

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

2020

長瀬 春奈

目次

第1章 序論

1-1. 神経変性疾患	1
1-2. 酸化ストレス誘導性の細胞死	2
1-3. プロテオグリカンと神経変性疾患	5
1-4. 本研究の目的	11

第2章 マウス海馬由来 HT22 細胞における硫酸化糖鎖阻害のオキシトーシスおよびフェロトーシスに及ぼす影響

2-1. 緒言	12
2-2. 実験材料および実験方法	13
2-3. 結果	16
2-3-1. 塩素酸ナトリウムおよび β -D-xyloside の硫酸化糖鎖に対する阻害効果	
2-3-2. 酸化ストレス誘導性細胞死に対する塩素酸ナトリウムおよび β -D-xyloside の効果	
2-3-3. エラスチン誘導性の細胞内グルタチオンの枯渇、活性酸素腫の産生および Ca^{2+} イオンの流入に対する塩素酸ナトリウムの影響	
2-3-4. 活性酸素種除去剤と鉄キレート剤の塩化ナトリウムが増強するフェロトーシス性の細胞死に対する効果	
2-3-5. エラスチン誘導性の細胞死および抗酸化関連タンパク質に対する塩素酸ナトリウムの作用	
2-4. 考察	25
2-5. 小括	28

第3章 抗コンドロイチン硫酸抗体 CS-56 を使用したウェスタンブロット法の改良によるマウス脳抽出物中のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの同定

3-1. 緒言	30
3-2. 実験材料および実験方法	31
3-3. 結果	35
3-4. 考察	41
3-5. 小括	42

第4章	マウス脳におけるコンドロイチン4硫酸結合タンパク質の探索	
4-1.	緒言	43
4-2.	実験材料および実験方法	43
4-3.	結果	46
4-3-1.	マウス脳切片におけるコンドロイチン4硫酸結合物質の局在解析	
4-3-2.	マウス小脳におけるコンドロイチン4硫酸結合タンパク質のプロテオーム解析	
4-4.	考察	56
4-5.	小括	56
第5章	総括	58
	参考文献	60
	略語一覧	65
	謝辞	66
	発表論文	67

第1章 序論

1-1. 神経変性疾患

神経疾患は、神経細胞群が障害を受けることで認知機能や運動機能が低下する疾患である。神経疾患は急性と慢性に分類される。このうち、外傷や脳血管障害や感染症に起因せず、中枢神経系における特定の神経細胞群が進行的に脱落する神経疾患を神経変性疾患と呼ぶ。中でも、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る。アルツハイマー病は、海馬をはじめとし大脳皮質などにおいてアミロイドβの蓄積やリン酸化τタンパク質の凝集による神経原線維変化、ニューロン間のシナプスの減少が見られ、高齢者の認知症の原因として過半数を占める (Grundke-Iqbal et al., 1986)。パーキンソン病は、中脳の黒質ドーパミン神経細胞の減少による振戦や筋固縮といった運動機能障害が見られるのが特徴である。両者とも、難治性の疾患であるが、明確な治療法は確立されていない。なぜ特定の人の神経細胞群が脱落し、どのような機序で進行が進むのか詳しいメカニズムは明らかではない。アルツハイマー病で発症する認知症においても、どのような神経細胞死機構により進行するのかは不明である。高齢者に多く見られる疾患であることから、加齢そのものがリスクとなっていることが考えられる。日本の主な傷病のうち、アルツハイマー病の受療率は近年、顕著に上昇している (図1)。

神経変性疾患の治療を向上させるためには、早期診断技術の向上や医療ケアを充実させることはもちろんだが、疾患原因を解明し病態の本質を知ることが必要不可欠である。神経変性に至る特定段階を阻止するために、神経脱落における細胞死および細胞保護機構の解明や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。

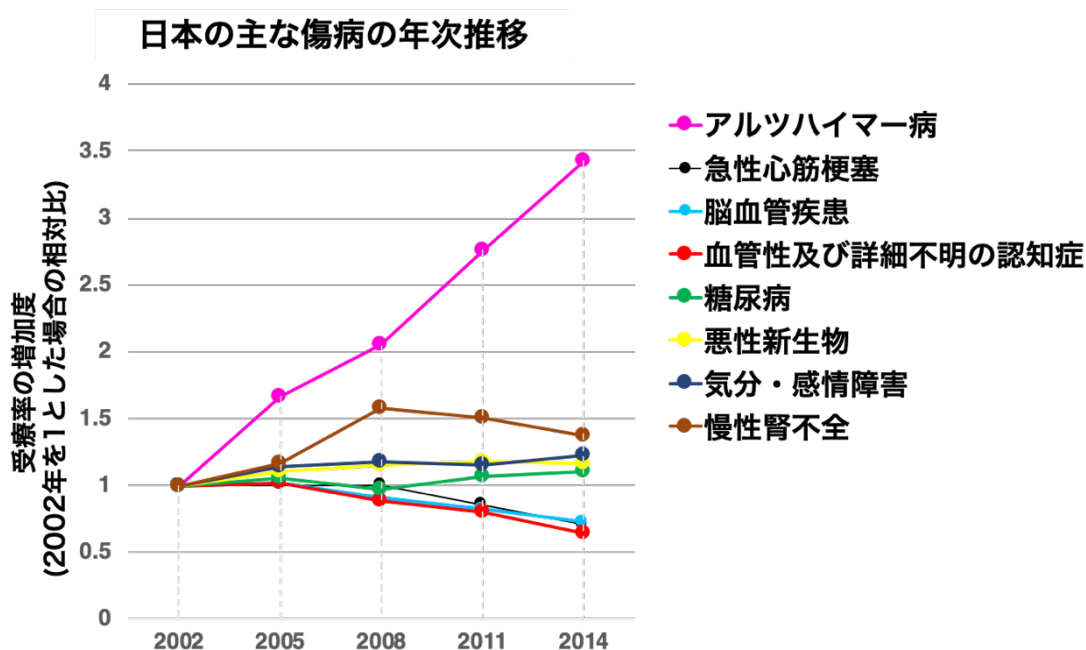


図 1. 平成 14 年～平成 26 年傷病の受療率 (人口 10 万対) の年次推移。厚生労働省 平成 29 年患者調査より引用・再編成した。縦軸は、受療率の増加度 (2002 年を 1 とした場合の相対比)、横軸は、2002 年から 3 年ごとの年代を示している。

1-2. 酸化ストレス誘導性の細胞死

酸化ストレスとは、酸化力が抗酸化力を上回ることによって、生体内の抗酸化防御機構のバランスが乱れた状態を指す (図 2)。酸化力は、生体内で産生されるスーパーオキシドアニオン、ヒドロキシラジカル、過酸化水素、一重項酸素などの活性酸素種による酸化反応を指す。活性酸素種は、呼吸による酸素消費で常に産生される他、殺菌作用を有する免疫機能や細胞シグナル伝達物質、細胞の分化、アポトーシスなどのメディエーターとして働いている。ストレス、環境汚染による化学物質への曝露、激しい運動、放射線や紫外線、また飲酒や喫煙などによって活性酸素種が過剰となると、活性酸素種による酸化反応すなわち酸化ストレスが亢進してしまう。過剰な活性酸素種産生は細胞を傷害し、がん、心血管疾患、生活習慣病、さらには、神経変性疾患など様々な疾患をもたらす。体内の臓器の中で最も酸素の消費量が多い脳では、活性酸素種が発生するリスクも高く、酸化ストレスを受けやすい組織といえる (Cheignon et al., 2018)。一方で、生体内には、還元反応により活性酸素種を消去する抗酸化力を有する酵素や抗酸化物質がある。抗酸化酵素としては、過酸化水素と脂質ペルオキシドを水とヒドロキシル基にそれぞれ還元

するグルタチオンペルオキシダーゼ (glutathione peroxidase, GPx)、脂質ペルオキシドをヒドロキシル基に還元するグルタチオン S-トランスフェラーゼ (glutathione S-transferase: GST)、スーパーオキシドを消去するスーパーオキシドジスムターゼ、過酸化水素を除去するカタラーゼなどが挙げられる。抗酸化物質としては、ビタミン類、カロテノイド類、ポリフェノール類があり、これらは食物から摂取することができる。グルタチオンは、三つのアミノ酸 (γ -Glu-Cys-Gly) からなる主要な内在性抗酸化物質で、生体内には 0.5~10 mM と高濃度で存在する。

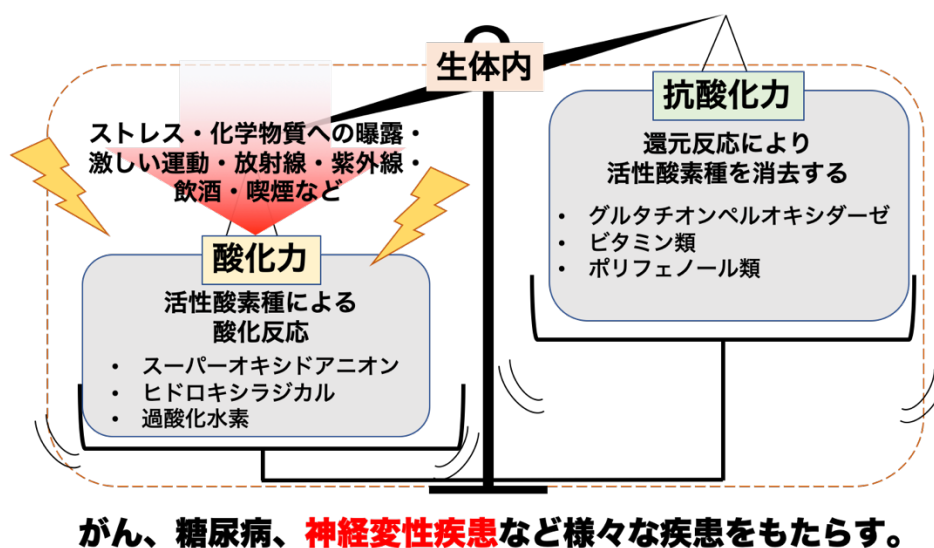


図 2. 生体内における酸化ストレス。

グルタチオンは、主に二つの作用を有する。一つは、GPx や GST の補酵素としての働きである。細胞内外の求電子的な化合物に対してジスルフィド結合形成し、解毒代謝する働きで、グルタチオン抱合と呼ばれる。もう一つは、前述の抗酸化作用である。過酸化水素や過酸化脂質などの活性酸素種を自身のチオール基 (SH 基) を用いて還元除去する作用である。これらの作用は、細胞死や細胞のがん化、さらに老化を防御するといった効果がある。グルタチオンは、中枢神経系においても主要なラジカルスカベンジャーであることから、その枯渇が神経変性疾患の要因とされている。抗酸化物質であるグルタチオンが枯渇すると、細胞内解毒作用のバランスが崩れ、酸化ストレスにより神経細胞死が生じる。実際に、神経細胞内のグルタチオンを減少させると神経変性が起こることや、パーキンソン病患者では、中脳黒質でグルタチオンが減少していることが知られている。また、アルツハイマー病患者の脳においても、酸化ストレスの亢進とグルタチオンの減少が報告されている (Adams et al., 1991)。

システム Xc^- は、 Na^+ 非依存性の交換輸送系のシスチン/グルタミン酸アンチポーターであり、シスチンとグルタミン酸のみを輸送基質とし、細胞内のグルタミン酸を放出する代わりに、細胞内にシスチンを 1:1 の割合で取り込む。細胞内に取り込まれたシスチンは還元されてシステインとなり、グルタチオン合成に利用される。

細胞外の高濃度グルタミン酸は、細胞外のグルタミン酸を増やすことによりシスチンの取り込みを妨げ、グルタチオン枯渇を引き起こす。一方で、生理的濃度のグルタミン酸は神経伝達物質として働き、正常な高次脳機能である認知、記憶・学習、社会性などに関与している。グルタミン酸が過剰に存在すると、神経毒となり、急性・慢性神経疾患へと至る。すなわち、神経細胞では、グルタミン酸は酸化ストレスだけでなく N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を介した興奮毒性も誘導する。HT22 細胞は、不死化したマウス海馬由来の細胞株であるが、NMDA 受容体のようなイオンチャンネル型グルタミン酸受容体を発現していないため、グルタミン酸受容体によって引き起こされる細胞死を排除できる (Maher and Davis, 1996; Dargusch and Schubert, 2002)。以上のことから、HT22 細胞は酸化ストレス研究用の *in vitro* モデルとして広く使用されている。

酸化ストレス誘導性の細胞死には、オキシトーシスやフェロトーシスなどが報告されている (図 3)。これらは、アポトーシスとは異なる新規の細胞死機構で、カスパーゼの活性化に依存しないという特徴がある。オキシトーシスとフェロトーシスは、両者ともシステム Xc^- の阻害による細胞内グルタチオンの枯渇によって、フェントン反応で発生した活性酸素種を原因とする脂質ラジカルが GPx4 により還元されず、細胞内に蓄積した結果、細胞死が誘導される (Xie et al., 2016; Stockwell et al., 2017; Lewerenz et al., 2018; McNally et al., 2007)。内因性の酸化ストレス誘導性細胞死はエラスチンやグルタミン酸により誘導される。エラスチンおよびグルタミン酸は、シスチンの取り込みを阻害し、グルタチオンの枯渇、活性酸素種の蓄積、カルシウムイオンの流入を引き起こし、細胞死へと至る。また、鉄イオンを介した脂質過酸化物のヒドロキシル基への無害化が阻害され、脂質過酸化物の蓄積が起きることでも、細胞死が誘導される。フェロトーシス/オキシトーシスと分けた表記をしているが、両者とも、シスチンの取り込みが阻害されることで細胞死が誘導されるため機構はほとんど同じで、誘導する試薬により、エラスチンで誘導される細胞死はフェロトーシス、グルタミン酸で誘導される細胞死はオキシトーシスとそれぞれ名付けられている。

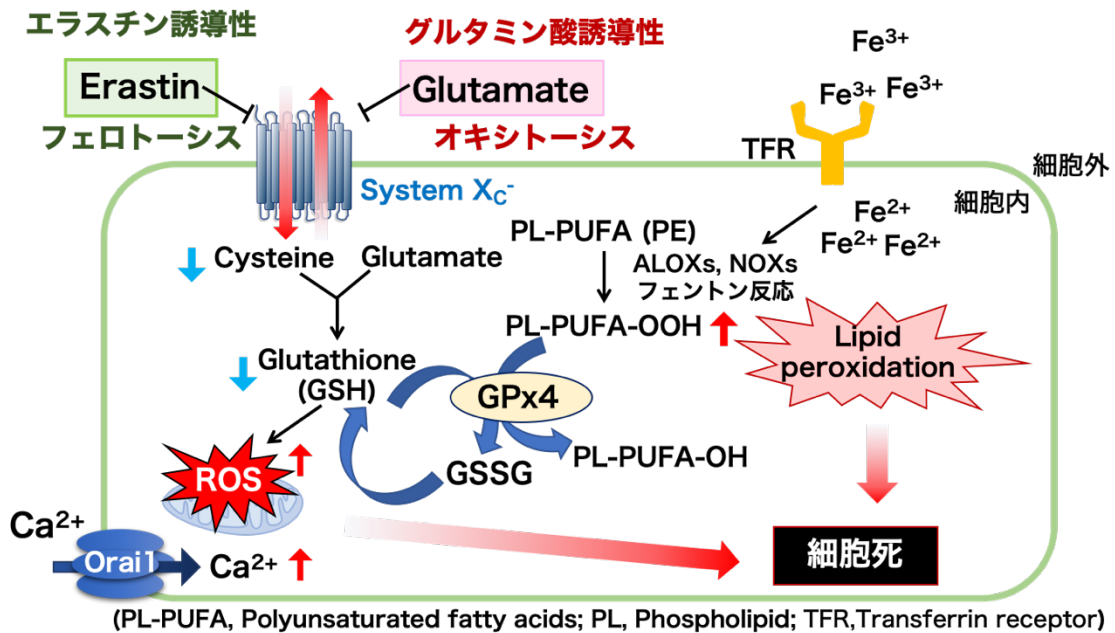


図 3. 内因性酸化ストレスが誘導する細胞死。

(PL-PUFA, Polyunsaturated fatty acids; PL, Phospholipid)

1-3. プロテオグリカンと神経変性疾患

糖鎖の生物学的活性

生体のタンパク質は小胞体で合成され、ゴルジ体でグリコシル化によって糖鎖が付与されている。付与された糖鎖は、プロテアーゼによりタンパク質が分解されるのを防ぐことや小胞体におけるタンパク質の品質管理を担っている。糖鎖は細胞膜を構成する脂質やタンパク質にも結合し生物活性を修飾する。例えば、糖脂質は特に脳や脊髄の神経組織の細胞膜の表面に多く存在し、細胞同士の認識や生理活性物質のレセプターとして働いている。細胞表面に存在する糖鎖は、情報伝達物質を保持し細胞間の情報交換役として働いている。そのため、細菌やウイルスへの感染、神経線維の伸長、精子形成、受精、炎症や免疫などにに関わり、多くの疾患に関わっている (図 4)。糖鎖の合成、構造および機能解明は、日本のみならずアメリカ、ヨーロッパにおいても国家プロジェクトとして取り組まれている。

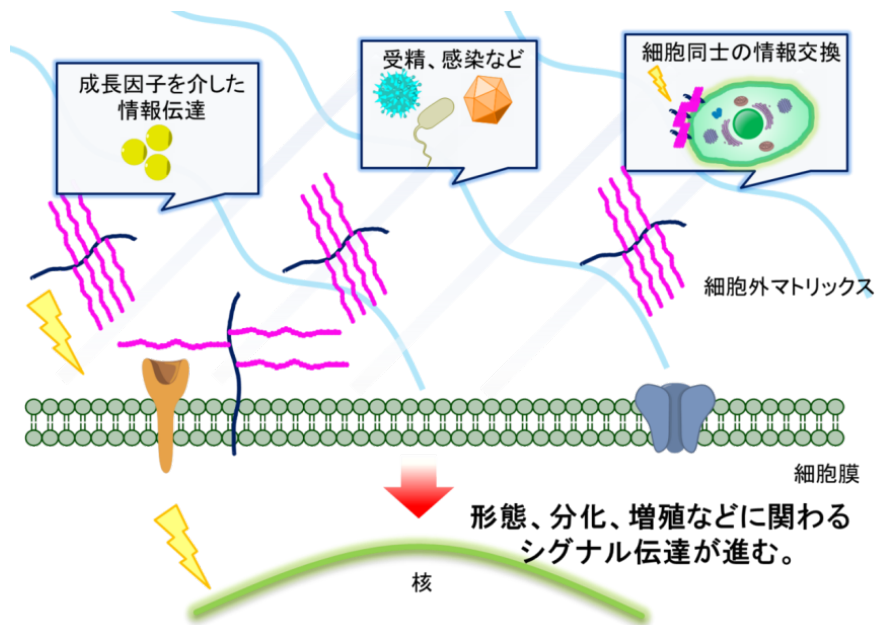


図 4. プロテオグリカンの生物学的活性。

(愛知医科大学分子医科学研究所 HP より改変)

糖鎖構造とプロテオグリカン

糖鎖は同じ種類の単糖からなるホモ多糖と異なった種類の単糖からなるヘテロ多糖がある。2-10 単位連なった糖はオリゴ糖と呼ばれ、10-100 単位もしくはそれ以上連なった糖鎖はグリカンと呼ばれ、グリカンの中でも特に枝分かれのない二糖繰り返し単位から構成される長鎖の糖をグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan, GAG) という。

タンパク質に結合している糖鎖は、*N*-結合型糖鎖と *O*-結合型糖鎖に分類される。*N*-結合型糖鎖は、アスパラギン (Asn) 側鎖のアミドに *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が β 結合している。一方、*O*-結合型糖鎖は、スレオニン (Thr) やセリン (Ser) 側鎖の水酸基に糖が結合しているものを指す。GAG は、グルクロン酸 (GlcA)、2 つのガラクトース (Gal)、そしてキシロース (Xyl) からなる四糖リンカーによってコアタンパク質のセリン残基 (Ser) に *O*-結合型糖鎖の形で結合し、(GAG (n)–GlcA–Gal–Gal–Xyl–Ser–Core Protein) のような構造をとっている (図 5)。

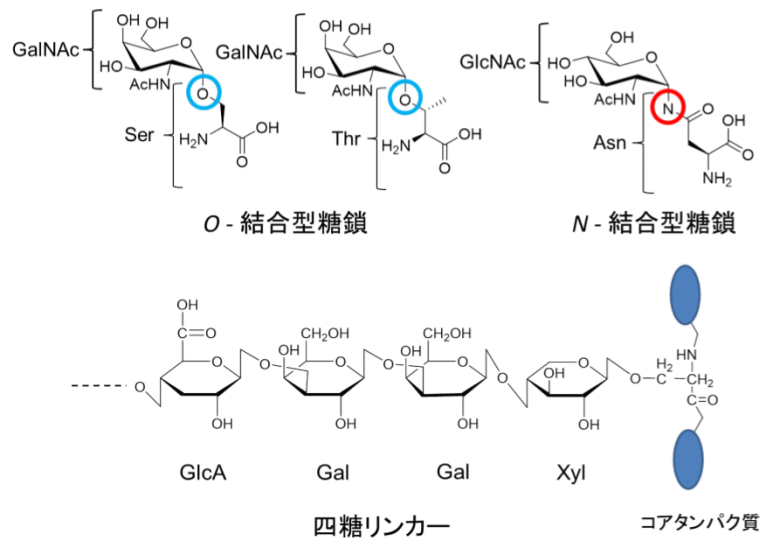
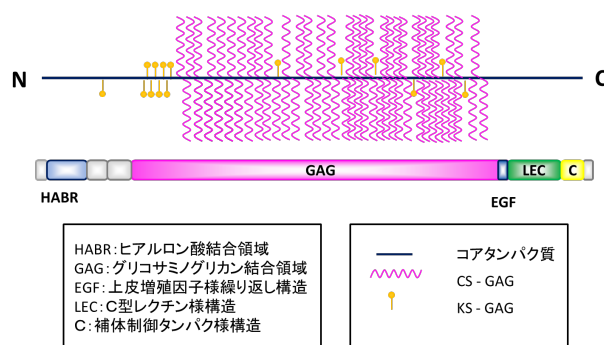


図 5. O-結合型糖鎖、N-結合型糖鎖と四糖リンカーの構造。

細胞表面や細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) は細胞を支える働きがあり、プロテオグリカンも ECM 構成因子の一つである。プロテオグリカンは GAG とコアタンパク質から成る。糖鎖修飾されたタンパク質は広義で糖タンパク質と呼ばれるが、プロテオグリカンは糖鎖構造が特徴的で、その特徴が一般的な糖タンパク質には見られないため、歴史的に区別されている。プロテオグリカンの構造の中心にあるタンパク質はコアタンパク質と呼ばれ、ECM の様々な分子と結合する。コアタンパク質は N 末端側にヒアルロン酸やリンクプロテインとの結合領域を持ち、C 末端側にレクチン様領域や上皮成長因子 (EGF) 様領域を持つ (図 6)。この性質により、プロテオグリカンは、様々な物質との結合や会合により、それぞれの組織にあった構造を築くことができる。プロテオグリカンを構成する GAG は主に硫酸化を受ける。その GAG の種類によって、ヘパラン硫酸 (HS)、コンドロイチン硫酸 (CS)、デルマタン硫酸 (DS)、ケラタン硫酸 (KS) の 4 種類に分類される (図 6)。代表的なプロテオグリカンとして、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) とヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) が挙げられる。CSPG と HSPG はコアタンパク質の Ser から伸長した四糖リンカーに続く O-結合型糖鎖を有している。CS-GAG は、硫酸化した GalNAc と GlcA の繰り返し構造を有しており、軟骨や脳、心膜弁に存在する。HS-GAG は硫酸化した GlcNAc と GlcA の繰り返し構造を有しており、ほぼ全ての細胞表面に存在し、最もよく研究されているプロテオグリカンである。

四糖リンカー構造の隣に GlcNAc が結合した場合の GAG は、ヘパリンか HS のいずれかになり、GalNAc が結合した場合の GAG は、CS か DS のいずれかとなる。ECM の構成因子であるプロテオグリカンには細胞の接着・増殖・維持に関わるリガンドや受容体と結合する。例えば、血管新生、創傷治癒、胚発生に関係する線維芽細胞増殖因子 (FGF) は、成長因子の一種であり、細胞や組織の増殖や分化の過程において重要な役割を果たす。FGF のシグナル伝達には細胞表面の HSPG との相互作用が必要不可欠であることが明らかになっている (Lin et al., 1999)。これらの相互作用には、硫酸基の電荷が関与することが示唆されているが、プロテオグリカン硫酸基の神経細胞保護における役割については不明である。



GAG	発現部位	糖組成
コンドロイチン硫酸	軟骨、骨、脳、心膜弁	GlcA-GalNAc
ヘパリン硫酸	基底膜、細胞表面	GlcA-GlcNAc
デルマトン硫酸	皮膚、血管、心膜弁	IdoA-GalNAc
ケラタン硫酸	角膜、骨、軟骨	Gal-GlcNAc

図 6. プロテオグリカンの分布と構造。

コンドロイチン硫酸プロテオグリカン

CS-GAG は、硫酸基の位置によってコンドロイチン硫酸 A から E まで分類される (図 7)。前述したように CSPG は軟骨成分として存在し、糖鎖の部分が大量の水分を保持することで関節がスムーズに動くことを助けている。最近の研究で、コンドロイチン硫酸はシグナル伝達に関わる分子であることがわかっている。中でも 4S の硫酸基を有する CS-A や CS-E の構造がシグナル伝達に関わっているとされ、例えば、中枢神経系の再生を抑制することが挙げられる。中枢神経系が損傷を受けると、CSPG は中枢神経系損

傷の後、損傷部位に集結するアストロサイトから分泌され、軸索再生が阻害されてしまう (McKeon et al., 1995)。糖鎖を分解する酵素であるコンドロイチナーゼ ABC (ChABC) を損傷部位に注入することで神経再生が促され、機能回復が見られることから、生理活性は糖鎖にある (図 8) と考えられている (Bradbury et al., 2002)。CSPG が軸索伸長に対して抑制的に働くことは、一般的に知られていることであるが、その一方で、神経を保護する機能を持ち合わせていることや、海馬神経細胞においては神経突起伸長に促進的な効果を示すことも報告されている (三上ら、2011)。

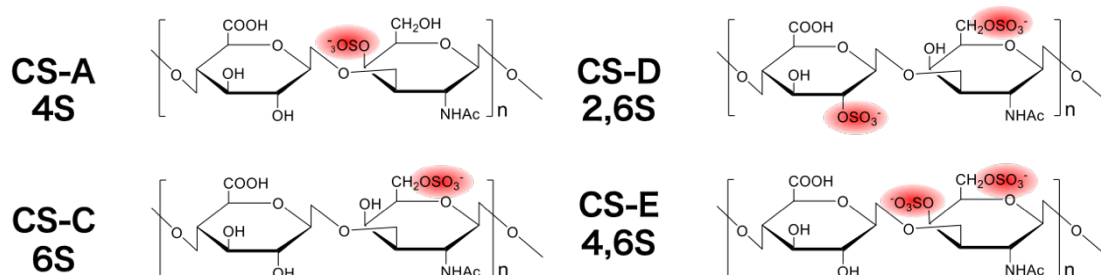


図 7. CS-GAG の構造。

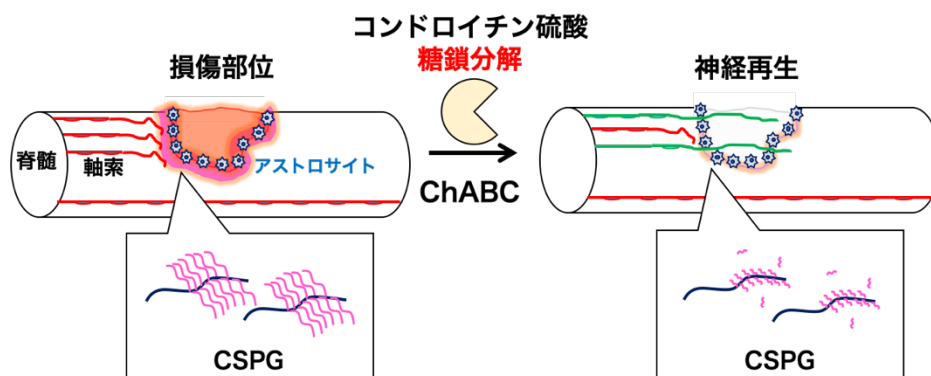


図 8. コンドロイチナーゼ ABC 処理による神経軸索再生。

糖鎖認識抗体

CSPG 糖鎖認識モノクローナル抗体 (CS-56)

抗体は抗原への特異性の高さから、抗原抗体反応を利用した免疫組織化学染色、ウェスタンブロット、ELISA 法などの様々な実験で使用されている。プロテオグリカンを認識する抗体は、コアタンパク質を認識する抗体と糖鎖部分を認識する抗体の 2 種類が存在する。プロテオグリカンの研究においては、糖鎖分解酵素による糖鎖消化によって細胞挙動変化を評価する実験も重要であり、この研究はコアタンパク質認識抗体だけでは評価できないため糖鎖認識抗体はプロテオグリカン研究において必要不可欠である。コ

アタンパク質認識抗体と比較した糖鎖認識抗体の利点としては、同種の糖鎖を有するプロテオグリカンと同時に検出できる点が挙げられる。CSPGの糖鎖認識抗体として市販されているCS-56は、CSPGのCS鎖をエピトープとするモノクローナル抗体で、主にGlcAの2位とGalNAcの6位に2つ硫酸基がついたもの、加えてGalNAcの6位に1つ硫酸基がついたものを認識する(図9)。CS-56は、1980年代からCSPGをターゲットとした多くの研究で汎用されている(Avnur and Geiger, 1984)。CS-56は最もスタンダードな糖鎖認識抗体のうちの1つであるが、抗体のアイソタイプがIgMであり、一般的なIgGに比べて取り扱いが難しい。加えて、糖鎖がDNAを鋳型にしていなかったり硫酸基の位置による多様性も操作の煩雑化の要因として挙げられる。CS-56を免疫染色へ応用するプロトコルは確立されているものの、ウェスタンブロットでは再現性の高い実験遂行が難しいようで、これまで報告された論文においても、一貫性の無い結果が見られる。

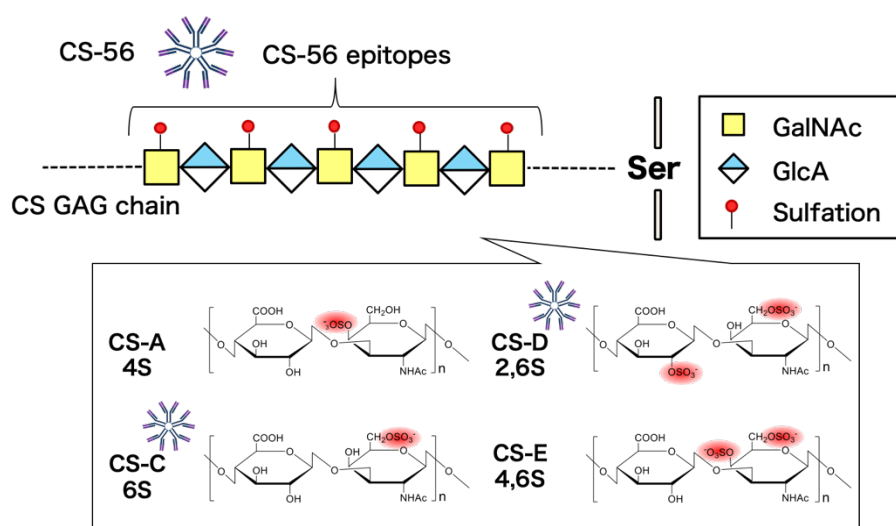


図9. CSPG糖鎖認識モノクローナル抗体 (CS-56)。

CSPG 酵素処理後糖鎖認識モノクローナル抗体 (Mab2030)

CSPGのCS鎖は分解酵素処理によって消化される。ChABCはCS-A、CS-B、CS-Cを分解する酵素である。ChABC処理により切断された糖の末端には二重結合が生成する。Mab2030は、還元末端の隣のGalNAcが4位に硫酸基を有する場合のCS-GAGを認識するStub抗体(Yi et al., 2012)であり、ChABC処理の確認のために広く使用されている(図10)。

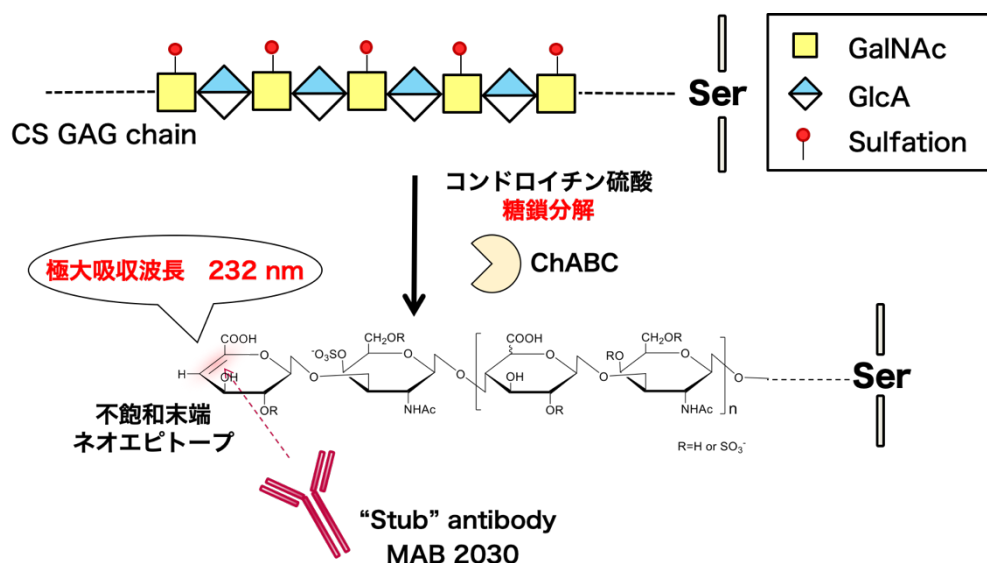


図 10. CSPG 酵素処理後糖鎖認識モノクローナル抗体 (Mab2030)。

1-4. 本研究の目的

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要因が神経細胞死に関与することが示唆されている。また、硫酸化糖鎖は、ECM 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 4-methylumbelliferyl- β -D-xylopyranoside (β -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シ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おけ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。

第2章 マウス海馬由来 HT22 細胞における硫酸化糖鎖阻害のオキシトーシスおよびフェロトーシスに及ぼす影響

2-1. 緒言

我々を含む多数の研究グループは、さまざまな天然および合成化合物がグルタミン酸による内因性酸化ストレスを抑制することを報告した (Ishige et al., 2001; Aoun et al., 2003; Hirata et al., 2018)。これらの化合物は主に、細胞内における活性酸素種の産生と蓄積を標的としている。

一方で、GAG 特に HS および CS の抗酸化特性が証明されており (Lin et al., 1999; Kurucz et al., 2018)、細胞外における酸化的損傷を軽減する可能性がある (Campo et al., 2004; Dudas et al., 2008)。これは、主に細胞表面または ECM に存在する GAG の硫酸イオンが高度に負に帯電した構造をもたらすためであり、様々な陽イオンがこの細胞の微小環境にトラップされ、酸化ストレスに対する神経保護作用を示すと考えることができる (Suttkus et al., 2012)。

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などの一般的な修飾であり、多種多様なシグナル伝達経路で重要な働きを担うと考えられている。塩素酸ナトリウムは、塩素酸イオンの構造が硫酸イオンとよく似ているため、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'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸の形成を競合的に阻害する (図 11, Costa et al., 2017)。GAG は高度に硫酸化した生体分子であるため、塩素酸ナトリウムは、HS や CS などの硫酸化糖鎖の阻害剤としても広く使用されている (図 11, Costa et al., 2017)。一方で、4-methylumbelliferyl- β -D-xylopyranoside (β -D-xyloside) は、四糖リンカーの初めのキシロースのアナログであり、HSPG と CSPG における糖伸長を阻害する。

本章では、硫酸化糖鎖の阻害剤である塩素酸ナトリウムおよび β -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シ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おける硫酸化糖鎖の役割を明らかにした。実験で使用したマウス海馬由来 HT22 細胞は、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体などのイオンチャネル型グルタミン酸受容体を発現していないことから、興奮毒性による影響を排除することができる (Maher and Davis, 1996; Dargusch and Schubert, 2002)。HT22 細胞では、細胞外の過剰なグルタミン酸またはエラスチンがシスチン/グルタミン酸アンチポーターを阻害し、細胞内システインを枯渇させ、グルタチオン含有量の減少と活性酸素種の蓄積を引き起こし (McNally, 2007)、酸化ストレス誘導性細胞死またはオキシトーシス/フェロトーシへと至ることが既に報告されている (Maher et al., 1996; Stockwell et al., 2017; Tan et al., 2001; Murphy et al., 1989)。

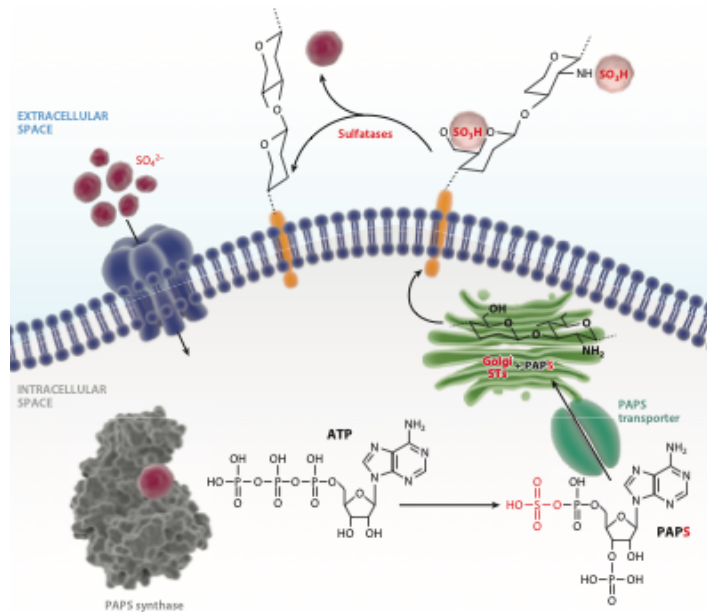


図 11. 細胞内硫酸化機構。(Costa et al., 2017 より引用)

2-2. 実験材料および実験方法

HT22 細胞の細胞培養

マウス海馬 HT22 不死化細胞株 (RRID: CVCL_0321) は David Schubert 博士 (The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, USA) より供与された。HT22 細胞は、5% fetal bovine serum (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA, Cat# SH30406.02) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; FUJIFILIM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan, Cat# 041-29775) 中で 37°C、5% CO₂ 下で培養した。

WST-1 試薬による細胞生存率の測定

テトラゾリウム塩還元型発色試薬 3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium (WST-1) (Cell counting Kit, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan, Cat# CK01) を用いて、塩素酸ナトリウム処理後の細胞生存率を測定した。テトラゾリウム塩は、ミトコンドリアの呼吸鎖に存在するコハク酸塩テトラゾリウム還元酵素の補酵素である NADH から電子キャリアである 1-methoxy PMS を介して電子を受け取ることで還元され、水溶性のホルマザン色素に分解される。この酵素は生細胞のみで活性があるため生存率を測定することができる。HT22 細胞 ($4.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$) を 96-well plate に播種し、一晚培養後、塩素酸ナトリウムで 24 時間もしくは 48 時間処理した。培養培地を 500 nM WST-1 を含有

した培地に置き換え、37°C, 5% CO₂ の条件下で 2 時間インキュベートした後、450 nm/690 nm における吸光度を測定した。

免疫蛍光染色法および画像解析

塩素酸ナトリウム (FUJIFILIM Wako Pure Chemical, Cat# 193-01642) 処理および β -D-xyloside による硫酸化糖鎖の変化を観察するために、HT22 細胞を抗 HS 抗体の 10E4 モノクローナル抗体 (1:250; mouse monoclonal, AMSBIO, MA, U.S.A., Cat# 370255, RRID:AB_10891554) もしくは、抗 C6S, C2, 4S 抗体の CS-56 モノクローナル抗体 (1:100; mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, MA, U.S.A., Cat# C8035, RRID:AB_476879) を用いて染色した。HT22 細胞 ($2.0 \times 10^4/\text{cm}^2$) を 24-well plate に播種して一晩培養した。塩素酸ナトリウムを任意の濃度で加え、24 時間処理した。 β -D-Xyloside の場合は、フラスコ内で β -D-xyloside の存在または非存在下で細胞を 2 日間培養した後、同様の条件で培養した。細胞を 4%パラホルムアルデヒド (PFA)/リン酸緩衝食塩水 (PBS) で 15 分間固定し、PBS で洗浄後、非特異的な結合を 2.5% BSA/PBS を用い常温で 1 時間ブロッキングした。その後、HT22 細胞を 1 次抗体の希釈溶液中に 4°C で一晩浸した。この時、10E4 の希釈液には 1% BSA/PBS、CCS-56 の希釈液には Can Get Signal solution[®] B (TOYOBO, Osaka, Japan, Cat# NKB-401) を用いた。PBS で洗浄後、IgM-FITC (fluorescein isothiocyanate) (1:250; Jackson immunoresearch, PA, USA) の希釈溶液中に 4°C で一晩浸した。この時、10E4 の希釈液には、2.5% BSA/PBS、CS-56 の希釈液には、Can Get Signal solution[®] B を使用した。PBS で洗浄後、PBS で希釈した 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33258 (Molecular Probes, OR, U.S.A.) により核を染色した。PBS で洗浄後、細胞の画像を BZ-X800 (Keyence, Osaka, Japan) を使用し取得した。画像の解析には、解析アプリケーションである BZ-X Analyzer (Keyence) を使用した。

LDH アッセイによる細胞死率の測定

HT22 細胞を $4.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ となるように 48-well plate に播種した。コントロールもしくは、塩素酸ナトリウム存在下で 5 mM グルタミン酸もしくは 0.2 μM エラスチンにより 24 時間刺激した。培養液の一部を測定用サンプルとして回収後、最終濃度が 1%となるように Triton[™] X-100 を加え、15 分間、400 rpm の条件で攪拌し、細胞溶解液の総 LDH を計測するためのサンプルとして採取した。50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、Solution 1、Solution 2 を混合した測定用試薬溶液を 90 μL 添加し、室温、遮光下にてシェーカーで攪拌しながら 30 分間反応させた後、プレートリーダーで 492 nm と 620 nm の吸光度を測定した。

細胞内グルタチオンの定量

HT22 細胞 ($2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$) を 6-well plate で培養し、塩素酸ナトリウム (20 mM) の存在下または非存在下で、エラスチン (0.2 μM) で 7 時間共処理した。氷上で冷却 PBS を使用して細胞を収集し、遠心分離した。細胞ペレットを 120 μL の 0.1 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 8.0) -5 mM EDTA に再懸濁し、4 倍量の 25% (w/v) メタリン酸を加えて除タンパクした。懸濁液を 15,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離した後、上清を測定用サンプルとした。遠心分離後の細胞ペレットは、0.2 M NaOH を 75 μL 添加することにより変性タンパク質を溶解し、タンパク定量に使用した。蛍光測定用 96-well black plate にサンプルまたは standard (グルタチオン: 0, 2.5, 5, 10, 20, 40 μM) 5 μL を移し、0.1 M NaPB/5 mM EDTA (pH 8.0) 185 μL 、メタノールに溶解した *o*-phthaldialdehyde 溶液 (1 mg/mL) 10 μL を加え、遮光下、室温で 15 分間インキュベートし、Ex/Em = 350/420 nm における蛍光強度を測定した。尚、この方法は、Hissin 及および Hilf が開発した方法 (Hissin and Hilf, 1976) を参考にした。

活性酸素種産生の評価

HT22 細胞 ($2.3 \times 10^4/\text{cm}^2$) を 12-well plate で培養し、塩素酸ナトリウム (20 mM) の存在下または非存在化において、エラスチン (0.2 μM) で 7 時間共処理した。MitoSOX™ Red 試薬 (5 μM ; Thermo Fisher Scientific, Cat# M36008) を添加し、37°C で 30 分間インキュベートした後、フェノールレッドを含まない無血清 DMEM (Thermo Fisher Scientific, Cat# 21063029) に培地を置き換えた。蛍光は、蛍光デジタル顕微鏡法 (BZ-X800, Keyence Corporation) によって測定した。蛍光強度は、キーエンス画像測定および分析ソフトウェア (BZ-X Analyzer; Keyence Corporation) により定量化した。

細胞内 Ca^{2+} 流入の評価

HT22 細胞 ($2.3 \times 10^4/\text{cm}^2$) を 12-well plate で増殖させ、塩素酸ナトリウム (20 mM) の存在下または非存在化において、エラスチン (0.2 μM) で 7 時間共処理した。Fluo4-AM (2 μM ; Thermo Fisher Scientific, Cat# F14201) および 0.04% Pluronic™ F-127 (Thermo Fisher Scientific, Cat# P3000MP) を添加し、37°C で 15 分間インキュベートした後、フェノールレッドを含まない無血清 DMEM に培地を置き換えた。蛍光強度は、キーエンス画像測定および分析ソフトウェア (BZ-X Analyzer, Keyence Corporation) により定量化した。

活性酸素種除去および鉄キレート化の細胞死率に対する効果の測定

HT22 細胞を $4.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$ となるように 48-well plate に播種した。コントロールもしくは、60 mM 塩素酸ナトリウム存在下で 0.2 μM エラスチンに任意の濃度の α -トコフェロール (ラジカルスカベンジャー) もしくは、デフェロキサミン (鉄キレート剤) を添加し 24 時間刺激し、LDH アッセイした。

ウェスタンブロットティング

ウェスタンブロット法によるタンパク質の検出には、以下の表 1 に示す抗体を用いた。培養 HT22 細胞を、塩素酸ナトリウム (20 mM) による 24 時間の前処理の存在下または非存在下で、エラスチン (0.2 μM) で 10 時間処理した。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) サンプルバッファー (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8) , 2% SDS, 10%グリセロール、0.1%プロモフェノールブルー) を使用し細胞を溶解した。溶解物中のタンパク質濃度は、DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA, Cat# 5000111JA) を用いて測定した。タンパク質を還元条件下で SDS-PAGE を使用し分離し、ニトロセルロース膜に転写した後、0.1% Tween-20 (PBST) を含む PBS 中の 5%スキムミルクで、室温で 1 時間、非特異的な結合をブロッキングした。表 1 に従い、二次抗体と膜をインキュベートし、Enhanced chemiluminescence (GE Healthcare UK Ltd., Cat# RPN2106) または、SuperSignalTM West Dura Extended Substrate (Thermo Fisher Scientific, MA, U.S.A. Cat# 34075) によって可視化した。場合によっては、ストリッピングバッファーを用いて 55°C、30 分の条件でストリッピングした後、膜を異なる抗体で再プローブした。

表 1. ウェスタンブロットに用いた抗体。

1次抗体	希釈倍率	2次抗体	希釈倍率
anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/ Tyr185) (81E11) (Cell Signaling Technology)	1:1000	anti rabbit IgG-HRP (Cell Signaling Technology)	1:2000
anti-heme oxygenase 1 (Enzo Life Science, Inc.)	1:2000	anti mouse IgG-HRP (Cell Signaling Technology)	1:2000
glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (Acris Antibodies, Inc.)	1:2000	anti mouse IgG-HRP (Cell Signaling Technology)	1:2000

2-3. 結果

2-3-1. 塩素酸ナトリウムおよび β -D-xyloside の硫酸化糖鎖に対する阻害効果

初めに、塩素酸ナトリウムの細胞生存に対する作用を調べた。24 時間および 48 時間の細胞培養後において、HT22 の細胞生存率は塩素酸ナトリウムの濃度 40 mM までは変

化せず、60 mM で有意に減少した (図 12)。したがって、これ以降の実験では、毒性のない 20 mM と僅かに毒性のある 60 mM の塩素酸ナトリウムを使用した。

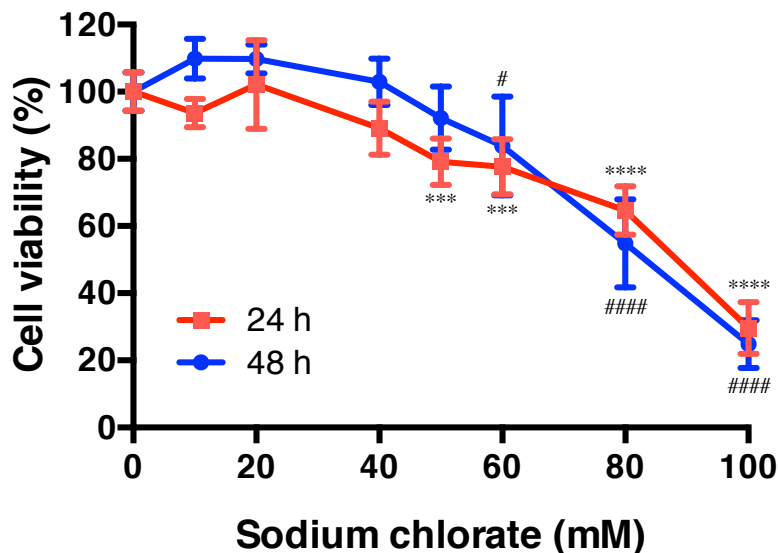
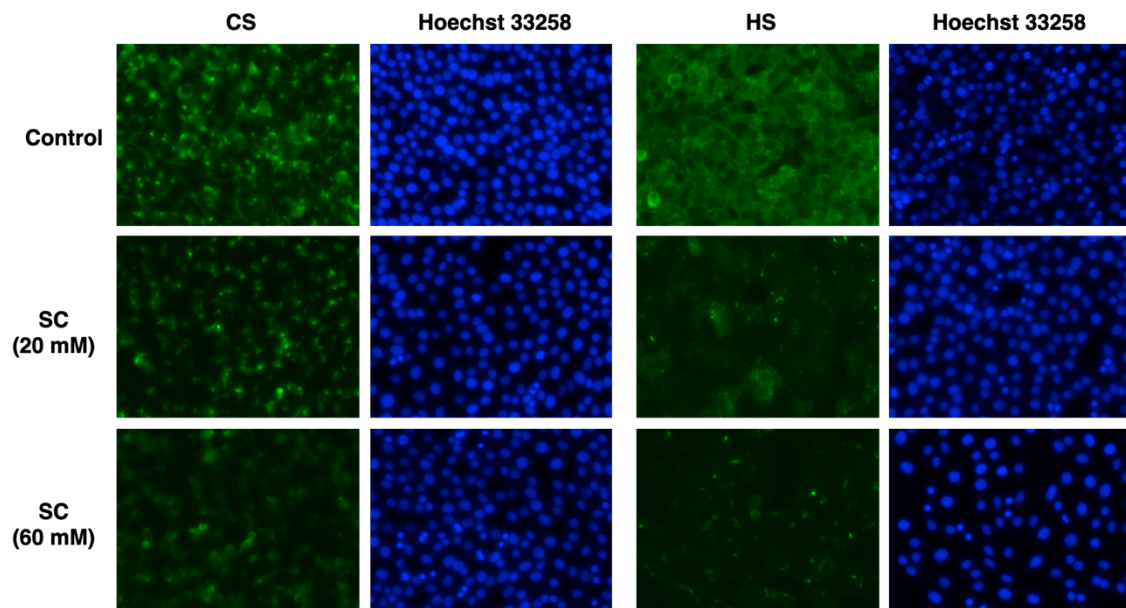


図 12. 塩素酸ナトリウム処理後における HT22 細胞の細胞生存率。HT22 細胞を様々な濃度 (0, 10, 20, 40, 50, 60, 80 or 100 mM) の塩素酸ナトリウムを用いて 24 時間 (赤) もしくは 48 時間 (青) 処理した後、細胞生存率 (%) を WST-1 アッセイにより測定した。
 $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$ compared with control of 24 hr; $\#p < 0.05$, $####p < 0.0001$ compared with control of 48 hr.

次に、塩素酸ナトリウムが HS と CS の発現に及ぼす影響について免疫染色法を用いて評価した。HS の検出には、HS に共通のエピトープを認識し、*N*-硫酸化グルコサミン残基を有する 10E4 エピトープに反応する 10E4 抗体 (F58-10E4 clone) (van den Born et al., 2005) を用いた。CS の検出には、CSPG の GAG 部分に特異性のある CS-56 抗体を用いた。20 mM 塩素酸ナトリウムは HS と CS の両方を有意に減少させた (図 13 a, b)。この結果は、塩素酸ナトリウムが HSPG と CSPG の硫酸基を減少させることを示唆している。

塩素酸ナトリウムの HS および CS に対する硫酸化阻害効果を検証した (図 13)。しかし、塩素酸ナトリウムは細胞外グリカンだけでなく、タンパク質およびステロイドホルモンのチロシン残基の硫酸化も阻害する可能性があり、これは多くのシグナル伝達経路で重要である。そのため、プロテオグリカンのグリコサミノグリカン付与を阻害する β -D-xyloside を使用した (Carrino et al., 2008)。その結果、 β -D-xyloside を使用した処理においても同様に、0.01 μ M β -D-xylosid は HS と CS の両方を有意に減少させた (図 14)。

(a)



(b)

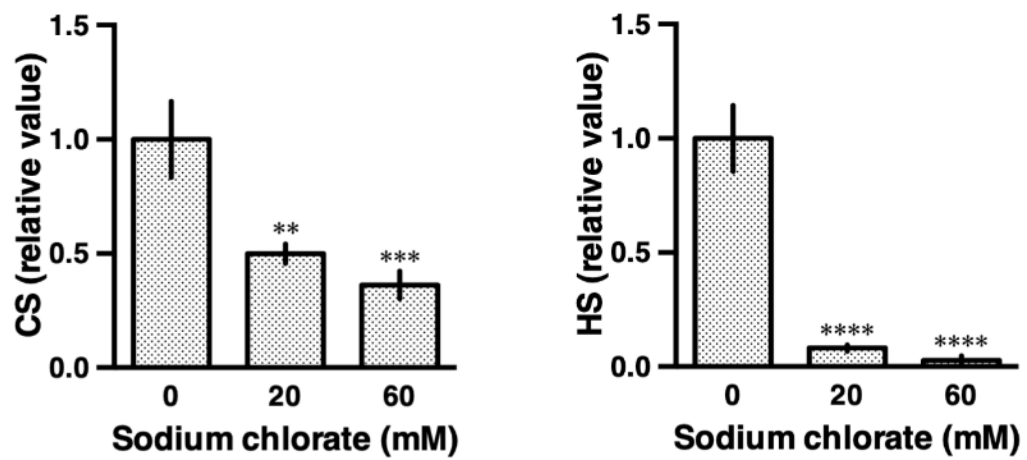


図 13. HT22 細胞における塩素酸ナトリウムの HS および CS に対する効果。(a) HS および CS の蛍光顕微鏡画像。(b) 蛍光強度の定量 (平均値±標準偏差; n=6; ** p < 0.01, *** p < 0.001 compared with control)。

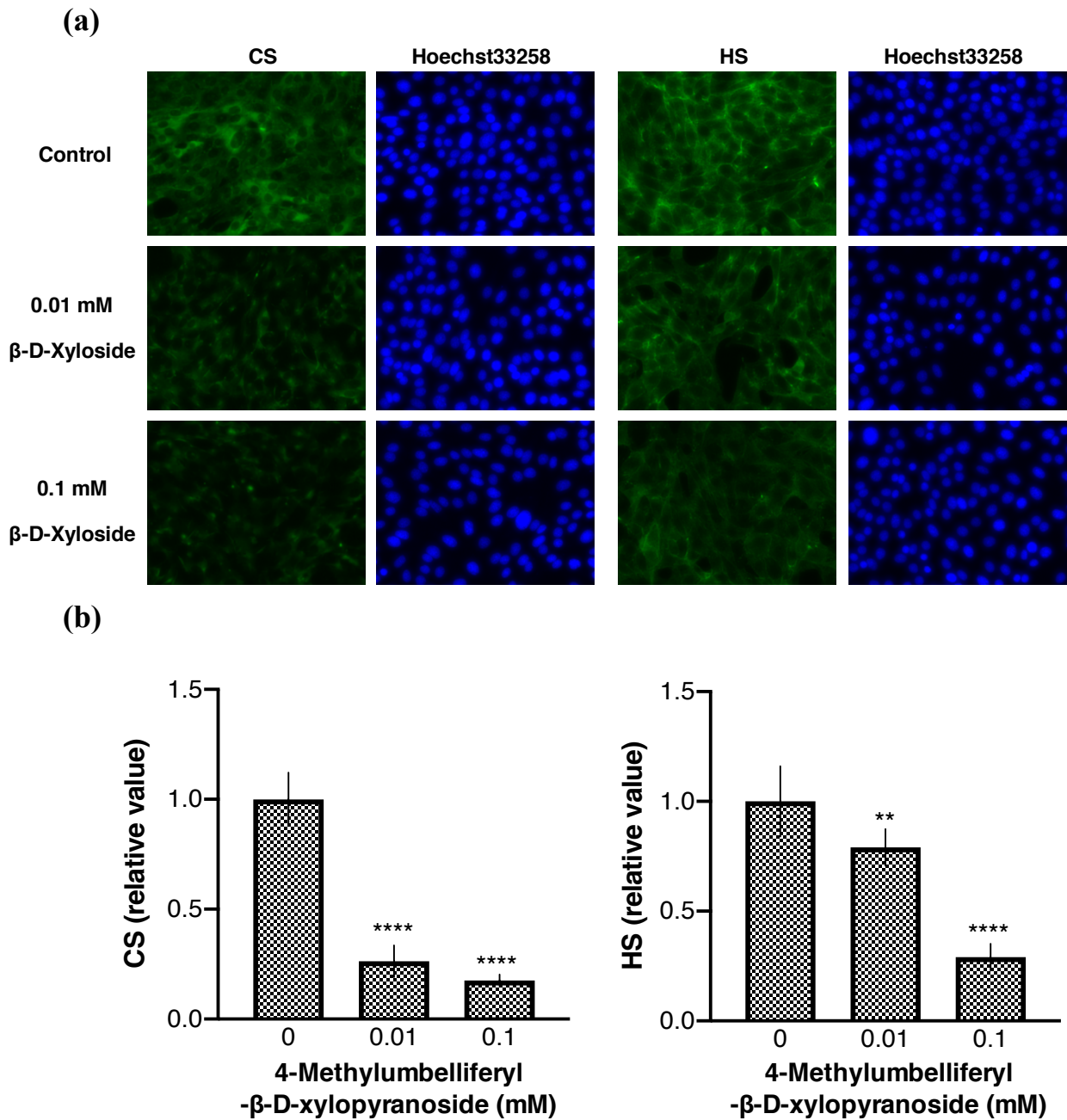


図 14. HT22 細胞における β -D-xyloside の HS および CS に対する効果。(a) HS および CS の蛍光顕微鏡画像。(b) 蛍光強度の定量 (平均値 \pm 標準偏差; n=6; ** p < 0.01, *** p < 0.001 compared with control)。

2-3-2. 酸化ストレス誘導性細胞死に対する塩素酸ナトリウムの効果

2-3-1 では、塩素酸ナトリウムの生存率に及ぼす影響の有無と硫酸基減少効果の確認ができたので、本項では、グルタミン酸誘導性オキシトーシスや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に対する硫酸化糖鎖の役割を検討した。

細胞死の評価は、LDH アッセイを使用した。培養液中に放出された乳酸脱水酵素 (lactate dehydrogenase; LDH) を Cytotoxicity Detection Kit (Takara Bio Inc., Tokyo, Japan) のプロトコルに従って測定した。LDH は細胞膜透過性を有さないため、健康な細胞では細胞質中に存在するが、細胞がストレスを受け細胞死が進行すると、細胞膜は破壊され、細胞質中の LDH が培養液中に放出される。以下のように細胞内外の総 LDH 量における培養液中に露出した LDH の割合を求めることで細胞死率を決定した。

$$\text{Cell death (\%)} = (\text{Abs experimental release} - \text{Abs blank}) / (\text{Abs total release} - \text{Abs blank}) \times 100$$

グルタミン酸とエラスチンはそれぞれ 10 mM, 0.5~1 μ M でほぼ最大の細胞死を引き起こすため (データは示していない)、中程度の細胞死を誘導する濃度としてグルタミン酸およびエラスチンをそれぞれ 5 mM, 0.2 μ M 使用した。塩素酸ナトリウムは、グルタミン酸とエラスチンの両方による細胞死を濃度依存的に増悪させた (図 15 a, b)。これらの結果は、硫酸化の減少がグルタミン酸誘導性オキシトーシスとエラスチン誘導性フェロトーシスの両方を増悪させたことを示唆している。エラスチン誘導細胞死はグルタミン酸誘導細胞死よりも塩素酸ナトリウムの影響をより強く受けたため、以降の実験はフェロトーシスであるエラスチン誘導細胞死に注目した。

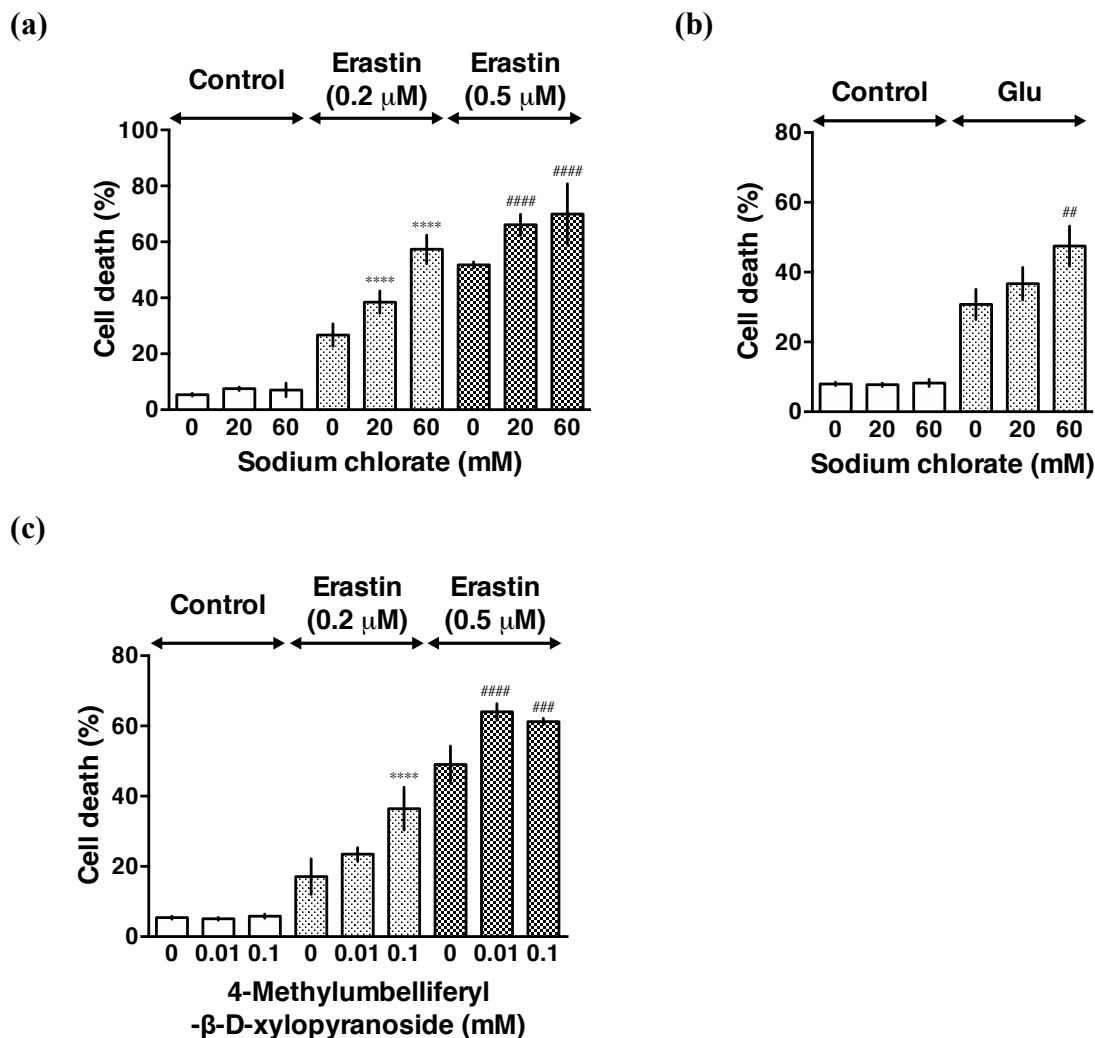


図 15. 硫酸化糖鎖の減少は HT22 細胞の酸化ストレス誘導性細胞死を促進した。(a) エラスチン誘導性細胞死に対する塩素酸ナトリウムの効果。塩素酸ナトリウム (20, 60 mM) 存在または非存在下において、HT22 細胞を 0.2 μM または 0.5 μM エラスチンにより 24 時間処理し、LDH アッセイにより細胞死を測定した。(b) グルタミン酸誘導性細胞死に対する塩素酸ナトリウムの効果。塩素酸ナトリウム (20, 60 mM) 存在または非存在下において、HT22 細胞を 5 mM グルタミン酸により 24 時間処理し、LDH アッセイにより細胞死を測定した。(c) エラスチン誘導性細胞死に対する β-D-xyloside の効果。β-D-Xyloside (0.01, 0.1 mM) 存在または非存在下において、HT22 細胞を 0.2 μM または 0.5 μM エラスチンにより 24 時間処理し、LDH アッセイにより細胞死を測定した (平均値 ±標準偏差; n=4; **** p < 0.0001, ##### p < 0.001 compared with 0.2 μM or 0.5 μM erastin alone, ## p < 0.01 compared with glutamate alone)。

2-3-3. エラスチン誘導性の細胞内グルタチオンの枯渇、活性酸素種の産生および Ca^{2+} イオンの流入に対する塩素酸ナトリウムの影響

システム Xc^- が阻害されると、細胞内抗酸化物質であるグルタチオンが枯渇し、細胞は産生した活性酸素種を消去が徐々に除去できなくなることから、細胞内に活性酸素種が蓄積するようになる。これによって細胞は細胞傷害を引き起こす。細胞内で特に活性酸素種を発生させるのはミトコンドリアであり、adenosine triphosphate (ATP) の産生時に発生する。また、グルタチオンの枯渇により活性化する 12-リポキシゲナーゼの影響を受けて、細胞内への Ca^{2+} 流入が促進される。細胞内外の Ca^{2+} 濃度の恒常性損失は細胞死を誘導する。細胞内の硫酸化が低下した状態の HT22 細胞におけるグルタチオン量、活性酸素種消去能および Ca^{2+} の流入に対するエラスチンの効果について調べるために、活性酸素種や Ca^{2+} を検出する蛍光試薬を用いて評価した。

エラスチンを添加して 7 時間経過後の細胞形態は、丸みを帯び細胞が死に始めたことが推察された。ミトコンドリアの活性酸素種を検出する MitoSOX™ Red を取り込ませ、蛍光を観察すると、いくつかの細胞は強い赤色蛍光を示した (図 16 b)。MitoSOX™ Red 試薬は、ミトコンドリアに選択性があり、スーパーオキシドにより酸化されることで赤色蛍光 (Ex/Em: ~510/580 nm) を示す。塩素酸ナトリウム (20 mM) をエラスチンと共処理した細胞では、より顕著な細胞の形態変化が見られた。さらに、赤色蛍光を示す細胞の数の増加とその蛍光強度の増加を観測した。一方で、塩素酸ナトリウム単独では赤色蛍光が認められなかった。塩素酸ナトリウムとエラスチンを共処理した場合は、エラスチン単独処理に比べ、活性酸素種の産生を有意に増強した。 Ca^{2+} の可視化に用いた Fluo-4 の観察結果も同様であった (図 16 c)。同様の処理を受けた細胞を回収し、グルタチオン量を調べてみると、エラスチンによるグルタチオン量の低下が見られた。コントロールでは約 20~30 nmol/mg protein のグルタチオン量であったのに対し、7 時間経過後の細胞内グルタチオン量は、その 2 分の 1 程度まで有意に減少することが分かった。しかしながら、このエラスチンによるグルタチオン低下量は、塩素酸ナトリウム存在下でも大きな違いは見られなかった (図 16 a)。

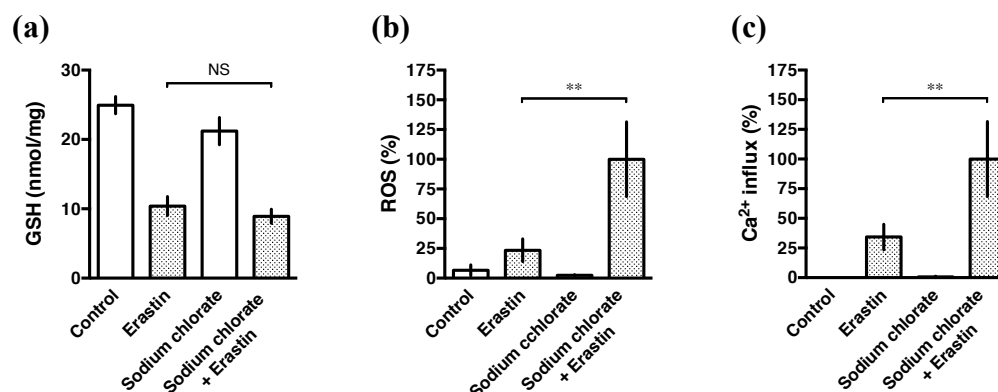


図 16. グルタチオン含有量、活性酸素種産生、エラスチンの Ca^{2+} 流入に対する塩素酸ナトリウムの影響。20 mM 塩素酸ナトリウムの存在下または非存在下で、HT22 細胞を 0.2 μM エラスチンで 8 時間処理した。(a) グルタチオン含有量を測定し、タンパク質濃度で補正した。(b) 活性酸素種の産生を MitoSOX 試薬で測定した。(c) 細胞内 Ca^{2+} を Fluo-4 試薬で検出した。データは平均値 \pm 標準偏差として表示している。データは、少なくとも 3 つの独立した実験から取得した。* $p < 0.01$; NS, not significant

2-3-4. 活性酸素種除去剤と鉄キレート剤の塩化ナトリウムが増強するフェロトキシ性の細胞死に対する効果

いくつかの研究では、活性酸素種除去剤 (α -トコフェロール) および鉄キレート化学物質 (デフェロキサミン) などが HT22 細胞のグルタミン酸またはエラスチンによる細胞死を防ぐことが報告されている。(Behl et al., 1995; Jelinek et al., 2018; Hirata et al., 2020)。そこで、活性酸素種の除去と鉄キレート化が塩素酸ナトリウムの毒性を軽減するかどうかを調べた。

α -トコフェロール (1 μM) との共処理は、塩素酸ナトリウムの有無にかかわらず、エラスチン誘導性細胞死を完全に抑制した。対照的に、 α -トコフェロール (0.1 μM 以下) の保護効果は、塩素酸ナトリウム非存在下の場合と比べて塩素酸ナトリウム存在下での効果が有意に弱まった (図 17 a)。同様に、デフェロキサミン (5 μM 以上) はエラスチンによる細胞死を完全に抑制したが、デフェロキサミン (2 μM) は塩素酸ナトリウムの毒性による細胞死の増強を部分的にしか抑えなかった (図 17 b)。これらの結果は、活性酸素種と Fe^{2+} の増加が、塩素酸ナトリウムで強化されたフェロトキシ性の細胞死に関与していることを示している。

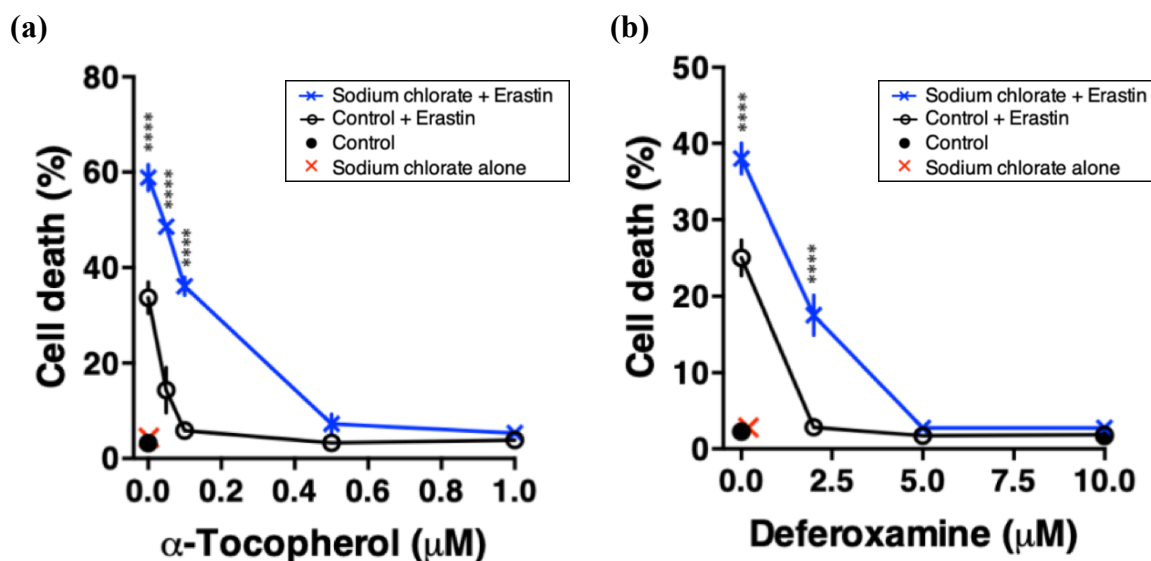


図 17. 塩素酸ナトリウムの存在下または非存在下でのエラスチン誘導性細胞死に対する α -トコフェロールまたはデフェロキサミンの効果。(a) α -トコフェロールによる活性酸素種除去は、塩素酸ナトリウムの毒性の増強を緩和した。(b) デフェロキサミンによる鉄のキレート化は、塩素酸ナトリウムの毒性の増強を緩和した。HT22 細胞を 60mM の塩素酸ナトリウムの存在下または非存在下で 0.2 μ M エラスチンと任意の濃度の α -トコフェロールまたはデフェロキサミンで 24 時間処理し、LDH アッセイにより細胞死を判定した (平均値 \pm 標準偏差; n=4 **** p < 0.0001 compared with control + erastin at the same concentration)。

2-3-5. 細胞死および抗酸化関連タンパク質に対する作用

以上の結果より、硫酸化糖鎖の抑制はエラスチンの添加による細胞内における活性酸素種の上昇を増加させ、その効果はグルタチオン下流で起きていることが明らかとなった。酸化ストレスは、直接的または間接的に活性酸素種を介した様々な細胞内シグナル伝達経路に寄与する。活性酸素種は、神経変性における酸化ストレスの指標および調節因子である Nrf2-ARE 経路を活性化し (Johnson et al., 2008)、HO-1 などの下流の標的遺伝子の発現を誘導する。活性酸素種は、環境ストレスに対する細胞応答に関与するストレスキナーゼ JNK のリン酸化も誘導する。そこで、塩素酸ナトリウムが酸化ストレスに応答してこれらの細胞内シグナル伝達経路に影響を与えるかどうかを検討した。

JNK のリン酸化はエラスチンで処理すると増加し、この誘導されたリン酸化は塩素酸ナトリウムによってさらに増強した (図 18 a, b, c)。HO-1 の発現量も同様にエラスチン処理により増加した。塩素酸ナトリウムとエラスチンの共処理では、エラスチン単独処理と比べると僅かながら上昇傾向にあったものの、有意な差は認められなかった (図 18 a, d)。

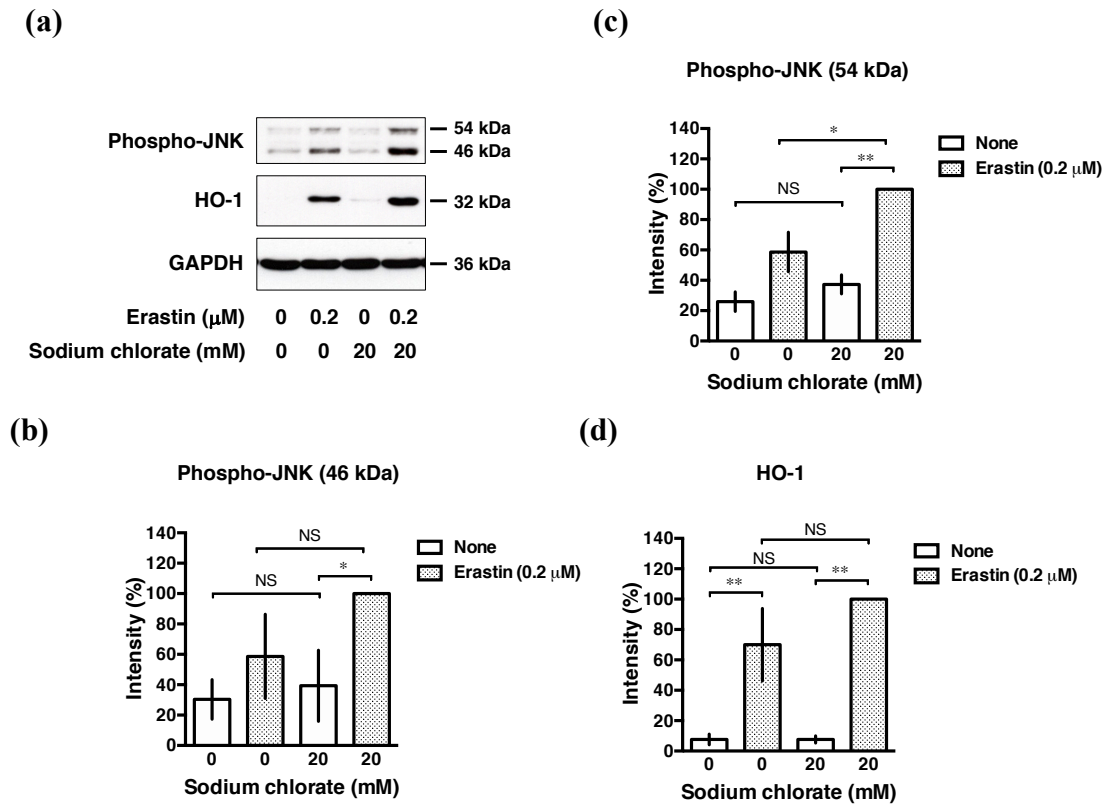


図 18. HT22 細胞において、硫酸化の減少はエラスチン誘導性 JNK のリン酸化を増強した。(a) Phospho-JNK および HO-1 のウエスタンブロット分析。(b-d) ImageJ ソフトウェアを使用して、バンド強度を定量化した (平均値 \pm 標準偏差; n=3, * p < 0.05, ** p < 0.01)。

2-4. 考察

本研究では、内因性酸化ストレスを研究するための確立された細胞モデルであるマウス海馬由来 HT22 細胞を使用して、酸化ストレスにおける硫酸化糖鎖の役割を調べた。その結果、硫酸化糖鎖の減少はグルタミン酸誘導性オキシトーシスとエラスチン誘導性フェロトーシスの両方を悪化させることが明らかとなった。これまでの研究では、酸化

ストレスがアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の病態に重要な役割を果たすことが知られている。本研究の結果は、GAG の硫酸基が酸化ストレス誘導性細胞死を軽減することを示唆する。

まず、塩素酸ナトリウムによる硫酸化阻害効果を確認した。塩素酸ナトリウムは、硫酸化の普遍的な共基質である 3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸の生合成における最初の酵素である ATP スルフリラーゼの *in vitro* 阻害剤である (Baeuerle et al, 1986)。タンパク質の硫酸化を減らすために細胞を塩素酸ナトリウムで処理することは、硫酸基が有する機能を調べるための理想的な方法であることが示唆されている (Fadel et al., 2004; Humphries et al., 1988; Schwartz et al., 2018)。塩素酸ナトリウムは、さまざまな高分子の硫酸化を減少させるのに使用される物質の中で最も効果的であることも報告されている (Safaiyan et al., 1999)。さらに、HS や CS の阻害剤としても使用されている (Ai et al., 2003)。

膜近傍の環境は、細胞外から細胞内の空間にさまざまな現象を伝達するために重要である。HSPG および CSPG は ECM および細胞表面に存在し、一時的に保持するサイトカイン、成長因子、および薬剤を含む任意の低分子物質を介して細胞間および細胞内シグナル伝達を間接的に調節する (Schwartz et al., 2018)。最近の研究では、中枢神経系 (CNS) の ECM の構成要素は神経保護作用があることが示唆されている (Suttkus et al., 2016)。中枢神経の ECM は主に GAG で構成されており、GAG はタンパク質に結合した形で存在し、プロテオグリカンを形成する。HSPG および CSPG の神経保護作用は、さまざまな実験モデルで提案されている。過去の研究において、CSPG が海馬および皮質の初代培養神経細胞の興奮毒性細胞死を保護し、特定の受容体サブタイプの活性化を遮断するのではなく、興奮性アミノ酸受容体の活性化に続く細胞応答に拮抗することにより、CSPG が神経保護作用を発揮することが示唆された (Okamoto et al., 1994; Okamoto et al., 1994; Sata et al., 2008)。さらに、FeCl₃ のマイクロインジェクションは、ペリニューロナルネット (PNN) を持たない神経細胞と比較して、異なるタイプの神経細胞を取り囲み、主に CSPG とヒアルロン酸で構成される ECM の特殊な形態である PNN の神経変性を引き起こさなかった (Suttkus et al., 2012)。これらの研究は、CNS の GAG が興奮毒性から神経を高度に保護することを示唆している。

また、Naylor らは、HS がイボテン酸の脳損傷に対して有意な神経保護作用を示すことを報告した (Naylor et al., 2007)。CSPG の緩衝機能は、脳の細胞外空間における Ca²⁺ の局所拡散を調節することによるものと考えられる (Hrabetova et al., 2009)。同様の機構が、主に CSPG で構成される ECM の特殊な形態である PNN のフェロトシスに対する神経保護に関与していることも示唆されている (Suttkus et al., 2012)。これらの知見か

ら、HSPG および CSPG の負電荷は、グルタミン酸興奮毒性および酸化ストレス毒性に重要な役割を果たす Ca^{2+} や Fe^{2+} などの二価カチオンの拡散に影響を与えると推定できる。 Ca^{2+} と Fe^{2+} は両方ともに、HT22 細胞のグルタミン酸およびエラスチン誘導細胞死に密接に関与しており (Takashima et al., 2019)、塩素酸ナトリウムの処理による硫酸化の減少は、二価カチオンの拡散を促進し、グルタミン酸およびエラスチン誘導の酸化ストレスを悪化させる可能性があることを示唆している。

除草剤および主要な水の消毒副産物である塩素酸ナトリウムは、活性酸素種を産生し、ヒト赤血球の酸化的損傷を誘導する (Ali et al., 2017)。塩素酸ナトリウムによる HT22 細胞の処理は、活性酸素種産生を誘導しなかった。塩素酸塩は赤血球に入り、そこで塩化物イオンに還元され、このプロセスにより活性酸素種および反応性窒素種が産生されるが、HT22 細胞では発生しない可能性がある。

細胞に酸化ストレスが誘導される原因としては、細胞内抗酸化物質グルタチオンの低下とそれに伴う活性酸素種の増加が挙げられる。抗酸化作用を示す物質はこれらの原因の一つまたは複数に対して作用を示すことにより、生体内での酸化と抗酸化のバランスが崩れないように働いている。酸化ストレス誘導性細胞死に対する硫酸化糖鎖の保護作用に関して、作用機序を明らかにするために、細胞内グルタチオン量、活性酸素種および細胞内 Ca^{2+} に対する塩素酸ナトリウムの効果について調べた。細胞内グルタチオン量は、エラスチンの添加による低下が認められた。これは、エラスチンがシステイン/グルタミン酸アンチポーターシステム Xc^- の機能を抑制したためであり、既報通りの結果であった。また、塩素酸ナトリウムのみを細胞に処理した場合には、コントロールとほぼ同程度の細胞内グルタチオン量であった。エラスチンと塩素酸ナトリウムを同時に処理した場合は、エラスチンのみを処理した場合と同程度であり、塩素酸ナトリウムの添加による細胞内グルタチオン量への影響はみられなかった。塩素酸ナトリウム処理は、エラスチン誘導性活性酸素種の産生と Ca^{2+} の流入を増強するが、HT22 細胞のグルタチオン枯渇には影響しないことが明らかとなった。細胞内グルタチオン量の低下は、システム Xc^- の機能を阻害することによるオキシトーシスやフェロトーシスにおいて最初に現れる変化である。硫酸化糖鎖の抑制で現れる酸化ストレス誘導性細胞死の効果は細胞内グルタチオンの下流で起こることが示された。

蛍光試薬を用いてミトコンドリアにおける活性酸素種の検出した結果、塩素酸ナトリウムはエラスチンの添加による活性酸素種の増加を促進させた。これらのことから、硫酸化糖鎖には活性酸素種の増加に対して保護作用があることが示唆された。また、活性酸素種の蓄積に伴って引き起こされる細胞内 Ca^{2+} の流入も塩素酸ナトリウムによって増加することが明らかとなった。これは、塩素酸ナトリウムが細胞内における活性酸素

種の増加を助長した結果、 Ca^{2+} 流入も促進されたと考えられる。このことより、硫酸化糖鎖の減少は活性酸素種の産生と Ca^{2+} 流入の増強を介して、グルタミン酸誘導性オキシトーシスとエラスチン誘導性フェロトーシスの両方を悪化させることが明らかとなった。

ウェスタンブロット解析では、phospho-JNK 量はエラスチンの添加による増加が認められた。これは、細胞内の活性酸素種が上昇したことで、環境ストレスに対する細胞応答に関与するストレスキナーゼ JNK のリン酸化が誘導されたためである。塩素酸ナトリウムのみを細胞に処理した場合には、コントロールとほぼ同程度の phospho-JNK 量であった。この結果は、細胞生存率に対する影響と一致しており、20 mM の塩素酸ナトリウムは、細胞にストレスを負荷しないことが示唆された。エラスチンと塩素酸ナトリウムを同時に処理した場合は、エラスチンのみを処理した場合より phospho-JNK 量が有意に増加した。HO-1 は、エラスチンの処理で有意に増加し、エラスチンと塩素酸ナトリウムの両方で処理した場合も同様に増加した。共処理の方がエラスチン単独に比べ HO-1 の発現量の上昇が見られたが、その増加量に有意な差は認められなかった。これらの結果は、JNK 経路の活性化が硫酸化糖鎖の減少による酸化ストレスに関与しているのに対し、Nrf2-ARE 経路は細胞内の硫酸化糖鎖の減少の影響を受けにくいことを示唆している。HO-1 は抗酸化に関わる酵素として、様々な刺激によって引き起こされる酸化ストレスの制御に関わっていることが報告されているが (Nitti et al., 2018)、グルタミン酸誘導性オキシトーシスやエラスチン誘導性フェロトーシスに対する細胞保護作用における HO-1 の詳細な機能については、明らかにされていない。そのため、酸化ストレス誘導性細胞死に対する硫酸化糖鎖の保護作用に関して、様々な濃度や処理時間での抗酸化関連酵素等の発現量に及ぼす影響を調べていくことで、より詳細な硫酸化糖鎖の保護機能を解析することは今後の課題である。

2-5. 小括

本研究では、内因性酸化ストレス誘導性細胞死に対する硫酸化糖鎖の役割を調べた。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って誘導される細胞死が増悪された。この結果は、ECM の硫酸化がオキシトー

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、オキシ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 JNK 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ーシスおよびフェロトー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 (図 19)。

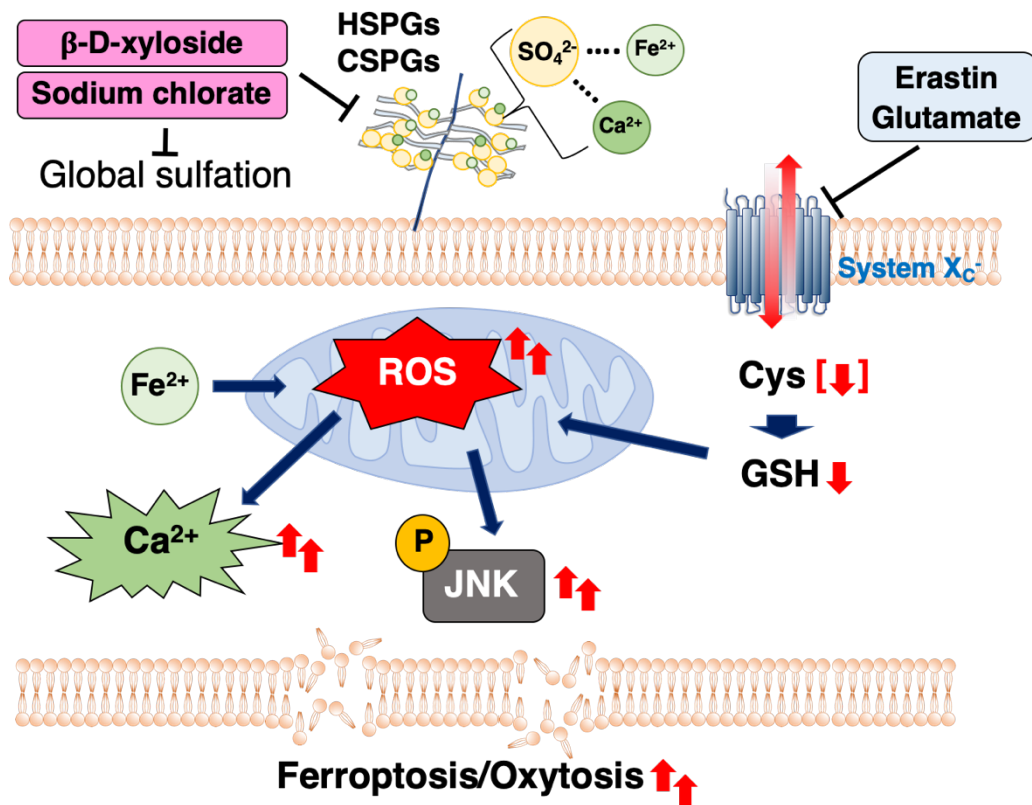


図 19. 本研究の概略図。硫酸化および硫酸化糖鎖はオキシトーシスおよびフェロトーシスに対する神経保護作用を有することが明らかとなった。

第3章 抗 C6S, C2, 4S 抗体 CS-56 を使用したウェスタンブロットの改良によるマウス脳抽出物中のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの同定

3-1. 緒言

ウェスタンブロット法は確立されたタンパク質の検出方法であるが、糖鎖に対する抗体を用いウェスタンブロットは容易ではない。その理由としては以下の点が挙げられる。① 糖鎖に対する抗体が 5 量体の IgM で取り扱いが難しい。② 認識される糖鎖が複数のタンパク質にあるためウェスタンブロットで数多くのバンドが検出される。③ そのシグナルの特異性を示す方法が多くない。④ コンドロイチン硫酸の場合、多数の糖鎖が付加されるため SDS 電気泳動での分離が悪い。CS-GAG 特異的なモノクローナル抗体である CS-56 は、CSPG を標的とした多くの研究分野で汎用されている最もスタンダードな糖鎖認識抗体の 1 つであるが、一般の糖鎖抗体同様に取り扱いが難しい。硫酸基による CS-GAG の修飾の度合いならびに付加する場所によって、CS-56 による糖鎖認識が変化することも要因である。CS-56 は免疫染色で頻繁に使われているものの、ウェスタンブロットでは未だ再現性のとれた実験遂行が難しく、これまで報告された論文においても、多くの場合その特異性を示すコントロール実験の欠如によって、その結果は一貫性の無いものとなっている。GAG は細胞間の情報伝達をはじめ種々の重要な生物学的活性を示すため、長年使用されている CS-56 抗体のウェスタンブロット手法を再現性のある信頼性の高いものとすることは、CSPG を介した細胞応答メカニズムを解明する手助けとなり、細胞学や神経学の発展に貢献できる。

CDR (cyclic draining and replenishing, CDR) 法は、循環排出および補充を繰り返し、サイズ関連拡散による制約を排除することでナノ粒子プローブによる迅速な表面バイオアッセイを可能にした方法である (Li et al., 2016)。我々のグループと他のグループがウェスタンブロットへの応用を報告している (Sajjad et al., 2018; Higashi et al., 2020)。我々のグループでは、免疫反応増強剤と組み合わせた抗体溶液の CDR により、抗原結合を改善するシステムを考案した。生化学分析により、CDR 法は抗体のインキュベーション時間を短縮し、市販の免疫反応増強剤の存在により抗体の親和性がそれぞれ変化することが明らかになった。CDR 法と免疫反応増強剤との組み合わせは、出力シグナルを増強し、抗体のインキュベーション時間を短縮した。本研究では、改良型ハイスピードウェスタンブロット CDR を使用して、検出が困難な CS-56 による硫酸化糖鎖用ウェスタンブロットの条件を決定した上 (データは示していない) で、検出されたシグナルの糖鎖特異性を示す方法を検討し、確立した。さらに、得られたメジャーバンドからペプチドを抽出し、プロテオミクス解析を使用して、マウス脳抽出物における CS-56 で顕著に検出される CS-GAG を有する CSPG のコアタンパク質を同定した。

3-2. 実験材料および実験方法

CDR 法を使用した CS-56 のウェスタンブロット (CS-56 CDR)

CS-56 を用いたウェスタンブロット法に再現性を持たせるため、希釈溶液、抗体希釈倍率、インキュベーション方法、さらには、抗体の洗浄方法などを再検討し、最適なプロトコルを確立した (論文投稿中)。以下にその手順を示す。ビーズ入りのチューブ (Benchmark D1030 Compact BeadBug Microtube Benchtop Homogenizer) に入った生後 7 週目マウスの脳 (50 mg) を cComplete™ Lysis M solution (Roche, Lysis M) にてホモジナイズ (Benchmark, 300 rpm, 60 秒) した。ホモジネートを遠心後 (13,000 rpm, 4°C, 10 分)、上清を -20°C で保存した。10% の 2-メルカプトエタノール (2ME) を含んだ 2×SDS Sample buffer をタンパク質の最終濃度が 1 mg/mL になるようにマウス脳組織溶解物へ加え、95°C で 10 分間熱変性させた (図 20)。

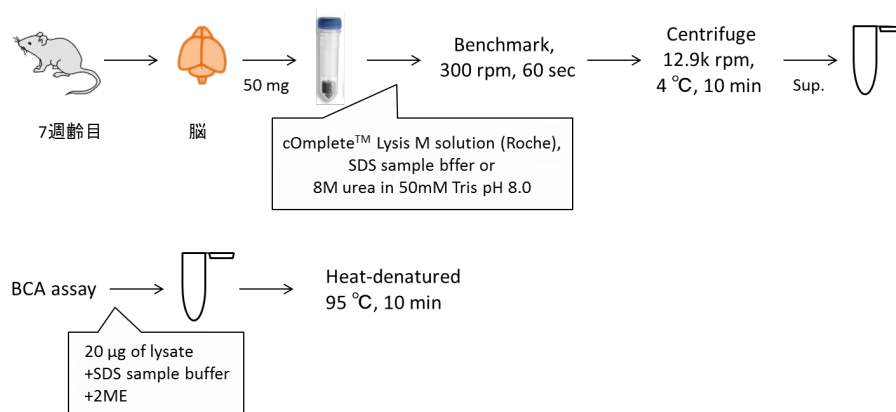


図 20. サンプル調製の概要。

25 µL のマウス脳組織溶解物サンプルと 10 µL のタンパク質マーカー (New England BioLabs, ColorPlus™ Prestained Protein Marker, Broad Range, 7-175 kDa) を SDS ポリアクリルアミド電気泳動で分離した (Novex system: Constant current, 25 mA; Maximum voltage, 300 V; Run time, 70-75 分; Initial voltage, 100~110 V)。セミドライブロッティング装置 (テックジャム、AE-6677P) でタンパク質を PVDF メンブレンにトランスファーした (160 mA constant, 300 V max, 30-35 分 run time)。メンブレンをキムワイプの上で乾燥させた。尚、ブロッティングする前のこの乾いたメンブレンは 1 週間程保管できる。MeOH で再度親水化し、10% スキムミルクを用いて 4°C で一晩ブロッティングした。IgM のアグリゲーションを防ぐために、一次抗体の入ったチューブを遠心 (13,000 rpm, 4°C, 10 分) した後、表 2 に従い一次抗体希釈液を調製した。CDR 法でメンブレンと一次抗体を 30 分間インキュベートした。メンブレンをファルコンチューブから取り出し、純水を用いて過

剰な抗体を取り除いた後、PBST で洗浄した (10 分×3)。表 2 に従い、二次抗体希釈液を調製した。CDR 法でメンブレンと二次抗体 (Anti-mouse IgM F (ab')₂) (Cat# 115-036-020, Jackson Immuno Research, U.S.A.) を 15 分間インキュベートした。メンブレンをファルコンチューブから取り出し、純水を用いて過剰な抗体を取り除いた後、PBST で洗浄した (5 分×6)。LumiGLO Reserve™ Chemiluminescent Substrate (KPL, 54-71-00, Solution A & B) を用いて化学発光法により検出した。撮影には CDD Image を使用した。

表 2. 各種抗体希釈溶液の組成と希釈率。

一次抗体希釈液	メンブレンサイズ	
	Entire size	1/4 size
10% CGS S-1	2.8	7.47
5% additive	0.2	0.53
Total (mL)	3	8

	CS-56	10E4
5% additive	5% skim milk/PBST	5% cold fish gelatin/PBST
Dilution	1:6000-1:7000	1:2000

二次抗体希釈液	メンブレンサイズ	
	Entire size	1/4 size
10% CGS S-2	2.3	6.13
5% skim milk	0.7	1.87
Total (mL)	3	8

	Anti-mouse IgM F (ab') ₂
Dilution	1:80000

ELISA

ビオチン化した CS-C 1 μL に 4 μL の milliQ 水と 10 μL の 100 mM Tris-HCl を加え、Thermal cycler 上で 37 °C に保温した。そこへ 0.01% BSA により希釈倍率 1 : 20 で希釈された ChABC を 5 μL 加え、各処理時間 (30 秒, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 分) インキュベート (25°C) した後、直ちに 95°C で酵素活性を失活させ、-20°C で保管した。未処理のビオチン化 CS-C を処理時間 0 秒とした。一次抗体の CS-56 と Mab2030 を 5% BSA/0.1% Tween-HBS (T-HBS) を用いて、各希釈倍率 (1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 4000, 1 : 8000,

1 : 16K, 1 : 32K, 1 : 64K, 1 : 128K) で希釈した。二次抗体の IgM と IgG を 5% BSA/T-HBS を用いて 1 : 2000 倍に希釈した。希釈した各抗体をサンプルとして使用した。96-Well plate に 40 μ L のストレプトアビジンを加え、4°C で一晩静置した。100 μ L の HBS で 5 回洗浄し、100 μ L の 5 % BSA/T-HBS でコートし、4°C で一晩インキュベートした。翌日、100 μ L の T-HBS で 5 回すすぎ、HBS で最終濃度 1 : 200 倍に希釈した酵素処理前後 GAG サンプル 30 μ L を加え、室温で 20 分間インキュベートした。その後、100 μ L の T-HBS で 5 回洗浄し、5% BSA/T-HBS で希釈 (1 : 10000) した 30 μ L の一次抗体 (CS-56 もしくは Mab2030) を加え、さらに 4°C で 2 時間インキュベートした。100 μ L の T-HBS で 5 回洗浄した後、5% BSA/T-HBS で希釈 (1 : 2000) した 30 μ L の二次抗体 (IgM もしくは IgG) を加え、さらに室温にて 30 分間インキュベートした。100 μ L の T-HBS にて 5 回洗浄し、酵素発色によって検出した。

ChABC 活性の測定

PBS、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM Tris-HCl および 100 mM Tris-HCl によって希釈した 1 M 尿素、1 \times Lysis M、0.1 \times Lysis M、0.1% Triton™ X-100 を用意した。98 μ L の各溶液に 2 μ L の CS-A を加え混和した後キュベットに移し、ブランクとした。そこへ 1 μ L の ChABC (50 unit/mL, 0.01% BSA) を加え OD 232 nm の吸光度を 15 秒ごとに計測した。

マウス脳組織溶解物の ChABC 処理とサンプル調製

8 M 尿素に溶解したマウス脳組織溶解物をプロテアーゼ阻害剤含有の 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) によって 8 倍希釈した。10 μ g の溶解物に 2 μ L の 50 unit/mL ChABC もしくは 0.01% BSA を加え、37°C で一晩インキュベートした。また、バンドのシグナル減少が 37°C で一晩インキュベーションしたことによるタンパク質の分解に起因するものではないことを確認するために、-20°C で同様にインキュベーションした。

マウス脳抽出物における CS-56 認識タンパク質の質量解析分析

SDS-PAGE でタンパク質を分離後、ゲルをクマシーブリリアントブルー (coomassie brilliant blue, CBB) 染色した。CS-56 CDR で検出される 50 kDa 付近のメジャーバンドと重なる部分を切り出し、ゲル内消化した後、質量分析した。使用する試薬は表 3 に示す通りに調製した。作業中はマスクと手袋を着用し、実験台および実験器具はアルコールを用いて消毒し、可能な限り、ケラチンのコンタミを防ぐよう心がけた。ゲルを脱水するために、25 mM triethylammonium hydrogen carbonate buffer

(TEAB; Sigma, Cat# T7408) /50% acetonitrile (Thermo Fisher Scientific, Cat# A998-4) を加え、10 分間振とうした。上澄液を取り除き、4~5 回繰り返す、SpeedVac を使用して、完全に乾燥させた。その間に、Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP; Sigma, Cat# C4706)、chloroacetamide (CAA; Sigma, Cat# 22790)、25 mM TEAB を使用して、10 mM TCEP/20 mM CAA/25 mM TEAB を調製した。ジスルフィド結合を切断し、アルキル化するために、ゲルを覆うくらいの量 (およそ 25 μ L) の 10 mM TCEP/20 mM CAA/25 mM TEAB を加え、スピンドウンした後、室温で遮光して 30 分間振とうさせた。上澄液を取り除き、25 mM TEAB を加え、10 分間振とうすることでゲルを洗浄した。上澄液を取り除き、25 mM TEAB/50% acetonitrile により 3 回脱水作業をした後、SpeedVac で完全に乾燥させた。ゲルを覆う程の 25 mM TEAB を乾燥したゲルの入ったチューブに加え、氷上で 10 分間再水和した。ゲルを僅かに覆う程のプロテオミクスグレードのトリプシン (Sigma, Cat# 03708969001) を加え、37°C で 4 時間~一晩振とうし、トリプシン消化液を得た。ゲルに 50% acetonitril/5% formic acid (30 μ L) を加え、30 分振とうした後、超音波を 5 分間かけた。抽出したトリプシン消化液を最初の消化液に加えた。この抽出作業をもう一度繰り返した。抽出液の容量が 10 μ L ほどになるまで SpeedVac を使用して溶媒をとばした。C18 Zip Tip (Sigma, Cat# ZTC18S096) を用いてペプチドの脱塩および濃縮を以下の表 4, 5 に示す通り行った。

表 3. 調製する試薬。

試薬	保存濃度	使用濃度
TEAB (Sigma)	1M pH 8.5	25 mM
TCEP (Sigma)	200 mM in 25 mM TEAB	10 mM in 25 mM TEAB
CAA (Sigma)	400 mM in 25 mM TEAB	20 mM in 25 mM TEAB

表 4

溶液	組成
Solution A	99.9% water / 0.1% formic acid
Solution B	60% AcN / 0.1% formic acid

表 5

STEP		
1	Wet	Solution B, 10 μ L
2	Equilibrate	Solution A, 10 μ L x3
3	Loading	Aspirate digested sample x5
4	Wash	Solution A, 10 μ L x3
5	Elution-1	Add 10 μ L of Solution B into new clean tube
6	Elution-2	Add 10 μ L of Solution B into new clean tube
7	Dry	SpeedVac

3-3. 結果

マウス脳抽出物を改良した CS-56 のウェスタンブロット法である CS-56 CDR 法を用いて評価し、その実用性と特異性を調べた。その結果、バックグラウンドのないシャープなバンドが 4 本と高分子量にブロードなバンドが検出された (図 21)。CS-C とプレインキュベートした CS-56 をウェスタンブロットに用いたところ、これらのバンドは検出されなくなった。一方で、ChABC を使用した酵素処理後の CS-C とプレインキュベートした CS-56 を用いた場合では、CS-56 は分解された CS-C を認識できないことから、CS-56 の結合を阻害しなかった。ヘパリンも同様に CS-56 の結合を阻害しなかった。これらの結果より、改良した CS-56 のウェスタンブロットが、バックグラウンドがなく、CS-GAG に特異的に結合し認識できていることを証明した。

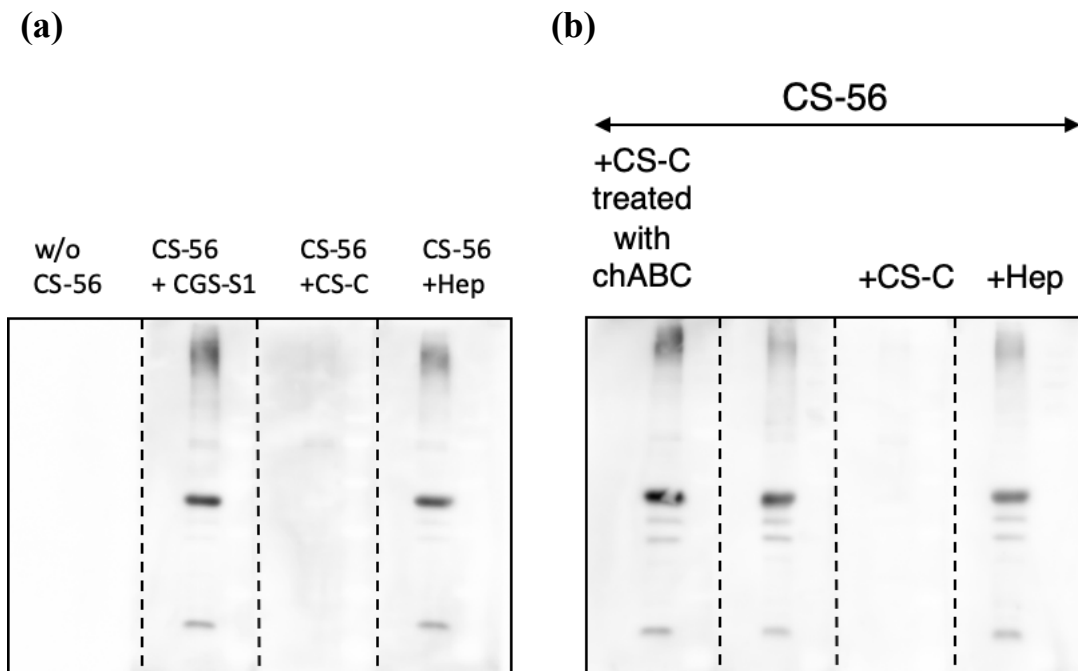


図 21. 改良型ウェスタンブロット CS-56 CDR を使用したマウス脳抽出物における CS-GAG の検出。マウス脳抽出物を CS-56 CDR により評価した。膜は 3 ウェル分毎に区切られている (点線)。各ウェルにはサンプルバッファー、マウス脳組織溶解物 (タンパク量 10 μ g)、分子量マーカーの順番でロードしており、それぞれの膜は表示の抗体溶液とインキュベートし、検出されたものである。(a)CS-C による競合、(b)ChABC で酵素分解した CS-C による競合を示す。

CS-56 CDR における CS-GAG への特異性をより強固に証明するために、試料を ChABC により酵素分解し、酵素処理前後の試料を CS-56 と糖鎖処理後産生物を認識する Mab2030 を用いて評価することを試みた。CS-56 の結合は、ChABC による CS-GAG の分解によって消失し、それと同時に、Mab2030 の結合が見られるようになるはずである。報告されている論文において、ChABC による CS-GAG 消化の CS-56 のウェスタンブロットを使用した評価が困難であることから、ChABC 処理を確認する方法として Mab2030 が使用されている。CS-56 が用いられない理由として、CS-56 の特異性を示す方法が少ないことが挙げられる。まず、ChABC におけるそれぞれの抗体の特性を評価するために、ELISA フォーマットを利用して ChABC で部分消化した糖鎖をプレートに

固相化し、抗体の結合を評価することで、それぞれのエピトープの消失並びに出現の経時変化を比較した。抗体の濃度を測定し、スキッチャードプロット (Scatchard plot) による K_d を求めた (図 22 a-c)。図 22 a, b において、縦軸はストレプトアビジンを介して固相化したビオチン化 CS-C (CS56 の場合は cABC 処理していないビオチン化 CS-C、Mab2030 の場合はコンドロイチナーゼ処理後に熱処理したビオチン化 CS-C) に結合した抗体の量、横軸は各ウェルに加えた抗体の濃度である。挿入されたグラフは結合リガンド (横軸) を非結合リガンド濃度/結合リガンド濃度の比 (縦軸) に対してプロットした Scatchard plot を示しており、この直線の傾きが $-1/K_d$ 、X 切片が最大結合数となることから、直線上に各プロットが乗っていることが重要となる。また、飽和結合の 1/2 の値に相当する抗体の濃度がおよそその解離定数 K_d となる。図 22 a, b において、Scatchard plot が直線上にプロットされていた。両抗体とも飽和した結合がみられることから、 K_d の算出を行うことができた (図 22 c)。その結果、Mab2030 と CS-56 の解離定数に大きな差は見られなかった。最大結合数は CS-56 の方が低かった。 K_d に大きな差が見られなかったことから、抗体の力価にそれほど差はないことが明らかとなった。この結果より、CS-56 は 1 : 10000、Mab2030 は 1 : 2000 の抗体希釈を採用して、ChABC 処理時間に対する CS-56 および Mab2030 によりエピトープが消失もしくは出現する経時変化を ELISA により確認した (図 22 d)。各抗体の結合飽和状態を 1 とした時の抗体結合量を酵素処理時間に対してプロットした。Mab2030 (赤線) のエピトープの出現はわずか 4 分で 50% にまで達するのに対し、CS-56 (青線) のエピトープは同じ処理時間でほとんど減少しなかった。この結果より、ChABC による糖鎖の分解において、CS-56 のシグナル減少が遅いことが明らかとなった。これまでの論文において、Mab2030 エピトープの出現が ChABC 処理の証明として使用されていた。しかしながら、本実験結果により、ChABC による糖鎖の分解において、CS-56 のシグナル減少が遅いことから、Mab2030 のエピトープの出現は必ずしも糖鎖分解の証明にはならないことが示唆された。そこで、CS-56 のバンド消失が認められるウェスタンブロットを遂行するために、改めて ChABC 処理の条件を検討した。

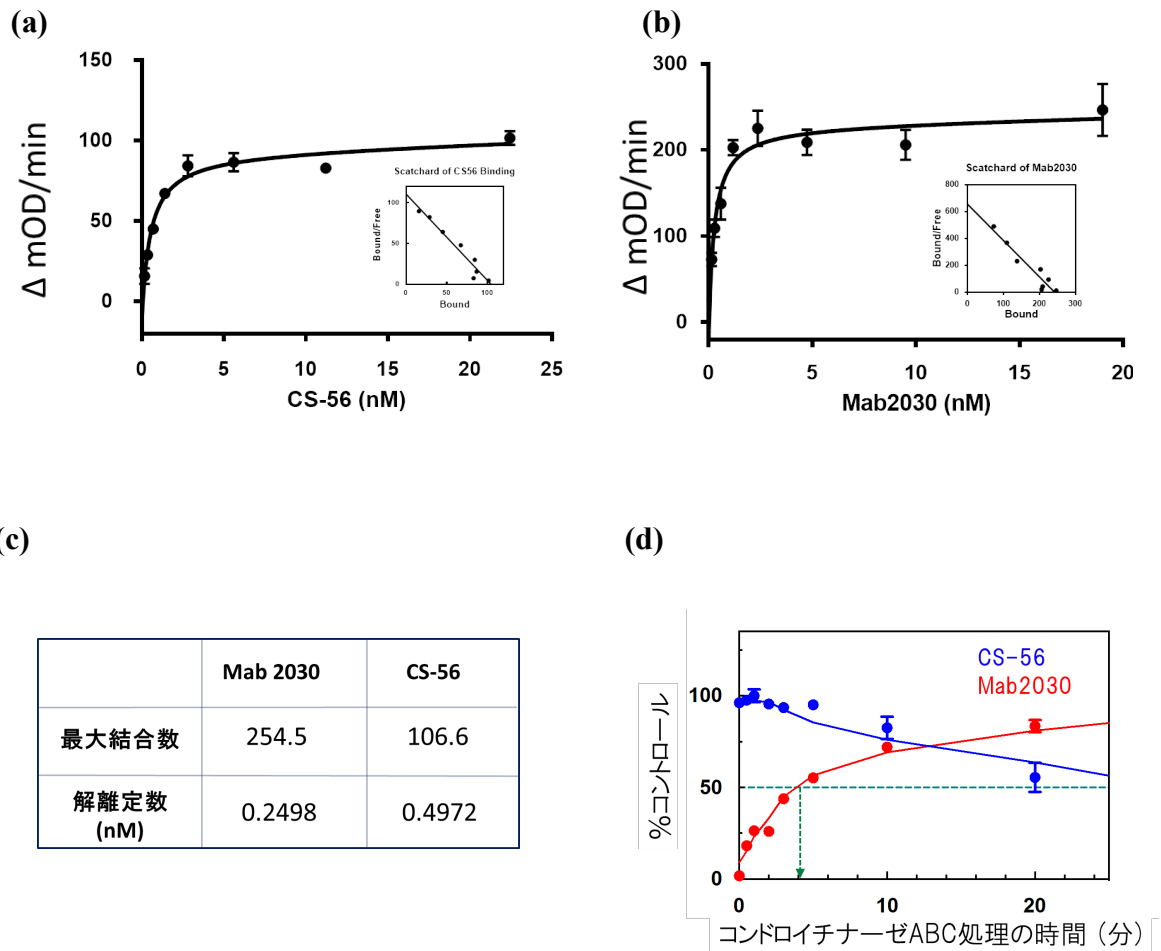


図 22. ELISA による CS-56 と MAB2030 の結合部位の比較。(a) CS-56、(b) Mab2030 の binding Assay の結果。各グラフの近似線は GraphPad Prism-One Site Saturation を示している。挿入のグラフは Scatchard plot である。(c) 解離定数の算出の結果。(d) ChABC 処理による各抗体エピトープの経時変化。CS-56 のエピトープの消失 (青線) および Mab2030 のエピトープ出現 (赤線) を示す。

前述したように、従来の方法では、酵素処理がうまくいかないことに加え、CS-56 のウェスタンブロットのバックグラウンドがかなり高いことが、酵素処理した試料の特異性を示すことが困難であった理由である。そこで、マウス脳抽出物の ChABC を使用した酵素処理の条件を見直すことにした。マウス脳抽出物の ChABC を使用した酵素処理の条件を様々な界面活性剤を用いて評価し、最適な条件を決定した (図 23 a)。その結果、尿素を含有した Tris-HCl (pH 8) では、100 mM Tris-HCl (pH 8) と同程度に ChABC の酵素活性が維持されることが明らかとなった。そのため、1M 尿素を含有した 50 mM

Tris-HCl (pH 8) を組織溶解の際に使用し、糖鎖特異性の証明に使用する試料を調製した。試料を ChABC により酵素処理した後、CS-56 抗体を用いた CDR 法または MAB2030 抗体を用いた通常のウェスタンブロット法を行った (図 23 b)。その結果、CS-56 CDR では、酵素処理したサンプルはバンドが消失し、反対に MAB2030 ウェスタンブロットでは、酵素処理前の試料が検出されず、酵素処理の試料が検出されるようになった。CS-56 および MAB2030 の両方の検出において、50 kDa 付近のメジャーなバンドは僅かに残った (図 23 b)。これらの結果より、CS-56 CDR のより強固な CS-GAG への特異性を証明した。

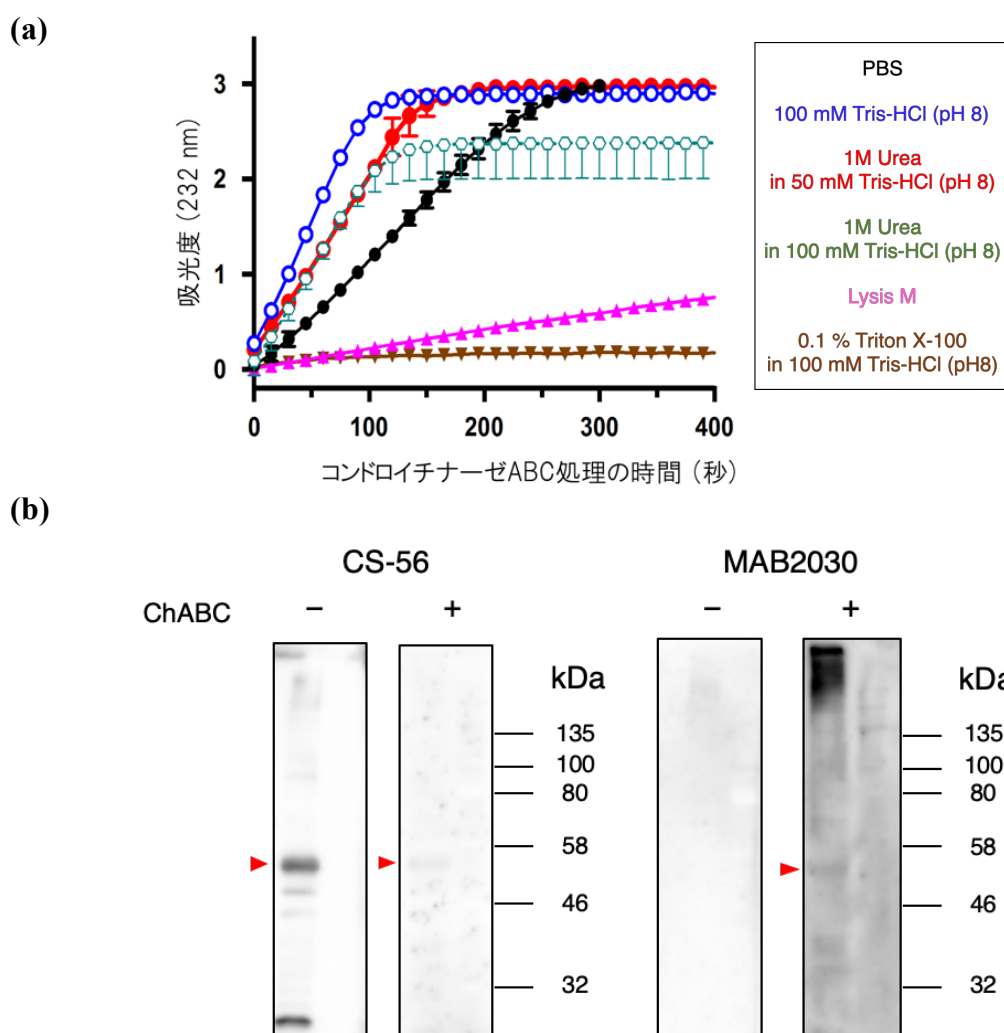


図 23. 改良型ウェスタンブロット CS-56 CDR を使用した CS-GAG 特異性の評価。(a) 種々の界面活性剤中における ChABC 活性と尿素中での活性。縦軸は 232 nm における吸光度、横軸は酵素処理時間を示している。(b) マウス脳抽出物の ChABC 酵素処理前後における CS-56 CDR と MAB2030 を使用したウェスタンブロット。膜は 2 ウェル分

毎に切られてある。各ウェルにはマウス脳組織溶解物 (タンパク量 10 μ g)、分子量マーカーの順番でロードした。

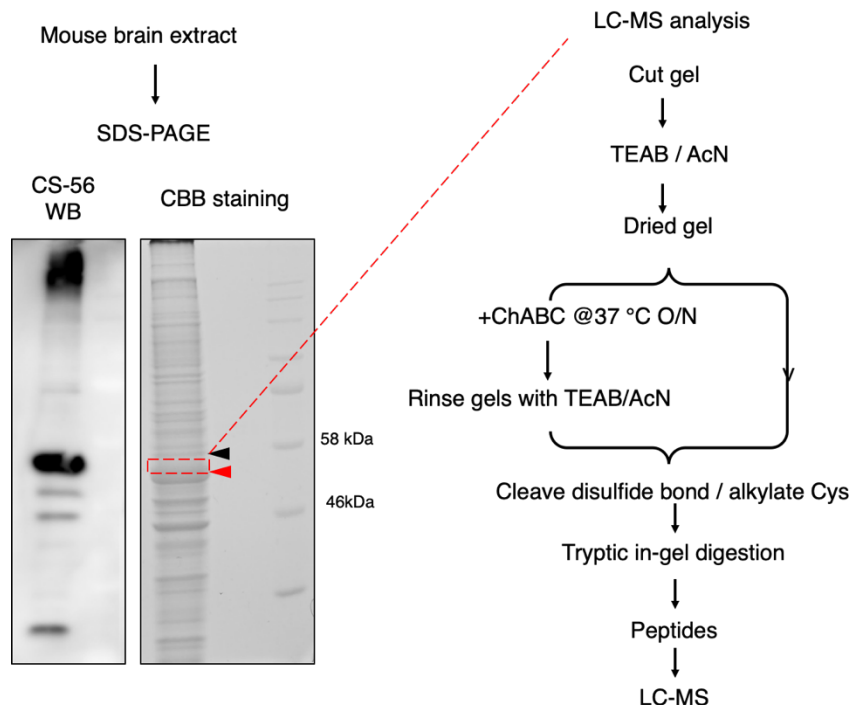


図 24. マウス脳抽出物における CS-56 認識タンパク質の解析。マウス脳抽出物を SDS-PAGE により分離し、CBB 染色した。CS-56 CDR で検出される 50 kDa 付近のバンドと重なる部分をゲルから切り出し、ゲル内消化した後、質量分析した

図 23 b において、MAB2030 を使用したウェスタンブロットでも CS-56 CDR と同様の分子量のバンドが検出されたことから、50 kDa 付近のタンパク質が、CS-GAG を有する可能性が示唆された。そこで、検出が顕著であった 50 kDa 付近のタンパク質をゲルから切り出し、プロテオミクス解析した (図 24)。その結果、高分子量 CSPG として知られるプレビカンが検出された (表 6)。

表 6. CS-56 CDR における 55kDa 付近バンドのプロテオーム解析により検出されたブレビカン。

Accession	Description	Coverage [%]	# Peptides	# PSMS	# Unique Peptides	# Protein Groups	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score Mascot
Q61361	Brevican core protein	11	8	12	8	1	883	95.8	4.93	8

3-4. 考察

今回使用したアクリルアミド濃度 (10%) で検出した分子量の範囲は、アグリカンに比べ、低分子の CSPG を評価しているため、保有する糖鎖がその分少なくなり、スメアになることが抑えられていると言える。

これまでの論文において、Mab2030 エピトープの出現が ChABC 処理の証明として使用されていた。しかしながら、本実験結果により、ChABC による糖鎖の分解において、CS-56 のシグナル減少が遅いことから、Mab2030 エピトープの出現は必ずしも糖鎖分解の証明にはならないことが示唆された。そこで、CS-56 のバンド消失が認められるウェスタンブロットを遂行するために、改めて ChABC 処理を条件検討した。その結果、尿素存在下における塩基性バッファーが最適条件であることが明らかとなった。しかし、図 22 および図 23 から見て取れるように、本条件下で ChABC 処理による CS-GAG の完全な消化を得ることは難しい。その一方で、図 23 b において、MAB2030 を使用したウェスタンブロットでも同様の分子量のバンドが検出されたことから、50 kDa 付近のタンパク質が、CS-GAG を有する可能性が示唆された。

本研究では 10% のポリアクリルアミドゲルを用いて主に低分子量の CSPG を検出し、主なバンドとして、80 kDa、70 kDa、50 kDa 付近の分子量を有する CSPG が検出された。CSPG の種類には、バーシカン、アグリカン、ニューロカンなどの高分子量 (100 kDa 以上) とデコリン、ビグリカン、テスチカン、グリピカンなどの低分子量 (100 kDa 以下) とが報告されている。メジャーな 50 kDa 付近のバンドであったが、高分子量の CSPG が分解している可能性も考えられる。それ故、分子量から検出した CSPG の種類を判断することは困難である。したがって、検出が顕著であった 50 kDa 付近のタンパク質をゲルから切り出し、プロテオミクス解析した (図 24)。その結果、高分子量 CSPG として知られるブレビカンが検出された (表 6)。検出されたバンドの分子量とブレビカンの分子量が一致していないが、ブレビカンの切断部位がすでに報告されている。切断後の分子量とウェスタンブロットで検出されたバンドの位置が類似していることから、切断後のブレビカンを検出していることが明らかとなった。

3-2. 小括

軸索再生に働く硫酸化糖鎖の解析方法を確立した。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。CS-56 によるウェスタンブロットの方法を最適化し再現性良くバンドを検出可能にしたとともに、組織抽出物に応用可能な ChABC 処理の新たな条件を見いだした。文献上で ChABC 処理による CS-56 のシグナルの減衰がウェスタンブロットで見られなかった理由の 1 つが不適切な酵素処理であることが容易に推測できる。さらにこれまで ChABC 処理とともに出現する Mab2030 のシグナルをもって CS-GAG の分解の証明とされていたが、本研究でそれだけでは十分でないことが明らかとなった。ChABC 処理による CS-GAG の消失をウェスタンブロットで評価できたことは成果であるといえる。次に CS-56 CDR で得られた 50 kDa 付近のバンドを切り出し、プロテオーム解析した。その結果、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。

本知見は、神経変性疾患に対する研究をはじめ、多くの研究分野で活用されると期待される。

第4章 マウス脳におけるコンドロイチン4硫酸に結合するタンパク質の探索

4-1. 緒言

CS-A (4 硫酸) や CS-E (4, 6 硫酸) がシグナル伝達に関与することが報告されている (Sato et al., 2008; Wang et al., 2008)。4 硫酸に結合し、受容体として機能する可能性を有したタンパク質を同定することは、硫酸化糖鎖がシグナル伝達にどう機能しているかを解明するために必要不可欠である。例えば、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) は、傷害後の哺乳類の中枢神経系で上方制御される (Chung et al., 2000; Silver and Miller, 2004; Yi et al., 2012)。ChABC を使用した CSPG のグリコサミノグリカン (CS-GAG) 鎖の消化により、軸索再生が改善される (Pizzorusso et al., 2002)。加えて、4 硫酸を豊富に持つ CS-GAG である CS-A が *in vitro* の実験で軸索を跳ね返すが、CS-A を特定の 4 硫酸エステル加水分解酵素であるアリアルスルファターゼ B で処理すると反発活性が劇的に低下する。このように軸索成長に対する CS-GAG 4 硫酸化の重要性が既に報告されている (Wang et al., 2008)。脳内の CS-A と結合する分子を同定することは、どの分子が脳内の CS-A と結合するかを解読することで、神経再生を促進するための新規標的の発見につながる。そこで、ビオチン化 CS-A をプローブとして利用し、マウス脳内における CS-A 結合物質の局在と質量分析による探索した。

4-2. 実験材料および実験方法

CS-A のビオチン化およびビオチン化 CS-A の精製

Briani らによる報告 (Briani et al., 1998) を参考にして、CS-A をビオチン化した (図 25)。

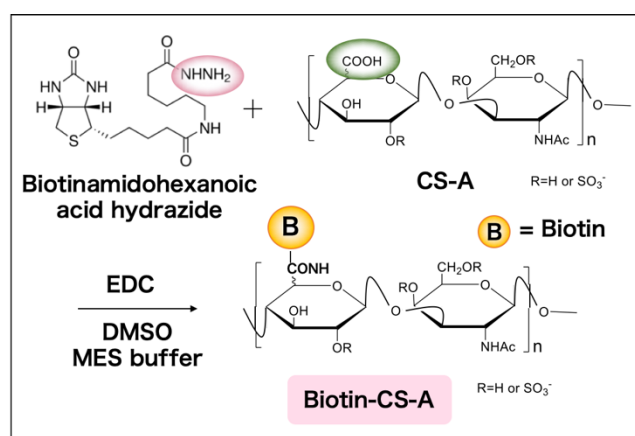


図 25. 反応スキーム。

使用する試薬は表 7 の通り調製した。

表 7. 調製する試薬。

試薬	濃度	使用量
CS-A (Sigma)	25 mg/ml in 0.1 M MES buffer	400 μ L
Biotin-hydrazide (Sigma)	50 mM in DMSO	200 μ L
EDC (PIERCE)	100 mg/ml in 0.1 M MES buffer	50 μ L

25 mg/mL CS-A (Sigma Cat# C9819) と 50 mM (+)-biotinamidohexanoic acid hydrazide (Sigma, Cat# B3770) をよく混合した後、氷上で冷却した。冷却した 100 mg/mL Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) を反応液に加え、チューブを HulaMixer Sample Mixer (Invitrogen, Cat# 15920D) にセットし、4°C で一晩攪拌した。Spectra/Por 3 Dialysis Membrane (MVCO: 3,500) (Repligen, MA, U.S.A.) を用いて透析し、不純物を排除し、グリコサミノグリカン定量キット Blyscan™ (biocolor Ltd., County Antrim, UK) を用いて生成物の収量を決定した。スタンダードを調製する際には、透析した際の外液を使用した。ビオチン化 CS-A は、ChABC 消化後に、232 nm の吸光度をサイズ排除クロマトグラフィーによって測定することで確認した。

組織切片の作製

マウスを経心臓的に灌流した後、4% PFA/PBS で灌流固定した。脳を摘出した後、4% PFA/PBS の入ったラウンドチューブに組織を投入し、4°C で一晩浸漬した。凍結する際の急激な脱水を防ぐために、段階的に 30%スクロースに置き換えた。手順は次の通り行った。固定液を 20%スクロースに置換し、4°C で一晩浸漬した。その後、30%スクロースに置き換え、さらに一晩 4°C で浸漬した。凍結組織切片作製用包埋剤であるティシュー・テック®O.C.T.コンパウンド (Sakura Finetek Japan Co.,Ltd., Tokyo, Japan) に試料を馴染ませ、別の容器に移した。ドライアイスとイソペンタンの入った容器に、試料の入った容器を浮かばせ、包埋した。凍結切片作製用マイクロームである Leica CM3050 を使用し、厚さ 30-50 μ m の凍結切片を作製した。切片は、PBS の入った 24-well plate に移し、4°C で保存した。

ビオチン化 CS-A を用いた免疫組織染色 (DAB 染色)

24-Well plate 上に PBS に入った組織切片を 1% H₂O₂/PBS に浸し、内在性ペルオキシダーゼをブロッキングし、TBS で 3 回洗浄した。内在性ビオチンおよび内在性アビジンは、Avidin/Biotin Blocking Kit (VECTOR LABORATORIES, INC., CA, U.S.A., Cat# SP-2001)

を使用してブロッキングした。その後、0.1% Triton™ X-100 を含有した 2.5% BSA/TBS で非特異的な結合をブロッキングした。TBS を用いて希釈したビオチン化 CS-A を組織切片と一晩 4°C でインキュベートした。TBS で洗浄した後、2.5% BSA/TBS を用いて 1:3000 倍に希釈した Streptavidin-HRP に 1 時間室温で浸漬した。TBS で洗浄した後、DAB Substrate Kit (VECTOR LABORATORIES, INC, Cat# SK-4100) を用いて DAB 染色を実施した。TBS で洗浄後、スライドガラスに注意深く移し風乾させ、標本とした。

免疫蛍光染色

内在性のペルオキシダーゼ、ビオチン、アビジン、非特異的な結合のブロッキングを DAB 染色の手順と同様に実施した後、希釈したビオチン化 CS-A に、4°C で一晩浸漬した。洗浄後、0.1% Triton™ X-100 を含有した 2.5% BSA/TBS を用いて希釈した Streptavidin, Alexa Fluor™ 647 conjugate (Thermo Fisher Scientific, Cat# S21374) に 1 時間室温でインキュベートした後、洗浄した。他の抗体を用いて多重染色する場合は、この後に行った。Polyclonal rabbit anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (Dako, CA, U.S.A., Cat# Z0334) もしくは、anti-NeuN antibody, clone A60, Alexa Fluor®488 conjugated (Sigma, Cat# MAB377X) により多重染色した。抗 GFAP では、洗浄後に anti-rabbit Oregon Greer®488 結合抗 IgG とインキュベートした。洗浄後、DAPI により核を染色し、標本化した。

ビオチン化 CS-A を用いたプルダウンアッセイ

マウスを経心臓的に PBS で灌流した後、脳を摘出した。部位毎に分離し、重さを測った後、-80°C で保存した。脳の湿重量 10 mg に 1 mL の 10 mM Tris-HCl (表 8) を加え、ホモジナイザーで機械的にホモジナイズした。そこへ、1/6 量の 300 mM OGP/10 mM Tris-HCl を加え、ガラスホモジナイザーに移した後、優しくホモジナイズした。13,000 rpm、15 分間、4°C で遠心した後、上清を取ることで核分画を取り除いた。上清に CS-A もしくは PBS を加え、HulaMixer Sample Mixer (Invitrogen, Cat# 15920D) を用いて、一晩 4°C でインキュベートした。MagCapture™ Tamavidin®2-REV (FUJIFILIM Wako Pure Chemical, Cat# 136-18341) を加え、さらに一晩 4°C でインキュベートした。遠心および磁石によって上清のみを取り除き、バッファーを用いて磁気ビーズを洗浄した。イオン性の結合を排除するために 0.5 M NaCl 入りの 10 mM Tris-HCl で洗浄した。溶出バッファー (2 mmol/L および 20 mmol/L ビオチン溶液) を用いて溶出した。SDS サンプルバッファーと混合した後、熱変性させた。SDS-PAGE でタンパク質を分離した後、Pierce™ Silver Stain for Mass Spectrometry (Thermo Fisher Scientific, Cat# 24600) を用いて銀染色し

た。手順はキットのプロトコルに従った。銀染色後のゲルを撮影した後、バンドの切り取り、1 mm³に裁断した後、脱染色した。手順はキットのプロトコルに従った。

表 8. 各種バッファの組成。

10 mM Tris-HCl (0.15 M NaCl, pH 7.4) containing 2 mM MgCl ₂ + protease inhibitor cocktail	
100 mM Tris Buffer pH 7.4	1 mL
ddH ₂ O	9 mL
2M MgCl ₂	10 μL
×100 protease Inhibitor cocktail	100 μL
Total	10 mL

300 mM OGP	
OGP	876 mg
10 mM Tris-HCl	Up to
Total	10 mL

ゲル内消化

前述したプロトコルに従いゲル内消化した後、質量分析した。

4-3. 結果

4-3-1. マウス脳切片におけるコンドロイチン 4 硫酸結合物質の局在解析

CS-A をプローブやプルダウンアッセイに使用するために、CS-A を構成するウロン酸のカルボキシル基をビオチン化標識した (図 25)。生成物であるビオチン化 CS-A は、サイズ排除クロマトグラフィーにより確認した (図 26, 27)。CS-A は ChABC によって酵素分解を受けると、末端に二重結合を有する糖を生成する。この二重結合は、232 nm の極大吸収波長を有する。非標識 CS-A では、全てのウロン酸と GalNAc 間で ChABC による酵素分解を受け 232 nm の吸収波長を二糖類が検出された (図 27 青線)。一方で、カルボキシル基がビオチン化されていると、ChABC による酵素分解を受けず、ボイドボリューム V₀ として溶出された (図 27 緑線)。適度にビオチン化され

た CS-A では、ビオチン化を受けていないウロン酸と GalNac 間のみで酵素分解を受け
 ため、様々なサイズの糖類が 232 nm において検出された (図 27 赤線)。

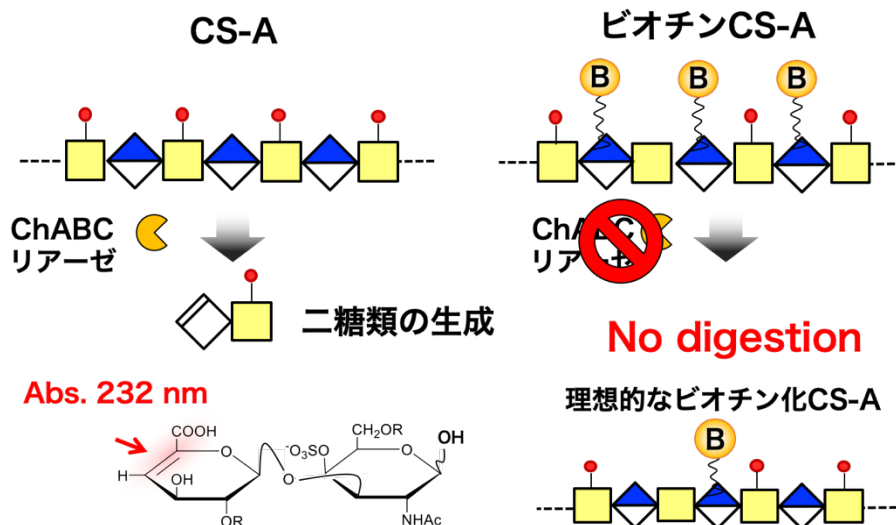


図 26. 原理と理想的なビオチン化 CS-A の概略図。 intact の CS-A は分解酵素により消化され、末端に不飽和結合が生じる。末端の不飽和結合は、232 nm の吸収波長を有するため検出される。高度にビオチン化されている場合、酵素処理されず、検出されない。理想的なビオチン化 CS-A は生理活性を維持していることが望ましいので、ビオチン化が部分的な CS-A である。

サイズ排除クロマトグラフィー

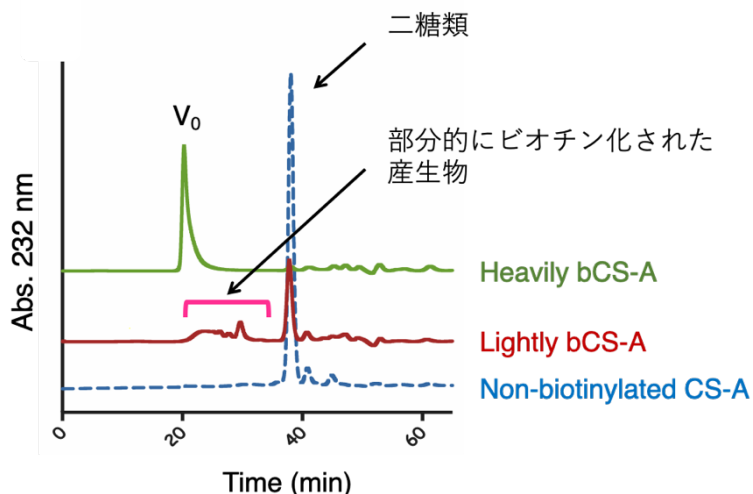


図 27. サイズ排除クロマトグラフィーによるビオチン化 CS-A の評価。様々な程度のビオチン化を伴う CS-A を ChABC で消化し、サイズ排除クロマトグラフィーにより分離し 232 nm の吸光度を測定した。グラフは、ChABC 消化後のビオチン化されていない CS-A (青)、軽度にビオチン化された CS-A (赤)、および、重度にビオチン化された CS-A (緑) を示している。

次に、ビオチン化 CS-A により、マウス脳切片におけるビオチン化 CS-A 結合タンパク質の局在を調べた (図 28)。実験には、ビオチン化 CS-A を用いた DAB 染色を使用した。この際、クレシルバイオレットを用いて神経細胞の核を対比染色した。その結果、ビオチン化 CS-A 結合タンパク質は、海馬と小脳に高度に局在していることが明らかとなった。小脳においては、分子層は染まらない一方で、小脳皮質にある γ -アミノ酪酸 (GABA) 作動性の抑制性ニューロンであるプルキンエ細胞が顕著に染まっていた。さらに、嗅球や梨状皮質においても多く発現していることが明らかとなった。興味深いことに、ビオチン化 CS-A での染まり方が、神経突起、成長円錐、そして、軸索といった神経細胞特有の形態であることから、ビオチン化 CS-A の結合が神経細胞で見られることが明らかとなった。

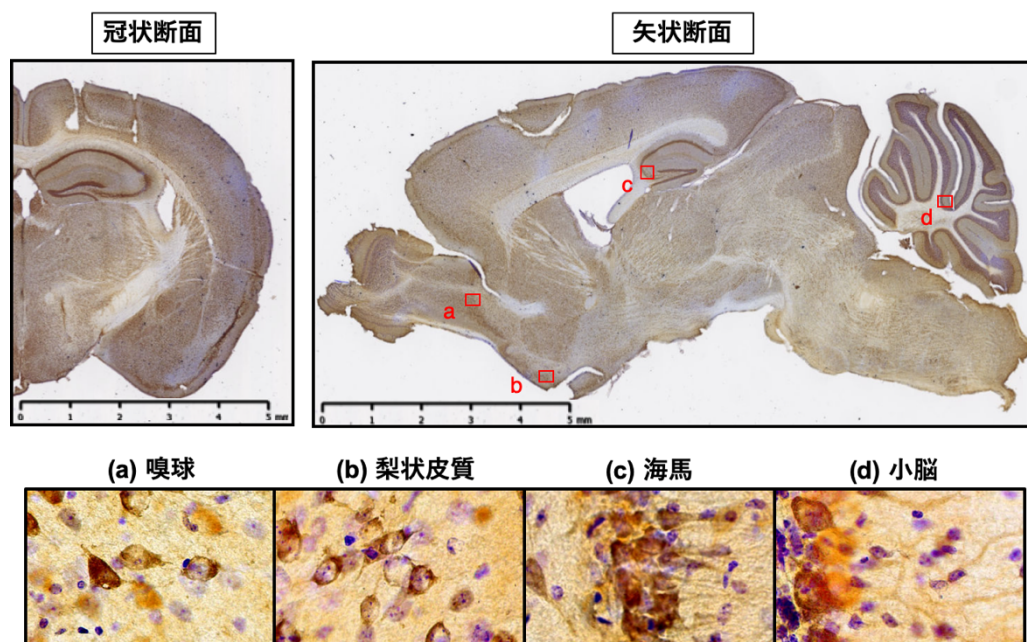


図 28. マウス脳切片におけるビオチン化 CS-A を用いた免疫組織染色。クレシルバイオレット (紫) で対比染色した。マウス脳切片の冠状断面および矢状断面の画像。(a) 嗅球、(b) 梨状皮質、(c) 海馬、および、(d) 小脳の高倍率画像を示す。

次に、マウス脳切片におけるビオチン化 CS-A 結合タンパク質への親和性を調べるために、ビオチン化 CS-A の非標識 CS-A との競合および高塩濃度存在下におけるビオチン化 CS-A の結合を免疫組織化学法で検討した。その結果、非標識 CS-A の競合により、ビオチン化 CS-A の結合が、ネガティブコントロールであるストレプトアビジンのみの染色程度まで抑えられることが示された (図 29 a)。一方で、ビオチン化 CS-A の染色は、

抗 GFAP 抗体を用いたコントロールと同様に、1M NaCl の影響を受けなかった (図 29 b)。これらの結果から、ビオチン化 CS-A の結合は、イオン性の結合ではなく、CS-A に特異的な結合であることが示唆された。

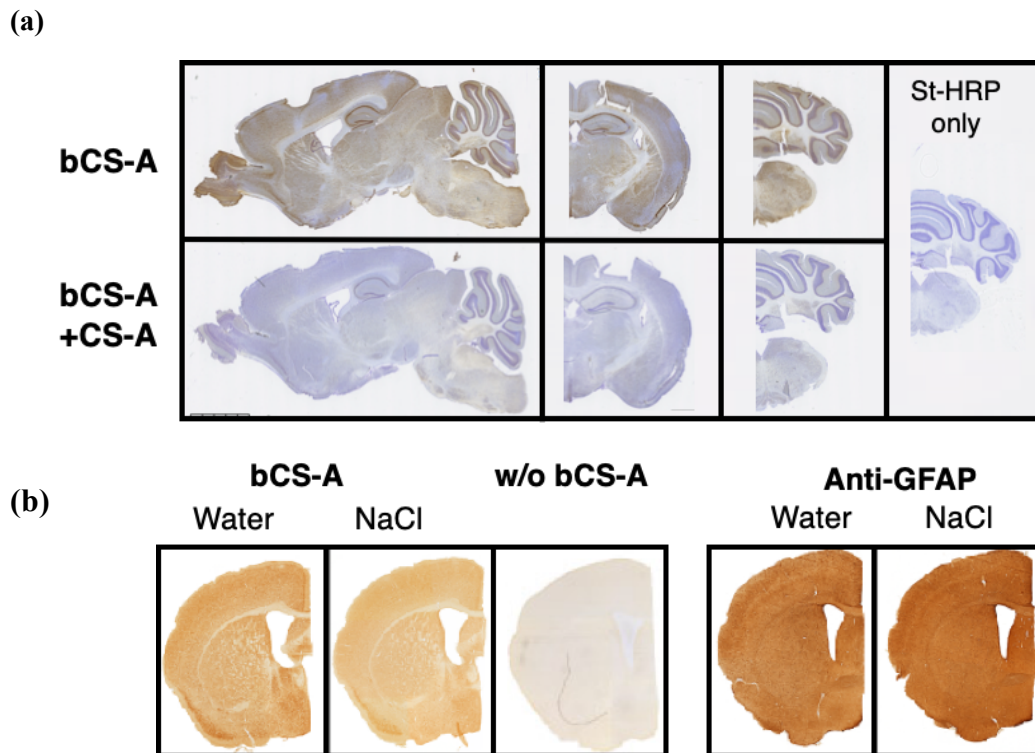


図 29. ビオチン化 CS-A のマウス脳切片における特異的な結合。(a) 非標識 CS-A、または、(b) 1M NaCl 存在下におけるビオチン化 CS-A 染色。陰性対照としてストレプトアビジン-HRP のみの染色、陽性対照として、抗 GFAP 抗体を用いた染色を示す。

上述したように、免疫組織染色においてビオチン化 CS-A は神経突起を強く染色した。そこで、実際にビオチン化 CS-A の結合が神経細胞に選択的であるかどうかを調べた (図 30-32)。実験には、アストロサイトに特異性のある GFAP と神経細胞の核に特異性のある NeuN を使用した免疫蛍光多重染色法を用いた。さらにより単純な系で確認するため、初代培養アストロサイトと初代培養海馬神経細胞の共培養を使用したビオチン化 CS-A 染色も同様に行った (図 33, 34)。その結果、アストロサイトとビオチン化 CS-A の局在は一致しなかった (図 30 a, 31)。一方で、海馬や梨状皮質においては、NeuN で染まった細胞と共局在する細胞が多く存在することが明らかとなった (図 30 b, 32)。小脳のプルキンエ細胞は、ビオチン化 CS-A で染まったが、既報の通り NeuN で染まらなかった。(図 32)。

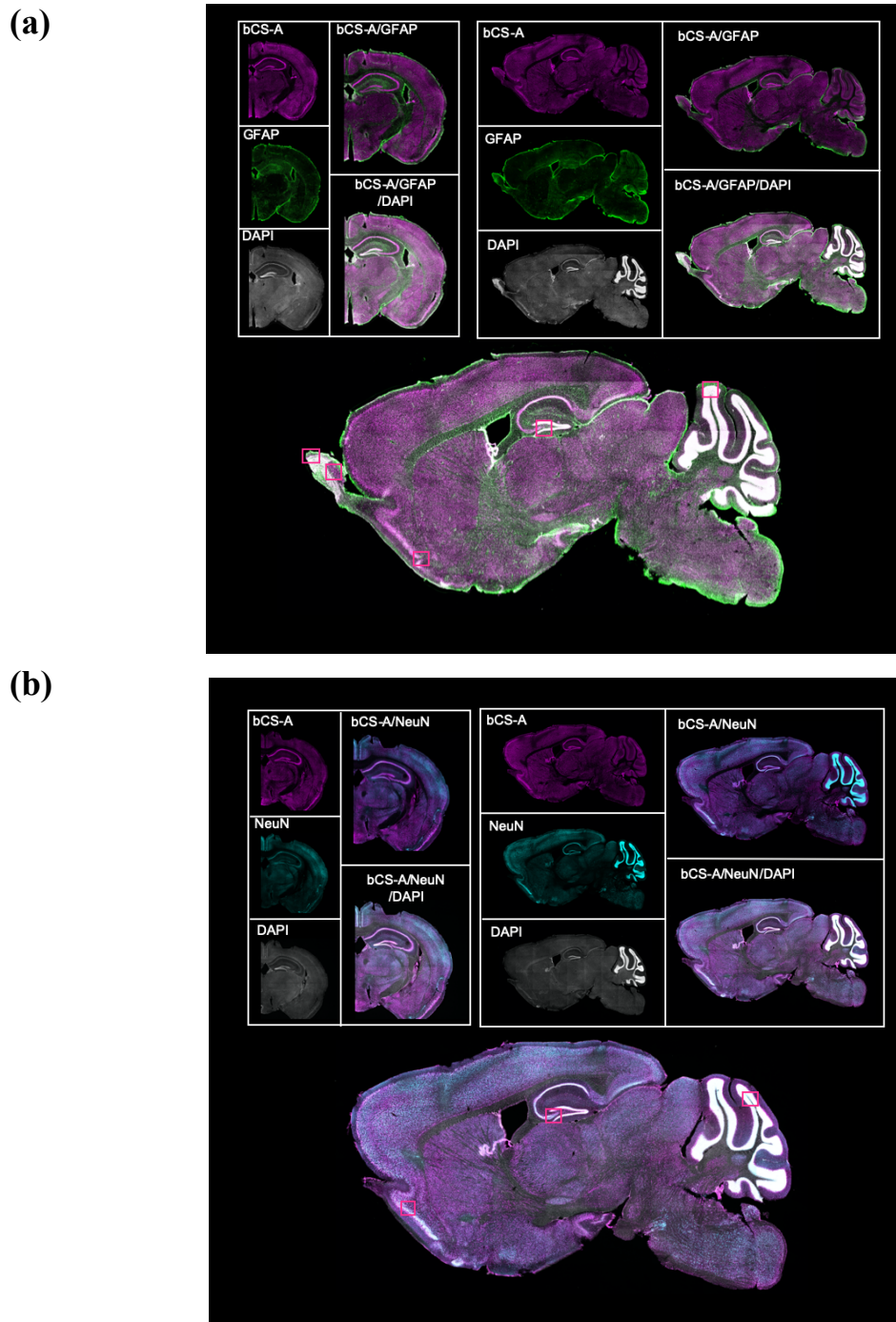


図 30. マウス脳切片におけるビオチン化 CS-A と GFAP または NeuN の多重染色 (Tile Scan)。免疫蛍光多重染色法により、マウス脳切片をビオチン化 CS-A (マゼンダ)、DAPI (白)、および (a) GFAP (緑) または、(b) NeuN (シアン) で染めた。画像は Tile Scan し、繋ぎ合わせたもの。

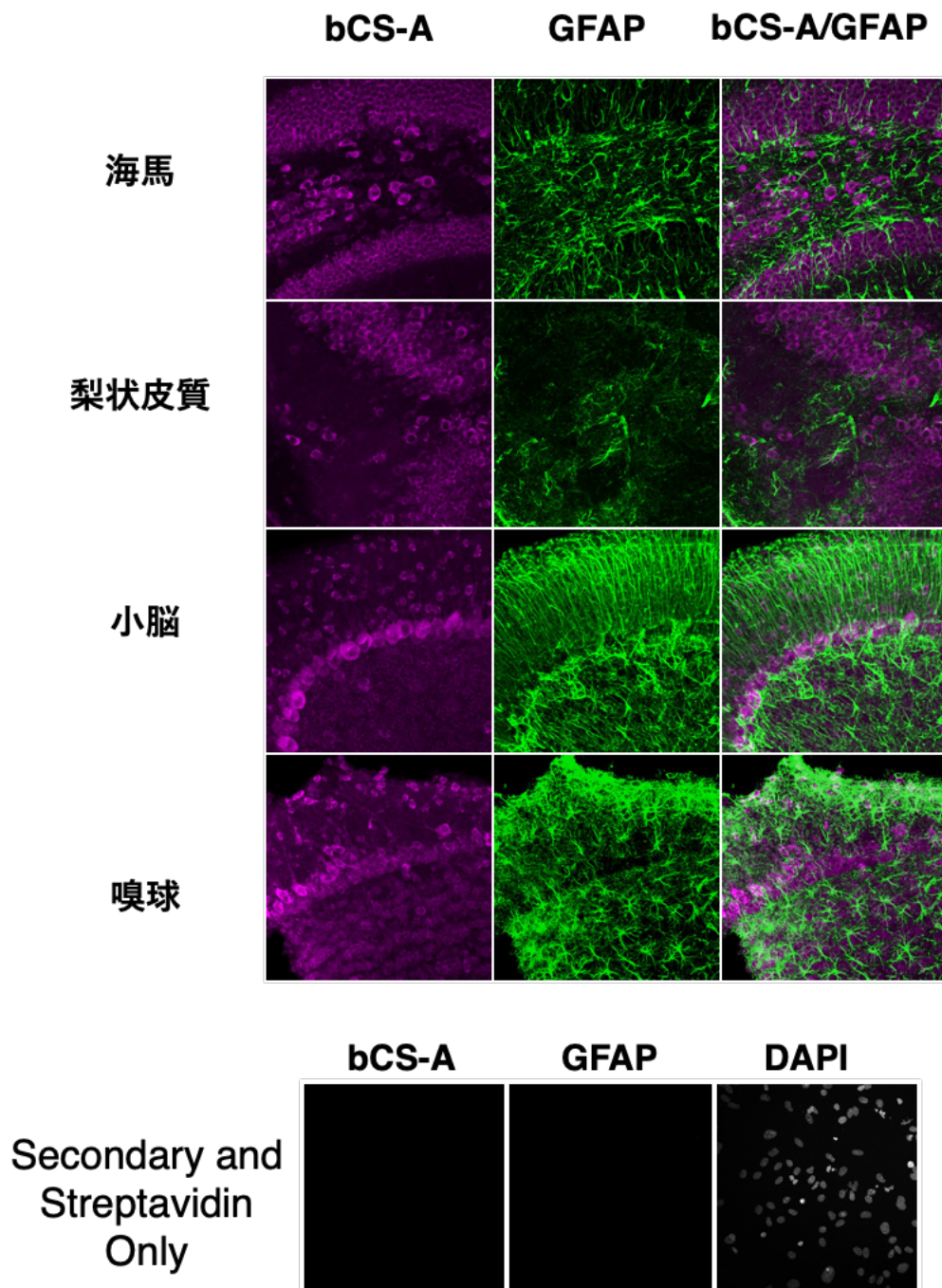


図 31. マウス脳切片におけるビオチン化 CS-A と GFAP の多重染色 (高倍率)。海馬、梨状皮質、小脳、および、嗅球におけるビオチン化 CS-A (マゼンダ) と GFAP (緑) の蛍光画像。陰性対照としてストレプトアビジン- Alexa Fluor™ 647 および DAPI のみの染色を示す。

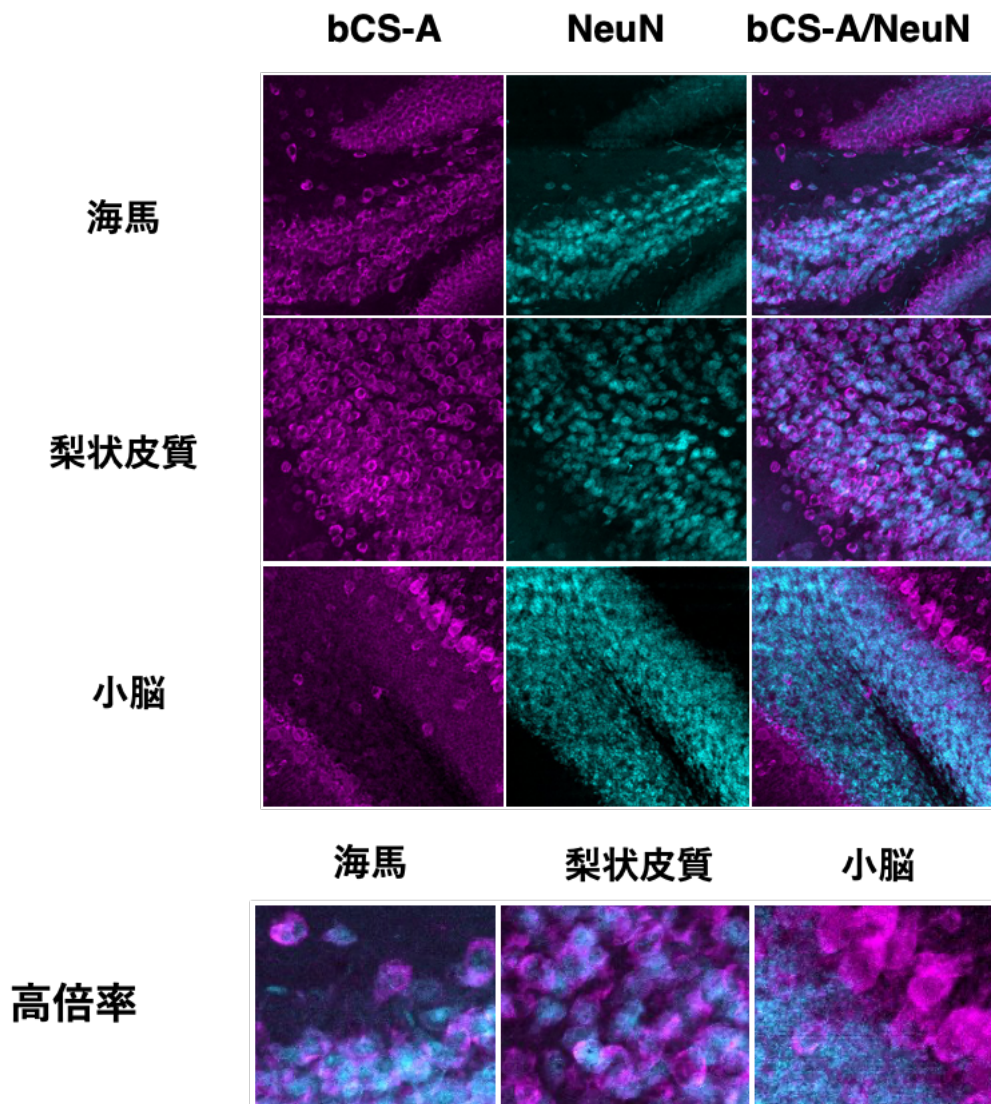


図 32. マウス脳切片におけるビオチン化 CS-A と NeuN の多重染色 (高倍率)。海馬、梨状皮質、小脳、および、嗅球におけるビオチン化 CS-A (マゼンダ) と NeuN (シアン) の蛍光画像とその高倍率画像を示す。

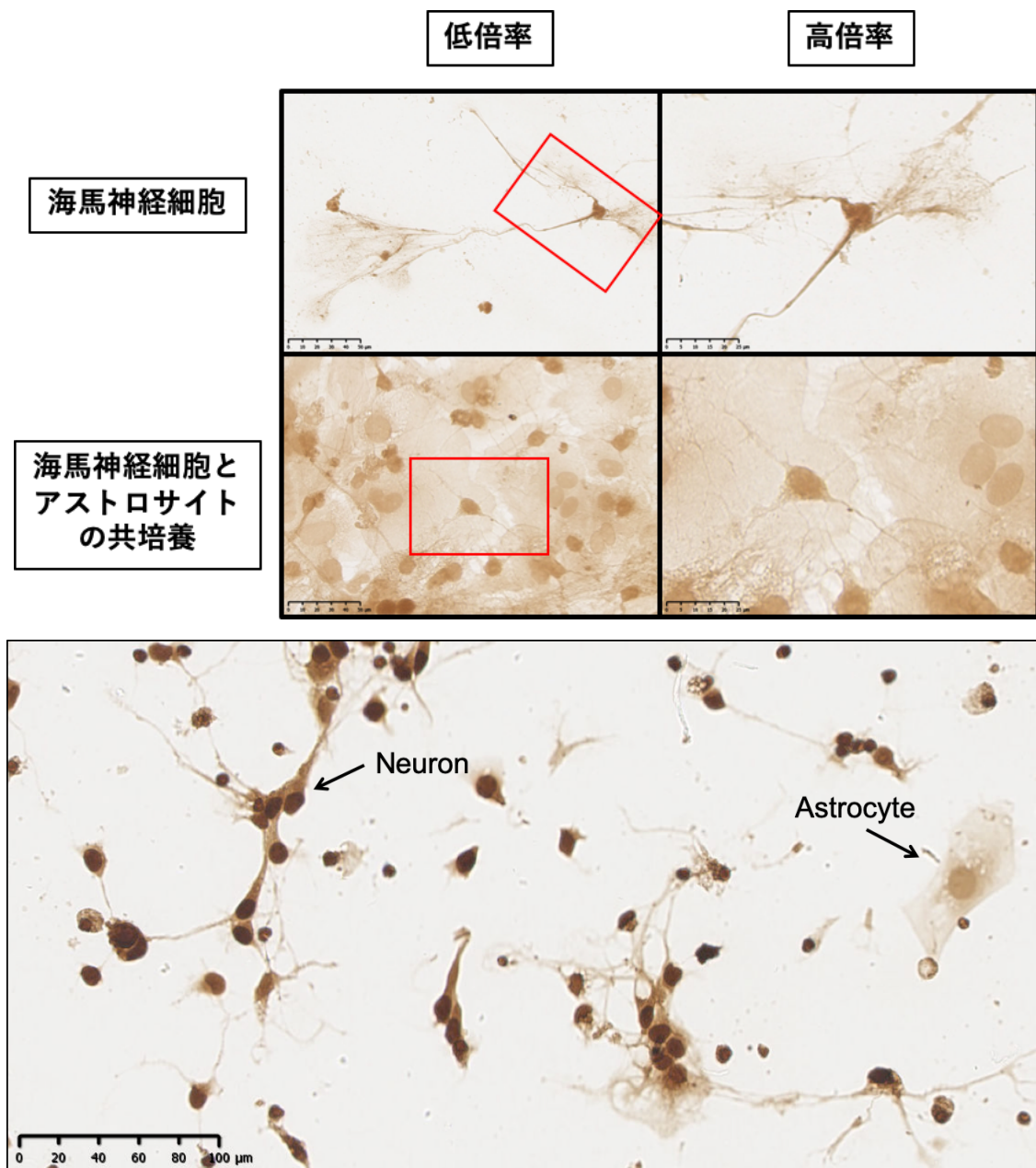


図 33. 初代培養アストロサイト、および、初代培養海馬神経細胞を用いたビオチン化 CS-A 染色。アストロサイトの単一層上に初代培養海馬細胞を培養した後、ビオチン化 CS-A 染色を施した。

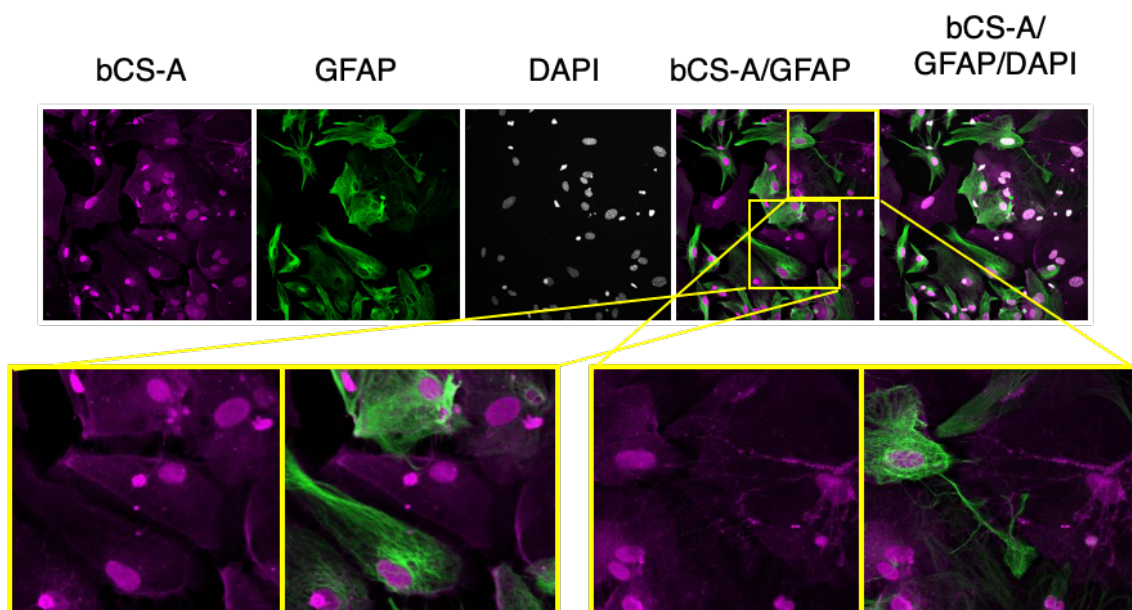


図 34. 初代培養アストロサイトと初代培養海馬神経細胞の共培養におけるビオチン化 CS-A 結合タンパク質の局在。アストロサイトの単一層上に初代培養海馬細胞を培養した後、ビオチン化 CS-A、GFAP、そして DAPI により多重染色した。

DAB 染色と免疫蛍光染色のいずれにおいても、海馬神経細胞がより強く染色された。

4-3-2. マウス小脳におけるコンドロイチン 4 硫酸結合タンパク質のプロテオーム解析

ビオチン化 CS-A がプローブとして使用できることに加え、CS-A 結合タンパク質が小脳に高発現していることが示されたため、マウス小脳における CS-A 結合タンパク質を抽出し、プロテオーム解析した。ビオチン化 CS-A は CS-A 結合タンパク質のプルダウンアッセイに使用した。マウス脳抽出物をビオチン化 CS-A とインキュベートさせた後、CS-A 結合タンパク質を磁気ビーズであるタマビジンによりプルダウンした。ビオチン溶液による磁気ビーズからの溶出後、サンプルを SDS-PAGE にて分離した。銀染色により、50 kDa 付近にバンドを検出することができた (図 35)。このバンドは、非標識 CS-A を使用した競合存在下で消失したため、50 kDa 付近のバンドを切り出し、塩基性アミノ酸 (リシンおよびアルギニン) のカルボキシ基側のペプチド結合を加水分解する酵素であるトリプシンを使用してゲル内消化した後、質量分析した。

ビオチン溶出液の銀染色

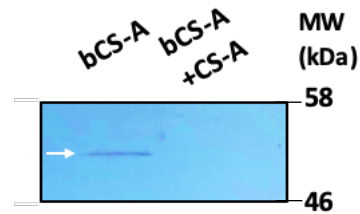


図 35. マウス小脳における CS-A 結合タンパク質の確認。ビオチン溶液による磁気ビーズからの溶出後、サンプルを SDS-PAGE により分離し、銀染色により CS-A 結合タンパク質を確認した。ビオチン CS-A とハイブリットさせたマウス小脳抽出物 (左レーン)、および、非標識 CS-A を使用して競合させたマウス小脳抽出物 (右レーン) を示す。

質量分析の結果、合計で 41 種類のタンパク質が CS-A 結合タンパク質として検出された (リストは非公開)。このうち、27%が細胞膜、細胞分泌物、細胞骨格に存在するタンパク質であり、5%が ECM に存在するタンパク質であった (図 36)。興味深いことに、アルツハイマー病で高発現するタンパク質も含まれていた。

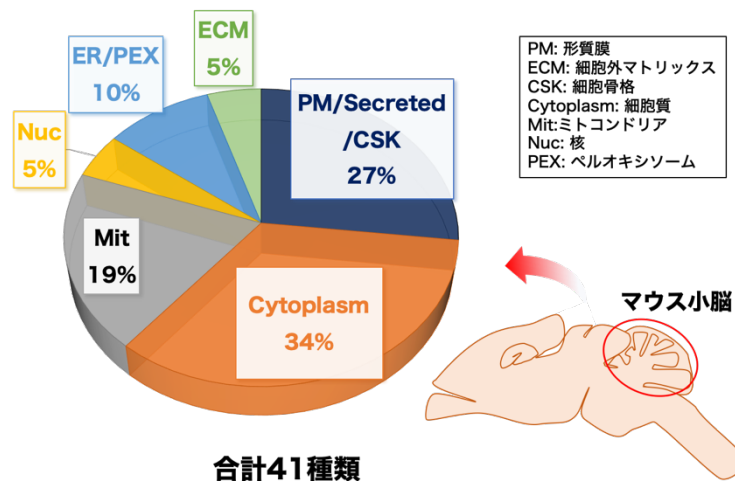


図 36. 検出されたマウス小脳における CS-A 結合タンパク質の局在。(公表前であるため、具体的なタンパク質名は伏せてある。)

4-4. 考察

ビオチン化 CS-A と NeuN が共局在する細胞が多く存在することが明らかとなった (図 30-32)。小脳のプルキンエ細胞は、ビオチン化 CS-A で染まったものの、NeuN で染まらなかったため、評価ができなかった (図 30 b, 32)。NeuN は神経細胞の核を染めるとされているが、既存のデータでは、プルキンエ細胞の核を染色することはできない。しかしながら、DAB 染色と免疫蛍光染色のいずれにおいても、海馬神経細胞がより強く染色されていることから、ビオチン化 CS-A が神経細胞に選択的な結合をする可能性が高いと言える。

界面活性剤には、n-octyl β -D-glucopyranoside (OGP) を使用した。膜タンパク質を可溶化する試薬として、ポリオキシエチレンエーテル型のノニオン界面活性剤が用いられているが、臨界ミセル濃度 (critical micelle concentration, CMC) 値が低いことに加えて、タンパク質との強い親和力のため可溶化混合物から、膜タンパク質自身を単離することが困難である。膜タンパク質の可溶化に有効な界面活性剤は未だ知られておらず、試行錯誤を繰り返しつつ選ばれているのが現状である。OGP は、同じくノニオン界面活性剤であるが、CMC=25 mmol/L と高く、さらに透析により脂質およびタンパク質から容易に分離できる。酵素活性も阻害されることがないため、膜タンパク質を可溶化するための優れた非イオン性界面活性剤である。ATPase や NADH 脱水素酵素などの膜結合酵素の研究に使用されている。OGP を使用し、ホモジネートと可溶化の条件をできるだけマイルドな条件にし、タンパク質を抽出した際に CS-A との結合能を維持させた。

今回は小脳における CS-A 結合タンパク質を解析したが、他の部位、特に CS-A の結合が多く見られた海馬や嗅球を取り出し、組織パート別で比較検討するなど、更なる解析が必要である。

4-5. 小括

CS-A や CS-E 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、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、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。興味深いことに、アルツハイマー病で高発現するタンパク質も含まれていた。以上の結

果より、ビオチン化 CS-A を用いた分析法は、CS-E や HS など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。

第5章 総括

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いない。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、進行性の神経再生を特徴としており、酸化ストレスを含む複数の要因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、ECMの主要な構成要素であり、神経軸索の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。

本研究では、広く使用されている硫酸化阻害剤である塩素酸ナトリウムを使用して、マウス海馬由来 HT22 細胞のグルタミン酸誘導性オキシトシスおよびエラスチン誘導性フェロトシスなどの内因性酸化ストレス誘導性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硫酸化の役割

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。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って誘導される細胞死が増悪された。この結果は、ECM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たことを示唆する。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産生と 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いことから、HSPG と CSPG の硫酸化は膜タンパク質のシスチン/グルタミン酸アンチポーターの機能には関与しないと考えられる。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 JNK 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 や CS-E 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。神経再生を促進する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の確立および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。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 CS-GAG 特異的な結合を確認することができた。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解析と質量分析により同定した。その結果、CS-A 結合物質は、海馬および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。質量分析では、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の候補をプロテオーム解析により 41 種類得ることができた。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。興味深いことに、アルツハイマー病で高発現するタンパク質も含まれていた。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 GAG においても解析ツールとして応用可能であり、神経再生を促進する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誘導性細胞死に対する硫酸化糖鎖の細胞保護作用が明らかとなり、さらに、硫酸化糖鎖に結合し神経再生を予測する新規標的分子を探索することができた。

参考文献

- Adams, J. D. Jr.; Klaidman, L. K.; Odunze, I. N.; Shen, H. C.; Miller, C. A. Alzheimer's and Parkinson's disease. Brain levels of glutathione, glutathione disulfide, and vitamin E. *Mol. Chem. Neuropathol.* 1991, 14, 213-226.
- Ai, X.; Do, A. T.; Lozynska, O.; Kusche-Gullberg, M.; Lindahl, U.; Emerson, C. P. Jr. QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. *J. Cell Biol.* 2003, 162, 341-351.
- Aoun, P.; Watson, D. G.; Simpkins, J. W. Neuroprotective effects of PPAR-gamma agonists against oxidative insults in HT-22 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2003, 472, 65-71.
- Avnur, Z.; Geiger, B. Immunocytochemical localization of native chondroitin-sulfate in tissues and cultured cells using specific monoclonal antibody. *Cell* 1984, 38, 811-822.
- Baeuerle, P. A.; Huttner, W. B. Chlorate-a potent inhibitor of protein sulfation in intact cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986, 141, 870-7.
- Bradbury, E. J.; Moon, L. D.; Popat, R. J.; King, V. R.; Bennett, G. S.; Patel, P. N.; Fawcett, J. W.; McMahon, S. B. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 2002, 416, 636-640.
- Behl, C.; Widmann, M.; Trapp, T.; Holsboer, F. 17- β estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995, 216, 473-482.
- Briani, C.; Bereger, J.; Latov, N. Antibodies to chondroitin sulfate C: a new detection assay and correlations with neurological diseases. *J. Neuroimmunol.* 1998, 84, 117-121.
- Campo, G. M.; D'Ascola, A.; Avenoso, A.; Campo, S.; Ferlazzo, A. M.; Micali, C.; Zanghi, L.; Calatroni, A. Glycosaminoglycans reduce oxidative damage induced by copper (Cu^{+2}), iron (Fe^{+2}) and hydrogen peroxide (H_2O_2) in human fibroblast cultures. *Glycoconj. J.* 2004, 20, 133-41.
- Cheignon, C.; Tomas, M.; Bonnefont-Rousselot, D.; Faller, P.; Hureau, C.; Collin, F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox. Biol.* 2018, 14, 450-464.
- Chung, K. Y.; Taylor, J. S.; Shum, D. K.; Chan, S. O. Axon routing at the optic chiasm after enzymatic removal of chondroitin sulfate in mouse embryos. *Development* 2000, 127, 2673-2683.
- Dargusch, R.; Schubert, D. Specificity of resistance to oxidative stress. *J. Neurochem.* 2002, 81, 1394-1400.

- Dudas, B.; Rose, M.; Cornelli, U.; Pavlovich, A.; Hanin, I. Neuroprotective properties of glycosaminoglycans: potential treatment for neurodegenerative disorders. *Neurodegener. Dis.* 2008, 5, 200-205.
- Fadel, S.; Eley, A. Chlorate: a reversible inhibitor of proteoglycan sulphation in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *J Med Microbiol* 2004, 53, 93-5.
- Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Tung, Y. C.; Quinlan, M.; Wisniewski, H. M.; Binder, L. I. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1986, 83, 4913-4917.
- Higashi, L. S.; Yagy, K.; Nagase, H.; Pearson, S. C.; Geller, H. M.; Katagiri, Y. Old but not Obsolete: An Enhanced High Speed Immunoblot. *J. biochem.* 2020.
- Hirata, Y.; Ito, Y.; Takashima, M.; Yagy, K.; Oh-Hashi, K.; Suzuki, H.; Ono, K.; Furuta, K.; Sawada, M. Novel oxindole-curcumin hybrid compound for antioxidative stress and neuroprotection. *ACS Chem. Neurosci.* 2020, 11, 76-85.
- Hirata, Y.; Yamada, C.; Ito, Y.; Yamamoto, S.; Nagase, H.; Oh-Hashi, K.; Kiuchi, K.; Suzuki, H.; Sawada, M.; Furuta, K. Novel oxindole derivatives prevent oxidative stress-induced cell death in mouse hippocampal HT22 cells. *Neuropharmacology* 2018, 135, 242-252.
- Hissin, P. J.; Hilf, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 1976, 74, 214-26.
- Hrabetova, S.; Masri, D.; Tao, L.; Xiao, F.; Nicholson, C. Calcium diffusion enhanced after cleavage of negatively charged components of brain extracellular matrix by chondroitinase ABC. *J. Physiol.* 2009, 587, 4029-4049.
- Humphries, D. E.; Silbert, J. E. Chlorate: a reversible inhibitor of proteoglycan sulfation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 154, 365-371.
- Ishige, K.; Schubert, D.; Sagara, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 30, 433-446.
- Jelinek, A.; Heyder, L.; Daude, M.; Plessner, M.; Krippner, S.; Grosse, R.; Diederich, W. E.; Culmsee, C. Mitochondrial rescue prevents glutathione peroxidase-dependent ferroptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 2018, 117, 45-57.
- Johnson, J. A.; Johnson, D. A.; Kraft, A. D.; Calkins, M. J.; Jakel, R. J.; Vargas, M. R.; Chen, P. C. The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008, 1147, 61-9.
- Kurucz, A.; Bombicz, M.; Kiss, R.; Priksz, D.; Varga, B.; Hortobagyi, T.; Trencsenyi, G.; Szabo, R.; Posa, A.; Gesztelyi, R.; Szilvassy, Z.; Juhasz, B. Heme Oxygenase-1 Activity as a

- Correlate to Exercise-Mediated Amelioration of Cognitive Decline and Neuropathological Alterations in an Aging Rat Model of Dementia. *Biomed. Res. Int.* 2018, 7212861.
- Lewerenz, J.; Ates, G.; Methner, A.; Conrad, M.; Maher, P. Oxytosis/Ferroptosis-(Re-) Emerging Roles for Oxidative Stress-Dependent Non-apoptotic Cell Death in Diseases of the Central Nervous System. *Front. Neurosci.* 2018, 12, 214.
- Li, J.; Zrazhevskiy, P.; Gao, X. Eliminating Size-Associated Diffusion Constraints for Rapid On-Surface Bioassays with Nanoparticle Probes. *small* 2016, 12, 1035-1043.
- Lin, C. M.; Lin, R. D.; Chen, S. T.; Lin, Y. P.; Chiu, W. T.; Lin, J. W.; Hsu, F. L.; Lee, M. H. Neurocytoprotective effects of the bioactive constituents of *Pueraria thomsonii* in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated nerve growth factor (NGF)-differentiated PC12 cells. *Phytochemistry* 2010, 71, 2147-56.
- Lin, X.; Buff, E. M.; Perrimon, N.; Michelson, A. M. Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development. *Development* 1999, 126, 3715-3723.
- Maher, P.; Davis, J. B. The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. *J. Neurosci.* 1996, 16, 6394-401.
- McKeon, R. J.; Höke, A.; Silver, J. Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp. Neurol.* 1995, 136, 32-43.
- McNally, S. J.; Harrison, E. M.; Ross, J. A.; Garden, O. J.; Wigmore, S. J. Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. *Int. J. Mol. Med.* 2007, 19, 165-172.
- Murphy, T. H.; Miyamoto, M.; Sastre, A.; Schnaar, R. L.; Coyle, J.T. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 1989, 2, 1547-1558.
- Naylor, M. C.; Negia, M.; Noetzel, M.; Burns, T. C.; Demorest, Z. L.; Low, W.C. Heparan sulfate mediates neuroprotection from degeneration in experimental glutaric aciduria. *Cell Transplant.* 2007, 16, 187-195.
- Okamoto, M.; Mori, S.; Endo, H. A protective action of chondroitin sulfate proteoglycans against neuronal cell death induced by glutamate. *Brain Res.* 1994, 637, 57-67.
- Okamoto, M.; Mori, S.; Ichimura, M.; Endo, H. Chondroitin sulfate proteoglycans protect cultured rat's cortical and hippocampal neurons from delayed cell death induced by excitatory amino acids. *Neurosci. Lett.* 1994, 172, 51-54.

- Pizzorusso, T.; Medini, P.; Berardi, N.; Chierzi, S.; Fawcett, J. W.; Maffei, L. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* 2002, 298, 1248-1251.
- Sajjad, S.; Do, M. T.; Shin, H. S.; Yoon, T. S.; Kang, S. Rapid and efficient western blot assay by rotational cyclic draining and replenishing procedure. *Electrophoresis* 2018, 39, 2974-2978.
- Sato, Y.; Nakanishi, K.; Tokita, Y.; Kakizawa, H.; Ida, M.; Maeda, H.; Matsui, F.; Aono, S.; Saito, A.; Kuroda, Y.; Hayakawa, M.; Kojima, S.; Oohira, A. A highly sulfated chondroitin sulfate preparation, CS-E, prevents excitatory amino acid-induced neuronal cell death. *J. Neurochem.* 2008, 104, 1565-1576.
- Schwartz, N. B.; Domowicz, M. S. Proteoglycans in brain development and pathogenesis. *FEBS Lett.* 2018, 592, 3791-3805.
- Silver, J.; Miller, J. H. Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004, 5, 146-156.
- Stockwell, B. R.; Friedmann Angeli, J. P.; Bayir, H.; Bush, A. I.; Conrad, M.; Dixon, S. J.; Fulda, S.; Gascon, S.; Hatzios, S. K.; Kagan, V. E.; Noel, K.; Jiang, X.; Linkermann, A.; Murphy, M. E.; Overholtzer, M.; Oyagi, A.; Pagnussat, G. C.; Park, J.; Ran, Q.; Rosenfeld, C. S.; Salnikow, K.; Tang, D.; Torti, F. M.; Torti, S. V.; Toyokuni, S.; Woerpel, K. A.; Zhang, D. D. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell* 2017, 171, 273-285.
- Suttkus, A.; Morawski, M.; Arendt, T. Protective Properties of Neural Extracellular Matrix. *Mol. Neurobiol.* 2016, 53, 73-82.
- Suttkus, A.; Rohn, S.; Jager, C.; Arendt, T.; Morawski, M. Neuroprotection against iron-induced cell death by perineuronal nets - an in vivo analysis of oxidative stress. *Am. J. Neurodegener. Dis.* 2012, 1, 122-9.
- Takashima, M.; Ichihara, K.; Hirata, Y. Neuroprotective effects of Brazilian green propolis on oxytosis/ferroptosis in mouse hippocampal HT22 cells. *Food. Chem. Toxicol.* 2019, 132, 110669.
- Tan, S.; Schubert, D.; Maher, P. Oxytosis: A novel form of programmed cell death. *Curr. Top. Med. Chem.* 2001, 1, 497-506.
- van den Born, J.; Salmivirta, K.; Henttinen, T.; Ostman, N.; Ishimaru, T.; Miyaura, S.; Yoshida, K.; Salmivirta, M. Novel heparan sulfate structures revealed by monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 20516-20523.

- Wang, H.; Katagiri, Y.; McCann, T. E.; Unsworth, E.; Goldsmith, P.; Yu, Z. X.; Tan, F.; Santiago, L.; Mills, E. M.; Wang, Y.; Symes, A. J.; Geller, H. M. Chondroitin-4-sulfation negatively regulates axonal guidance and growth. *J. Cell Sci.* 2008, 121, 3083-3091.
- Xie, Y.; Hou, W.; Song, X.; Yu, Y.; Huang, J.; Sun, X.; Kang, R.; Tang, D. Ferroptosis: process and function. *Cell Death. Differ.* 2016, 23, 369-379.
- Yi, J. H.; Katagiri, Y.; Susarla, B; Figge, D; Symes, A. J; Geller, H. M. Alterations in sulfated chondroitin glycosaminoglycans following controlled cortical impact injury in mice. *J. Comp. Neurol.* 2012, 520, 3295-3313.
- 三上雅久、北川裕之、生化学 2011, 83, 21-29.

略語一覽

ARE	: antioxidant response element
ATP	: adenosine triphosphate
ChABC	: chondroitinase ABC
DMEM	: dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DNA	: deoxyribonucleic acid
ECM	: extracellular matrix
EDTA	: ethylene diamine tetra acetic acid
GAPDH	: glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase
GPx	: glutathione peroxidase
GSH	: glutathione
CMC	: critical micelle concentration
CSPG	: chondroitin sulfate proteoglycan
GSSG	: glutathione disulfide
H ₂ O ₂	: hydrogen peroxid
HO-1	: Heme oxygenase-1
HSPG	: heparan sulfate proteoglycan
LDH	: lactate dehydrogenase
LOX	: lipoxygenase
NMDA	: N-methyl-D-aspartate
NaPB	: sodium phosphate buffer
Nrf2	: NF-E2 related factor 2
MeOH	: Methanol
MW	: molecular weight
O ₂ • -	: superoxide anion
OH •	: hydroxyl radical
PNN	: perineuronal net
PVDF	: polyvinylidene difluoride
ROS	: reactive oxygen species
SDS	: sodium lauryl sulfate
TEMED	: tetra methyl ethyl enediamine
TFR	: transferrin receptor

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました、連合創薬医療情報研究科 平田 (森田) 洋子教授に篤く御礼申し上げます。

本稿の作成にあたり、御校閲を賜りました、連合創薬医療情報研究科 横川隆志教授、丹羽雅之教授、大橋憲太郎准教授に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、温かい御指導ならびに御鞭撻を賜りました、アメリカ国国立衛生研究所心肺血液研究所 Herbert M. Geller 博士、片桐康博博士、Zu-Xi Yu 博士、Yong Chen 博士、研究員諸氏に深謝いたします。

留学に際しては、文部科学省トビタテ！留学 JAPAN 日本代表プログラムより資金援助をいただきました。ここに深甚なる謝意を表します。

最後に、本研究の遂行にあたり多くのご協力をいただきました、森田研究室、旧 北出研究室・現 池田研究室の皆様に深く感謝いたします。

令和2年3月
長瀬 春奈

発表論文

1. Haruna Nagase, Yasuhiro Katagiri, Kentaro Oh-hashii, Herbert M. Geller, and Yoko Hirata, Reduced Sulfation Enhanced Oxytosis and Ferroptosis in Mouse Hippocampal HT22 Cells., *Biomolecules* 10, 92 (2020)
(第二章に全文記載)

参考論文

1. Sayuri L. Higashi, Kazuya Yagyu, Haruna Nagase, Craig S. Pearson, Herbert M. Geller, and Yasuhiro Katagiri, Old but not Obsolete: An Enhanced High Speed Immunoblot., *Journal of Biochemistry* (in press)
(第三章に記載)
2. Yoko Hirata, Chika Yamada, Yuki Ito, Shotaro Yamamoto, Haruna Nagase, Kentaro Oh-hashii, Kazutoshi Kiuchi, Hiromi Suzuki, Makoto Sawada, and Kyoji Furuta, Novel Oxindole Derivatives Prevent Oxidative Stress-Induced Cell Death in Mouse Hippocampal HT22 Cells., *Neuropharmacology* 135, 242-252 (2018)
(第二章に記載)