

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591256

研究課題名(和文)ニューロパチーにおけるラミニンとジストログリカンの相互作用の解析と治療への応用

研究課題名(英文) characterization of the laminin-dystroglycan interaction in neuropathy and its therapeutic application

研究代表者

斉藤 史明 (Saito, Fumiaki)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：40286993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経における髄鞘形成には基底膜中のラミニンとシュワン細胞のジストログリカンとの相互作用が不可欠である。申請者らはLARGEの過剰発現によりこの相互作用が著明に亢進したLARGEトランスジェニックマウスを作成した。本マウスの末梢神経では髄鞘形成に関わる遺伝子群の発現変動が認められた。しかし髄鞘形成不全を有するdy2Jマウスと本マウスを交配したが、dy2Jマウスの髄鞘形成不全は改善しなかった。一方、末梢神経は神経筋接合部を介して骨格筋の再生に影響を与えるため、LARGE過剰発現dy2Jマウスへの骨格筋の再生を検討した。この結果LARGEにより筋再生は抑制されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The interaction between dystroglycan in Schwann cell and laminin in the basement membrane is crucial for the myelination of peripheral nerve. We generated LARGE transgenic mice in which this interaction is greatly enhanced. In the peripheral nerves of these mice, the expression of some genes related to myelination was altered. We crossed LARGE transgenic mice with dy2J mice, which exhibit dysmyelination of the peripheral nerve, however the defects in myelination were not ameliorated. Since the peripheral nerve affects the regeneration of the skeletal muscle via neuromuscular junction, we examined the regeneration of dy2J mice skeletal muscles. We demonstrated that the muscle regeneration was suppressed by the overexpression of LARGE in these mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学 ニューロパチー ジストログリカン 髄鞘形成 骨格筋再生

1. 研究開始当初の背景

末梢神経が正常に機能するためには軸索を形成する神経細胞に加えて、その周囲を取り巻くシュワン細胞が重要な役割を果たしている。シュワン細胞は軸索周囲に髄鞘を形成することで神経伝導を円滑に行わせている。また髄鞘の両端は微絨毛となり軸索に接してランビエ絞輪を形成し、絞輪部には Na チャンネルを、それに隣接した部位に K チャンネルを集簇させ跳躍伝導を可能にしている。さらに髄鞘は軸索を保護して、末梢神経障害における脱神経後に神経再生をガイドする役割を担っている。このようにシュワン細胞が髄鞘という高度に分化した構造を形成しその機能を維持するためには、軸索-シュワン細胞間の適切な相互作用とシグナル伝達が不可欠である。そして、この相互作用を担う分子機構の一つがシュワン細胞膜上のジストログリカンと基底膜中のラミニンとの結合である。またこのラミニン-ジストログリカンの相互作用の異常がニューロパチーを引き起こすとの知見も徐々に集積されつつある。ヒトのラミニン $\alpha 2$ 鎖欠損先天性筋ジストロフィーやそのモデルマウスである dy^{2J} マウスではラミニン $\alpha 2$ 鎖の変異によりこの相互作用が断たれ、髄鞘形成不全を特徴とするニューロパチーが生じる。さらにジストログリカン結合蛋白質である periaxin の変異により Charcot-Marie-tooth 病 type 4F が発症する。一方福山型先天性筋ジストロフィーのモデルマウスであるフクチン欠損キメラマウスにもラミニン-ジストログリカン相互作用の欠損により髄鞘形成不全が生じることを申請者らは報告している。

2. 研究の目的

LARGE はキシロースとグルクロン酸の tandem repeat をジストログリカンの O-マンノース型糖鎖に付加してそれを伸長させる糖転移酵素であり、ジストログリカンの糖鎖修飾を著明に亢進してラミニンとの結合性を著しく増大させる事が明らかにされている。申請者らは LARGE を過剰発現するトランスジェニックマウス (LARGE Tg マウス) を作出したが、このマウスではラミニンとジストログリカンの相互作用が著明に亢進していることを確認している。本研究では LARGE Tg マウスを用いてラミニンとジストログリカンの相互作用が髄鞘形成に及ぼす影響を詳細に検討すること、またラミニン-ジストログリカン相互作用を用いたニューロパチーに対する新たな治療法の可能性を探ることを目的としている。さらに LARGE Tg マウスでは LARGE の過剰発現は末梢神経のみならず骨格筋においても認められることから、筋ジストロフィーに対するラミニン-ジストログリカン相互作用の増強が及ぼす影響についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) LARGE の過剰発現が末梢神経の髄鞘形成に及ぼす影響に関する検討

LARGE の過剰発現の影響を正常なマウスおよび髄鞘形成不全のモデルマウスである dy^{2J} マウスを用いて検討した。すなわち LARGE Tg マウスと dy^{2J} マウスを交配して、LARGE を過剰発現する dy^{2J} マウス (dy^{2J} /LARGE マウス) を作出し、野生型マウス、LARGE Tg マウス、 dy^{2J} /LARGE マウスの末梢神経の形態学的な検討を行った。特に髄鞘形成や基底膜の形成に関して LARGE の過剰発現の有無で変化が生じるかどうかを、光学顕微鏡、電子顕微鏡を用いて検討した。

(2) LARGE の過剰発現がもたらす遺伝子発現変動の網羅的解析

野生型マウスと LARGE Tg マウスの坐骨神経および大腿四頭筋から RNA を精製し、DNA マイクロアレイ解析を行った (Agilent 社 Whole Mouse Genom オリゴ 4x44k v2)。有意な発現変動を示す遺伝子群の中から gene ontology search により髄鞘関連遺伝子、筋再生関連遺伝子を抽出した。

(3) LARGE の過剰発現が骨格筋の筋再生に及ぼす影響に関する検討

dy^{2J} マウスには髄鞘形成不全の他に骨格筋の変性が生じ、先天性筋ジストロフィーのモデルとしても知られている。 dy^{2J} マウスと dy^{2J} /LARGE マウスで筋変性に差異が生じるかどうかを、筋再生という観点に重点を置きながら解析を行った。

(4) 培養細胞における LARGE の過剰発現と細胞に与える影響に関する検討

株化マウス筋芽細胞である C2C12 細胞へ LARGE をトランスフェクションし、LARGE 安定高発現株のクローニングを行った。この細胞と野生型 C2C12 細胞で増殖能や筋管細胞への分化能を比較検討した。

4. 研究成果

(1) LARGE の過剰発現が末梢神経の髄鞘形成に及ぼす影響に関する検討

LARGE はジストログリカンの糖鎖修飾を亢進してラミニンとの結合性を増強させることが知られている。このため LARGE の過剰発現は髄鞘形成にも影響を及ぼしこれを促進する方向へはたらくものと予想された。このためまず始めに LARGE Tg マウスにおける髄鞘の検討を行った。LARGE Tg マウスの末梢神経において予想通りにジストログリカンの糖鎖修飾は著明に亢進しラミニン結合能も増強していた (図 1)。しかしトルイジンブルー染色後の光学的顕微鏡での観察、ならびに電子顕微鏡における観察でも髄鞘を含めて末梢神経の形態に野生型マウスとの差異は明らかではなかった。さらに dy^{2J} マウスと dy^{2J} /LARGE との間にも明らかな違いは認めら

れず、 dy^{2J} マウスにおける髄鞘形成不全は $dy^{2J}/LARGE$ マウスにおいても同程度に認められた。また基底膜の構造にも違いはなかった。

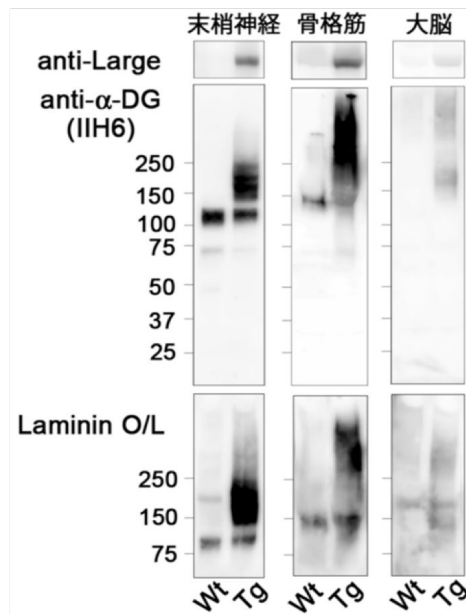


図1 . LARGE Tg マウスの末梢神経や骨格筋、大脳ではジストログリカンの糖鎖に対する抗体 (IIH6) により糖鎖修飾の亢進が、ラミニンオーバーレイ法 (Laminin O/L) によりラミニン結合能の増大が確認された。

(2) LARGE の過剰発現がもたらす遺伝子発現変動の網羅的解析

末梢神経サンプルを用いた DNA マイクロアレイ解析の結果 LARGE Tg マウスにおいて野生型マウスと比較して quaking、neurofibromatosis 1、transcription factor 7-like 2、Ski などの髄鞘形成に關与する遺伝子の発現変動を認めた。一方で骨格筋サンプルにおいては LARGE Tg マウスにおいて insulin-like growth factor-1 (IGF-1)、thrombospondin 4、integrin β 1 binding protein 3、plasminogen、caspase 1、B-cell translocation gene 1 などの骨格筋再生に關与する遺伝子発現の変動を認めた。これらの中でも IGF-1 の発現低下は興味深く、ウエスタンブロットや ELISA において蛋白質レベルにおいても発現の低下が確認された。

(3) LARGE の過剰発現が骨格筋の筋再生に及ぼす影響に関する検討

ラミニン α 2 鎖欠損先天性筋ジストロフィーのモデルマウスである dy^{2J} マウスではジストログリカンとラミニンとの結合性が低下し、筋線維の変性、壊死が生じる。そこで LARGE の過剰発現が筋ジストロフィー変化にどのような影響を及ぼすのか、 dy^{2J} マウスと $dy^{2J}/LARGE$ マウスを比較検討した。表現系の観察では dy^{2J} マウスと比べて $dy^{2J}/LARGE$ マウスでは 8 週齢における体重が有意に少なく、握力も有意に弱かった。さらに寿命も短い傾

向にあった。筋病理学的検討では、 $dy^{2J}/LARGE$ マウスで有意に間質の線維化面積の割合が多く、筋線維は小径化していたが、中心核線維の割合では有意差は認められなかった。これらの結果より、 $dy^{2J}/LARGE$ マウスでは線維化が亢進するにもかかわらず筋再生の指標である中心核線維の割合は増加しないことから筋再生の障害が示唆された。そこでさらにこれらのマウスにおける筋衛星細胞と再生線維の計測を行った。その結果 dy^{2J} マウスと比較して $dy^{2J}/LARGE$ マウスでは筋衛星細胞は減少傾向を、再生線維面積は有意な減少を示した。これらのことから LARGE の過剰発現は骨格筋の再生を抑制することが明らかとなった (図 2)。

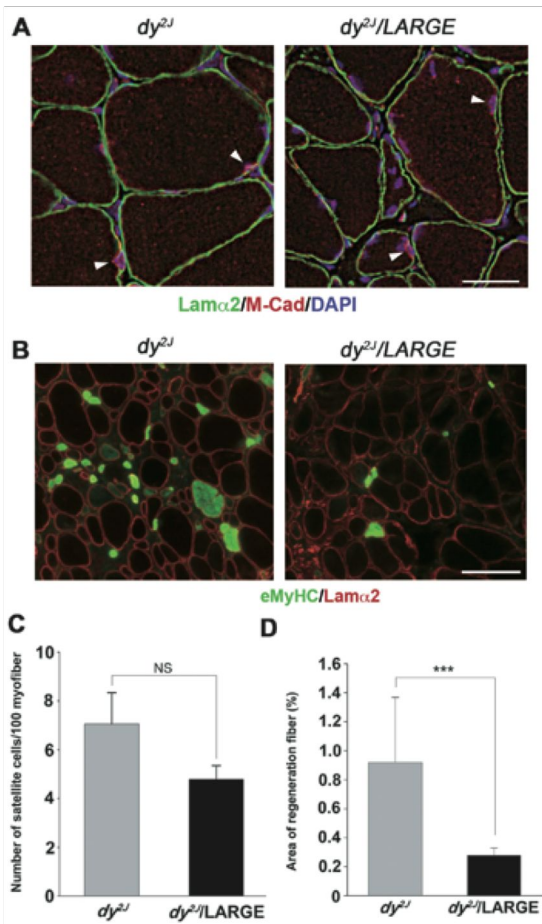


図2 .A. 筋衛星細胞のマーカである M-cadherin (M-Cad) を用いた多重染色により筋衛星細胞 (白矢頭) を計測した。B. 筋再生線維のマーカである embryonic myosin heavy chain (eMyH) を用いた多重染色により再生線維面積を計測した。C. 筋衛星細胞は $dy^{2J}/LARGE$ マウスにおいて減少傾向を示した。D. 再生線維面積は $dy^{2J}/LARGE$ マウスで有意に減少した。

(4) 培養細胞における LARGE の過剰発現と細胞に与える影響に関する検討

LARGE 安定発現 C2C12 筋芽細胞は野生型 C2C12 細胞と比較して細胞増殖能が有意に低下していた。また LARGE 安定発現 C2C12 筋芽

細胞は筋管細胞への分化能も有意に低下していた。これらの結果は LARGE Tg マウスにおける筋再生の抑制を *in vitro* の系を用いて再現したことを示すものであった。また LARGE Tg マウス骨格筋で IGF-1 の低下が見られたことから C2C12 細胞の IGF-1 を検討したところ、LARGE 安定発現 C2C12 細胞では野生型 C2C12 細胞に比較して IGF-1 の発現が低下していた。さらに培養上清へ IGF-1 を添加することで LARGE 安定発現 C2C12 筋芽細胞の筋管細胞への分化能が野生型と同程度まで回復した。このことから LARGE を過剰発現することで何らかの機序を介して IGF-1 の発現が低下し、その結果マウスにおける筋再生や C2C12 細胞における筋管への分化が抑制される事が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Saito F, Kanagawa M, Ikeda M, Hagiwara H, Masaki T, Ohkuma H, Katanosaka Y, Shimizu T, Sonoo M, Toda T, Matsumura K. Overexpression of LARGE suppresses muscle regeneration via down-regulation of insulin-like growth factor 1 and aggravates muscular dystrophy in mice. Hum Mol Genet (査読有) 2014 (*in press*). doi: 10.1093/hmg/ddu168

Goddeeris MM, Wu B, Venzke D, Yoshida-Moriguchi T, Saito F, Matsumura K, Moore SA, Campbell KP. LARGE glycans on dystroglycan function as a tunable matrix scaffold to prevent dystrophy. Nature (査読有) 503, 2013, 136-140. doi: 10.1038/nature12605.

斉藤史明. LARGE による α -ジストログリカノパチーに対する治療戦略. 神経内科 (査読有) 76, 2012, 367-371

Hagiwara H, Saito F, Masaki T, Ikeda M, Nakamura-Ohkuma A, Shimizu T, Matsumura K. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A enhances myogenesis by coordinating muscle regulatory factors and myogenic repressors. Biochem Biophys Res Commun (査読有) 414, 2011, 826-831. doi:10.1016/j.bbrc.2011.10.036.

Saito F, Saito-Arai Y, Nakamura-Okuma A, Ikeda M, Hagiwara H, Masaki T, Shimizu T, Matsumura K. Secretion of N-terminal domain of α -dystroglycan in cerebrospinal fluid. Biochem Biophys Res Commun (査読有) 411, 2011, 365-369. doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.150.

[学会発表](計 10 件)

斉藤史明, 金川基, 萩原宏毅, 真先敏弘,

池田美樹, 清水輝夫, 園生雅弘, 戸田達史, 松村喜一郎. 骨格筋特異的 Fukutin 欠損マウスに対する LARGE の過剰発現の影響. 第 54 回日本神経学会学術大会. 東京. 2013.5.31

萩原宏毅, 斉藤史明, 真先敏弘, 清水輝夫, 松村喜一郎, 園生雅弘. レスベラトロールの先天性筋ジストロフィーモデルマウスに対する効果の検討. 第 54 回日本神経学会学術大会. 東京. 2013.5.31

Saito F, Hagiwara H, Ikeda M, Masaki T, Shimizu T, Matsumura K. Effects of overexpression of LARGE on a mouse model of congenital muscular dystrophy. 17th International congress of the World Muscle Society. Perth, Australia. Oct 9, 2012.

斉藤史明, 萩原宏毅, 真先敏弘, 池田美樹, 園生雅弘, 松村喜一郎. LARGE による α -dystroglycan の機能亢進を用いた先天性筋ジストロフィー治療の試み. 第 53 回日本神経学会学術大会. 東京. 2012.5.24

萩原宏毅, 斉藤史明, 真先敏弘, 清水輝夫, 松村喜一郎, 園生雅弘. 転写因子 Pax3 は MyoD と細胞周期の制御因子に作用して筋分化を抑制する. 第 53 回日本神経学会学術大会. 東京. 2012.5.24

真先敏弘, 斉藤史明, 萩原宏毅, 松村喜一郎, 園生雅弘. 細胞外 H1 蛋白は末梢神経・胸腺における新しいラミニン結合蛋白である. 第 53 回日本神経学会学術大会. 東京. 2012.5.24

斉藤史明, 萩原宏毅, 池田美樹, 黄山, 真先敏弘, 松村喜一郎. Dystroglycan の機能亢進を用いた癌細胞抑制に関する検討. 第 84 回日本生化学会大会. 京都. 2011.9.22

斉藤史明. シンポジウム 筋ジストロフィー新規治療法開発の最前線 Large による α -ジストログリカノパチーに対する治療法の開発. 第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋. 2011.5.19

斉藤史明, 萩原宏毅, 大熊文美, 池田美樹, 真先敏弘, 清水輝夫, 松村喜一郎. Large による α -dystroglycan の機能修復と疾患治療への応用. 第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋. 2011.5.19

萩原宏毅, 斉藤史明, 真先敏弘, 大熊文美, 松村喜一郎, 清水輝夫. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は筋原性制御因子に作用して骨格筋分化を促進する. 第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋. 2011.5.18

[図書](計 1 件)

斉藤史明, 清水輝夫. 南江堂. 筋強直性ジストロフィー. In: 神経疾患最新の治療 2012-2014. 2012, 334-336.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 史明 (Saito Fumiaki)
帝京大学・医学部・准教授
研究者番号：40286993

(2) 研究分担者

真先 敏弘 (Masaki Toshihiro)
帝京科学大学・医療科学部・教授
研究者番号：00585028

萩原 宏毅 (Hagiwara Hiroki)
帝京科学大学・医療科学部・教授
研究者番号：80276732

(3) 連携研究者

松村 喜一郎 (Matsumura Kiichiro)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：50260922