

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06888

研究課題名(和文) 軸索発達促進因子25型コラーゲンの分子基盤と先天性脳神経支配異常症の病態機序

研究課題名(英文) Molecular basis of axon elongation by collagen XXV and pathomechanisms of congenital cranial dysinnervation disorders

研究代表者

若林 朋子 (Wakabayashi, Tomoko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任准教授

研究者番号：20530330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の患者脳より発見された膜貫通型コラーゲンColXXVの生理的役割を解析した。ColXXVは胎生期には筋肉に一過性に発現し、骨格筋内部での運動ニューロン軸索の伸長に必須の役割を果たす。本研究では、ColXXVが軸索上のRPTP / と結合することで、プロテオグリカンが関与する軸索伸長/抑制を制御する可能性を明らかにした。また、ヒトColXXVで見つかった先天性の脳神経発生異常を来す変異が、RPTP / との結合ならびに軸索伸長を障害することも示した。さらに、薬理的な筋障害や筋ジストロフィーモデルにおいて、骨格筋の再生過程でColXXVが発現上昇することも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ColXXVは脳においてアルツハイマー病の病態形成に関与するのみならず、発生期には骨格筋で重要な役割を果たし、先天性の神経発生異常の原因ともなる。本研究は、現象論を根拠として長年存在が予想されてきた筋由来運動神経支配因子としてColXXVを同定し、そのメカニズムを明らかにした点で生物学的に意義がある。また、ColXXVを原因とする小児の疾患であるCCDDをモデルに、各種の運動ニューロン疾患の病態解明にもつながるものと期待され、社会的な意義のあるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the physiological roles of the transmembrane collagen ColXXV, which was discovered from the brain of Alzheimer's disease patients. During embryonic development, ColXXV is transiently expressed in muscle and plays an essential role in the elongation of motor axons inside skeletal muscle. In this study, we demonstrated that ColXXV may regulate proteoglycan-mediated axon elongation/inhibition through binding to RPTP / on axons. We also showed that mutations found in human ColXXV that cause congenital defects in cranial nerve development impair RPTP / binding and axon outgrowth. Furthermore, we showed that ColXXV is upregulated in the process of skeletal muscle regeneration in pharmacological muscle injury and muscular dystrophy models.

研究分野：神経病理学

キーワード：アルツハイマー病 コラーゲン 運動ニューロン 神経発生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

25 型コラーゲン (ColXXV) は、アルツハイマー病患者脳に蓄積する老人斑の構成タンパク質として同定された、膜結合型のコラーゲンである (Hashimoto et al., EMBO J 2002)。成体においては脳の神経細胞に特異的に発現が認められるが、その生理機能は未解明であった。

我々は ColXXV のノックアウトマウスを作製し、機能解析を試みた。その結果、ColXXV 発現を欠いたマウス胎児では、脊髄運動ニューロンの軸索が標的の骨格筋内部で伸長せず、退縮した。その結果、骨格筋と神経との間のシナプスである神経筋接合部 (neuromuscular junction, NMJ) が形成されず、運動ニューロンは逆行性に変性してアポトーシスにより消失した。それにより、ColXXV 欠損マウスは呼吸筋麻痺により出生時に致死となることを明らかにした (Tanaka et al., J Neurosci 2014)。申請者らの続く解析から、この神経筋発生の過程では、骨格筋に一過性に発現する ColXXV が重要であり、その機能発揮には運動ニューロンに発現する RPTP $\sigma/\delta$  との相互作用が関与している可能性が考えられた。しかし、ColXXV が RPTP $\sigma/\delta$  とどのように関わる事で軸索伸長を制御しているのか、その分子機構の全容は未解明であった。

さらに近年、ColXXV タンパク質をコードするヒト COL25A1 遺伝子の変異が、眼球運動を制御する外眼筋に投射する動眼神経や外転神経、滑車神経など、脳神経の支配に先天性の異常を来す congenital cranial dysinnervation disorders (CCDD) の原因となることが報告された。このことは、ColXXV の神経筋発生における重要性を支持するものである。

本研究では ColXXV-RPTP $\sigma/\delta$  の軸索発達促進機能と、その異常が脳神経系の発達不全を来す分子基盤を解明する。

### 2. 研究の目的

ColXXV の神経軸索伸長の制御因子としての生理機能ならびに CCDD の病態機序に着目し、分子基盤の解明を目指す。ひとつには、受容体 RPTP $\sigma/\delta$  を介した軸索伸長の分子機構を明らかにし、ColXXV の“骨格筋由来の軸索発達促進因子”としての役割を解明する。また、ヒトで CCDD を来す COL25A1 の変異が、脳神経の発生異常を導く分子メカニズムを明らかにする。さらに、ColXXV の軸索・骨格筋再生における機能を解析することで、ColXXV の神経筋システムにおける役割を解明する。

### 3. 研究の方法

ColXXV と RPTP $\sigma/\delta$  との結合を解析するため、RPTP $\sigma/\delta$  を発現する HEK293 細胞に対する精製 ColXXV の結合を評価する cell surface binding 実験を用いた。また、リコンビナント RPTP $\sigma/\delta$  をビーズにコンジュゲートし、そこに精製 ColXXV を添加することで、RPTP のクラスタリングを評価する実験を行った。さらに、脊髄運動ニューロンに GFP を発現する Hb9-GFP Tg マウスの E12.5 胎児より脊髄前角カラムを切り出し、細切して組織片 (explant) 培養を行うことで、運動ニューロン軸索の伸長を評価した。

マウスを用いた解析では、成体における筋特異的 Col25a1 ノックアウト (KO) (MCK-Cre; Col25a1<sup>fllox/fllox</sup>) マウスを作成した。また、骨格筋に持続的に ColXXV を発現させる筋特異的 ColXXV トランスジェニックマウスを作成した (HSACre; LSL-Col25)。組織における ColXXV の発現は qRT-PCR 法により解析した。

### 4. 研究成果

#### ■ ColXXV と RPTP $\sigma/\delta$ との結合と骨格筋由来の軸索発達促進因子としての役割

ColXXV の軸索発達促進因子としての機能について、神経細胞側の結合因子 RPTP $\sigma/\delta$  との相互作用が軸索伸長を促進する機序を検討した。これまでに、ColXXV および RPTP $\sigma$ 、 $\delta$  の細胞外領域の精製リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* 結合実験、RPTP $\sigma/\delta$  を発現する HEK293 細胞に対するリコンビナント ColXXV の結合を評価する cell surface binding 実験を構築し、両者の相互作用を評価してきた。両分子の欠損変異を用いた解析では、ColXXV の COL3-NC4 領域を含むカルボキシ末端と、RPTP の Ig3、Ig1 領域が結合に重要な役割を果たしていることを示した。RPTP の Ig1 領域内には、グリコサミノグリカンとの結合に重要であることが知られるリジン残基が存在する。これをアラニンに置換した KA 変異体では、ColXXV との結合が有意に低下した。更に、RPTP $\sigma/\delta$  の基質であり Ig1 領域への結合が示されているコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) が ColXXV と RPTP $\sigma/\delta$  との結合に競合することも示した。RPTP $\sigma/\delta$  はグリコサミノグリカン (GAG) により細胞膜上で会合状態が変化し、軸索伸長を制御することが知られる (Coles et al., Science 2011)。そこで、ColXXV が RPTP 分子の会合状態を制御することで軸索伸長に影響を及ぼしている可能性を考えた。リコンビナント RPTP をビーズにコーティングし、そこに精製した ColXXV の細胞外領域を添加すると、RPTP コートビーズの凝集を誘導することがわかった。さらに、胎児脊髄前角 explant を用いた解析からは、ColXXV を基質としてコートした培養においては、運動ニューロン軸索の伸長が有意に促進すること、CSPG を基質とした場合の軸索伸長抑制効果が ColXXV の存在により打ち消されることを示した。これらの結果から、ColXXV がプロテオグリカンと競合的に RPTP と結合することで細胞表面上の

会合状態に影響をおよぼし、ひいては軸索伸長を制御する可能性が示唆された。

次いで軸索伸長への *in vivo* での影響を解析する目的で、筋特異的に ColXXV を発現誘導することが可能な遺伝子改変マウスの作製を試みた。これまでに、骨格筋の興奮を抑制する NMJ ポストシナプス分子の欠損、あるいは骨格筋内のカルシウムシグナルの制御を行う RyR 受容体の欠損を行うと、発生期の運動ニューロン軸索の過剰伸長をもたらす、致死となることが報告されている。そこで CRISPR-Cas9 システムを用い、Cre 依存的に ColXXV を発現する loxP-stop-loxP-COL25A1 ベクターの、Rosa26 領域へのノックインを行った。計 82 匹の産仔のうち目的領域への組換えが生じた個体は得られず、F0 としてトランスジェニックマウスを 8 匹得た。そこで、これらの F0 トランスジェニック系統を用い、胎生期の筋細胞に Cre を発現する HSA-Cre マウスと交配を行うことで、3 つの F0 系統に由来する F2 個体 50 匹を得た。結果として、22% が HSA-Cre;LSL-Col25 マウスであり、致死の表現型は認められなかった。このことは、ColXXV の NMJ 形成後の持続的な発現は、ポストシナプス機能阻害と同程度の強い発生異常を誘発しない可能性を示唆している。

#### ■ ヒト ColXXV の変異が CCDD を導く病態機序

CCDD 患者で見出された ColXXV の変異について、Gly382Arg および Gly497Ter の変異体を用いた解析を行った。これまでに、Gly382Arg 変異は ColXXV の構造的安定性を低下させること、Gly497Ter 変異は RPTP $\sigma/\delta$  との結合部位を欠失することにより、ColXXV-RPTP 相互作用を障害し、それにより軸索誘引・伸長作用が障害されることを示してきた。また本研究においては、これらの CCDD 変異型 ColXXV が、RPTP をコートしたビーズの凝集をも障害することを示した。これらの結果から、CCDD の変異を有する患者では、ColXXV と RPTP との相互作用が生じず、その結果として特に脳神経における運動ニューロンの標的骨格筋支配が障害されることを明らかにした。

#### ■ ColXXV の再生における機能

成体骨格筋における ColXXV の機能を解析するため、NMJ 形成後の骨格筋で Col25a1 を欠損し、致死性をレスキューしたマウスを作成した (MCK-Cre;Col25a1<sup>fllox/fllox</sup>)。これらのマウスは発生異常を示さず、成体を得た。

また、ColXXV の軸索・骨格筋再生における機能に関連して、マウスの前脛骨筋に cardiotoxin を注入することで筋障害を誘発したマウスにおいて、障害後の骨格筋再生過程で新たに生成した筋管では、Col25a1 遺伝子が一過性発現上昇することを見出した。デュシャンヌ型筋ジストロフィーは、基底膜、筋細胞の細胞膜と細胞骨格を連結するのに重要な役割を果たすジストロフィン遺伝子の異常により生じる。ジストロフィンの欠失により、筋緊張によって筋膜が障害され、破壊と再生を繰り返し替えることが知られている。このような、病的な骨格筋再生筋における Col25a1 発現を、筋ジストロフィーのモデルである mdx マウスの骨格筋を用いて検討した。Mdx マウスでは筋の慢性的な変性と再生が生じるが、筋再生が最も盛んな 5 週齢マウスの下肢骨格筋を定量 RT-PCR 方で解析した結果、mdx マウスの筋における Col25a1 mRNA の発現上昇を認めた。本研究では、ColXXV の成体骨格筋における発現の誘導が、様々な筋再生過程で生じ得ることが示された。

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 Wakabayashi Tomoko	4. 巻 13
2. 論文標題 Transmembrane Collagens in Neuromuscular Development and Disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 635375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2020.635375	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tomoko Wakabayashi, Takeshi Iwatsubo
2. 発表標題 Roles of collagen XXV in motor innervation of skeletal muscle and the development of a congenital cranial dysinnervation disorder
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
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
---------	---------