

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24592202

研究課題名(和文)筋損傷の再生を促進する分泌性タンパク質の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of RAMP and CXCL14 in skeletal muscle regeneration.

研究代表者

中山 由紀(Nakayama, Yuki)

熊本大学・大学院先端科学研究部(理)・准教授

研究者番号：30332381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：機能未知である新規の分子RAMPとケモカインの一つであるCXCL14をmdxマウス筋芽細胞株より同定した。いずれの分子も分泌タンパク質であるが、筋再生過程にどのように関与するのか明らかにされていない。RAMPについてはRAMP結合タンパク質の候補分子であったLYVE1とは骨格筋内では共局在しない可能性が高まった。CXCL14については、CXCR4へのCXCL12の結合を阻害する働きがあることが報告されているが、C2C12ではそのような効果が見られないことが明らかになった。さらに、マウス骨格筋再生時にはCXCL14は筋再生を促進することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the physiological function of RAMP and CXCL14 whose expression is enhanced in skeletal muscles after injury. Regarding RAMP, co-localization of RAMP and LYVE1 protein does not occur in skeletal muscle. It has been reported that CXCL14 has a function of inhibiting the binding of CXCL12 to CXCR4, but it was revealed that such effect was not seen with C2C12. Furthermore, it was revealed that CXCL14 promotes muscle regeneration during mouse skeletal muscle regeneration.

研究分野：発生生物学

キーワード：ケモカイン 骨格筋 再生

1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーとは、骨格筋の変性・壊死を主病変とし、進行性の筋力低下をきたす遺伝性の疾患である。筋ジストロフィーには様々な型が報告されている。中でも最も重篤な病状を示すのは Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) であり、その責任遺伝子はジストロフィン遺伝子である。骨格筋では、ジストロフィンタンパク質は基底膜、細胞膜と細胞骨格を結びつける働きをしている。ジストロフィンとその複合体の異常により筋肉細胞が脆弱になり、骨格筋の変性・萎縮がおこる。近年エキソスキッピング誘導治療に期待が集まっているが、現在まで有効な治療法は確立されていない。

さらに、ジストロフィンとその複合体タンパク質の異常が、がん患者にみられる骨格筋萎縮 (悪液質) の原因であることが報告された (Acharyya *et al.*, *Cancer Cell*, 2005)。がん患者の 20%以上が悪液質により亡くなっていることから、悪液質の改善・治療は深刻かつ早急な対応が迫られる問題である。以上から、筋ジストロフィーやがん患者にみられる骨格筋萎縮の進行を抑える、あるいは進行の原因となる因子の同定は極めて重要な研究課題と考えられる。

申請者は DMD 患者に筋萎縮や筋力低下をもたらす因子や mdx マウスの筋再生を促進する因子を同定するために、mdx マウスと正常マウス骨格筋由来の細胞株を作成し、マイクロアレイ解析を行った (Nakayama *et al.*, *Am J Pathol*, 2004)。その結果、機能不明の RAMP (regeneration-associated muscle protease) およびケモカインの一種である CXCL14 を mdx マウス筋細胞株よりクローニングした。

2. 研究の目的

本研究計画は分泌タンパク質である RAMP および CXCL14 が骨格筋再生過程でどのように機能するのかを明らかにすることを目的とする。申請者はこれまでの研究により以下の予備的な研究結果を得ている。

<RAMP>

RAMP mRNA は薬剤処理により損傷した骨格筋の再生時に発現が誘導される。

ヒト正常筋由来の筋細胞株に比べ、DMD 患者由来の筋細胞株で RAMP mRNA の発現が低下していた (Nakayama *et al.*, *Am J*

Pathol, 2004)。

RAMP 遺伝子ホモ欠損 (RAMP-KO) マウスは胎生致死であった。RAMP-KO 胚は胎生 8.5 日で、野生型胚に比べて発生が遅れている。RAMP がマウス初期発生過程に必須であることを示した (未発表)。

RAMP はヒアルロン酸受容体の一つである LYVE1 (Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1) のヒアルロン酸結合領域に結合し、LYVE1 の発現の安定化に寄与する可能性を明らかにした。また、筋再生時に RAMP と LYVE1 は共局在することを明らかにした (未発表)。

<CXCL14>

CXCL14 欠損マウスを用いた研究により、CXCL14 がマウスの肥満によるインスリン抵抗性の発症と (Nara, Nakayama *et al.*, *J Biol Chem*, 2007)、摂食行動に關与することを明らかにした (Tanegashima *et al.*, *PLoS ONE*, 2010)。

これまで未解明であった CXCL14 受容体 2 種類を同定した。

マウス筋再生時に CXCL14 および受容体の発現が誘導されることを明らかにした (未発表)。

マウス筋芽細胞株 C2C12 の増殖および分化を CXCL14 は促進することを明らかにした (未発表)。

3. 研究の方法

<RAMP>

1) 再生筋における RAMP と LYVE1 の共局在化の解析

免疫組織化学染色により、RAMP と LYVE1 はマウスの再生筋で共局在することが明らかになっている。この結果をサポートするために、RAMP 抗体と LYVE1 抗体による共免疫沈降 (IP) 実験が必要であるが、IP 実験に適した RAMP 抗体が現在のところ存在していない。そこで、培養細胞でリコンビナント RAMP を作成し、これを抗原として新たな RAMP 抗体を作成する。得られた RAMP 抗体と LYVE1 抗体を再生筋のライセートに添加し、IP 実験を行う。

2) 骨格筋再生時における RAMP の機能解明

RAMPは筋再生過程で発現が誘導されることから、何らかの機能を果たしていると考えられる。筋再生過程におけるRAMPの機能を明らかにするため、コンディショナルノックアウトマウスの作成を行っており、RAMP-flox/floxマウスの作成を完了した。骨格筋特異的にCreリコンビナーゼを発現するMCK-Creマウスと交配し、骨格筋特異的にRAMP遺伝子を欠損したマウスを作成する。得られたコンディショナルノックアウトマウスの骨格筋の重量や筋線維の太さなどに異常がないか検討する

<CXCL14>

1) 筋再生過程における CXCL14 とその受容体の発現解析

筋再生過程における CXCL14 とその受容体の mRNA やタンパク質の発現をリアルタイム PCR や抗体を用いた免疫組織化学染色などにより検討する。

2) マウスを用いた CXCL14 の機能解析

筋再生を誘導した野生型マウスに CXCL14 を静脈注射により投与し、未投与個体と筋再生過程の進行に違いがないか未投与個体と比較する。

4. 研究成果

<RAMP>

1) 再生筋における RAMP と LYVE1 の共局在化の解析

生体内で RAMP と LYVE1 が共局在するかどうかを明らかにするために、骨格筋に筋再生を誘導し、回収後、RAMP 抗体と LYVE1 抗体を用いて免疫沈降実験を行なった。その結果、いずれの抗体を用いても RAMP と LYVE1 の共局在するデータは得られなかった (図 1)。

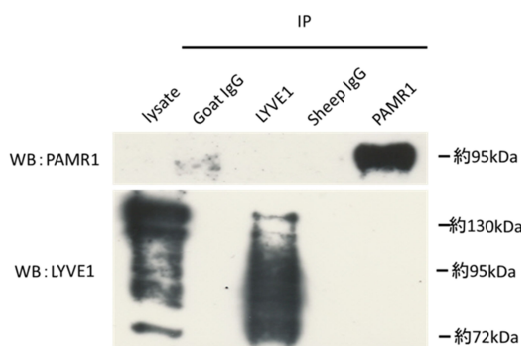


図 1

念の融合タンパク質を用いて、培養細胞内での pull down assay を行なったが、この実験系でも RAMP と LYVE1 の結合を確認することはできなかった (図 2)。

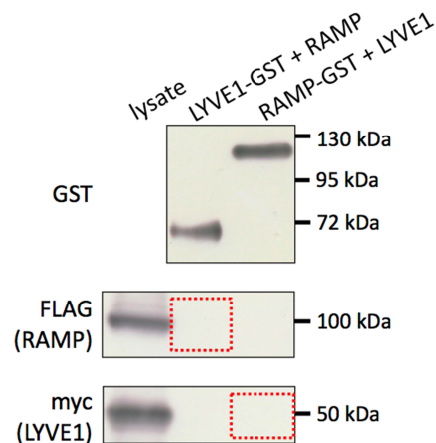


図 2

以上のことより、RAMP は LYVE1 ではないタンパク質と相互作用している可能性が明らかになった。

2) 骨格筋再生時における RAMP の機能解明

RAMP の骨格筋再生時における機能を明らかにする為、骨格筋特異的 RAMP コンディショナルノックアウトマウスの作成を試みた。しかし、flox/flox マウスが何らかの原因により胎生致死となり、その後の解析を行うことができなかった。

<CXCL14>

1) 筋再生過程における CXCL14 とその受容体の発現解析

骨格筋における CXCL14 の機能を明らかにするため、骨格筋再生時における CXCL14 とその受容体の発現解析をリアルタイム PCR により行なった。その結果、CXCL14 は筋損傷後 1 日目より発現が増加し、その後急速に現象することが明らかになった。CXCR4 は筋損傷後、1、3 日目に発現が高く、その後減少した (図 3)。

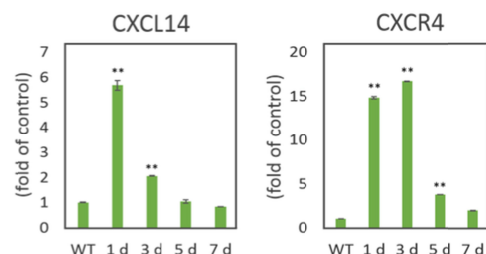


図 3

以上のことより、損傷した筋線維で CXCL14 は発現が増加し、その後細胞外に放出され、

損傷部に動員された炎症系の細胞やサテライト細胞などに作用する可能性が示唆された。

2) マウスを用いた CXCL14 の機能解析

マウス筋再生時における CXCL14 の機能を明らかにするため、マウスリコンビナント CXCL14 タンパク質を作成し、筋再生時に投与した。その結果、CXCL14 を投与したマウスでは、再生筋の断面積が多かった(図4)。このことは、CXCL14 が筋再生を促進する働きをもつことを示している。

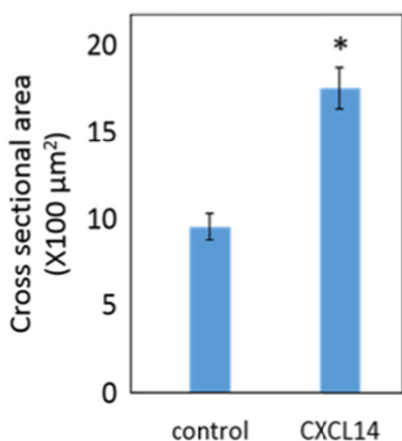


図4

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 件)

1. Tanegashima K, Suzuki K, Nakayama Y, Tsuji K, Shigenaga A, Otaka A, Hara T. (2013) CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis. FEBS Lett, 587(12): 1731-1735.

〔学会発表〕(計 4件)

1. イモリ筋再生のメカニズム 下鶴 健太郎 中山 由紀 第47回日本分子生物学会年会 2014.5 神戸

2. 筋分化過程における BRINP3 の機能解析 田口 文、中山 由紀 第36回日本分子生物学会年会 2013.12 神戸

3. Analysis of CXCL14 and its receptors in muscle differentiation Daiki Shuto, Yuki Nakayama 第35回日本分子生物学会年会、2012.12 福岡

4. The roles of CXCL14 and its receptors

in skeletal muscle differentiation. Daiki Shuto, Kosuke Tanegashima, Kenji Suzuki, Takahiko Hara, Shinichi Abe, Kou Eto, Yuki Nakayama 第45回発生病物学会年会、2012.5 神戸

〔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

https://www.fast.kumamoto-u.ac.jp/wp/wp-content/uploads/2016/09/yuki_nakayama.pdf

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 由紀 (NAKAYAMA YUKI)

熊本大学・大学院先端科学研究科

・准教授

研究者番号：30332381

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()

