

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07091

研究課題名(和文)25型コラーゲンの神経疾患における分子病態ならびに健康老化効果の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular bases of collagen XXV functions in neurological diseases and healthy aging.

研究代表者

若林 朋子(Wakabayashi, Tomoko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任助教

研究者番号：20530330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Collagen XXVはアルツハイマー病老人斑の構成分子である。本研究ではcollagen XXVがアミロイド斑の形態形成と可溶性A β の挙動に影響を与える因子であることを明らかにした。一方で、collagen XXVがシナプス形成や軸索誘導に働くRPTP / と結合する分子機序を明らかにした。またCOL25A1の変異に伴う先天性脳神経発達異常(CCDD)の病態機序について、筋由来のcollagen XXVが運動性脳神経の発達にも重要であることを示し、CCDD変異型collagen XXVはRPTP / との結合、ひいては運動ニューロン軸索との相互作用を阻害することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではcollagen XXVがアルツハイマー病や神経発生の障害という複数の疾患に関与するメカニズムについて、分子レベルの研究を行った。A β の蓄積はアルツハイマー病の最も重要な病因として確立しており、その形成過程に影響をおよぼす因子は、病態解明と疾患修飾療法の創出に重要な役割を果たすと考えられる。一方で、collagen XXVはこどもの脳神経の発達障害の原因とも関わっているが、本研究ではcollagen XXVの変異が脳神経支配に障害を来す分子機序を明らかにした。本研究をモデルとして、各種の運動ニューロン疾患の病態解明にもつながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Collagen XXV has been identified as a component of senile plaques in Alzheimer's disease. In this study, we demonstrated that collagen XXV affects the compaction of amyloid plaques and consequently the brain dynamics of A β . We also revealed the molecular mechanism of binding of collagen XXV to its interactor RPTP / , which are implicated in synaptic organization and axon guidance. To elucidate further the pathological mechanism of a congenital cranial dysinnervation disorder (CCDD) caused by mutations in the COL25A1 gene, the effect of mutant collagen XXV on motor innervation was examined. Analysis of muscle-specific Col25a1 KO mice showed that muscle-derived collagen XXV is important for the development of cranial motor neurons. We also showed that CCDD mutations in collagen XXV impair the binding to RPTP / , resulting in reduced interaction with motor axons.

研究分野：神経病理学

キーワード：アルツハイマー病 コラーゲン 運動ニューロン 神経発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Collagen XXV はアルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) 脳老人斑の構成分子として同定された膜結合型コラーゲンであり、これまでに collagen XXV が A β に結合し *in vitro* でアミロイド凝集に影響を及ぼすこと、胎生期には運動ニューロンの骨格筋支配に必須の役割を果たすことなど、多面的な機能が明らかになってきた。

AD との関連に加え近年、COL25A1 遺伝子の異常が先天性の脳神経支配異常症 (congenital cranial dysinnervation disorder: CCDD) や、統合失調症を始めとする精神疾患を引き起こすことが報告された。一方 Welllderly (健康老化) と COL25A1 上の複数の変異との関連も示された。しかし、collagen XXV やその変異がこれらの疾患を導くメカニズムや、老化との関わりについて、分子機序は明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、近年 collagen XXV との関わりが病理学的、遺伝学的に示された複数の神経疾患について、病態機序を分子レベルで解明し、AD を始め未だ治療法の存在しない神経疾患の新規分子標的の創出につなげることを目的とする。

(1) AD のアミロイド病態形成におよぼす影響

AD の発症機序として、アミロイド線維形成の中間体である A β オリゴマーが神経細胞毒性の本態と考えられ、A β 産生阻害あるいは抗 A β 免疫療法など複数の臨床試験が試みられてきたが、未だ有効な治療法は見出されていない。Collagen XXV は A β に結合し老人斑に蓄積するタンパク質であり、AD 予防・治療戦略の新たな作用標的として期待される。そこで本研究ではアミロイド蓄積を呈する AD モデルマウスを用い、collagen XXV の発現が脳内の A β 動態、ひいてはアミロイド蓄積におよぼす影響を解明する。

(2) Collagen XXV と RPTP との結合

受容体型チロシンフォスファターゼ RPTP σ , δ はシナプス誘導分子として知られ、これまでに collagen XXV との結合が示唆されてきた。本研究では両分子の相互作用について、分子レベルで詳細な解析を行う。

(3) Collagen XXV の変異が CCDD を導く病態機序

Collagen XXV は発生期には骨格筋に一過性に発現し、筋組織内での運動ニューロン軸索伸長に必須の役割を果たす。近年、斜視や眼瞼下垂など脳神経の発達異常を示す家系あるいは孤発例の解析から、COL25A1 遺伝子上に複数の変異が報告され、ヒトにおいても collagen XXV が神経筋発生に重要な役割を担う可能性が示唆された。本研究では collagen XXV の軸索発達促進因子としての生理機能と、CCDD における病態機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) AD のアミロイド病態形成におよぼす影響

加齢依存的に脳に A β が蓄積する APP トランスジェニック (Tg) マウスと神経細胞特異的 collagen XXV Tg を交配し、APP/collagen XXV ダブル Tg (dTg) マウスを作出した。脳の生化学的解析ならびに免疫組織化学的解析によりアミロイド蓄積を、脳微小透析法を用いて脳間質液中の可溶性 A β を解析した。さらに、認知機能におよぼす影響について、Y-maze 試験を行った。

(2) Collagen XXV と RPTP σ/δ との結合

両分子の結合を解析するため、リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* 結合実験、RPTP σ/δ を発現する HEK293 細胞に対するリコンビナント collagen XXV の結合を評価する cell surface binding 実験を用いた。また、脊髄運動ニューロンに GFP を発現する Hb9-GFP Tg マウスの脊髄前角カラムより切り出した組織片培養を用い、collagen XXV を発現する HEK293 細胞との共培養により運動ニューロン軸索の誘引作用を評価した。

(3) Collagen XXV の変異が CCDD を導く病態機序

組織における collagen XXV ならびに RPTP σ/δ の発現を、whole mount in situ hybridization 法や qRT-PCR 法で解析した。また初代培養筋細胞を分化誘導し、筋管における collagen XXV の発現制御機構について、薬剤投与実験を行った。マウス脳神経の解析では、Col25a1 ノックアウト (KO) マウスおよび筋特異的 Col25a1 KO (HSA-Cre; Col25a1^{flox/flox}) マウスの胎児を用い、脳神経核の運動ニューロンの定量ならびに、外眼筋や顔面筋の神経支配、神経筋接合部形成を組織学的に検討した。また、CCDD 変異型 collagen XXV を作製し、(2)で記した各種アッセイ法により RPTP σ/δ との結合を評価するとともに、脊髄前角組織片培養を用いて、CCDD 変異の運動ニューロン軸索誘引作用に対する影響を検討した。

4. 研究成果

(1) AD のアミロイド病態形成におよぼす影響

APP/collagen XXV dTg マウスでは、APP Tg マウスと比較して APP の切断には変化は見られなかった。APP/collagen XXV dTg マウスのアミロイド蓄積を免疫組織化学的に解析した結果、collagen XXV の発現は A β 蓄積の形態をよりアミロイド線維密度の高いコンパクトな形状に変化させ、アミロイド β シート構造特異的に結合する thioflavin-S の陽性斑が有意に増加した。

次に脳微小透析法により脳間質液中の可溶性 A β レベルを測定した。その結果、高齢の APP/collagen XXV dTg マウス脳では可溶性の脳間質液 A β 量が有意に減少し、半減期も低下する

傾向にあった。しかし生化学的解析の結果、脳の TBS 抽出画分中の A β ならびに界面活性剤不溶性のアミロイド画分中の A β 量いずれも、APP/collagen XXV dTg マウスと APP Tg マウスで有意な差はなかった。また、アミロイド蓄積前の月齢においては脳間質液、抽出液ともに A β レベルに変化は生じていなかった。本研究では、Y-maze 試験を用いて認知機能（空間作業記憶）の検討を行ったが、APP/collagen XXV dTg と対照の APP Tg マウスの間に差は認められなかった。

これらの結果から、アミロイド斑の成熟化が脳の可溶性 A β レベルと関連し、collagen XXV はその動態に影響をおよぼす因子である可能性が示唆された。可溶性 A β は神経毒性との関連が報告されていることから、その動態と制御因子の解明は AD の病態形成および毒性発現機序の理解に重要である。

(2) Collagen XXV と RPTP σ/δ との結合

Collagen XXV および RPTP σ, δ の細胞外領域の精製リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* の結合実験と、RPTP σ/δ を発現する HEK293 細胞に対するリコンビナント collagen XXV の結合を評価する cell surface binding 実験を用い、両蛋白質の結合様式を検討した。RPTP のドメイン欠損変異体を用い、Ig (イムノグロブリン様) 1-3 領域を欠く RPTP σ では collagen XXV との結合が顕著に低下すること、Ig1-3 領域からなる RPTP δ は結合能を有する一方、Ig1-2 の RPTP δ ペプチドでは結合が消失したことから、RPTP の Ig3 領域が collagen XXV との結合に重要であることを示した。また、Ig1 領域内でグリコサミノグリカンとの結合に重要であることが知られるリジン残基をアラニンに置換した変異体では、collagen XXV との結合が有意に低下した。更に、RPTP σ/δ の基質であり Ig1 領域への結合が示されているコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) が collagen XXV と RPTP σ/δ との結合に競合することも示した。Collagen XXV の欠損変異を用いた解析では、COL3-NC4 領域の重要性が示され、以上の結果から、collagen XXV のカルボキシ末端と RPTP の Ig3、Ig1 領域が結合に重要な役割を果たしていることが考えられた。

また、脊髄前角組織片と HEK293 細胞の共培養による collagen XXV の運動ニューロン軸索誘引作用の評価においては、リコンビナント RPTP σ/δ が誘引作用を阻害すること、また Ig3 領域を含まない RPTP σ/δ でのみ阻害作用が消失したことから、collagen XXV の軸索に対する作用は RPTP σ/δ を介している可能性が支持された。RPTP σ/δ と collagen XXV との結合の分子機序が明らかになったことで、RPTP σ/δ のシナプス誘導分子としての機能における collagen XXV との関わりを解き明かす足掛かりとなることが期待される。

(3) Collagen XXV の変異が CCDD を導く病態機序

Collagen XXV は発生期の骨格筋において一過性に発現するが、その制御機構を検討した。初代培養筋細胞ならびに胎生 (E)13.5 胎児横隔膜を用いた *in situ* hybridization の結果から、collagen XXV は筋管形成とともに発現が上昇し、その転写産物の分布は筋管中央部のシナプス形成領域を中心に高いことがわかった。また同時期の脊髄における RPTP σ/δ の発現も qRT-PCR を用いて明らかにした。一方、神経筋接合部 (NMJ) 形成期以降の骨格筋で *Col25a1* の発現が顕著に抑制される機序について、初代培養筋管への興奮誘導では *Col25a1* mRNA の発現が抑制され、興奮抑制では発現が亢進することがわかった。また、脱神経した骨格筋で *Col25a1* mRNA の発現が上昇することと考えあわせ、運動ニューロンの支配に伴う骨格筋の興奮に伴い、*Col25a1* 発現が持続的に抑制される可能性を明らかにした。

次に CCDD の発症機序として、collagen XXV が脊髄運動ニューロンのみならず、外眼筋をはじめとする頭部の筋肉に投射する運動性の脳神経の発達にも関与するかについて、全身性の *Col25a1* KO マウスならびに筋特異的 *Col25a1* KO マウスの解析を行った。いずれのマウスにおいても、脳幹の切片を用いた組織学的検討から、Islet-1 陽性の運動性神経核 (動眼、滑車、三叉、顔面、舌下神経) が顕著に縮小していることを示した (図 1A)。また筋特異的 *Col25a1* KO マウスの外眼筋や咀嚼筋において、プレシナプスを伴わないアセチルコリン受容体 (AChR) のクラスター (ポストシナプス) が認められ、神経支配の異常が生じていることが示された (図 1B)。

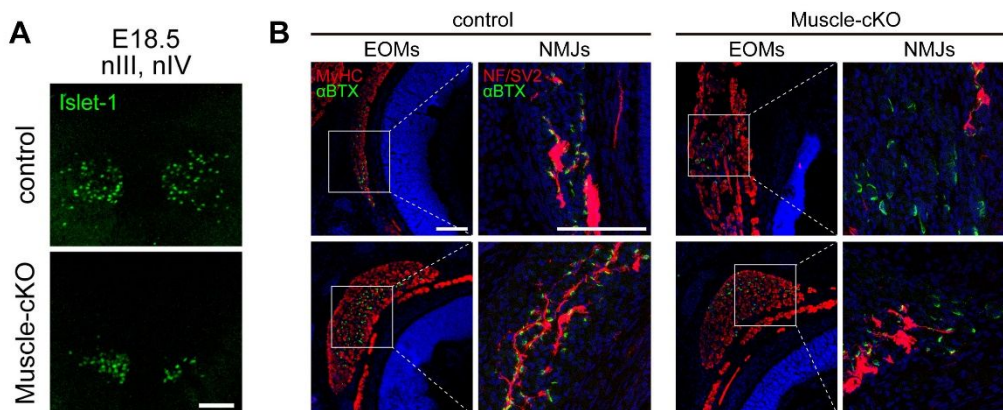


図 1 (A) E18.5 中脳の動眼神経核 (nIII)・滑車神経核 (nIV) における Islet-1 陽性運動ニューロンの染色。筋特異的 *Col25a1* KO マウス (Muscle-cKO) では顕著な細胞数の減少が認められる。(B) E18.5 の外眼筋 (EOMs) を MyHC (赤) で、神経筋接合部 (NMJs) のプレシナプスを neurofilament (NF・赤) および SV2 (赤) で、ポストシナプスの AChR クラスターを α ブンガロトキシン (α BTX・緑) で染色した。Muscle-cKO マウスでは神経支配を欠く領域が広く認められる。

次に CCDD 患者で見出された collagen XXV の変異について、Gly382Arg および Gly497Ter の変異体を用いた解析を行った。トリプシン消化に対する抵抗性を指標としたアッセイより、Gly382Arg 変異は collagen XXV タンパク質の構造的安定性を低下させることがわかった。一方、Gly497Ter 変異は collagen XXV と RPTP σ/δ の結合部位を欠失していた。In vitro および細胞を用いた結合アッセイから、両変異型 collagen XXV は RPTP σ/δ との相互作用が有意に低下することがわかった。さらに、脊髄前角組織片培養を用いた検討から、両変異は collagen XXV の軸索誘引作用も顕著に障害することが示された (図 2)。以上の結果から、collagen XXV は発生期において脳神経の投射にも影響し、CCDD 変異による筋と軸索との相互作用の障害が、ヒトにおいて先天性の神経支配異常を来す可能性が明らかとなった。

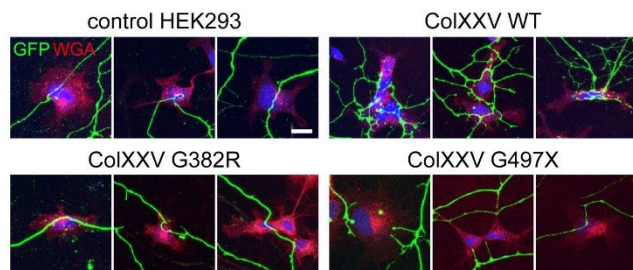


図 2 脊髄前角組織片および各種 CCDD 変異型 collagen XXV (ColXXV) を恒常的に発現する HEK293 細胞の共培養実験。野生型の ColXXV 発現細胞では、GFP 陽性の運動ニューロン軸索が誘引されるが、CCDD 変異型 (G382R、G497X) の ColXXV 発現細胞には誘引作用は認められない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Goncalves T.J.M, Boutillon F, Lefebvre S, Goffin V, Iwatsubo T, Wakabayashi T, Oury F, Armand A-S	4. 巻 9
2. 論文標題 Collagen XXV promotes myoblast fusion during myogenic differentiation and muscle formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5878
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-42296-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Munezane Haruka, Oizumi Hiroaki, Wakabayashi Tomoko, Nishio Shu, Hirasawa Tomoko, Sato Takashi, Harada Akihiro, Yoshida Tomoyuki, Eguchi Takahiro, Yamanashi Yuji, Hashimoto Tadafumi, Iwatsubo Takeshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Roles of Collagen XXV and Its Putative Receptors PTP / in Intramuscular Motor Innervation and Congenital Cranial Dysinnervation Disorder	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 4362 ~ 4376.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.11.112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Munezane H, Oizumi H, Yoshida T, Wakabayashi T, Iwatsubo T
2. 発表標題 CLAC-P/collagen type XXV regulates intramuscular innervation of motor axons through the interaction with receptor protein tyrosine phosphatase and
3. 学会等名 第41回 日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平澤朋子、若林朋子、岩坪威
2. 発表標題 神経-筋発生におけるcollagen XXVの発現制御機構の解析
3. 学会等名 第38回 日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	吉田 知之 (Yoshida Tomoyuki)		