

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08271

研究課題名(和文) テネイシンX欠損に起因するエーラス・ダンロス症候群の慢性疼痛発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism of chronic pain in Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency

研究代表者

堺 弘道 (Sakai, Hiromichi)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：00375255

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)：遺伝性結合組織疾患エーラス・ダンロス症候群(EDS)は、患者の関節や筋肉に慢性疼痛をもたらす。本研究により、EDSの原因遺伝子の一つであるテネイシンX(TNX)の欠損マウスの坐骨神経において血管数が減少することを見出したが、低酸素マーカーHIF-1の発現は変化しておらず、この血管数の減少は、痛みを誘発する虚血状態を引き起こさないと考えられた。一方で、筋肉の慢性疼痛の要因として、傷害を受けた筋再生能力が十分でないことが挙げられる。その機序の解明のために、ジアシルグリセロールキナーゼは筋再生に重要な筋芽細胞の増殖をmTOR complex 1-脂肪酸合成酵素を介して制御している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性結合組織疾患エーラス・ダンロス症候群(EDS)は、患者の関節や筋肉に慢性疼痛をもたらし、著しくクオリティ・オブ・ライフ(QOL)を低下させる。従って、EDS患者のQOLを向上させるためには、慢性疼痛の発生メカニズムを解明し、新たに治療法を開発することが重要である。本研究により、ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)は筋芽細胞の増殖を制御することを示した。従って、今後、このDGKがどのようにEDS患者の筋再生に寄与するのかを明らかにすることが、慢性疼痛の発生メカニズムを解明する上で重要である。

研究成果の概要(英文)：Ehlers-Danlos syndrome (EDS) patients frequently complain of chronic pain. Tenascin-X (TNX) is known as one of causative genes for EDS. In this study, we observed that the number of blood vessels in sciatic nerves of TNX-deficient mice was significantly decreased. However, the levels of HIF-1, which is a marker of hypoxia, was not altered, indicating that hypoxia for pain might be not induced in TNX-deficient mice. On the other hand, it is thought that chronic pain in muscle is caused by the reduction of capability of muscle regeneration. To explore the mechanism, we showed that diacylglycerol kinase might regulate myoblast proliferation, which is an important for muscle regeneration, through mTOR complex 1-fatty acid synthase pathway.

研究分野：病態生化学

キーワード：エーラス・ダンロス症候群 慢性疼痛 テネイシンX ジアシルグリセロールキナーゼ 坐骨神経 筋肉細胞増殖

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エーラス・ダンロス症候群 (EDS, 5000 人に一人の頻度で発症) は、結合組織を形成する細胞外マトリックスタンパク群の遺伝子欠損・変異が原因で引き起こされる遺伝性結合組織疾患である (2015 年には指定難病に認定)。症状の特徴から、EDS は主に 6 つのタイプ (古典型、関節可動亢進型、血管型、後側彎型、多発関節弛緩型、皮膚脆弱型) に分類されるが、共通して、進行性の結合組織脆弱性関連症状 (皮膚・関節・血管・内臓の脆弱性) と関節・筋肉などにおける慢性疼痛を示す。この慢性疼痛は、患者の QOL を著しく低下させる大きな要因となっているが、根治療法は無く、車椅子等の補助器具を用いることで症状の悪化を防ぐ予防的治療法や湿布を貼付する等の対処療法が主となっている。従って、EDS 患者の QOL の向上のためには、慢性疼痛の発生メカニズムを解明し、治療法を改善・開発することが重要になる。

EDS 原因遺伝子の探索研究の中で、古典型 EDS 患者において細胞外マトリックスであるテネシンファミリーの中のテネシン X (TNX) が完全欠損していること (引用文献 1)、一方で、関節可動亢進型 EDS 患者では TNX がハプロ不全であることが報告された (引用文献 2)。さらに、TNX 欠損マウスは、皮膚過伸展などの古典型 EDS の特徴を示したことから (引用文献 3)、TNX は EDS の原因遺伝子の一つであることが明らかとなった。従って、TNX 欠損マウスを用いることは、EDS 慢性疼痛発生メカニズムを明らかに出来る可能性が高いと考えられる。その一方で、EDS の関節や筋肉における慢性疼痛の改善のためには、それら組織の形成を促進し、組織をより強固にすることも重要である。

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はジアシルグリセロール (DG) をリン酸化してホスファチジン酸 (PA) を産生する酵素である。DGK の基質 DG とその産生物 PA は共に細胞内シグナリングのためのセカンドメッセンジャーであることから、DGK はこれら二つのメッセンジャーを代謝・制御する“key enzyme”であり、極めて重要な生理的役割を担っていると考えられてきた。実際に、最近、DGK が細胞増殖・分化や糖代謝などの多彩な生理現象に関わること、そして、癌や 2 型糖尿病などの難治性病態形成に決定的な役割を果たすことが明らかになってきている。以前、我々は、II 型 DGK の δ アイソザイムが筋組織に高発現すること、そして、筋分化を正に制御することを示した (引用文献 4)。さらに、II 型 DGK の η アイソザイムも筋細胞に高発現していたことから、DGK η も筋分化制御のために重要な役割を担っている可能性が高い。

本研究では、TNX 欠損マウスを用いて、EDS の慢性疼痛発生メカニズムを明らかにするだけでなく、さらに、DGK η が制御する筋分化制御機構を解明し、II 型 DGK (δ と η) の筋肉における機能を包括的に理解する。このように、本研究は、EDS の慢性疼痛メカニズムと筋形成機構を明らかにすることで、EDS 患者の新規慢性疼痛治療法の開発へと展開するための基礎的知見を提供し、EDS 患者の QOL の向上を目指す。

2. 研究の目的

TNX 欠損によって引き起こされる構造異常部位 (病変部位) を明らかにし、TNX に起因する EDS 慢性疼痛発生メカニズムを明らかにする。

筋芽細胞に高発現する DGK η の筋細胞における役割を解明し、筋形成における II 型 DGK (δ と η) の役割を包括的に理解する。

3. 研究の方法

(1) 構造解析のための試料作製 腱や靭帯、筋肉の結合組織の構造観察のために、試料はホルマリン固定・脱灰処理後に、パラフィンを用いて包埋し、切片を作製した。作製した切片を用いて Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行った。また、筋肉と坐骨神経の観察のために、試料はホルマリン固定後に、OCT compound を用いて包埋し、切片を作製した。作製した切片を用いて免疫染色を行った。

(2) 細胞培養 マウス筋芽細胞 C2C12 は 10% ウシ胎児血清を含む DMEM (growth medium (GM)) を用いて培養した。培養後、必要に応じて、0.1% ウシ胎児血清及び 5 μ g/ml insulin を含む DMEM (differentiation medium (DM)) に置換し、筋管細胞へと分化させた。

(3) DGK δ の発現抑制 エレクトロポレーション法を用いて DGK δ 特異的 siRNA を C2C12 細胞に導入した。導入した細胞は GM で培養し、必要に応じて、DM に置換し分化誘導した。

4. 研究成果

< TNX に起因する EDS 慢性疼痛発生メカニズムの解明 >

1. TNX 欠損による結合組織への影響

TNX に起因する EDS の慢性疼痛発生メカニズムを明らかにするために、TNX 欠損マウスの腱や靭帯、筋肉の結合組織の構造的変化を詳細に観察した。しかしながら、膝関節部、足関節部、足指部のいずれにおいても、腱や靭帯、筋肉に大きな構造的異常は見られず、また、関節の痛みに関連する他の部位 (軟骨、滑膜、骨膜等) にも構造的異常を見出すことは出来なかった。さらに、これらの結合組織におけるマクロファージ等の炎症細胞の浸潤も観察することは出来な

った。

2. TNX 欠損による末梢神経への影響

以前、我々は、本研究計画以前に TNX 欠損マウスの坐骨神経において血管数が減少することを観察していた。従って、この血管数の減少が慢性疼痛に関与するの否かを検討することにした。TNX 欠損マウスの坐骨神経における血管数についてさらに詳細に調べた。その結果、TNX 欠損マウスでは坐骨神経の血管数が 18.6% 減少していることがわかった (図-A)。逆に、血管の径は TNX 欠損マウスで 17.0% 増大しており (図-B)、径が大きい血管の割合が増加していることがわかった (図-C)。そこで、TNX 欠損マウスの坐骨神経は虚血状態にあり、その虚血状態が痛みと関連するの否かを明らかにするために、低酸素状態で誘導される HIF-1 α の発現レベルを調べた。しかしながら、HIF-1 α は殆ど発現誘導されていなかった。これらの結果から、TNX 欠損マウスの坐骨神経の血管数の減少は、痛みを引き起こすような大きな虚血状態を引き起こすわけではないと考えられた。

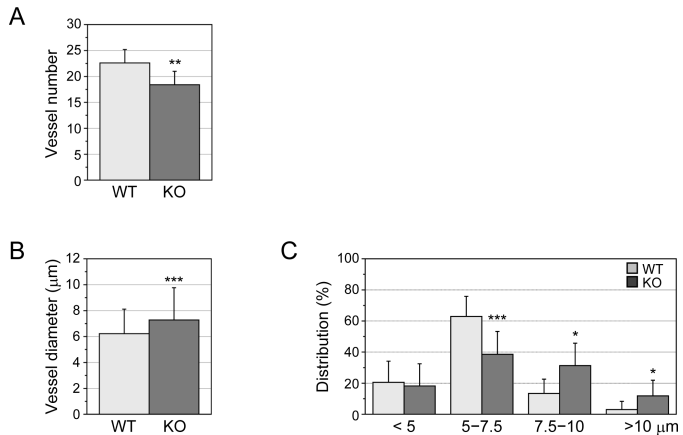


図 TNX 欠損マウスの坐骨神経における血管数 (A) とそれらの径の平均値 (B) と径の分布 (C)

< 筋芽細胞に高発現する DGK η の機能解明 >

以前、我々は II 型 DGK (δ, η, κ) に属する DGK η は C2C12 筋芽細胞の増殖時で高発現することを見出した。そこで、DGK η の筋細胞における機能を明らかにするために、筋芽細胞の増殖及び分化過程における DGK η の発現変化を調べたところ、DGK η は増殖時で高発現すること、そして、その発現は分化 24 時間後には抑制されることがわかった。この結果から、DGK η は筋芽細胞の増殖、もしくは、分化の早い段階に重要な役割を担う可能性が考えられた。次に、DGK η の筋芽細胞における機能を調べるために、C2C12 筋芽細胞の DGK η の発現を siRNA により抑制した。その結果、DGK η の発現抑制は、筋分化マーカーの myogenin の発現には影響せず、一方で細胞数を減少させることがわかった。このことから、DGK η は、C2C12 細胞の筋分化ではなく、細胞増殖を制御することが示された。Mammalian target of rapamycin complex (mTORC) は DGK の産生物である PA によって活性・安定化し、細胞増殖を制御することが知られている。そこで、DGK η の発現抑制は mTOR の発現に影響するの否かを調べた。その結果、DGK η の発現抑制は mTOR の発現量を減少させ、そして、mTOR が調節する脂肪酸合成酵素 (FASN) の発現量も減少させることがわかった。また、mTOR の発現抑制は、細胞数と FASN の発現量を減少させたことから、DGK η は mTOR を介して細胞増殖を制御している可能性が考えられた。さらに、このとき、mTOR の発現抑制は DGK η の発現量をも低下させたことから、DGK η は mTOR と相互制御関係にあることが示された。そして、mTORC1 の構成因子である raptor の発現抑制は FASN の発現量を減少させたことから、DGK η は細胞増殖制御のために、特に mTORC1 を介して制御することが示唆された。筋芽細胞の増殖は筋再生に重要な役割を担う。従って、DGK η は、生体内では筋再生に重要な役割を担っていること、そして、筋分化を制御する DGK δ とは異なる役割を担っていることが考えられた。

本研究により、TNX 欠損に起因する慢性疼痛メカニズムについては明らかにすることは出来なかったが、TNX 欠損は坐骨神経の血管数を増加させ、逆に、血管の径を大きくすることが明らかとなった。一方で、DGK δ と η は骨格筋形成のために、それぞれ重要な役割を担う可能性が示された。今後、DGK δ と η の生体における機能をさらに解明することにより、EDS 慢性疼痛を改善するための新規治療薬の開発へと展開できる可能性が考えられた。

< 引用文献 >

1. Burch GH, Gong Y, Liu W, Dettman RW, Curry CJ, Smith L, Miller WL, Bristow J., Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome., *Nat Genet*, 1997, 17:104-108.
2. Zweers MC, Bristow J, Steijlen PM, Dean WB, Hamel BC, Otero M, Kucharekova M, Boezeman JB, Schalkwijk J., Haploinsufficiency of TNXB is associated with hypermobility type of Ehlers-Danlos syndrome., *Am J Hum Genet*, 2003, 73:214-217.
3. Mao JR, Taylor G, Dean WB, Wagner DR, Afzal V, Lotz JC, Rubin EM, Bristow J., Tenascin-X deficiency mimics Ehlers-Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition., *Nat Genet*, 2002, 30:421-425.
4. Sakai H, Murakami C, Matsumoto KI, Urano T, Sakane F., Diacylglycerol kinase δ controls down-regulation of cyclin D1 for C2C12 myogenic differentiation., *Biochimie*, 2018, 151:45-53.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 7件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Murakami Chiaki, Hoshino Fumi, Sakai Hiromichi, Hayashi Yasuhiro, Yamashita Atsushi, Sakane Fumio | 4. 巻 295 |
| 2. 論文標題 Diacylglycerol kinase and sphingomyelin synthase-related protein functionally interact via their sterile motif domains | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry | 6. 最初と最後の頁 2932 ~ 2947 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.012369 | 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 Hoshino Fumi, Murakami Chiaki, Sakai Hiromichi, Satoh Mamoru, Sakane Fumio | 4. 巻 513 |
| 2. 論文標題 Creatine kinase muscle type specifically interacts with saturated fatty acid- and/or monounsaturated fatty acid-containing phosphatidic acids | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 1035 ~ 1040 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.097 | 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 Iwata Kai, Sakai Hiromichi, Takahashi Daisuke, Sakane Fumio | 4. 巻 1864 |
| 2. 論文標題 Myristic acid specifically stabilizes diacylglycerol kinase protein in C2C12 skeletal muscle cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids | 6. 最初と最後の頁 1031 ~ 1038 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2019.04.003 | 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 Maeda Yuki, Shibata Kosuke, Akiyama Rino, Murakami Yuki, Takao Saki, Murakami Chiaki, Takahashi Daisuke, Sakai Hiromichi, Sakane Fumio | 4. 巻 504 |
| 2. 論文標題 Diacylglycerol kinase induces filopodium formation via its C1, catalytic and carboxy-terminal domains and interacts with the Rac1-GTPase-activating protein, 2-chimaerin | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 54 ~ 60 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.08.119 | 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 Sakai Hiromichi, Murakami Chiaki, Matsumoto Ken-ichi, Urano Takeshi, Sakane Fumio | 4. 巻 151 |
| 2. 論文標題 Diacylglycerol kinase controls down-regulation of cyclin D1 for C2C12 myogenic differentiation | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Biochimie | 6. 最初と最後の頁 45 ~ 53 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biochi.2018.05.017 | 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 Sakane, F., Mizuno, S., Takahashi, D., Sakai, H. | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 Where do substrates of diacylglycerol kinases come from? Diacylglycerol kinases utilize diacylglycerol species supplied from phosphatidylinositol turnover-independent pathways. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Adv. Biol. Regul. | 6. 最初と最後の頁 101-108 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbior.2017.09.003. | 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 Sakai, H., Yokota, S., Kajitani, N., Yoneyama, T., Kawakami, K., Yasui, Y., Matsumoto, K. | 4. 巻 124 |
| 2. 論文標題 A potential contribution of tenascin-X to blood vessel formation in peripheral nerves. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Neurosci. Res. | 6. 最初と最後の頁 1-7 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2017.06.003. | 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 |

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Abul Kalam Azad, Abdullah Md Sheikh, Harumi Osago, Hiromichi Sakai, Shozo Yano, Makoto Michikawa, Atsushi Nagai |
| 2. 発表標題 Time-course analysis of ether lipids and ROS in Alzheimer's disease model mouse |
| 3. 学会等名 第38回日本認知症学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堺弘道, 坂根郁夫 |
| 2. 発表標題 ジアシルグリセロールキナーゼ はC2C12筋芽細胞においてmTORタンパク量を調節する |
| 3. 学会等名 第92回日本生化学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堺弘道, 坂根郁夫 |
| 2. 発表標題 C2C12筋芽細胞におけるジアシルグリセロールキナーゼ によるmTORタンパク量の制御 |
| 3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 村上千明, 堺弘道, 林康広, 山下純, 坂根郁夫 |
| 2. 発表標題 ジアシルグリセロールキナーゼ とスフィンゴミエリン合成酵素関連タンパク質の相互作用および機能連関 |
| 3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 村上千明, 堺弘道, 林康広, 山下純, 坂根郁夫 |
| 2. 発表標題 ジアシルグリセロールキナーゼ とスフィンゴミエリン合成酵素関連タンパク質の相互作用および機能連関 |
| 3. 学会等名 2019年度生化学会関東支部例会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hiromichi Sakai and Fumio Sakane |
| 2. 発表標題 The role of diacylglycerol kinase in skeletal muscle glucose metabolism and myogenic differentiation |
| 3. 学会等名 1st International Symposium of Soft Molecular Activation Research Center (SMARC) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Haque Ahsanul, Sheikh Abdullah, 長子 晴美, 堺 弘道, 土屋 美加子, 道川 誠, 長井 篤 |
| 2. 発表標題 Analysis of phospholipid species in AD model mouse brain by LC-MS/MS |
| 3. 学会等名 第37回日本認知症学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堺 弘道, 坂根 郁夫 |
| 2. 発表標題 ジアシルグリセロールキナーゼ によるC2C12筋芽細胞の筋分化制御機構 |
| 3. 学会等名 第91回日本生化学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 堺 弘道, 坂根 郁夫 |
| 2. 発表標題 脂質代謝酵素ジアシルグリセロールキナーゼ の骨格筋グルコース代謝と分化における役割とその制御機構 |
| 3. 学会等名 第123回日本解剖学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堺 弘道, 松本 健一 |
| 2. 発表標題 細胞外マトリックス・テネイシンXは末梢神経の血管形成に関与する |
| 3. 学会等名 第90回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 堺 弘道, 松本 健一, 坂根 郁夫 |
| 2. 発表標題 ジアシルグリセロールキナーゼ はC2C12筋芽細胞の筋分化誘導のためにcyclin D1の発現を制御する |
| 3. 学会等名 第59回日本脂質生化学会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 島根大学 総合科学研究支援センター 生体情報・RI実験部門 https://www.med.shimane-u.ac.jp/CRLHP/index.html |
|--|

| | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 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 |