

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700373

研究課題名(和文) CLAC-P/25型コラーゲンの神経軸索伸長およびシナプス形成における機能の解析

研究課題名(英文) Physiological functions of CLAC-P/Coll XXV in axon elongation and synapse formation

研究代表者

若林 朋子 (Wakabayashi, Tomoko)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20530330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病老人斑構成蛋白質であるCLAC-P/25型コラーゲンの生理機能について、遺伝子改変マウスを用いた解析を行った。CLAC-Pの欠損により、発生期の運動ニューロンの骨格筋内での軸索伸長・分枝が阻害され、過剰なアポトーシスによりほぼ全ての運動ニューロンが特異的に消失した。CLAC-P KOマウスにおいてBaxを欠損しアポトーシスを抑制しても軸索伸長障害が回復しなかったことから、CLAC-Pは運動ニューロン軸索の標的骨格筋への支配の最初の段階に働き、それに続く神経筋接合部形成とプログラム細胞死の抑制に必須の役割を果たす分子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We studied the physiological functions of CLAC-P/collagen XXV, a transmembrane-type collagen originally identified as a component of senile plaque amyloid of Alzheimer's disease brains, by means of generating CLAC-P knockout and conditional knockout mice. In CLAC-P KO mice, motor axons failed to elongate and branch within the muscle, followed by degeneration of axons. Failure of muscular innervation in KO mice led to excessive apoptosis during development, resulting in almost complete and exclusive loss of spinal motoneurons. Bax deletion in CLAC-P KO mice rescued motoneurons from apoptosis, although motor axons remained halted around the muscle entry site. These observations indicate that CLAC-P/collagen XXV is a novel essential factor that regulates the initial phase of intramuscular motor innervation, which is required for subsequent target-dependent motoneuron survival and NMJ formation during development.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：運動ニューロン 神経発生 アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、アルツハイマー病 (AD) 発症と密接な関連が想定されている老人斑のアミロイド線維に蓄積し、斑形成に影響を与えると考えられる新規老人斑構成タンパク質 CLAC および、その前駆体 CLAC-P/collagen type XXV を同定した。CLAC-P は成体の神経細胞に特異的に発現する膜貫通型コラーゲンであることが明らかになってきたが、その生理機能は不明であった。CLAC-P ノックアウト (KO) マウスを作出し、解析を行った結果、発生期に脊髄前角の運動ニューロンが消失すること、また神経筋接合部 (NMJ) の形成が認められず、骨格筋が成熟不全となる結果、呼吸障害により出生時致死となることがわかった。しかし、CLAC-P の欠損により神経筋発生が阻害される原因は未解明であった。

2. 研究の目的

CLAC-P KO マウスで見られた神経筋発生不全のメカニズムとして、標的組織内での神経軸索伸長不全、NMJ 形成・維持の不全、神経栄養因子の受容もしくは下流シグナリングの不全、筋組織分化もしくは神経栄養因子の分泌の不全、などの可能性が考えられた。そこで本研究においては、上記の可能性をマウスを用いた *in vivo* もしくは培養細胞系を用いた *in vitro* 両面から検討し、CLAC-P が神経発生に果たす役割を分子レベルで明らかにすることを目的とした。また、CLAC-P KO マウスと同様の表現型を示す例として、受容体型チロシンフォスファターゼである RPTP α 、RPTP δ のダブル KO マウスが報告されており、これら RPTP と CLAC-P が相互作用し、運動ニューロンの発生に関与する可能性についても、検討することを目的とした。

3. 研究の方法

CLAC-P の神経筋発生における役割を明らかにするため、KO マウスの発生時期を追った詳細な解析をすすめるとともに、神経細胞における機能を解析するにあたり、ノックアウトマウスが致死性の表現型を示すことから、この問題を克服するため アポトーシスに抵抗性を示す Bax KO マウスを用いた解析、コンディショナル KO (cKO) マウスの作出と解析を行い、*in vivo* の組織で CLAC-P の生理機能を明らかにしていく。また、これに関わる分子メカニズムを解明するため、生存や軸索伸長に対する機能を明らかにする目的で、初代培養運動ニューロンを用いた *in vitro* での軸索伸長、栄養因子応答性の検討を行う。更に、RPTP を始めとするリガンド-受容体機能の解析を目的とした培養細胞系を用いた実験を行う。

4. 研究成果

CLAC-P KO マウス胚の神経筋発生について、日齢を追った詳細な解析を行った。その

結果、胎生 11.5 日 (E11.5) までに脊髄運動ニューロンは軸索を標的骨格筋に投射するが、その程度は野生型 (WT) と CLAC-P KO マウスとの間に差が認められなかった。しかし E12.5 以降、WT の運動ニューロン軸索束は筋組織内に侵入し、分枝をして NMJ 形成部位に向かって伸長していくのに対し、KO マウスの軸索は、骨格筋侵入部位付近で伸長を停止し、以降の分枝も認められなかった (図 1)。WT の胎児では、E13.5 に筋線維中央部の終板に NMJ 形成が認められるが、KO では軸索が変性、退縮していた (図 1)。

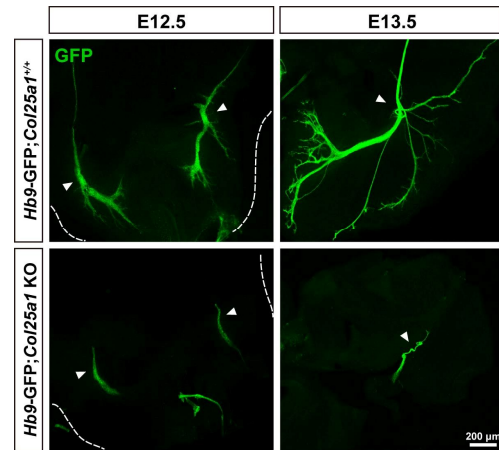


図 1 横隔膜への運動ニューロン軸索の投射
矢頭：軸索束侵入部位

同時に脊髄前角における運動ニューロン数を検討した結果、運動ニューロンへの分化が終了する時期である E11.5 では KO でも WT と同等の運動ニューロンが存在し、運動ニューロンへの運命決定と分化は正常に起こっていることが明らかとなった。WT マウスの運動ニューロンはその後、E13.5 をピークにアポトーシスにより約半数が消失するが、KO マウスでは、この時期に一致して大規模なアポトーシスが起り、出生前までに、脊髄の全レベルに渡って、ほぼ全ての神経細胞体が消失することが示された (図 2)。

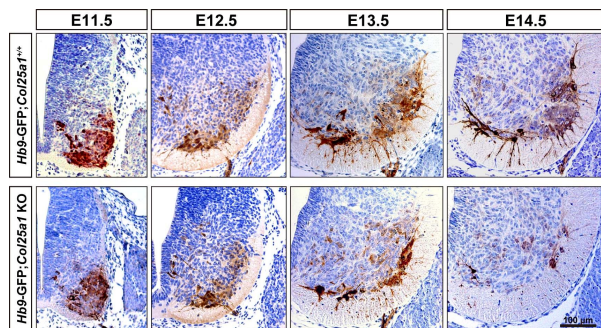


図 2 脊髄前角運動ニューロンの脱落
下段：CLAC-P KO マウス

運動ニューロン軸索の伸長障害・退縮と細胞体のアポトーシスによる消失が同時期に進行することから、これらの因果関係を明らかにする目的で、発生過程の運動ニューロンのアポトーシスが抑制されることが知られる Bax KO マウスを用いた解析を行った。Bax と CLAC-P のダブル KO マウスにおいては、運動ニューロンはアポトーシスを免れるものの、軸索末端は標的骨格筋侵入部位にとどまり、伸長・分枝は阻害されたままであった(図3)。これらの結果から、CLAC-P の欠損では軸索伸長阻害が主要因となり、標的由来の栄養因子を十分に受容できない影響で、運動ニューロンが過剰なアポトーシスを起していることが明らかとなった。

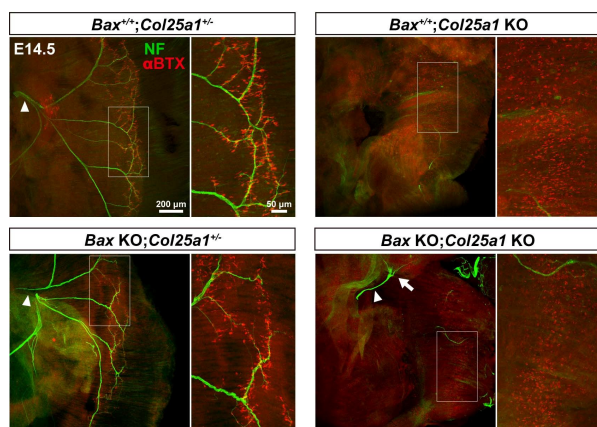


図3 アポトーシス抑制時の軸索伸長障害
下段右: Bax, CLAC-P ダブル KO マウス

次に、いずれの組織に発現する CLAC-P が神経筋間の相互作用に重要な役割を果たしているのかを明らかにする目的で、cKO マウスの作出を行った。KO マウス同様、細胞外の furin 切断部位を含む exon2 を loxP 配列で挟む CLAC-P flox マウスを作成した。このマウスを、E9.5 より運動ニューロンで Cre リコンビナーゼを発現する Hb9-Cre tg マウスおよび骨格筋で発現する HSA-Cre tg マウスと交配し、胎生期における神経筋発生の解析を行った。その結果、運動ニューロン特異的 CLAC-P cKO マウスにおいては、運動ニューロンの標的骨格筋支配や NMJ 形成が起こり、正常に発生することが明らかになった。一方、骨格筋特異的 CLAC-P cKO マウスにおいては、コンベンショナル KO マウスと同様、神経支配の起こる E15 前後において、運動ニューロン軸索の退縮と、細胞体の消失を認めた。このことから、胎生期においては、骨格筋に発現する CLAC-P が神経軸索の伸長・分枝に重要な役割を果たしていることが示された。

また、中枢神経系における CLAC-P の機能解析を目的として、Nestin-Cre あるいは CaMKII α -Cre tg マウスと CLAC-P flox マウスの交配をすすめた。これらのマウスは顕著な障害を認めず、正常に発生し、成体マウス

となることが分かった。

CLAC-P の生存および軸索伸長に対する機能を明らかにする目的で、初代培養運動ニューロンを用いた検討も行った。CLAC-P の欠損が、運動ニューロンの神経栄養因子の受容による抗アポトーシス作用に影響を与えるかについて、CLAC-P KO マウス由来の初代培養運動ニューロンを用いて解析を行った。その結果、KO ニューロンは WT と同等の生存率を示し、CLAC-P は神経栄養因子によるアポトーシス抑制効果に直接関与していないことが示された。また、運動ニューロンに対するリコンビナント CLAC-P の添加によっても、生存率や軸索伸長は認められず、CLAC-P 自身が運動ニューロンに対して栄養因子として機能する可能性も否定する結果となった。

これらの研究により、CLAC-P による標的骨格筋内での運動ニューロン軸索伸長を担う分子メカニズムの一端が明らかとなり、論文報告を行った (Tanaka, Wakabayashi et al., J Neurosci 2014)。

RPTP を始めとするリガンド-受容体機能の解析を目的とし、培養細胞を用いた検討を行った。KO マウスの表現型が CLAC-P KO と酷似しており、またシナプスオーガナイザーとしても知られる RPTP α および RPTP β について、これらを一過性に発現する HEK293 細胞に対し、CLAC-P の細胞外領域を精製したリコンビナントタンパク質を添加し、結合アッセイを行った。その結果、RPTP 発現細胞特異的に CLAC-P の細胞表面への結合が認められた。これらの結果から、シナプスあるいは神経突起の伸長過程で CLAC-P と RPTP が協調的に働いている可能性を示唆した。

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 1 件)

田中 智弘、若林 朋子 (共同筆頭著者)、大泉 寛明、西尾周、佐藤 隆史、原田 彰宏、藤井 大資、松尾 祥子、橋本 唯史、岩坪 威、CLAC-P/collagen type XXV is required for the intramuscular innervation of motoneurons during neuromuscular development. The Journal of Neuroscience, 査読有、Vol.34, No.4, 2014, pp.1370-1379, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2440-13.2014

〔学会発表〕(計 1 件)

若林 朋子、ROLE OF CLAC-P/TYPE XXV COLLAGEN IN THE TERMINAL ARBORIZATION AND

SURVIVAL OF DEVELOPING
MOTONEURONS、The 11th International
Conference on Alzheimer's & Parkinson's
Diseases、2013年03月07日、Florence, Italy

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

若林 朋子 (WAKABAYASHI, Tomoko)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20530330

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：