

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430075

研究課題名(和文) 神経系におけるジストログリカンN末端ドメインの未知機能と病態関与の解明

研究課題名(英文) Characterization of the function of dystroglycan N-terminal domain and its related disorders in nervous system

研究代表者

松村 喜一郎 (Matsumura, Kiichiro)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：50260922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：-ジストログリカン(-DG)のN末端ドメイン(-DG-N)は切断され細胞外へと分泌されるが、切断後の-DG-Nの機能については全く不明のままである。我々はこの点を明らかにするために全身で-DG-Nを高発現するトランスジェニック(-DG-N Tg)マウスを作成した。そして同マウス骨格筋において-DGの糖鎖を特異的に認識する抗体、11H6の反応性が著しく減弱していることを明らかにした。一方で-DGのラミニン結合能は比較的保たれていた。これらの結果より、-DG異常症の診断には11H6反応性のみではなくラミニン結合能の評価が不可欠であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The N-terminal domain of -dystroglycan (-DG-N) is cleaved and secreted from many types of cells. However, the functional role of secreted -DG-N is still unidentified. To elucidate this point, we generated transgenic mice overexpressing -DG-N ubiquitously. Interestingly, we demonstrated that the reactivity of 11H6, an antibody which detects specific sugar chain structure of -dystroglycan, was markedly reduced in skeletal muscle. In contrast, laminin binding activity was well preserved. Based on these results, we propose that the evaluation not only of 11H6 reactivity but also of the laminin binding activity is necessary for the clinical diagnosis of -dystroglycanopathies.

研究分野：神経内科学

キーワード：ジストログリカン 糖鎖修飾 蛋白質プロセッシング トランスジェニックマウス

## 1. 研究開始当初の背景

ジストログリカン (DG) は、細胞外に存在する膜表面性蛋白質の  $\beta$ -ジストログリカン ( $\beta$ -DG) と膜貫通型蛋白質である  $\alpha$ -ジストログリカン ( $\alpha$ -DG) から成り DG 複合体を形成している。そして細胞外で基底膜中のラミニンと、細胞内でジストロフィンを介して細胞骨格と結合している。この DG 複合体は細胞内外の架橋構造を形成し、細胞の形態維持やシグナル伝達などに重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。そして DG による架橋構造の破綻により筋ジストロフィーが発症することから、従来 DG は筋ジストロフィーの分野を中心に精力的に研究が進められてきた。最近になり、 $\alpha$ -DG の N 末端ドメインは翻訳後修飾の過程でプロテオソームコンパターゼによって切断されることが示された。また研究代表者らは  $\alpha$ -DG の N 末端ドメイン ( $\alpha$ -DG-N) が各種の培養細胞において蛋白分解酵素フューリンにより切断され、ただちに細胞外へ分泌されること、脳脊髄液中には高濃度の  $\alpha$ -DG-N が存在していることなどを報告し、DG のプロセッシング研究に先鞭を付けてきた。しかし現時点ではこの切断がいかなる生理学的意義を有するのか、また各種病態とどのような関わりを持つのか不明のままである。

## 2. 研究の目的

一般的に細胞表面に存在する成長因子やサイトカインは不活性型の蛋白質として産生され、後にプロテアーゼによる切断を受け活性型の蛋白質になることが知られている。また研究代表者らは予備実験において  $\alpha$ -DG-N を欠損するノックインマウスの作出を試みたがこれらは胎生致死であった。これらの事実を考え合わせると、切断・分泌された  $\alpha$ -DG-N が未知の重要な生物学的機能を有する可能性は極めて高いものと考えられる。本研究の目的はこれら  $\alpha$ -DG-N プロセッシングの生理的意義や切断後の  $\alpha$ -DG-N の機能、また疾患・病態へ及ぼす影響に関して検討を行うことである。そして培養細胞よりも生体に近い *in vivo* の実験系で、すなわちモデル動物を用いて個体レベルにおける解析を行いこれらの点を解明する事を目標とした。

## 3. 研究の方法

### (1) モデルマウスの作出

$\alpha$ -DG-N の機能を明らかにすることを目的に、 $\alpha$ -DG-N を高発現するトランスジェニックマウス ( $\alpha$ -DG-N Tg マウス) を規程の方法により作出した。CAG プロモーターの下流にマウス  $\alpha$ -DG-N 配列に相当する DAG1 遺伝子 1-310 塩基を挿入したプラスミドを作製した。そして野生型 C57BL/6NJ マウスの受精卵へマイクロインジェクションを行った。遺伝子型の判定はプラスミドに固有な配列に設計したプライマーを用いた PCR 法によ

り行った。一方で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コンディショナルノックアウトマウス (FKTN cKO マウス) は神戸大学大学院分子脳科学、戸田達史教授より供与を受けた。

### (2) マウスの解析

マウスより各種組織を摘出し直ちに凍結保存した。生後 8 週齢、16 週齢、24 週齢の  $\alpha$ -DG-N Tg マウスおよび FKTN cKO マウスの凍結切片を作製し、光学顕微鏡による組織形態観察を行った。また  $\alpha$ -DG-N に対する抗体、 $\alpha$ -DG の糖鎖に特異的に反応する抗体である IIH6、 $\alpha$ -DG のコア蛋白質に対する抗体などを用いて、免疫蛍光抗体法やウエスタンブロット法を行い、ジストログリカンやその関連蛋白質の発現、挙動に関する検討を行った。さらにラミニンオーバーレイ法を用いて  $\alpha$ -DG のラミニン結合能を解析した。

### (3) ラージの過剰発現が生体へ及ぼす影響

ラージは  $\alpha$ -DG の糖鎖修飾に関わる糖転移酵素の一つで、未切断の  $\alpha$ -DG-N と結合することで  $\alpha$ -DG の  $\mu$  チンドメインに糖鎖を付加していくことが知られている。このラージの機能をより深く理解することは  $\alpha$ -DG-N の機能を解明する上で不可欠である。そこで培養細胞を用いてラージの過剰発現の影響を検討した。すなわちマウス筋芽細胞である C2C12 培養細胞にラージ遺伝子をトランスフェクションして安定発現株を得た。この細胞を用いて培地の血清濃度を下げることにより筋芽細胞から筋管細胞への分化を誘導し、分化に対するラージ過剰発現の影響を調べた。さらに DNA マイクロアレイ解析を行いラージの過剰発現により発現が変化する遺伝子を網羅的に検討した。

## 4. 研究成果

### (1) $\alpha$ -DG-N Tg マウスの作出と解析

全身性に  $\alpha$ -DG-N を高発現する 2 系統の  $\alpha$ -DG-N Tg マウスを得た。これらマウスは正常に出生、発育し、寿命も野生型マウスと比較して大きな違いは認められなかった。8 週、16 週、24 週齢マウスの大腿四頭筋、大腿屈筋、前頸骨筋、腓腹筋をヘマトキシリン・エオジン染色して組織形態学的観察を行ったが、筋線維の再生・壊死や結合織の増生、中心核や筋線維の大小不同などの筋ジストロフィーを示唆する所見は認められず野生型と比較して明らかな差異はなかった。免疫蛍光抗体法およびウエスタンブロット法の結果、 $\alpha$ -DG-N Tg マウス骨格筋におけるラミニン  $\alpha$ 2 鎖、 $\beta$ -ジストログリカンの発現は野生型と変化はなかったものの、興味深いことに  $\alpha$ -DG の糖鎖修飾を特異的に認識する抗体である IIH6 に対する反応性が著明に減弱していた。一方でラミニンオーバーレイ法による検討では  $\alpha$ -DG-N Tg マウスにおける  $\alpha$ -DG のラミニン結合能は野生型と同程度に保たれていた。これを FKTN cKO マウスと比較すると IIH6 反応性は FKTN cKO マウスの方が

保たれており、ラミニン結合能は $\alpha$ -DG-N Tg マウスの方が強かった(図1)。

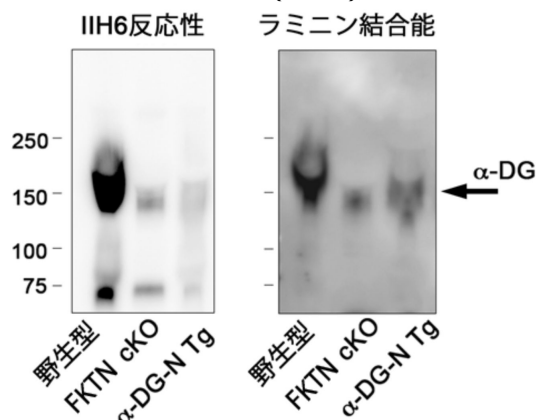


図1 マウス骨格筋のウエスタンブロット

今回の研究から $\alpha$ -DG-N の高発現は生理的な条件下ではマウスの骨格筋に大きな影響は与えないようであった。しかし $\alpha$ -DG-N Tg マウスではIIH6に対する反応性が著減しているにもかかわらずラミニン結合能は保たれていることは注目に値する。このことはFKTN cKO マウスとの比較においても明らかであった。これまで $\alpha$ -DG のIIH6反応性とラミニン結合能は正の相関を示すと考えられIIH6反応性の低下は福山型先天性筋ジストロフィーなど $\alpha$ -DG異常症の臨床的指標としても用いられてきた。しかし本例のようにこれらが解離する場合もあることから、 $\alpha$ -DG異常症の診断にはラミニン結合能の評価も不可欠であることが明らかとなった。

#### (2) 糖転移酵素ラーゼの過剰発現

ラーゼ遺伝子をC2C12培養細胞へ導入して安定的に高発現している細胞株を得た。この細胞の筋芽細胞から筋管細胞への分化をフュージョンインデックスを指標として検討した。この結果ラーゼの高発現により筋管細胞への分化が抑制されることが明らかとなった(図2)。

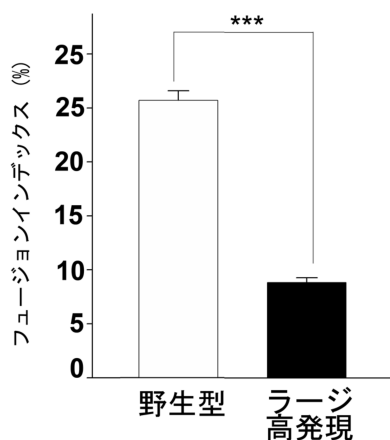


図2 C2C12の分化に及ぼすラーゼ高発現の影響

さらにラーゼの高発現の下流に何らかの分子の発現変動がありこれがC2C12の筋芽細胞

から筋管細胞への分化を抑制している可能性を考え、ラーゼ高発現細胞株を用いてDNAマイクロアレイ解析を行った。この結果多数の遺伝子において発現変動がみられたが、中でもその嘉多が筋分化に影響を及ぼすことが既に知られていたインスリン様成長因子1(IGF-1)の発現低下は非常に興味深いものであった。そこでウエスタンブロット法とELISA法によりIGF-1の発現を比較検討した。その結果これら両アッセイ法において野生型と比較してラーゼ高発現細胞株においてIGF-1の発現が有意に低下していることが明らかとなった。さらにIGF-1をラーゼ高発現C2C12培養細胞の上清へ添加することによりフュージョンインデックスは回復した。これらの結果からラーゼの高発現は何らかの機序によりIGF-1の発現低下を引き起こし、それによりC2C12筋芽細胞から筋管細胞への分化が抑制されたものと考えられた。

#### 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 3件)

Okuma H, Saito F, Mitsui J, Hara Y, Hatanaka Y, Ikeda M, Shimizu T, Matsumura K, Shimizu J, Tsuji S, Sonoo M. Tubular aggregate myopathy caused by a novel mutation in the cytoplasmic domain of *STIM1*. *Neurol Genet* 2016 February 1, doi: <http://dx.doi.org/10.1212/NXG.000000000000050> (査読有)

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.* 2014; 23: 4543-4558. (査読有)

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.* 2013; 503: 136-140. (査読有)

##### [学会発表](計 11件)

斉藤史明、大熊秀彦、池田美樹、萩原宏毅、真先敏弘、清水輝夫、松村喜一郎、園生雅弘。 $\alpha$ -dystroglycan N末端ドメインの過剰発現がマウス骨格筋に及ぼす影響に関する検討。BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会)。兵庫県・神戸市。2015.12.2

大熊秀彦、三井純、原雄二、萩原宏毅、真先敏弘、池田美樹、畑中裕己、清水輝夫、松村喜一郎、清水潤、辻省次、園生雅弘、齋藤史明。Tubular aggregate myopathyにおけるSTIM1の新規変異とC2C12筋芽細胞への影響。第1回日本筋学会学術集会。東京都・小平市。2015.8.8

齋藤史明、大熊秀彦、萩原宏毅、真先敏弘、池田美樹、清水輝夫、園生雅弘、松村喜一郎。Analysis of the functional role of  $\alpha$ -dystroglycan N-terminal domain in vivo。第56回日本神経学会学術大会。新潟県・新潟市。2015.5.20

大熊秀彦、三井純、大森亜希、肥田あゆみ、畑中裕己、松村喜一郎、清水潤、辻省次、園生雅弘、齋藤史明。Tubular aggregate myopathyにおける新規STIM1変異と筋芽細胞に及ぼす影響。第56回日本神経学会学術大会。新潟県・新潟市。2015.5.20

齋藤史明、金川基、池田美樹、萩原宏毅、真先敏弘、大熊秀彦、片野坂友紀、清水輝夫、園生雅弘、戸田達史、松村喜一郎。LARGEの過剰発現はIGF-1の発現低下により筋再生を抑制してマウスの筋ジストロフィーを悪化させる。第87回日本生化学会大会。京都府・京都市。2014.10.18

齋藤史明、金川基、池田美樹、萩原宏毅、真先敏弘、大熊秀彦、片野坂友紀、清水輝夫、園生雅弘、戸田達史、松村喜一郎。LARGEの過剰発現による筋ジストロフィーモデルマウスにおける筋再生の抑制。第37回日本神経科学大会。神奈川県・横浜市。2014.9.11

大熊秀彦、畑中裕己、三井純、齋藤史明、大森亜希、肥田あゆみ、松村喜一郎、清水潤、辻省次、園生雅弘。STIM1遺伝子に変異を認めるTubular aggregateを伴う筋疾患の42歳男性例の臨床病理像の検討。第55回日本神経病理学会総会学術研究会。東京都・千代田区。2014.6.7

齋藤史明、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。FukutinノックアウトマウスにおけるLARGEの過剰発現 - 治療応用へ向けての課題 -。第55回日本神経学会学術大会。福岡県・福岡市。2014.5.24

萩原宏毅、齋藤史明、真先敏弘、松村喜一郎、園生雅弘。レスペラトロールは線維化を軽減し先天性筋ジストロフィーモデルの症状を改善する。第55回日本神経学会学術大会。福岡県・福岡市。2014.5.24

齋藤史明、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。東京都・千代田区。2013.5.31

萩原宏毅、齋藤史明、真先敏弘、清水輝夫、松村喜一郎、園生雅弘。レスペ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。東京都・千代田区。2013.5.31

〔図書〕(計 2件)

大熊秀彦、齋藤史明、松村喜一郎。骨格筋症候群(第2版)-その他の神経筋疾患を含めて-[上]筋ジストロフィーおよび膜イオンチャネル異常症 肢帯型筋ジストロフィー 常染色体劣性型 LGMD, LGMD2G, 日本臨床 2015; 0047-1852 別冊骨格筋症候群(上): 122-123.

大熊秀彦、齋藤史明、松村喜一郎。骨格筋症候群(第2版)-その他の神経筋疾患を含めて-[上]筋ジストロフィーおよび膜イオンチャネル異常症 肢帯型筋ジストロフィー 常染色体劣性型 LGMD, LGMD2H, 日本臨床 2015; 0047-1852 別冊骨格筋症候群(上): 124-125.

〔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

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

(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

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