

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16267

研究課題名(和文) シャルコー・マリー・トゥース病様末梢神経障害を引き起こす新規髄鞘タンパク質の解析

研究課題名(英文) Increased ratio of large myelin protein zero (L-MPZ) in myelin leads to Charcot-Marie-Tooth disease-like neuropathy

研究代表者

大谷 嘉典(Otani, Yoshinori)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：30815973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Large myelin protein zero (L-MPZ) は、myelin protein zero (P0) のC末端側に63アミノ酸が付加された生理的リードスルー産物で、P0と共に正常な末梢神経髄鞘の構成成分として存在し、病態との関連も示唆されているが、L-MPZの機能に関しては未だ不明な点が多い。L-MPZの機能を明らかにするためにL-MPZのみを発現するマウス(L-MPZマウス)を作製し、解析を行ったところ、このマウスの成獣ではシャルコー・マリー・トゥース(CMT)病様の運動神経障害や髄鞘膜の異常が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は翻訳リードスルー産物であるL-MPZの機能を明らかにしていくことで髄鞘でのL-MPZの生理的意義の解明や高等生物における新しい翻訳制御機構解明への応用といった基礎研究からL-MPZを用いたCMT病の病態解明や治療法への応用といった臨床研究にも貢献できる。

研究成果の概要(英文)：L-MPZ is an isoform of myelin protein zero (P0), containing additional 63 amino acids at C-terminus by translational readthrough mechanism in various species including human.

However, a role of this protein is still uncertain.

We generated a mouse line (L-MPZ mice) that synthesizes only L-MPZ by CRISPR-Cas9 system. L-MPZ mice caused neuropathy like Charcot-Marie-Tooth disease (CMT). L-MPZ was not compensated function of P0 protein. This indicated that the function of L-MPZ was different from the function of P0.

Heterozygote mice those had increased L-MPZ and decreased P0 levels demonstrated various conditions from normal to neuropathy phenotypes. Thus, increased ratio of L-MPZ/P0 may cause CMT phenotype. Our study indicates a new possibility of CMT pathogenesis caused by alteration of the L-MPZ/P0 ratio.

研究分野：神経科学

キーワード：L-MPZ リードスルー シャルコー・マリー・トゥース病 myelin protein Zero

1. 研究開始当初の背景

翻訳リードスルーは生体内でタンパク質の翻訳時に生じる生理的な読み飛ばしであり、一つの mRNA の最初のストップコドンを読み飛ばすことで従来のタンパク質よりも長い C 末を持つアイソフォームを産生する翻訳制御機構である。近年、翻訳リードスルーはヒトを含む高等生物でも観察され、このメカニズムによって産生されたタンパク質は元の分子とは異なる性質を持つ可能性が示唆されている。

我々の研究室で同定した large myelin protein zero (L-MPZ) は、指定難病である慢性炎症性脱髄性多発性神経炎の患者の血清と反応する末梢神経特異的抗原として見出された。興味深いことに、L-MPZ は myelin protein zero (P0) と同一の mRNA からストップコドン翻訳リードスルーすることにより C 末に 63 アミノ酸残基が付加された分子として産生される P0 の新規アイソフォームである (Yamaguchi et al., 2012)。

日本ではシャルコー・マリー・トゥース (CMT) 病は 10000 人に 1 人の割合で発症するとされる下腿の萎縮と感覚障害を特徴とする最も頻度の高い末梢神経障害であり難病指定を受けている。この病の主な原因遺伝子の一つとして知られているのが全末梢髄鞘タンパク質の約 50% を占める接着分子である P0 である。L-MPZ は P0 のアイソフォームであるが、リードスルー異常による L-MPZ の量的な変化がこのような症状を引き起こすのかなど、いまだ疑問点が多く、原因の同定には至っていない。またこれまでにヒトで L-MPZ が原因で CMT 病を発症するという報告例はない。これは L-MPZ が P0 の非翻訳領域に存在するため、これまで CMT 病の研究では対象とされていなかったためと考えられる。従って、L-MPZ の生理的意義を知ることは新しい CMT 病の診断や治療法の開発への応用や新たな翻訳制御機構の解明にもつながると期待される。

2. 研究の目的

本研究は翻訳リードスルーにより産生される新規髄鞘タンパク質分子 L-MPZ に着目し、その髄鞘タンパク質分子の量的異常によって引き起こされる CMT 病様神経障害や新規翻訳制御機構を明らかにし、CMT 病の新たな診断・治療法への応用や翻訳リードスルーの生理的意義の解明を目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、CRISPR-Cas9 法にて作製された P0 マウス (L-MPZ 欠損状態) および L-MPZ マウス (P0 の代わりに L-MPZ が発現し、過剰状態) もしくは、それぞれのヘテロ接合体マウスなど様々な L-MPZ/P0 比を持つマウスを用いて、L-MPZ の生理的な意義を明らかにし、最終的に翻訳制御機構の解明と L-MPZ に起因する MT 病態の分子レベルでの解明や臨床応用に展開していく。

具体的には、3つのサブテーマを策定し、研究を行ってきた。

動物実験および DNA 操作は東京薬科大学および島根大学の各関連委員会に申請し、学長および医学部長の承認を受けた上で関連規定を遵守して実施した。

様々な P0 と L-MPZ の量比を持つマウスを用いた L-MPZ の生体内の機能解析

現在までに、髄鞘内の L-MPZ の生理的な機能は未だに不明である。そこで L-MPZ の生理的な機能を明らかにするために、L-MPZ が欠損する P0 マウスおよび P0 の代わりに L-MPZ が発現する L-MPZ マウスを用いて比較実験を行う。これらのマウスを用いた形態学・電気生理学的な解析を行い、L-MPZ の生理的意義を明らかにしていく。

発達段階および加齢時における L-MPZ マウスの解析

成獣の L-MPZ マウスでは薄く密な層構造ができていない髄鞘など観察できる。そこで、この薄い髄鞘や細い軸索などの異常が生後初期から起こるのか、また成長段階で脱髄を起こし、このよう異常が観察できるのかを検討し、L-MPZ の増加がいつの段階で CMT 病様神経症状を起こすかを調べる。また CMT 病などの疾患は年齢に伴いその症状が重篤化していく症例も報告されている (Higuchi, et al., 2016)。そこで加齢時におけるそれぞれのマウスの表現型や形態学的な観察を行うことにより L-MPZ の増加がどのように CMT 病様神経障害を引き起こし、重篤化するのか原因を明らかにしていく。

L-MPZ ヘテロ接合体マウスの発達段階や再生時の髄鞘の解析

L-MPZ ヘテロ接合体マウスは P0 と L-MPZ が約 1:1 の割合で発現する。このマウスでも

L-MPZ マウスのヘテロ接合体でも CMT 病様神経症状をきたすかどうか明らかにする。また L-MPZ ヘテロ接合体マウスと正常マウスにおける生後発達段階および脱髄を引き起こす薬剤であるリゾレシチンを坐骨神経に投与し、脱髄と髄鞘再生時の髄鞘を観察することで L-MPZ の量的変化がどのように髄鞘に影響を与えるか明らかにし、L-MPZ と CMT 病の関連を明らかにしていく。

4. 研究成果

様々な P0 と L-MPZ の量比を持つマウスを用いた L-MPZ の生体内の機能解析

L-MPZ の生理的な意義を明らかにするために、申請者は CRISPR-Cas9 遺伝子編集法を用いてストップコドンアラニンに変異させることで P0 を完全に L-MPZ に換させ、末梢神経髄鞘で L-MPZ のみを発現する遺伝子改変マウス (L-MPZ マウス) を作製した。

この L-MPZ マウスの表現型を明らかにするために様々な運動機能試験を行うと、運動機能障害や神経伝導速度低下など L-MPZ マウスで明らかな異常が認められた。

そこで、このマウスの有髄神経軸索を観察したところ L-MPZ マウスで髄鞘が壊れる像などの異常が多数観察されたため、より詳細な解析を行うために電子顕微鏡を用いた解析を行った。その結果、野生型マウスでは正常に髄鞘が巻かれているのに対して、L-MPZ マウスでは髄鞘が非常に薄い有髄軸索や髄鞘を巻いていない神経軸索が多く観察された。また L-MPZ マウスでは髄鞘の Major dense line と呼ばれる細胞質側が開大した異常な有髄軸索が多く存在することが明らかとなった。さらに、準薄切切片の解析では、L-MPZ マウスでは CMT 病の患者などでよく観察される所見である Tomacula と呼ばれる髄鞘の肥厚が観察されることも明らかになった。以上のことから、P0 を L-MPZ に置き換えることによる末梢神経髄鞘での L-MPZ の増加は運動機能障害や神経伝導速度の遅延など CMT 病様末梢神経障害に類似した症状を引き起こし、髄鞘の肥厚など髄鞘の形態異常を生じさせることを明らかにした。この L-MPZ はヒトでも発現が確認されており、L-MPZ 特異的部位の変異などによる異常がヒトの CMT 病の病態を引き起こす可能性も示唆されている。今回、申請者はこれらの結果を論文にまとめ、Communication Biology で発表した (Otani et al., 2020)。

現在、継続的に P0 のみを発現する P0 マウスの研究を進めている。P0 マウスは CRISPR-Cas9 遺伝子編集法を用いて L-MPZ 特異的配列を欠損させ作製した。

この P0 マウスの解析を行うと現在、P0 マウスに目立った運動障害、神経伝導速度に有意な差は認められていない。唯一、複合筋活動電位の振幅の高さの減少のみがある。免疫組織染色によりランビエ絞輪周辺部の構造異常は存在することが明らかとなっている。このことから生体内での L-MPZ の欠損は末梢神経に影響を与えることが明らかになったことから、L-MPZ は生体内で生理的に重要な働きをしていることが示唆される。現在、このマウスのより詳細な解析を行っている。この P0 マウスの解析が進むことでさらなる生体内での L-MPZ の機能解明につながると考えられる。

発達段階および加齢時における L-MPZ マウスの解析

L-MPZ マウスの成獣は髄鞘に異常を引き起こすことが明らかとなった。そこでこの髄鞘の異常が成獣になってから引き起こされるのか、もしくは発達段階から異常が認められるかどうかを明らかにすることは神経発達研究の上で非常に重要なことである。そこで発達段階における L-MPZ マウスおよび野生型マウスの末梢神経の有髄神経から準薄切切片を作製し、トルイジンブルー染色後に観察を行った。通常野生型のマウスでは生後 7 日から徐々に有髄神経の数が増え、生後 21 日目ではほとんどの神経が髄鞘を巻くようになる。L-MPZ の発現も髄鞘化にともない増加していく。一方で L-MPZ マウスでは生後 21 日齢でも髄鞘が薄く、髄鞘がうまく巻けていない軸索が多数確認され、生後 42 日齢ではさらに異常な有髄軸索を多数確認できた。このことから L-MPZ マウスでは髄鞘を巻くシュワン細胞自体に異常があり、発達段階でこのシュワン細胞が髄鞘をうまく巻けないもしくは巻けても非常に薄く、脆い髄鞘を形成していることが推測された。加齢に伴う変化は現在研究を進めている最中である。

L-MPZ ヘテロ接合体マウスの発達段階や再生時の髄鞘の解析

L-MPZ のみが発現する L-MPZ 遺伝子アレルと正常な遺伝子アレルから P0 が発現する L-MPZ ヘテロ接合体マウスは P0 と L-MPZ が約 1:1 の割合で発現する。この L-MPZ ヘテロ接合体の解析をすると、L-MPZ ホモ接合体に比べると軽度だが、運動神経障害や有髄神経軸索に異常が認められた。準薄切切片による解析において髄鞘の Tomacula が多く観察され、P0 が半分存在するにもかかわらず末梢神経髄鞘に異常が認められることから、P0 と L-MPZ の量比が髄鞘の形成や維持に重要であることが明らかとなった。

現在、L-MPZ のヘテロ接合体の発達段階時や再生時の髄鞘の解析を行っている最中である。発達段階の髄鞘の変化および脱髄を引き起こす薬剤であるリゾレシチンを投与し、脱髄からの再髄鞘化を経時的に観察し、L-MPZ の発現量の変化がどのように髄鞘の正常発達および再髄鞘化の影響するのかを検討を行っている。今後この研究を進めていくことで L-MPZ の量比が髄鞘化に影響があるかなどが明らかになると考えられる。

以上、今回の研究結果より、生理的なリードスルータンパク質である L-MPZ は末梢神経の機能に影響し、その量的な変化によりシャルコー・マリー・トゥース病を引き起こし得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshinori Otani, Nobuhiko Ohno, Jingjing Cui, Yoshihide Yamaguchi, and Hiroko Baba	4. 巻 3
2. 論文標題 Upregulation of large myelin protein zero leads to Charcot-Marie-Tooth disease-like neuropathy in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communication Biology	6. 最初と最後の頁 121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-0854-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大谷 嘉典, 大野 伸彦, 山口 宜秀, 崔 晶晶, 馬場 広子
2. 発表標題 翻訳リードスルーにより制御されるミエリンの形成と機能
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshinori Otani, Nobuhiko Ohno, Yoshihide Yamaguchi, Jing-Jing Cui, Hiroko Baba
2. 発表標題 Increased ratio of large myelin protein zero (L-MPZ) in myelin leads to Charcot-Marie-Tooth disease-like neuropathy
3. 学会等名 The 2019 ISN-ASN Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大谷 嘉典, 大野 伸彦, 山口 宜秀, 崔 晶晶, 藤谷 昌司, 馬場 広子
2. 発表標題 末梢神経機能に影響を及ぼす翻訳リードスルータンパク質Large myelin protein zeroの解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------