

氏 名 橋本 弘和

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1694 号

学位授与の日付 平成26年3月20日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Keratan sulfate affects sonic hedgehog signaling and regulates  
mouse spinal cord development

論文審査委員 主 査 教授 吉村 由美子  
教授 池中 一裕  
教授 高田 慎治  
教授 門松 健治 名古屋大学

論文内容の要旨  
Summary of thesis contents

Neurons and glial cells of the central nervous system (CNS) are generated from neural stem cells in a highly specific manner, both spatially and temporally. In the embryonic spinal cord, several secretory factors, such as Wnt, BMP and Shh, act as morphogen and regulate development. Wnt and BMP are secreted from the roof plate, and Shh are secreted from the floor plate and the notochord. They are involved in the patterning of the spinal cord. Wnts and Shh bind to acidic sugar chains, for example, heparan sulfate, chondroitin sulfate and keratan sulfate. I hypothesized that the interaction between morphogens and acidic sugar chains play essential roles in the pattern formation of embryonic spinal cord. In this study, I analyzed involvement of keratan sulfate.

Keratan sulfate is a glycosaminoglycan. It is composed of repeating disaccharide units of galactose and N-acetylglucosamine (GlcNAc), where the C6 position of GlcNAc is always sulfated. Keratan sulfate is expressed in the cornea, cartilage, bone and the CNS during development. Although there are several reports showing that keratan sulfate is an important factor for the glial scar formation following an injury, corneal development and healing, function of keratan sulfate in the spinal cord development remains to be investigated. First, I analyzed localization of keratan sulfate in the embryonic spinal cord. Highly sulfated keratan sulfate was expressed in the floor plate and the notochord. This expression pattern colocalized with Shh expression. Genes of all the enzymes involved in keratan sulfate synthesis were expressed in the embryonic mouse spinal cord. Next, to understand roles of keratan sulfate, I analyzed the keratan sulfate null mouse spinal cord. This mouse is deficient in GlcNAc6ST-1, which is essential for keratan sulfate chain elongation. I first examined the position of domain structures by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. I could not find any change at E10.5. At E12.5, however, the domain structure shifted ventrally in the keratan sulfate null spinal cord; pMN domain shifted ventrally and the length of p2 and p3 domain was decreased. Formation of these domain structures were controlled by Shh signaling. Thus I checked the Shh signaling as well as Wnt signaling, representing dorsal morphogens. Wnt signaling was monitored by the expression of Axin2, which did not change between wild type (WT) and keratan sulfate null mice at E10.5 and E12.5. Expression of Shh signaling reporter gene, Patched1, also did not change between WT and keratan sulfate null mice at E10.5. However, at E12.5, Patched1 expression pattern was different between WT and keratan sulfate null mice. I thus focused on Sulf1, heparan sulfate endosulfatase, involved in the Shh signaling and oligodendrocyte

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

development. In the E12.5 keratan sulfate null mice, the length of Sulf1 expressing region decreased. It is possible that keratan sulfate regulates Sulf1 expression in the embryonic spinal cord via alternation of Shh signaling since Sulf1 expression is regulated by Shh signaling.

These phenotypes may affect differentiation of neural stem cells in the embryonic spinal cord. I focused on cell types generated from the pMN domain. The pMN domain generates motor neurons and subsequently oligodendrocytes. PDGFR $\alpha$ , a marker for oligodendrocyte precursor cell, was hardly detected in the E12.5 spinal cord. In addition, at E14.5 the number of oligodendrocyte precursor cells still tended to be decreased. Moreover, motor neuron production analyzed by Islet1/2 immunohistochemistry was increased at E12.5. These excessively generated motor neurons were eliminated by apoptosis and microglial phagocytosis at later stages. On the other hand, decrease in the number of oligodendrocyte lineage cells was caught up by P0.

Finally, since pMN domain position shifted ventrally in the keratan sulfate null mice, I investigated oligodendroglial specification; whether the switch from motor neuron production to oligodendrocyte production was abnormal in the pMN domain. Oligodendroglial specification is marked by the induction of the SOX10 expression. Following that, coexpression of Olig2 with Nkx2.2 promotes oligodendrocyte differentiation. I showed the SOX10 expression at E12.5, did not change between wild type and keratan sulfate null mice. On the other hand, the number of Olig2, Nkx2.2 double positive cells was decreased in the keratan sulfate null mice. Thus switching of motor neuron generation to oligodendrocyte generation was abnormal.

The number of double positive cells was decreased in keratan sulfate

Taken together, my study suggests that keratan sulfate chain plays important roles in the pattern formation and oligodendrocyte development in the embryonic spinal cord.

(Separate Form 3)

## 博士論文の審査結果の要旨

### Summary of the results of the doctoral thesis screening

中枢神経系を構成するニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトは共通の起源を持つ神経幹細胞から産生され、その産生過程は発生時期に依存して高度な制御を受けている。特に胎生期脊髄では脊髄の背腹軸に沿ってドメイン構造が形成されており、それぞれのドメインからは異なる種類のニューロンやグリア細胞が産生される。Wnt や Shh といったモルフォゲンは脊髄ドメイン構造の形成やそこから産生される細胞分化に影響を与えている。Wnt や Shh には Cardin-Weintraub 配列と呼ばれる塩基性に富んだ配列を含んでいる事から、酸性の物質である硫酸化糖鎖と結合しやすい事が知られている。しかしながら硫酸化糖鎖の一つであるケラタン硫酸については、胎生期マウス脊髄において Wnt や Shh シグナリングにどのような影響を与えているかほとんど分かっていなかった。

橋本弘和氏はこのような背景を踏まえて、まず胎生期脊髄におけるケラタン硫酸の発現パターンを解析した。高硫酸化されたケラタン硫酸が Floor plate や Notochord に集積していた事から、Shh との相互作用が示唆された。そこでケラタン硫酸欠損マウスを用い、胎生期脊髄におけるドメイン構造及び細胞分化について解析を行なったところ、胎生 12.5 日においてドメイン構造の腹側へのシフトが観察された。特に Olig2 陽性となる pMN ドメインでは、幅は変わらずに位置だけが腹側へ移動しているという興味深い結果が得られた。加えて p2、p3 ドメインはその幅が有意に減少している事を見出した。そこで Shh のシグナリングに着目し、レポーター遺伝子である Patched1 の発現を調べた結果、その発現パターンに変化がみられた。このことからケラタン硫酸の欠損により Shh シグナリングパターンの変化が起こり、その結果としてドメイン構造が腹側へシフトしたものと考えられる。次にドメイン構造のシフトが細胞分化に与える影響について検討した。pMN ドメインは発生初期に運動ニューロンを産生するが、胎生 12.5 日からオリゴデンドロサイト前駆細胞の産生へと変化することが知られている。そこで胎生 12.5 日におけるオリゴデンドロサイトの分化について解析を行い、ケラタン硫酸欠損マウスにおいて前駆細胞の数が著しく減少している事を明らかにした。この減少は胎生 14.5 日においても観察されるが、生後までには回復する結果も得た。よってケラタン硫酸の欠損により胎生期オリゴデンドロサイトの発生が遅れることを明らかにした。一方で、同じく pMN ドメインより産生される運動ニューロンについて調べたところ、胎生 12.5 日ケラタン硫酸欠損マウスにおいて運動ニューロン産生が続き、過剰な運動ニューロンが存在している事も明らかとなった。過剰に産生された運動ニューロンは、胎生 14.5 日にアポトーシスもしくはミクログリアによる貪食によってその数が調整されていた。pMN ドメインにおけるこれらの表現系は運動ニューロン産生からオリゴデンドロサイト前駆細胞産生へスイッチングの遺伝子制御異常によるものと考えられる事から関連遺伝子の発現を調べた。すると、オリゴデンドロサイトの分化誘導因子である Nkx2.2:Olig2 ダブルポジティブとなる細胞の割合が有意に減少していた。対照的に、運動ニューロンの分化誘導因子である Neurogenin2:Olig2 ダブルポジティブとなっている細胞の割合が有意に増加している事を見出した。よってケラタン硫酸欠損により pMN ドメインにおける運動ニューロン産生からオリゴデンドロサイト産生へのスイッチングが遺伝子発現制御異常により遅れていることがわかった。

以上の結果よりケラタン硫酸欠損マウスにおいて観察されたドメインのシフトや pMN ドメインにおける分化の遅れは、ケラタン硫酸欠損により Shh シグナリングに異常が生じ、発生・分化関連遺伝子の異常を誘導することにあると示された。

以上の結果は、脊髄の発生・分化におけるケラタン硫酸の機能を明らかにした内容であり、発生期にお

(Separate Form 3)

ける糖鎖の機能を考える上で重要な情報を提供していることから、学位論文として十分な内容を有している  
と判断された