

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430014

研究課題名(和文) 神経・筋接合に必須のレセプター蛋白LRP4の脳中枢神経系における役割

研究課題名(英文) Participation of LRP4 receptor which is indispensable to neuromuscular junctions in central nervous system

研究代表者

棚橋 浩 (TANAHASHI, Hiroshi)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：90236654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Lrp4 KOマウスは出生直後に横隔膜での神経・筋接合ができずに呼吸不全で死亡した。多くのKOに両方/片方の腎臓欠損が見られたが羊水過多が見られ卵膜、胎盤でのアクアポリン9、アクアポリン1の有意な発現低下が見られた。またLrp4 KO胎児では神経・筋接合シナプス形成不全により呼吸様運動、嚥下に障害があり、羊水の羊膜腔からの排出に異常を生じ、主たる羊水成分である胎児尿の分泌が無くても羊水過多になったと考えられ、羊水量の調節は羊水の取り込みが本質的な役割を果たしていると考えられた。ヒトでも稀だが両腎形成不全で尿生産が無いにもかかわらず脳脱や食道閉鎖による羊水過少症にならない例が報告されている。

研究成果の概要(英文)：Amniotic fluid volume during mid-to-late gestation depends mainly on the urine excretion from the fetal kidneys and partly on the fluid secretion from the fetal lungs during fetal breathing-like movements. Lrp4, which functions as an agrin receptor, is essential for the formation of neuromuscular junctions. Herein, we report novel phenotypes of Lrp4 KO mice. Most KO fetuses showed unilateral or bilateral kidney agenesis, and Lrp4 knockout resulted in polyhydramnios. The loss of Lrp4 compromised fetal swallowing and breathing-like movements and downregulated the expression of AQP9 in the fetal membrane and AQP1 in the placenta, which possibly affected the amniotic fluid clearance. These results suggest that amniotic fluid removal was compromised in KO fetuses, resulting in polyhydramnios despite the impairment of urine production. Our findings indicate that amniotic fluid removal plays an essential role in regulating the amniotic fluid volume during mid-to-late gestation.

研究分野：神経科学

キーワード：神経可塑性 シナプス 合指多指症 歯数過剰 不正咬合 腎臓欠失 羊水過多 アクアポリン

1. 研究開始当初の背景

シナプスは神経伝達物質の放出に関わるシナプス前部と神経伝達物質を受け取った後の複雑な細胞内情報処理を効率的に行うシナプス後部に分かれる。PSDはシナプス後部膜の裏打ち構造を形成する膜蛋白と細胞質蛋白から構成される分子密度の高い分子複合体であり、短時間でもダイナミックな変化を起こす。PSDを構成する分子の働きによって正常なシナプス後部機能が発揮される。逆にそれらの分子の異常によりシナプス機能の破綻がもたらされ、その症状は精神・神経疾患となって現れる。

シナプス後部に局在するLRP4は神経・筋接合に必須であり、ポストシナプス筋終板でMuSK (muscle-specific kinase) と複合体を形成し、MuSKを活性化してアセチルコリンレセプターのクラスター化とそれに続くシナプス形成に必須の蛋白であり、運動神経終末から分泌される糖蛋白 agrin と結合し、シナプス形成後のLRP4・MuSK結合を増強してシナプス形成を保持する為に必須の蛋白である。

2. 研究の目的

(1)本研究では作製したLrp4ノックアウト(KO)マウス(conventional及び条件付き)を用い、胎生期の脳、成体の脳の神経新生、シナプス新生への関与を調べると共にLrp4条件付きKOマウスの学習・行動・情動等の高次神経機能を解析することによりLRP4の関与する脳発育、神経回路形成、神経可塑性獲得の仕組みを明らかにする。

(2)作製したLrp4 KOマウスを詳細に解析し、脳中枢以外の全身の表現型を解析し、LRP4の新規機能を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究において研究代表者はLRP4のconventional KOマウス、前脳特異的(CaMK2-Cre)、神経幹細胞特異的(Nestin-Cre) Lrp4条件付きKOマウスを作製し解析した。研究目的(1)は競合する2つのグループにより報告が続いてなされた為、研究の方向性を変えざるをえなくなり、研究目的(2)のLRP4 KOマウスの表現型を詳細に解析した。詳細は研究成果欄に記す。

4. 研究成果

(1) Lrp4 ノックアウト (KO) マウス (conventional 及び条件付き) の作成

C57BL/6J mouse ES cell line BRUCE-4 にターゲティングベクターを導入した ES cell を Balb/c 胚盤胞にインジェクションし、ICR を仮親マウスとしてキメラマウスを作製した。このキメラマウスを C57BL/6J と交配して F1 マウスを作製、Flp マウスと交配し、ネオマイシン陽性選択カセットを除き Flox マウスを作製した。この Flox マウスは Lrp4 転

写開始点上流 1527 base、第一イントロン 122 base に *loxP* 部位を持つ。この Flox マウスから Lrp4 conventional KO マウス、神経幹細胞特異的 Nestin-Cre Lrp4 条件付き KO マウス、前脳特異的 CaMK2 -Cre Lrp4 条件付き KO マウスを作製した。

(2) Lrp4 conventional KO マウスは全て出生直後に死亡した。その肺を取り出し PBS(-) 溶液に入れた処、wild-type, Lrp4+/- マウスが浮くのに対し KO マウスの肺は沈んだ。KO マウスの肺湿重量は wild-type, Lrp4+/- マウスの 73.6%、74.1%だが肺乾燥重量、肺 DNA 総量は変わらず、肺の HE 染色を行うと KO マウスの肺胞は膨らんでいなかった。KO マウスの横隔膜を neurofilament, synaptophysin, α -bungarotoxin で染色するとアセチルコリンレセプターのクラスターは見られなかった。これらの事から KO マウスは横隔膜において神経・筋接合の形成が出来ず呼吸不全で死亡したと考えられる。また KO マウスは合指・多指症を呈した。

(3) 多くの KO マウスに両方 (77 匹 / 295 匹) あるいは片方 (126 匹 / 295 匹) の腎臓の欠損が見られ左腎の欠失の方が多かった (左欠失 73 匹、右欠失 53 匹; OR:1.4, 95% CI:0.8-2.3)。予期しなかった表現型として羊水量を比較すると E13.5 KO 胎児では同腹の wild-type, Lrp4+/- 胎児と有意差は見られなかったが (wild-type 5 匹 平均 $150.1 \pm SD 7.6$ mg, Lrp4+/- 14 匹 162.4 ± 13.8 mg, KO 5 匹 159.5 ± 4.0 mg), E17.5 KO 胎児ではそれぞれに対して 1.49 倍、1.23 倍 (wild-type 9 匹 180.2 ± 52.0 mg, Lrp4+/- 18 匹 218.6 ± 36.7 mg, KO 11 匹 268.3 ± 44.1 mg), E18.5 KO 胎児ではそれぞれに対して 2.83 倍、2.77 倍 (wild-type 30 匹 124.0 ± 36.7 mg, Lrp4+/- 49 匹 126.8 ± 37.0 mg, KO 24 匹 351.2 ± 50.1 mg) の羊水過多が見られた。E18.5 での羊水の osmolality は wild-type 39 匹 348 ± 13 mOsm/L, Lrp4+/- 58 匹 348 ± 16 mOsm/L, KO 66 匹 335 ± 14 mOsm/L で KO が wild-type, Lrp4+/- に比べて有意に低かった。面白い事に E18.5 KO 胎児は両方の腎臓が揃っていても片腎、両腎の欠損があっても羊水過多が見られ、KO 胎児間では腎臓の有無による羊水量に有意差は見られなかった (両腎のある KO マウス 7 匹 365.4 ± 48.6 mg, 片腎だけの KO マウス 9 匹 339.7 ± 46.7 mg, 両腎とも無い KO マウス 8 匹 351.8 ± 58.0 mg)。これは不思議な事である。胎生後期に羊水の 7 割は胎児腎臓で作られた尿が羊膜腔に排出されたもので残りは主として胎児肺から分泌される肺胞液と考えられてきた。一方、羊水の羊膜腔からの排出は、胎児の呼吸様運動・嚥下による取り込みや卵膜からの吸収によっておこる。

そこで Lrp4+/- と交配した妊娠 Lrp4+/- 19 dpc の子宮に墨汁を注入し 30 分後に胎

児を取り出し固定後、胎児の肺、胃腸を調べたところ、コントロールとなる Lrp4^{+/+}、Lrp4^{+/-}胎児では墨汁の取り込みが見られたのに対し K0 胎児では墨汁の取り込みがまったく見られなかった。また墨汁の取り込みは E17.5 より E18.5 の Lrp4^{+/+}、Lrp4^{+/-}胎児の方が活発だった。

羊水中の肺サーファクタント蛋白 A は胎盤からも分泌されるが、その多くは胎児の呼吸様運動によって胎児の肺から羊水中に分泌される。そこで E18.5 の羊水中の肺サーファクタント蛋白 A を K0 胎児とコントロール胎児(wild-type, Lrp4^{+/+})と比較してみると肺胞液の羊膜腔への分泌がない K0 胎児羊水中の肺サーファクタント蛋白 A はコントロール胎児と比べて半量まで減少していた。しかし肺での肺サーファクタント蛋白 A 量、卵膜、胎盤での肺サーファクタント蛋白 AmRNA 量に差は見られなかった。また K0 胎児に羊水過多の一因となる消化管閉塞は見られなかった。これらの事から K0 胎児は呼吸様運動・嚥下ができない事が解った。

さらに羊膜腔からの水の取り込みに関与すると考えられる aquaporin family について卵膜、胎盤での mRNA の発現を qPCR により定量すると E13.5, E17.5, E18.5 の卵膜において aquaporin 9 mRNA の有為な発現低下 (wild-type と比較してそれぞれ 0.55 [95% CI:0.43-0.70], 0.63 [0.55-0.71], 0.41 [0.22-0.75])、E17.5, E18.5 の胎盤において aquaporin 1 mRNA の有為な発現低下 (wild-type と比較してそれぞれ 0.60 [0.53-0.68], 0.61 [0.52-0.72]) が見られた。以上の結果から羊水の羊膜腔からの排出 (嚥下、卵膜からの吸収) に異常を生じ、腎臓が無いにもかかわらず羊水過多になったと考えられる。

胎生後期には羊水量の調節は生産より排出が重要な役割を果たす事が分かった。ヒトでも稀だが両腎形成不全で尿生産が無いにもかかわらず羊水過少症にならない例が報告されている (脳脱や食道閉鎖による嚥下障害、腸管吸収障害の為に考えられる例、原因のわからない例もある)。

ところで両腎のある K0 マウスの腎臓は本当に機能しているのだろうか。K0 マウスは出生直後に死亡してしまい、生後の腎機能は調べられない。そこで E18.5 のコントロールマウス、両腎のある K0 マウス、片腎だけの K0 マウス、両腎とも無い K0 マウスの羊水中の尿素窒素、クレアチニンの濃度を測定してみた。尿素窒素についてはそれぞれ、 $9.53 \pm SD 2.13 \text{ mM}$ $n=43$, $7.61 \pm 1.06 \text{ mM}$ $n=8$, $6.97 \pm 1.63 \text{ mM}$ $n=11$ 、クレアチニンについてはそれぞれ、 $0.18 \pm 0.06 \text{ mM}$ $n=43$, $0.12 \pm 0.2 \text{ mM}$ $n=8$, $0.092 \pm 0.019 \text{ mM}$ $n=11$, $0.067 \pm 0.009 \text{ mM}$ $n=18$ となった。コントロールマウスと比べて両腎のある K0 マウスの羊水中の尿素窒素やクレアチニンの濃度は有為に低く、腎臓の形態や尿管、腎動脈に異常がないように見えても腎

機能が低下している可能性が示された。Lrp4 が腎臓の発生だけでなく、その後の内部構造の発達や機能に関与している可能性もあり、腎臓内部の詳細な解剖学的解析が必要である。

一方、Nestin-Cre Lrp4 条件付き K0 マウスもすべて Lrp4 conventional K0 マウスと同様に出生直後に呼吸不全で死亡したが、合指多指症、腎臓の欠損は見られなかった。Nestin-Cre Lrp4 条件付き K0 マウスでは脳、脊髄だけでなく横隔膜での Lrp4 の発現が欠如しており Lrp4 conventional K0 マウスと同様にアセチルコリンレセプターのクラスターは見られなかった。CaMK2⁻-Cre Lrp4 条件付き K0 マウスは、同腹のマウスと同様に成長し、繁殖可能であった。

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)

1 Tanahashi H, Tian QB, Hara Y, Sakagami H, Endo S & Suzuki T Polyhydramnios in Lrp4 knockout mice with bilateral kidney agenesis: Defects in the pathways of amniotic fluid clearance. *Sci. Rep.* 6: 20241 (2016) 査読有り

[学会発表](計1件)

1 棚橋浩、田慶宝、遠藤昌吾、鈴木龍雄「両腎形成不全を伴う Lrp4 欠失マウスは羊水の排出に異常を来し羊水過多を起こす」第 63 回日本実験動物学会総会 (ミュージア川崎シンフォニーホール 川崎) 2016 年 5 月 18 日

[その他]

1 公開討論会

棚橋浩「Lrp4 欠失マウスが示す多様な表現型」武蔵野フォーラム 2 (東京) 2015 年 11 月 21 日

2 学会英文抄録

Tanahashi H, Tian QB, Endo S & Suzuki T Polyhydramnios in Lrp4 knockout mice with bilateral kidney agenesis: Amniotic fluid clearance defect. *Exp. Anim.* 65 (5) S26, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

棚橋 浩 (TANAHASHI, Hiroshi)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：90236654

(2) 研究分担者

鈴木 龍雄 (SUZUKI, Tatsuo)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：80162965

(3)連携研究者

阪上 洋行 (SAKAGAMI, Hiroyuki)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90261528

原 芳信 (HARA, Yoshinobu)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：40558467