

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350892

研究課題名(和文) XV/XVIII型コラーゲンとミトコンドリア間の分子機構

研究課題名(英文) Analysis of trans-plasma membrane molecular machinery between collagen types XV/XVIII and mitochondria

研究代表者

百田 龍輔 (Momota, Ryusuke)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80263557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：大規模塩基配列計画のデータベースの検索より筋肉で発現している約千の遺伝子の中から候補となる受容体を数十に絞り込んだ。現在、その解析を進めている。また変異動物の組織学的な解析、細胞生物学的な解析により、XV/XVIII型コラーゲン変異個体では細胞骨格に大きな構造変化が起きていることがわかった。抗XV/XVIII型コラーゲン抗体の検索と反応条件の検討の結果、固定標本に対しても反応する条件を確立し、患者標本を用いて未知のXV/XVIII型コラーゲン関連ヒト疾患の検索を行った。現在、これらの結果をまとめている。

研究成果の概要(英文)：To identify the molecules which would compose "the trans-plasma membrane molecular machinery" of collagen types XV/XVIII and mitochondria, we have screened thousands of genes expressed in muscular tissues and identified possible candidate G-protein coupled receptors. In addition, our histological analyses on collagen types XV/XVIII mutant animals revealed abnormal structures of cytoskeletons, which would potentially compromise the mitochondrial and cellular functions. Moreover, we had successfully optimized the immunohistochemical conditions for the anti-collagen XV/XVIII monoclonal antibodies, which enabled us to use variously processed tissue samples to diagnose human diseases caused by defective collagen XV/XVIII.

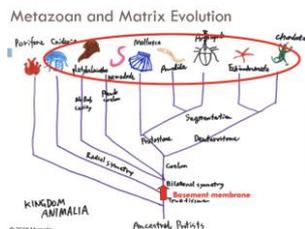
研究分野：解剖学

キーワード：XV/XVIII型コラーゲン ミトコンドリア 細胞骨格 診断法

1. 研究開始当初の背景

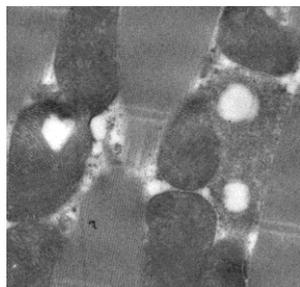
国内で数万人いると見積もられ、難病認定されているミトコンドリア病の原因として、ミトコンドリア DNA やミトコンドリア構成成分をコードする遺伝子の変異が報告されている。すでに 200 近い遺伝子の変異が報告されている一方で、まだ多くの症例で原因が不明である。

これまで、我々は基底膜主要成分である IV 型コラーゲンを中心に、遺伝子発現様式、免疫抗体法を用いた組織中での分布などの解析を進めて来た。



XV/XVIII 型コラーゲン分子も同様に多細胞生物で広く保存されている (上図: 動物界での基底膜分子の分布)。これらについても同様に解析を行い、XV 型は主に筋・神経組織に分布し、XVIII 型コラーゲンは主に肝臓、血管周囲、表皮下基底膜に分布することがわかった。また、他のグループの研究より、XVIII 型コラーゲン分子の C 末端断片エンドスタチンに血管新生阻害作用が見出されたほか、COL18A1 遺伝子変異が網膜の加齢性変性疾患 (ノブロック症候群) の原因であることがわかった。XV 型コラーゲンに関しては、ノックアウトマウスでは加齢性の筋変性、拡張型心筋症を起こすとの報告があるが、まだヒトの疾患についての報告はなされていない。

ショウジョウバエを用いた研究より、基底膜成分 XV/XVIII 型コラーゲン相同分子変異体において加齢とともにミトコンドリアの形態異常 (右写真) が起こり、機能が著しく低下し筋変性が起こること、さらに、高血圧治療薬として広く用いられている薬剤 (アンギオテンシン II-1 型受容体阻害剤) のロザルタンが XV/XVIII 型コラーゲン遺伝子変異体の加齢性の症状を改善することを報告した (概要は参考となるサイトをご覧ください)。



しかしその一方で、ショウジョウバエにはアンギオテンシン II-1 型受容体が存在しないこともわかっている。アンギオテンシン II-1 型受容体は生体で数多く存在する G タンパク受容体の一つであることから、同種の受容体が XV/XVIII 型コラーゲンとミトコンドリア間で仲介をしているものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、XV/XVIII 型コラーゲン異常がミトコンドリア病一因ではないかとの仮説に基づき、XV/XVIII 型コラーゲンとミトコンドリア間にある分子機構を明らかにし、ヒト疾患への応用の可能性について検証する。

3. 研究の方法

以下の方法で XV/XVIII 型コラーゲンとミトコンドリア間にある分子機構を明らかにすることを試みた。

(1) 遺伝子情報データベースを利用して、GO ターム (遺伝子語彙) 検索を行い、候補となる分子の抽出を行った。

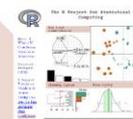
(2) XV/XVIII 型コラーゲン異常のショウジョウバエの組織を電子顕微鏡、蛍光顕微鏡などを用いて詳細な形態学的解析を行い、細胞小器官や細胞骨格の構造的変化の検討を通じて、上記の経路に関わる分子の検索を行った。

(3) XV/XVIII 型コラーゲンが関与すると考えられる未知の疾患を組織学的に検索すること、また、その診断法を確立するために、抗 XV/XVIII 型コラーゲン抗体の検索と反応条件の検討を行った。そして、その抗体を用いて岡山大学病院の過去の患者由来の病理標本の染色を行い、XV 型コラーゲン関連疾患の検索を行った。

4. 研究成果

(1) 大規模塩基配列計画のデータベースの検索より、ショウジョウバエ筋組織で発現するすべてのタンパク質、あるいは変異により筋に症状が現れる遺伝子をすべて抽出したところ約 18000 の遺伝子がヒットした。そのうちで、G タンパク受容体は約 100 個存在することがわかった。この中でさらに、XV/XVIII 型コラーゲンと発現パターンが似ていて組織中で一緒に存在すると考えられるものは約 30 存在する。これらの候補となる分子の中で、ロザルタンと結合することが

遺伝子語彙検索



筋で作用する
遺伝子
18000個

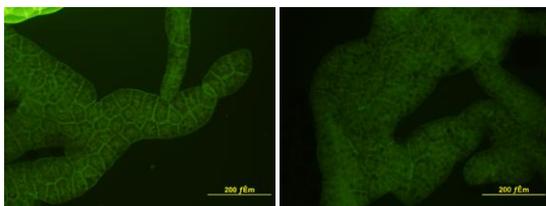
Gタンパク受
容体の遺伝子
100個

XV/XVIII型コ
ラーゲンと共
局在する
30個

予想される構造を持つものから順番に解析を進めている。

(2) ショウジョウバエ XV/XVIII 型コラー

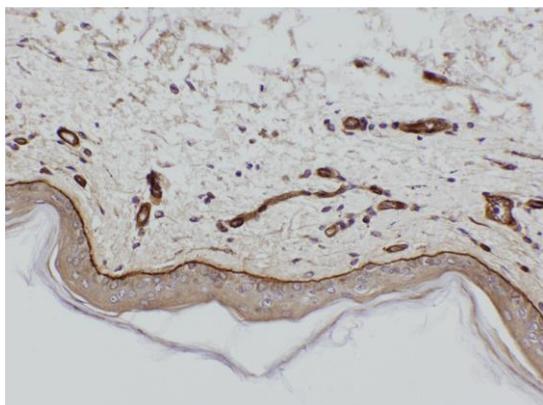
ゲン変異個体について、蛍光顕微鏡を用いて解析を行ったところ、細胞骨格である繊維性アクチンの構造に大きな変化が起きていることがわかった（下図左：野生型、右：変異体）。



アクチン、XV/XVIII 型コラーゲンは共に動物界で進化的に保存されている分子であり、組織中でも広く分布することを考えると、XV/XVIII 型コラーゲンと細胞内に存在するアクチンとの間に進化的に保存された分子機構が存在することが予想される。また、XV/XVIII 型コラーゲンを原因とする疾患、ノックアウトマウス等に見られる様々な症状のいくつかは、この分子機構の異常により起きていることが考えられる。我々はこれまでに、XV/XVIII 型コラーゲンの異常でインテグリンを介したシグナル経路に異常が起きていることを報告したが、インテグリンを介してアクチン線維が配向することを考慮すると、今回のこの発見は以前の我々の観察結果を支持するものである。

(3) これまで我々が用いていた抗 XV/XVIII 型コラーゲン抗体は、凍結標本に対してはよく反応するものであったが、固定されパラフィン包埋された標本に対しては反応性が悪かった。したがって、XV/XVIII 型コラーゲン関連疾患の病理診断に用いるには常に新鮮な凍結標本を用意する必要があり、標本に対して制約がある。そこで、今後 XV/XVIII 型コラーゲン関連疾患が新たに解明された際に、過去の疑わしい症例標本についても病理診断に使えるよう、固定後パラフィン包埋された標本反応する抗体の検出と反応条件の検討を行った。

これまでに用いていた抗体の中から、試行錯誤の結果、XV/XVIII 型コラーゲンの両方について、固定標本に対しても反応する抗体を見つけ、反応条件を確立することができた（例：パラフィン包埋されたヒト皮膚標本からの抗 XVIII 型コラーゲンの検出）。



他のグループの XV 型コラーゲンノックアウトマウスの解析によると、変異マウスは拡張型心筋症を起こすことが明らかとなった。そして、我々のショウジョウバエ変異体の解析でも同様に拡張型心筋症を示唆する結果が得られている。そこで、我々は拡張型心筋症に注目して、岡山大学の倫理委員会の審査を受けた後、過去に岡山大学病院にて拡張型心筋症と診断され原因が明らかとなっていない症例のパラフィン包埋標本を用いて、未知の XV/XVIII 型コラーゲン関連ヒト疾患の検索を進めている。

現在、これらの結果をまとめて投稿の準備を行なっているところである。また、XV/XVIII 型コラーゲンを検出する方法についてもさらに簡便で非侵襲的な検出方法の開発を進めているところである。

参考となるサイト

<https://globalmedicaldiscovery.com/key-scientific-articles/drosophila-type-xv-xviii-collagen-mutants-manifest-integrin-mediated-mitochondrial-dysfunction-which-is-improved-by-cyclosporin-a-and-losartan/>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

大橋俊孝, 基底膜ツールキットとしての XV/XVIII 型コラーゲン遺伝子の機能、岡山医学会雑誌, 第 127 巻, 103-109 (2015) 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① 百田龍輔、パブリックの遺伝情報データベースを用いた遺伝子発現の解析、第 34 回日本美容皮膚科学会総会・学術大会、2016 年 8 月 7 日、京王プラザホテル（東京都新宿区）
- ② 百田龍輔、Drosophila collagen type XV/XVIII: a novel chondroitin sulfate proteoglycan and its biological functions、The 24th Proteoglycan Forum: Proteoglycan Research – Latest Findings、2015 年 8 月 22 日、東京医科歯科大（東京都文京区）
- ③ 米澤朋子、百田龍輔、大橋俊孝ら、光老化における XVIII 型コラーゲンの変化に対する未成熟桃果実エキスの効果、第 33 回日本美容皮膚科学会総会・学術大会、2015 年 7 月 25 日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）
- ④ 百田龍輔、Characterization of a Drosophila multiplexin lethal mutation and its effects on gene expression、第

47 回結合組織学会学術大会、2015 年 5 月 15~16 日、コクヨホール(東京都港区)

- ⑤ 百田 龍輔、Characterization of a *Drosophila* multiplexin lethal mutation and its effects on gene expression、第 47 回結合組織学会学術大会、2014 年 6 月 7 日、ウイंकあいち(愛知県名古屋市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

百田 龍輔 (MOMOTA, Ryusuke)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：80263557

(2) 研究分担者

大塚 愛二 (OHTSUKA, Aiji)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：50168986

内藤 一郎 (NAITO, Ichiro)
岡山大学・医学部・研究員
研究者番号：60362993

(3) 連携研究者

大橋 俊孝 (OOHASHI, Toshitaka)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：50194262

米澤 朋子 (YONEZAWA, Tomoko)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30304299

(4) 研究協力者

小見山 高明 (KOMIYAMA, Takaaki)

檜崎 正博 (NARASAKI, Masahiro)