

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07279

研究課題名(和文) 血液脳関門におけるジストロフィン分子病態とてんかん脳の関わり

研究課題名(英文) Functional analysis of dystrophin in blood-brain barrier and its relevance to epilepsy

研究代表者

藤本 崇宏 (Fujimoto, Takahiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10446114

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)：血液脳関門を構成するアストロサイト足突起の脳型ジストロフィン分子複合体の機能的同定を目的とした。本研究にてDp71特異的タグ挿入マウス(HA-Dp71マウス)を使用して海馬、小脳におけるDp71蛋白発現・局在プロファイルの同定と、Dp71相互作用蛋白群の同定に成功した。BBB機能を制御するアストロサイト足突起や神経細胞間シナプスの微小環境制御にあずかるパーグマンガリア突起部において、Dp71とその相互作用蛋白AQP4、Kir4.1が複合体として存在することをHA-Dp71マウスで証明したことは本研究の特筆すべき成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのジストロフィン研究で問題になっていたジストロフィン短鎖産物特異的検出の問題を解決する手段としてHA-Dp71マウスを樹立したが、このマウスを用いた解析結果を本研究期間において初めて海外学術雑誌に報告した。本マウスの有用性を周知させ、アダルトマウス海馬と小脳におけるDp71分子複合体の実体を示したことは重要である。過去の知見との相違も浮き彫りにしており、今後の真実を追究する世界中の関連研究に影響を与えるものと期待する。本研究でDp71とチャネル分子との関連が見えてきたが、これら分子・細胞・形態学的情報を基盤として、今後、生理学的研究との融合を図る必要性が理解できたことは意義深い。

研究成果の概要(英文)：We found that Dp71 is localized at inhibitory postsynapses within the hippocampal dentate gyrus granule neuronal soma and the dendrites. Dp71 is also located to astrocytic endfeet, glia limitans at blood vessels and pia membranes. Furthermore, interactome analysis revealed that Dp71 formed distinct molecular complex at different cellular compartments, i. e. synapse-associated Dp71 interacted with dystroglycan, dystrobrevin-beta and Insyn1 whereas glia-associated Dp71 did with dystroglycan, dystrobrevin-alpha and syntrophin as well as AQP4/Kir4.1 channels. Although we could not detect prominent differences in Dp71-AQP4 expression and its localization at blood-brain barrier (BBB) before and after 10 times consecutive pentylenetetrazol administrations, deeper investigations addressing to BBB integrity and its molecular components, Dp71-AQP4 and Dp71-Kir4.1, might open avenues for future understandings of pathomechanism of DMD/BMD.

研究分野：神経筋疾患、分子生物学、生化学、神経細胞生物学

キーワード：DMD 神経筋疾患 ジストロフィン Dp71 タグ挿入マウス 筋ジストロフィー 知的障がい プロテオーム

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ジストロフィノパチーは進行性の筋線維壊死を主徴とする X 染色体劣性遺伝性疾患である。ジストロフィノパチーの原因であるジストロフィン(Dp)遺伝子異常が高頻度で精神遅滞・自閉症・「てんかん」などの中枢神経症状を合併することが知られているが、その病態形成機序や Dp 分子機能は不明であった(図 1)。Dp は複数のアイソフォームをコードし、時期・組織依存的な発現制御が為されている。筋では全長型 Dp(Dp427)が筋細胞の形態と機能の維持に必須であり、その分子機序の一端として、特にジストログリカン(DG)分子複合体を介した細胞内骨格と細胞外マトリックスの架橋の重要性が知られていた(図 1)。いっぽう、脳では構成する細胞種の相違と脳構造の複雑性、さらにはそこに発現する複数の Dp アイソフォームの存在が、ジストロフィノパチーで発症する中枢神経症状の病態理解を困難なものにしている。しかし、Dp ゲノム領域内の下流側に位置する変異が精神遅滞の重症度や、てんかんの発症率と相関するとの報告があり、エクソン 63 より下流に相当する Dp71 が、脳で最も高発現する Dp アイソフォームであることからその生理的機能と中枢神経合併症における役割の解明が待たれる(図 1)。

我々は、株化培養細胞を用いた研究にて、細胞・細胞間ジャンクションに局在する DG との相互作用を引き金に、タンパク安定化・膜局在化・高度リン酸化といった脳型 Dp(Dp71)のプロテオスタシスのダイナミックな変化が起こることを報告していた(Fujimoto T. et al., Hum Mol Genet, 2020)。さらに、マウス *in vivo* の内在 Dp71 を特異的に検出可能なタグ挿入マウスの樹立に成功し(研究開始当初は未発表であった)、Dp71 の脳内発現分布を解析するなかで、血液脳関門(BBB)を構成するアストロサイト足突起における Dp71 分子複合体の同定と、それが織り成す細胞間ジャンクションの機能調節機構の解明が直近の課題であると考えた。

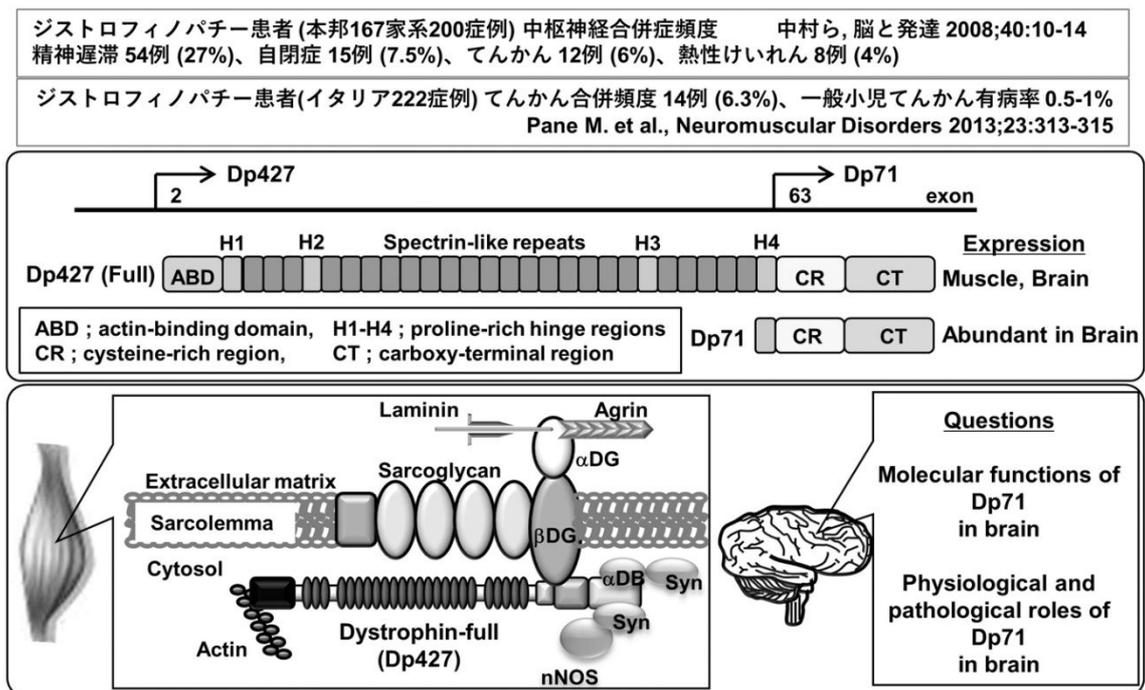


図 1:背景と未解明の課題(上段)ジストロフィノパチー患者の中枢神経合併症発症率。(中段)ジストロフィン(Dp)遺伝子から産生される複数のアイソフォーム(Dp427, Dp71)の関係。(下段)筋における Dp ジストログリカン(DG)分子複合体の模式図と、未解明の課題。

## 2. 研究の目的

「血液脳関門(BBB)に存在する脳型ジストロフィンの機能的意義は何か？そして認知障がい・側頭葉てんかん病態との関わりは如何なるものか？」という問いに対して、その分子基盤と細胞基盤を明らかにすべく、BBB を構成するアストロサイト足突起の脳型ジストロフィン分子複合体の機能的同定と、側頭葉てんかんモデルマウスにおける脳型ジストロフィンのプロテオスタシス異常をもたらすメカニズムを解明することを目的とした。

脳内の細胞間ジャンクションが観察できる最たる場として、BBB や神経シナプスが存在する。BBB と「てんかん」や「認知障がい」といった高次脳機能病態の関わりに着目した研究は独創的であり、BBB を構成するアストロサイト足突起のマーカーになり得る Dp71 を標的としたタグ挿入マウスの樹立が立案・介入可能な状況を創り出した。

## 3. 研究の方法

生理的な脳内においては、全長型ジストロフィン Dp427 と短鎖型ジストロフィン Dp140 と Dp71 が時空間的に複雑に発現機能する。Dp71 蛋白一次構造が Dp427 に含まれることから、Dp71 特異的抗体の作製は理論的に難しい。申請者らは内在性 Dp71 を特異的に検出可能なタグ挿入マウスを樹立していた。この遺伝子改変マウス(HA-Dp71)を Dp71 の生理的発現プロファイルの取得、Dp71 相互作用蛋白の探索、低用量ペンチレンテトラゾール慢性投与によるてんかん重積発症モデルに供した。てんかん重積モデルにて Dp71 および相互作用蛋白群の BBB における発現量・分布に与えるてんかんの影響を検討した。

アダルトの野生型コントロールおよび HA-Dp71 マウスから脳を採取し免疫組織染色にて HA-Dp71 蛋白発現部位を検出した。また、胎児 E17.5 海馬または生後 5 日(P5)小脳から初代培養を調製し、ニューロンとグリアのミックスカルチャーにて HA-Dp71 発現細胞種の同定と細胞内局在を解析した。細胞種の同定には細胞種特異的マーカーとの共染色にて行い、各種プレ・ポストシナプスマーカーとの共染色で神経細胞シナプスにおける局在を検討した。

野生型コントロールマウスおよびアダルトマウスから海馬を採取し、その蛋白抽出物を HA-magnetic beads と反応させて HA-Dp71 蛋白複合体を精製回収した。複合体のトリプシン消化産物を質量分析解析(外注)し、構成蛋白を網羅的に同定した。相互作用の検証には共免疫沈降物を特異抗体によるウェスタンで検出することで行った。

生後 8 週齢 HA-Dp71 マウスにペンチレンテトラゾール(PTZ; Sigma-Aldrich, #P6500)を 35 mg/kg 体重の用量で1日単回腹腔内投与し、3, 6, 10 回連投後、それぞれ 24 時間後に安楽死、脳採取を行い、ウェスタンブロット、免疫組織染色、共沈降アッセイに供した。対照群として生理食塩水を同ボリューム投与したマウスを用意した。

## 4. 研究成果

Dp71 の生理的発現プロファイルの取得

HA-Dp71 マウスと抗 HA 抗体を用いた免疫組織染色は内在性の HA-Dp71 蛋白の発現部位を明らかにした。脳全領域に分布する血管周囲と軟膜で高発現し、これらはアストロサイトの足突起が接着する BBB と判断できた。発現細胞としてはアストロサイトであり、足突起部に限局する発現様式である。小脳に存在するバークマングリア細胞も Dp71 を高発現し、細胞質とくに小脳分子層に広がるグリア突起中に分布することが分かった。また、新規性の高い知見として Dp71 は海馬歯状回顆粒ニューロンの抑制性ポストシナプスに限局することが観察され、それらは細胞体と樹状突起の両方に分布した。他方、海馬 CA1 錐体細胞ニューロンにおいては Dp427 が顕

著に発現し、抑制性ポストシナプスに局限した。小脳に分布する神経細胞(プルキンエ細胞や顆粒細胞層)においては有意なDp71発現を認めなかった(検出限界以下)が、Dp427がプルキンエ細胞中の抑制性ポストシナプスに局限することが観察された。Dp427のCA1錐体細胞シナプス局在と小脳プルキンエ細胞シナプス局在は、過去の他者らによる結果と一致するものである。

#### Dp71 相互作用蛋白の探索

海馬顆粒ニューロンやアストロサイト足突起(BBB)部位におけるDp71蛋白複合体の同定はDp71機能を考えるうえで重要な情報である。共免疫沈降産物の網羅的質量分析の結果、

-1-シントロフィン(Snta1)、-1-シントロフィン(Sntb1)、-2-シントロフィン(Sntb2)、ジストロブレピン(Dtna)、ジストロブレピン(Dtnb)、Insyn1を相互作用蛋白として同定した。申請者による検討では1% NP40や1% Tx-100を抽出条件に使用した場合、ジストロフィン結合蛋白として有名なジストログリカン(Dag1)は、複合体から解離してしまうことを再現性よく観察している。この理由から、ジストログリカンとの相互作用はクロスリンク法による免疫沈降で別途証明した。

組織染色または初代培養分散系においてアストロサイトではDp71-Dag1-Dtna-Snta1が共局在し、シナプスにおいてはDp71-Dag1-Dtnbが共局在することが明らかになり、細胞種によるジストロブレピンアイソフォーム(と)の使い分けの存在が明示された。Insyn1に関しては入手可能な特異抗体がなく、検討を加えられなかったが、他者らの報告によると、抑制性ポストシナプスに局在化するアダプター蛋白で間違いないようだ。少なくとも海馬歯状回顆粒細胞層におけるDp71機能にInsyn1が機能していることが示唆される。CA1, CA3, 大脳皮質といった他の領域におけるジストロフィン(Dp427またはDp71)との関係性については今後の検討課題である。

Dp71の既知の相互作用蛋白としてAQP4やKir4.1チャンネルが存在するが、今回の網羅的質量分析では有意に検出することはできなかった。これは方法論と蛋白の存在様式などの性質がマッチせず、検出不能となった可能性が高い。特にAQP4は細胞膜上で格子状巨大分子複合体として存在することが知られ、実験的に蛋白を扱うことが少し難しい。AQP4とKir4.1は高温に曝されると凝集する性質がある。そこで、これら二種の膜チャンネル蛋白に関しては別途、一般的な共免疫沈降後のウェスタン法でDp71との会合能の有無を検証した。その結果、大脳、小脳の両者において、Dp71はAQP4とKir4.1と複合体として存在し、それらはBBB、軟膜直下、小脳バグマンガリアに高発現していることが確認できた。

#### ペンチレンテトラゾール慢性投与によるてんかん重積発症モデルにおけるDp71・相互作用蛋白の発現

PTZ 6または10回連投後のHA-Dp71マウス海馬において、明らかなGFAP陽性アストロサイトの増生(すなわちグリオシス)が確認できた。この状況下で、BBBに高発現するHA-Dp71やAQP4の発現量や分布をウェスタンプロット法や免疫染色法で調べたところ、生理食塩水処理コントロール群と比較して有意な差は観察できなかった。Dp71とAQP4の会合状態を免疫沈降法で検討したが、再現性のある有意な結果は得られなかった。

#### 4. 考察

本研究にてDp71特異的タグ挿入マウス(HA-Dp71マウス)を使用して海馬、小脳におけるDp71蛋白発現・局在プロファイルの同定と、Dp71相互作用蛋白群の同定に成功し、海外学術雑誌2報(Fujimoto T et al. Cellular and Molecular Life Sciences2022, Fujimoto et al. Molecular Neurobiology2023)に詳細を発表した。BBB機能を制御するアストロサイト足突起や

神経細胞間シナプスの微小環境制御にあずかるバグマングリア突起部において、Dp71 とその相互作用蛋白 AQP4, Kir4.1 が複合体として存在することを HA-Dp71 マウスで証明したことは本研究の特筆すべき成果である。組織レベルと初代培養レベルの両者において、グリア足突起や神経細胞シナプスでの Dp71 とその相互作用蛋白群の共局在を示し、生化学的に免疫沈降法で会合能を示し、揺るぎない実験的事実として今後の自身や他者らの研究の発展に寄与するものとする。HA-Dp71 マウスと HA 抗体の利用が特異性と検出力の信頼性を担保しているが、HA 抗体の種類(販売会社の違いや、クローンの違い)によっては特異性と検出力の両面で劣るものがあり、特にシナプス部位での検出は申請者が論文報告した手法・抗体の使用を遵守すべきである。

過去に Daoud F らは海馬神経細胞の興奮性シナプス部に Dp71f アイソフォームが発現することを示唆していたが(PLoS One. 2008 Aug 10;4(8):e6574)、今回の研究においては HA-Dp71 シグナルは興奮性シナプス部位には全く検出されず、抑制性ポストシナプスに局限する結果を得たため、過去の知見には否定的な見解を抱いている。Jackson T らは小脳分子層における抗ジストロフィン C 末抗体シグナルを興奮性シナプスに存在するものと考えたが、この知見に関しても、本研究では否定的な見解すなわち、小脳バグマングリアでの Dp71 を興奮性シナプスでの発現とミスリードしたものとする(Cell Mol Neurobiol. 2022 Oct;42(7):2357-2377)。このように、HA-Dp71 マウスを用いた研究には優位性があり、過去に得られた実験的結果には懐疑的なものが含まれることをあぶり出している。今後の研究においても未だ明らかにされていない脳内 Dp71 発現・機能に迫る知見が得られるであろうが、HA 抗体の非特異的反応を野生型コントロールとの比較にて除外しつつ慎重に検討しなければならない。

Dp71 発現・機能とてんかん病態との関連は不明である。PTZ 処理プロトコルの見直しや、カイニン酸など他の薬剤によるてんかん誘発の適用を考える必要がある。脳実質内の水分量やシナプス間隙の水分量・体積・各種イオン濃度の制御に AQP4 や Kir4.1 を介した機構の重要性が取り沙汰されている。これらチャンネル機能を加味した方法論による今後のさらなる研究がジストロフィン異常症(DMD, BMD)で発症する中枢神経症状の病態機序理解に通じると考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujimoto T, Stam K, Yaoi T, Nakano K, Arai T, Okamura T, Itoh K.	4. 巻 60
2. 論文標題 Dystrophin Short Product, Dp71, Interacts with AQP4 and Kir4.1 Channels in the Mouse Cerebellar Glial Cells in Contrast to Dp427 at Inhibitory Postsynapses in the Purkinje Neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 3664-3677
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12035-023-03296-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujimoto Takahiro, Yaoi Takeshi, Nakano Kenta, Arai Tetsuya, Okamura Tadashi, Itoh Kyoko	4. 巻 79
2. 論文標題 Generation of dystrophin short product-specific tag-insertion mouse: distinct Dp71 glycoprotein complexes at inhibitory postsynapse and glia limitans	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00018-022-04151-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Hisashi, Fujimoto Takahiro, Yaoi Takeshi, Fushiki Shinji, Itoh Kyoko.	4. 巻 28(12)
2. 論文標題 Leukemia inhibitory factor shortens primary cilia by upregulating C-C motif chemokine 2 in human neural stem/progenitor cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 868-880
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kiso-Farne Kaori, Yaoi Takeshi, Fujimoto Takahiro, Itoh Kyoko.	4. 巻 55(6)
2. 論文標題 Low Doses of Bisphenol A Disrupt Neuronal Differentiation of Human Neuronal Stem/Progenitor Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 193-202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.22-00090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤本崇宏
2. 発表標題 ジストロフィン分子機能の理解に立脚したデュシェンヌ型筋ジストロフィー機序解明を目指して
3. 学会等名 第63回日本神経病理学会総会学術研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤本崇宏
2. 発表標題 ジストロフィン遺伝子産物Dp71の脳における役割
3. 学会等名 第9回筋ジストロフィーのCNS障害研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都府立医科大学分子病態病理学 <a href="http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/neurpath/index.html">http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/neurpath/index.html</a>
--

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
---------	---------