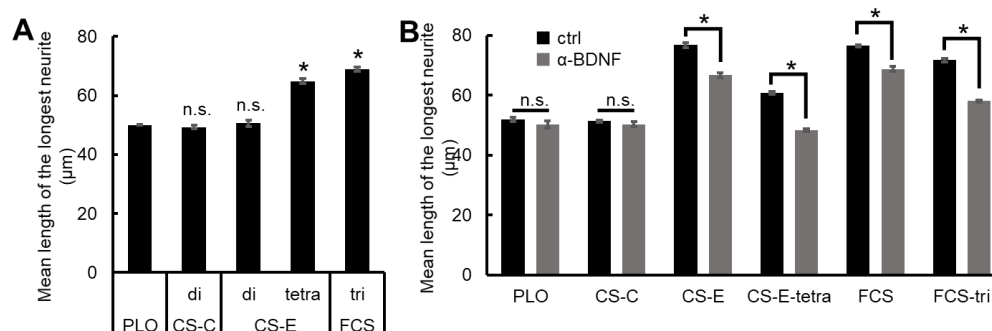


Fig. 3 *A. japonicus* 由来 FCS および FCS-tri の *in vitro* における神経突起伸長促進活性

A. PLO コート上に合成 CS オリゴ糖 (CS-C-di または CS-E-di、CS-E-tetra、FCS-tri) (15 μg/mL) をコートした基質上で、海馬神経細胞を 24 時間培養した。細胞を固定後、Cy3 標識抗 β チューブリン抗体および Hoechst 33342 により海馬神経細胞を染色した。条件ごとに無作為抽出した 50 個以上の神経細胞について最長神経突起長を計測し、その平均値を算出した。(*, $p < 0.01$; $n = 3$; n.s. not significant; 対 PLO; error bar, S.E.M.)。 **B.** 海馬神経細胞播種 2 時間後に抗 BDNF 抗体 (1 μg/mL) または isotype ctrl を添加した。CS 鎖標品 (サメ軟骨由来 CS-C またはイカ軟骨由来 CS-E、*A. japonicus* 由来 FCS) (5 μg/mL) または合成 CS オリゴ糖 (CS-E-tetra または FCS-tri) (15 μg/mL); $n = 5$; 対 ctrl。

よび CS-E 四糖と同様に、BDNF シグナル伝達経路の活性化を介しうると考えられた。

2. CS-D による神経突起伸長の促進機構の解析

CS 鎖の生理機能発現における分子モデルとして、「サイトカインのリザーバー」モデルに加えて、所属研究室では「CS 受容体のリガンド」モデルを新たに提唱している。実際、2009 年に、CNS における促進性の CS 受容体として CNTN-1 を世界に先駆けて同定している(23)。この報告以降、活発な研究により、脊髄損傷において阻害性の CS 受容体が相次いで同定され(24-26)、創薬の標的として注目を集めている。よって、促進性 CS 受容体についても創薬の標的となりうると期待される。しかし、促進性 CS 受容体を介した神経突起伸長促進機構は未解明の部分が多く残されており、

この解明が喫緊の課題である。

面白いことに、海馬神経細胞の形態は足場基質となる高硫酸化 CS の硫酸化パターンに依存する(7-9)。E unit とは硫酸化パターンの異なる D unit を多量に含有する高硫酸化 CS である CS-D は、CS-E とは異なり、比較的短い樹状突起様の神経突起の形成を促進する。さらに CS-D 基質上では、CS-E 基質上と比較して海馬神経細胞の接着性が亢進する様子が観察される(9)。これらのことから、CS-E の受容体である CNTN-1 とは異なり、なおかつ細胞外マトリックス成分と強い接着性をもつ分子が、CS-D の硫酸化パターンを認識し、樹状突起様の神経突起形成を促進する CS 受容体として機能すると推察された。

そこで CS-D に対する新規 CS 受容体の候補分子として、細胞外マトリックス中のタンパク質成分と細胞との接着を担う主要な細胞接着分子であるインテグリン (ITG) ファミリーに着目した。ITG ファミリーは、神経細胞の細胞膜において α 鎖と β 鎖の 2 つのサブユニットから構成されるヘテロ二量体を形成し、細胞内外の架け橋として、細胞外マトリックスに埋め込まれた情報を読み取り、細胞内へ伝達する(27,28)。

これまでに CNS において ITG ファミリーは、*in vivo* および *in vitro* において重要な役割を担うことが示されてきた(29-31)。また神経細胞表面に発現する高硫酸化 CS が ITG シグナルを活性化することも報告されている(32)。よって、高硫酸化 CS による神経突起伸長において、神経細胞表面に発現する特定の ITG が、高硫酸化 CS の受容体として機能する可能性が示唆される。しかし、これまでに CNS において ITG が CS 受容体として機能するという事実を直接的に明らかにした報告は存在しない。そこで著者は ITG ファミリーに着目し、CS-D による神経突起伸長の促進に関与する CS 受容体としての妥当性の検証および責任分子種の同定を試みた。

2-1. CS-D による神経突起伸長の促進は ITG シグナルの活性化に起因する

ITG にリガンドが結合すると、ITG の主要な細胞内シグナル伝達分子である FAK (focal adhesion kinase) の活性化を介して、細胞外マトリックスと細胞間の接着性の亢進、および神経突起の伸長を含む神経細胞分化の促進が誘導される(33)。そこで、各 CS 鎖基質上で培養した海馬神経細胞において、各 CS 鎖基質への接着性および、FAK の活性化体であるリン酸化 FAK (pFAK) の発現動態を免疫染色法により解析した。その結果、CS-D 基質上においては CS-D のコート濃度依存的に pFAK の染色強度が増強した。このことから、CS-D 基質上における海馬神経細胞の接着性の亢進は CS-D により ITG のシグナル伝達分子である FAK の活性化が促進された結果である可能性が示唆された。

興味深いことに、ITG を介した FAK シグナル伝達経路の活性化により、神経突起の伸長を含む神経細胞分化が制御されることが報告されている(34,35)。また、一般に ITG を介して活性化された FAK は、その下流のシグナル分子である Src ファミリーチロシンキナーゼ (Src/Fyn) を活性化する(33)。よって、CS-D 基質上における神経突起伸長の促進についても FAK-Src/Fyn シグナル伝達経路の活性化に起因すると考えられた。そこでこの検証のため、FAK を阻害する Genistein、および Src/Fyn を含むチロシンキナーゼの阻害剤である PP2 を用いて、CS-D による神経突起伸長に及

ばす影響を検討した。

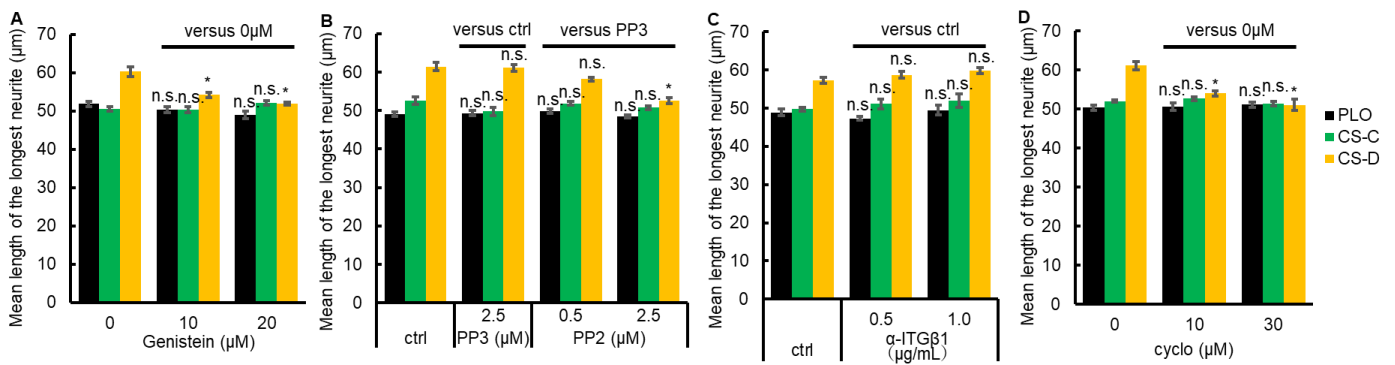


Fig. 4 ITG のシグナルまたは機能の阻害による CS-D の神経突起伸長促進作用への影響
A-D. CS-C または CS-D (5 μg/mL) をコートした基質上で、海馬神経細胞を培養した。**A, B.** 海馬神経細胞を播種する際、培養用培地に FAK 阻害剤である Genistein (**A**)、または Src/Fyn 阻害剤である PP2 または PP2 のネガティブコントロールである PP3 (**B**) を添加した。その後は Fig. 3 の解析と同様の方法で行った。**C, D.** 海馬神経細胞の播種の 2 時間後に α-ITGβ1 (**C**) または cyclo (**D**) を添加し、合計で 24 時間となるように培養した。(n=5; *, p<0.01; n.s. not significant) **A, D.** 対 0 μM。 **B.** PP3 は対 ctrl、PP2 は対 PP3。 **C.** 対 ctrl。

その結果、コントロールである PLO および CS-C 基質上における神経突起伸長は Genistein の添加による影響が認められなかった一方で、CS-D による神経突起伸長の促進は Genistein の濃度依存的に有意に抑制された (Fig. 4 A)。また、PP2 のネガティブコントロールである PP3 と比較して、コントロールである PLO および CS-C 基質上における神経突起伸長は PP2 の添加による影響が認められなかった。一方で、CS-D による神経突起伸長の促進は PP2 の添加により有意に抑制された (Fig. 4 B)。

これらのことから、CS-D による神経突起伸長の促進は FAK-Src/Fyn の活性化を介することが明らかとなった。したがって、海馬神経細胞は細胞表面の ITG を介して CS-D 基質との接着性を亢進させ、主要な ITG のシグナル経路である FAK-Src/Fyn の活性化を誘導することにより、自らの神経突起を伸長させていると考えられた。

2-2. CS-D による神経突起伸長の促進は ITGαVβ3 を介する

神経突起伸長を促進する CS-D 受容体として機能する ITG の構成サブユニットを同定するため、まず、胎生 16 日齢のマウス胎仔由来海馬片において、神経細胞分化に関与する主要な ITG の構成サブユニットの mRNA 発現量を Real-time PCR 法により定量したところ、少なくとも解析したサブユニットの全てが発現していることが判明した。

ここで α 鎖に比べ分子種の少ない β 鎖に着目すると、神経系において、ITGβ1 は複数の α 鎖とヘテロダイマーを形成する一方で、ITGβ3 は ITGαV とのみヘテロダイマーを形成することが知られている(36)。そこで、CS-D 受容体の構成分子として、神経突起伸長を促進する ITG の β 鎖を同定するために、各 β 鎖に対する機能阻害を試みた。ITGβ1 に対してはその中和抗体である α-ITGβ1 を、ITGβ3 に対しては ITGαVβ3 に特異的な阻害ペプチドである cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) を用いた。

ITGβ1については、いずれの条件においても、isotype ctrlと比較してα-ITGβ1の添加による影響が認められなかった (Fig. 4 C)。対照的にITGβ3については、PLOおよびCS-C基質上における神経突起伸長はcycloの添加による影響が認められなかったが、CS-Dによる神経突起伸長の促進はcycloの濃度依存的に有意に抑制された (Fig. 4 D)。これらのことから、CS-Dによる神経突起伸長の促進は主にITGαVβ3を介すると考えられ、ITGαVβ3が神経突起伸長を促進するCS-D受容体として機能するITGである可能性が強く示唆された。

2-3. CS-DはITGαVβ3と親和性を示す

ITGαVβ3のCS-D受容体としての妥当性を検証するために、ITGαVβ3とCS-Dとの相互作用をBIAcoreにより解析したところ、ITGαVβ3はCS-Dと結合親和性を示した。以上のことから、CS-Dによる神経突起形成の促進は、神経細胞表面に発現するITGαVβ3がCS-Dに対する促進性CS受容体として機能し、FAK-Src/Fyn経路の活性化を介して発現されると考えられた。これらの知見はITGが神経細胞に発現するCS受容体として機能することを直接的に示した最初の例である。

2-4. 神経細胞の表面に発現するITGαVβ3はCS-Eの受容体としても機能する

CS-Dとは異なる硫酸化パターンを有する高硫酸化CSであるCS-EについてもCS-Dと同様に解析したところ、CS-EがITGαVβ3のみならず、ITGβ1を含む特定のITG分子種のリガンドとしても機能する可能性を見出した。

以上の結果をまとめると、高硫酸化CSであるCS-DおよびCS-E基質上で誘導促進される固有の神経突起の伸長は、それぞれ異なるITG分子種が固有のCS受容体として機能することに起因する可能性が示唆された。

総括

高硫酸化CSは海馬神経細胞に対して顕著な神経突起伸長促進作用を示すことが見出されているため、CNS疾患領域において、高硫酸化CSの医療応用に多大なる期待が寄せられている。そこで著者は、CS鎖の生理機能発現における2つの分子機構モデルに着目し、CNSにおける高硫酸化CSの神経突起伸長促進活性の分子機構を追究した。

その結果、合成オリゴ糖であるFCS-triは、その2,4-O-ジ硫酸化フコース分枝がE unitの機能を模倣しており、神経突起伸長活性を有するCS-E四糖のアナログとして機能することを見出した。また神経系におけるCS-DおよびCS-Eに対する新規の促進性CS受容体としてITGαVβ3を同定したのみならず、ITGβ1を含む特定のITG分子種がCS-Eに対する促進性CS受容体として機能する可能性も見出した。よって、CS鎖に依存的な生命現象が生じる微小環境は、時空間的にCS鎖の構造多様性およびCS受容体の多彩な組み合わせが絶妙に調和されることにより、織り成されると考えられた。

これらの知見により、CNSにおける高硫酸化CSの医療応用の実現に向けて、一步前進した。また、本研究は高硫酸化CSの神経突起伸長促進活性のみならず、CS鎖の多彩な機能を包括的に理

解するための分子基盤を探る一助となった。

参考文献

- 1) Mikami, T., and Kitagawa, H. (2013) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1830**, 4719-4733. 2) Raman, R., et al. (2005) *Nature Methods* **2**, 817-824. 3) Silver, J., and Miller, J. H. (2004) *Nature Reviews Neuroscience* **5**, 146-156. 4) Fawcett, J. W. (2015) *Progress in Brain Research* **218**, 213-226. 5) Miyata, S., et al. (2012) *Nature Neuroscience* **15**, 414-422. 6) Sugahara, K., et al. (2003) *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 612-620. 7) Nadanaka, S., et al. (1998) *Journal of Biological Chemistry* **273**, 3296-3307. 8) Clement, A. M., et al. (1999) *Neuroscience Letters* **269**, 125-128. 9) Hikino, M., et al. (2003) *Journal of Biological Chemistry* **278**, 43744-43754. 10) Miller, G. M., and Hsieh-Wilson, L. C. (2015) *Experimental Neurology* **274**, 115-125. 11) Nandini, C. D., et al. (2004) *Journal of Biological Chemistry* **279**, 50799-50809. 12) Kitagawa, H. (2014) *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **37**, 1705-1712. 13) Mourão, P. A. S., et al. (1996) *Journal of Biological Chemistry* **271**, 23973-23984. 14) Mourão, P. A. S., et al. (1998) *British Journal of Haematology* **101**, 647-652. 15) Lian, W., et al. (2013) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1830**, 4681-4691. 16) Wu, M., et al. (2015) *European Journal of Medicinal Chemistry* **92**, 257-269. 17) Liu, X., et al. (2016) *Molecules* **21**, 625. 18) Vieira, R. P., and Mourão, P. A. S. (1988) *Journal of Biological Chemistry* **263**, 18176-18183. 19) Vieira, R. P., et al. (1991) *Journal of Biological Chemistry* **266**, 13530-13536. 20) Shida, M., et al. (2017) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **487**, 678-683. 21) Gama, C. I., et al. (2006) *Nature Chemical Biology* **2**, 467-473. 22) Tamura, J., et al. (2013) *Tetrahedron Letters* **54**, 3940-3943. 23) Mikami, T., et al. (2009) *Journal of Biological Chemistry* **284**, 4494-4499. 24) Shen, Y., et al. (2009) *Science* **326**, 592-596. 25) Fisher, D., et al. (2011) *Journal of Neuroscience* **31**, 14051-14066. 26) Dickendesh, T. L., et al. (2012) *Nature Neuroscience* **15**, 703-712. 27) Ruoslahti, E., and Pierschbacher, M. D. (1987) *Science* **238**, 491-498. 28) Hynes, R. O. (1987) *Cell* **48**, 549-554. 29) Clegg, D. O., et al. (2003) *Frontiers in Bioscience* **8**, d723-750. 30) Denda, S., and Reichardt, L. F. (2007) *Methods in Enzymology* **426**, 203-221. 31) Wu, X., and Reddy, D. S. (2012) *Pharmacology & Therapeutics* **134**, 68-81. 32) Nishimura, K., et al. (2010) *Neuroscience* **169**, 1535-1547. 33) Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999) *Science* **285**, 1028-1033. 34) Beggs, H. E., et al. (2003) *Neuron* **40**, 501-514. 35) Robles, E., and Gomez, T. M. (2006) *Nature Neuroscience* **9**, 1274-1283. 36) Anderson, L. R., et al. (2014) *Biophysical Reviews* **6**, 203-213.

論文審査の結果の要旨

コンドロイチン硫酸鎖 (CS) は、グルクロン酸と *N*-アセチルガラクトサミンの二糖単位が直鎖状に重合した構造をもつ。この二糖単位には、1 箇所のヒドロキシ基が硫酸基に置換された低硫酸化 CS (A unit と C unit) と、2 箇所置換された高硫酸化 CS (D unit と E unit) が存在する。高硫酸化 CS は神経細胞に対し神経突起伸長作用を示すことから医療応用が期待されており、本研究は、この作用の分子機構を検討したものである。

まず、硫酸化フコース分枝を有する E unit が多く含まれるマナマコ由来 CS (FCS) に着目し、検討を試みた。この FCS は、E unit を多く含むイカ由来の CS-E 鎖と同等の神経突起伸長作用を有し、また、その最小機能単位がフコース分枝を有する E unit (FCS-tri) であることを明らかにした。さらに、この FCS-tri の神経突起伸長促進作用には、分泌因子 BDNF が必須であることを明らかにした。続いて、D unit を多く含むサメ軟骨由来 CS-D 鎖の神経突起伸長促進作用について、CS-D が直接結合する未知の受容体を介するものと考え、その同定を試みた。その結果、インテグリンの一種 ITGαVβ3 が、高硫酸化 CS の受容体として神経突起伸長作用に重要な役割を果たす可能性を明らかにした。

以上、本研究は、中枢神経系疾患に対する高硫酸化 CS の医療応用に向けて、有効な硫酸化糖鎖の構造およびその作用機構を明らかにしたものである。本研究は、CS の硫酸化の生理的意義の解明に寄与しただけではなく、医学薬学的に重要な学問的価値を有するものと考えられる。

したがって、上記の論文は博士（薬学）論文として、適当と判定する。