

令和元年6月26日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09682

研究課題名(和文) 神経筋疾患におけるジストログリカンプロセッシングの意義と病態関与に関する研究

研究課題名(英文) Significance of dystroglycan processing and its participation in the pathogenesis of neuromuscular disorders

研究代表者

松村 喜一郎 (Matsumura, Kiichiro)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：50260922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：筋ジストロフィーの一型である -ジストログリカンパチーはジストログリカンの異常によって生じる。 -ジストログリカンのN末端ドメイン(-DG-N)はプロセッシングの結果細胞外へ分泌されるが、分泌された -DG-Nの機能は不明である。本研究はこの機能を明らかにすることを目的として行われた。先行研究の結果から -DG-Nは中枢神経系に影響を及ぼすことが予測されたが遺伝子改変マウスの解析の結果このような作用は確認されなかった。一方で全く予期しなかった -DG-Nの機能が明らかとなった。それは -DG-Nがインフルエンザの感染を抑制するというものであり、今後同感染症の治療への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

-ジストログリカンのN末端ドメイン(-DG-N)の機能はこれまで不明であった。しかし今回の研究によってインフルエンザウイルスの増殖を抑制するという思いがけない作用を有することが明らかとなった。インフルエンザは全世界で毎年300-500万人が罹患し、その結果25-50万人が死亡していると推定されている。また先進国においてもインフルエンザによる高齢者の死亡が問題となっている。今後 -DG-Nを用いたインフルエンザに対する新たな治療法開発への道が開かれるかもしれない。

研究成果の概要(英文)： -Dystroglycanopathy, a type of muscular dystrophy, is caused by abnormal post-translational modifications. Although the N-terminal domain of -dystroglycan (-DG-N) is secreted from cells by processing, the function of secreted -DG-N remains unknown. This study was performed to elucidate the function. -DG-N was presumed to affect the extension of neurites in central nervous system by the results of a previous report. However, this function was not ascertained in vivo using gene-modified mice. On the other hands, an unexpected function of -DG-N was revealed. Indeed, -DG-N inhibits infection of influenza virus. Thus, it is possible that -DG-N may be applied to the therapy of influenza infection in the future.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋ジストロフィー ジストログリカン インフルエンザ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ジストログリカン (DG)は、細胞外に存在する膜表在性蛋白質の α -ジストログリカン (α -DG)と膜貫通型蛋白質である β -ジストログリカン (β -DG)から成り DG 複合体を形成している。そして細胞外で基底膜中のラミニンと、細胞内でジストロフィンを介して細胞骨格と結合している。この DG 複合体は細胞内外の架橋構造を形成し、細胞の形態維持やシグナル伝達などに重要な役割を果たしている。これまでにこの DG による架橋構造の破綻によって各種の筋ジストロフィーが発症することが明らかにされてきた。なかでも各種の糖転移酵素の変異による α -DG の糖鎖修飾の異常は、脳奇形や眼球異常を合併する重症型の先天性筋ジストロフィーから比較的軽症の肢帯型筋ジストロフィーまでの幅広い疾患スペクトラムを呈し α -ジストログリカノパチーと総称されている。本邦において特異的に高頻度で発症する福山型先天性筋ジストロフィーはこの代表的な疾患である。一方で、 α -DG のもうひとつの翻訳後修飾に N 末端ドメインのプロセッシングがある。 α -DG は N 末端ドメイン、ムチン様ドメイン、C 末端ドメインから成るが、この N 末端ドメインは proprotein convertase の一つである furin によって切断される。この点に関して我々の研究グループは α -DG-N が各種の培養細胞において切断後直ちに細胞外へ分泌されること、また脳脊髄液中には高濃度の α -DG-N が存在していることなどを報告し α -DG N 末端ドメインのプロセッシング研究を推進してきた。さらに α -DG-N のアミノ酸置換を伴う点変異により認知機能障害を伴う筋ジストロフィーが発症することが見いだされ α -DG-N と疾患との関連が注目され始めている。しかし現時点では α -DG-N のプロセッシングがいかなる生理学的意義を有するのか、また各種病態とどのような関わりを持つのか全く不明のままである。

2. 研究の目的

我々はこれまでに α -DG-N を欠損するノックインマウスの作出を試みたが胎生致死であったことから、 α -DG-N は生体に不可欠な機能を有するものと考えられる。また一般的に細胞表面に存在する成長因子やサイトカインはプロテアーゼによるプロセッシングを受けて初めて活性型の蛋白質になることが知られている。例えばヘパリン結合性 EGF 様成長因子は細胞外ドメインが切断・分泌され、ErbB 受容体と結合して細胞内シグナル伝達を惹起する。これらの事実を考え合わせると、切断・分泌された α -DG-N が未知の重要な生物学的機能を有する可能性は高いものと推察される。一方で最近我々は *in vivo* における α -DG-N のプロセッシングやその機能を解析するために α -DG-N のトランスジェニックマウス (α -DG-N Tg マウス) を作出した。そして同マウスでは大脳や骨格筋をはじめとする各臓器において α -DG-N が高発現していることを確認している。本研究ではこれら遺伝子改変マウスを用いて 1) α -DG-N の未知の機能を明らかにすること、そして 2) α -DG-N の疾患における病態への関与を検討することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) α -DG の翻訳後修飾と中枢神経系の細胞構築に関する解析

我々はこれまでの研究で α -DG-N を過剰発現するトランスジェニックマウス (α -DG-N Tg マウス) および α -DG-N と結合して α -DG の糖鎖修飾を行う糖転移酵素 LARGE のトランスジェニックマウス (LARGE Tg マウス) を作出してきた。一方先行研究において α -DG-N には培養細胞 (PC12) の神経突起進展作用があることが報告されている。このため α -DG-N には中枢神経系において何らかの作用を有している可能性が考えられた。そこでこの現象を *in vivo* で検討するためにこれら遺伝子改変マウスの脳を光学顕微鏡および蛍光顕微鏡を用いて形態学的な観察を行った。

(2) α -DG-N のインフルエンザウイルス感染抑制の検討

α -DG-N は proprotein convertase の一つである furin によって切断される。従って furin の発現が α -DG-N の分泌を規定している大きな因子と考えられる。そしてこの furin の産生は炎症によって亢進するとの知見がある。そこで頻度の高い代表的な炎症性疾患の一つであるインフルエンザ感染症を対象として、 α -DG-N と A 型インフルエンザウイルス感染との関連を検討した。このためにタモキシフェン誘導性の α -DG-N ノックアウトマウスと野生型マウスの気道および肺におけるインフルエンザウイルスの感染力価を比較検討した。さらに α -DG-N 発現アデノウイルスやリコンビナント α -DG-N 蛋白質をマウスの鼻腔に投与してその前後でのウイルス感染力価の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) α -DG の翻訳後修飾と中枢神経系の細胞構築に関する解析

光学顕微鏡および蛍光顕微鏡を用いて遺伝子改変マウスの脳の形態学的な解析を行った。その結果 LARGE Tg マウスにおいて小脳分子層の形成不全、プルキンエ細胞の脱落などの異常所見を認めたが、大脳や脳幹では明らかな異常は認められなかった。一方で α -DG-N Tg マウス脳では大脳や小脳、脳幹の細胞構築に際立った異常は認められなかった。これらの結果から予想に反して α -DG-N のプロセッシングよりも LARGE による α -DG の糖鎖修飾の方が小脳神経細胞の発生に影響を及ぼしている可能性が示された。

(2) α -DG-N のインフルエンザウイルス感染抑制の検討

α -DG-N と A 型インフルエンザウイルス感染との関連を検討するためにタモキシフェン誘導性 α -DG-N ノックアウトマウスと野生型マウスに A 型インフルエンザウイルスの PR8 株を感染させた。この結果 α -DG-N ノックアウトマウスの肺において野生型よりも有意に高い同ウイルスの感染力価を認めた (下図 A)。この結果から α -DG-N はインフルエンザウイルスの感染に対して抑制的に働いている可能性が考えられた。そこで α -DG-N を発現するアデノウイルスを野生型マウスの鼻腔に感染させた後インフルエンザウイルスを感染させたところ、肺におけるインフルエンザウイルス感染力価の有意な低下を認めた。さらにリコンビナント α -DG-N 蛋白質を鼻腔に投与した後インフルエンザウイルスを感染させたところ、同様にウイルス感染力価の有意な低下を認めた。そしてこの効果はインフルエンザウイルス感染の 1 日後にリコンビナント α -DG-N 蛋白質を投与しても認められた (下図 B)。これらの結果から α -DG-N にはインフルエンザウイルスの感染を抑制する効果がある事、また感染後に投与する事によってもウイルスの増殖を抑制できたことから将来的には同感染症の治療にも応用できる可能性がある事が明らかとなった。

図 A

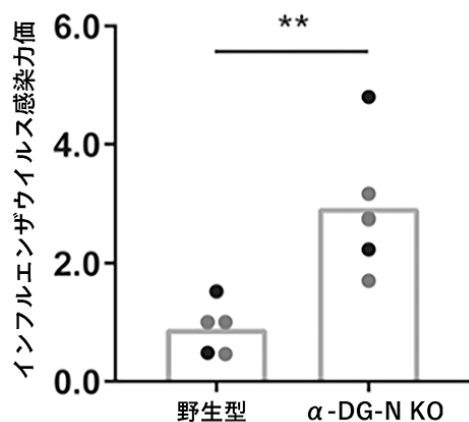
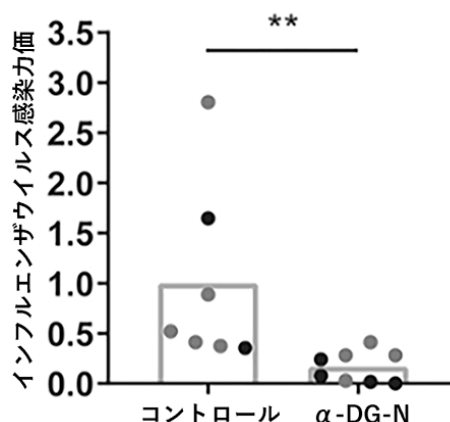


図 B



(図は下記発表論文 より一部改変)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- ① de Greef JC, Slütter B, Anderson ME, Hamlyn R, O'Campo Landa R, McNutt EJ, Hara Y, Pewe LL, Venzke D, Matsumura K, Saito F, Harty JT, Campbell KP. Protective role for the N-terminal domain of α -dystroglycan in Influenza A virus proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Jun 4;116(23):11396-11401. doi: 10.1073/pnas.1904493116.
- ② Rader EP, Turk R, Willer T, Beltrán D, Inamori K, Peterson TA, Engle J, Prouty S, Matsumura K, Saito F, Anderson ME, Campbell KP. Role of dystroglycan in limiting contraction-induced injury to the sarcomeric cytoskeleton of mature skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Sep 27;113(39):10992-7. doi: 10.1073/pnas.1605265113.

〔学会発表〕(計 14 件)

- ① 斉藤史明. CRISPR/Cas9 による筋強直性ジストロフィーにおける伸長 CTG リピートの切除 -Cas9 nuclease と Cas9 nickase の比較-. 第 91 回日本生化学会大会. 2018 年
- ② 斉藤史明. CRISPR/Cas9 による筋強直性ジストロフィー RNA foci の形成抑制. 第 4 回日

本筋学会学術集会．2018年

- ③ 齊藤史明．CRISPR/Cas9 ダブルニッキング法を用いた筋強直性ジストロフィーにおけるCTG リピート配列の除去．日本ゲノム編集学会第3回大会．2018年
- ④ 齊藤史明．Excision of myotonic dystrophy CTG repeat by CRISPR/Cas9 double nicking. 第59回日本神経学会学術大会．2018年
- ⑤ 齊藤史明．Cas9 nickase を用いた筋強直性ジストロフィーにおける伸長CTG リピート配列の除去．ConBio2017(第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会合同大会)．2017年
- ⑥ Saito Fumiaki. Excision of expanded CTG repeat of myotonic dystrophy with CRISPR/Cas9 genome editing. 23rd World congress of neurology. 2017年
- ⑦ 齊藤史明．Excision of myotonic dystrophy CTG repeat using CRISPR/Cas9 genome editing．第3回日本筋学会学術集会．2017年
- ⑧ 齊藤史明．筋強直性ジストロフィーに対するゲノム編集治療の基礎的研究．第2回日本ゲノム編集学会．2017年
- ⑨ 齊藤史明．CRISPR/Cas9 による筋強直性ジストロフィーにおける伸長CTG リピート配列の除去．第89回日本生化学会大会．2016年
- ⑩ 松村喜一郎．Tubular aggregate myopathy における細胞質ドメイン変異STIM1の機能解析．第2回日本筋学会学術集会．2016年
- ⑪ 松村喜一郎．Novel mutation of STIM1 causes dysregulation of Ca²⁺ homeostasis in tubular aggregate myopathy. 第57回日本神経学会学術大会．2016年
- ⑫ 松村喜一郎．Recapitulation of ML-induced reprogramming of Schwann cells by artificial methods. 第57回日本神経学会学術大会．2016年
- ⑬ 真先敏弘．Similarity of Schwann cell dedifferentiation in ML-induced reprogramming and Wallerian degeneration. 第57回日本神経学会学術大会．2016年
- ⑭ 萩原宏毅．Dynamics of myokines in the process of muscle atrophy and reloading in the mouse disuse model. 第57回日本神経学会学術大会．2016年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

(1)研究分担者

研究分担者氏名：真先 敏弘

ローマ字氏名：Masaki Toshihiro

所属研究機関名：帝京科学大学

部局名：医療科学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 00585028

研究分担者氏名：萩原 宏毅

ローマ字氏名：Hagiwara Hiroki

所属研究機関名：帝京科学大学

部局名：医療科学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 80276732

(2)研究協力者

研究協力者氏名：斉藤 史明

ローマ字氏名：Saito Fumiaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。