

論文の内容の要旨

論文題目

シュワン細胞の基底膜を構成するラミニンの発現と機能に関する研究

指導教官 波利井 清紀 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 中川 雅裕

(目的と方法) ラミニンは、基底膜を形成する主要蛋白質であり、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の組み合わせでラミニン1から11までのアイソフォームが存在する。そのうちラミニン2 (別名メロシン) は、 α 2鎖、 β 1鎖、 γ 1鎖からなり、心筋、骨格筋、末梢神経のシュワン細胞の基底膜に発現している。メロシン欠損型先天性筋ジストロフィー (以下 MD-CMD) は、ラミニン α 2鎖をコードする *LAMA2* 遺伝子の異常が原因でラミニン α 2鎖の発現異常があり、乳幼児期より、筋線維の壊死、大小不同、結合組織の増加などが認められ、筋力の低下を示す疾患である。MD-CMD は、末梢神経伝導速度の低下も示すが、その原因は解明されていない。MD-CMD と同様に、ラミニン α 2鎖の発現が著しく低下する突然変異マウスの *dy* マウスでも、筋力低下、筋線維の壊死、大小不同、結合組織の増加が認められ、また、末梢神経の異常も報告されている。末梢神経の脊髄神経根で、髄鞘のない裸の軸索 (naked axon) が集簇するのが電子顕微鏡的観察で認められ、また、坐骨神経の有髄線維のシュワン細胞の基底膜が断裂し、末梢神経伝導速度の低下も認められている。しかし、*dy* マウスの遺伝子異常は明確に解っておらず、骨格筋の基底膜に僅かながらラミニン α 2鎖が発現していることより、*dy* マウスは MD-CMD のモデルマウスとしては完全ではない。そこで、ラミニン α 2鎖の骨格筋や神経系における機能や発現を詳細に解明し、MD-CMD の骨格筋や神経系における異常を明かにし、治療法を開発するためにラミニン α 2鎖の発現を完全に欠損したノックアウトマウス (*dy*^{ko} マウス) が作成された。*dy*^{ko} マウスは、ラミニン α 2鎖の発現が骨格筋及び末梢神経に全く認められず、症状は *dy* マウスより重く、体重増加不良、筋力低下で生後6~8週で死亡してしまう。筋病理所見では、骨格筋の基底膜はなく、筋線維の壊死が認められ、筋線維の再生がおこるが不良で結合組織の増加が認められる。*dy*^{ko} マウスの骨格筋の研究はすでに Miyagoe らにより報告されているⁱⁱ⁾。MD-CMD の神経系における異常を明かにし、治療法を開発するためにラミニンの発現と機能を研究した。

ⁱⁱ⁾ FEBS Letters 415 (1997) 33-39

(結果と考察) 組織学的検索において、脊髄神経根では、WTマウスのシュワン細胞は個々の軸索を取り囲み髄鞘を形成しているのに対し、*dy*マウスのシュワン細胞は軸索を取り囲まず、髄鞘の形成していない裸の軸索 (naked axon) が集簇するのが認められた。このnaked axonには基底膜は認められなかった。*dy*^{+/+}マウスのシュワン細胞でも個々の軸索を取り囲み髄鞘を形成していたが、基底膜は全く形成しなかった。また、WTマウスに比べ髄鞘は菲薄化し、髄鞘を欠く孤立性軸索も認められた (Fig. 1, 2)。

坐骨神経では、WTマウス、*dy*マウスおよび*dy*^{+/+}マウスともに髄鞘が形成されていた。*dy*マウスと*dy*^{+/+}マウスの有髄線維のシュワン細胞には基底膜が存在するが、一部に断裂が認められた (Fig. 3)。ランビエ絞輪の基底膜にも断裂が見られるものが多かった。

脊髄神経根及び坐骨神経において*dy*^{+/+}マウスでは、シュワン細胞が個々の軸索を取り囲み髄鞘を形成していたことより、ラミニン α 2鎖の発現の完全欠損でもシュワン細胞の分化は進行し、髄鞘を形成することが示された。

免疫組織化学的検索で、*dy*マウスと*dy*^{+/+}マウスで脊髄神経根の形態に差が生じたのは、*dy*^{+/+}マウスでは、ラミニン α 2鎖の発現が欠損しているもののラミニン α 5鎖の発現が保たれているのに対し、*dy*マウスでは、ラミニン α 2鎖の欠損に加えてラミニン α 5鎖の発現が低下しているためと考えられた (Fig. 4, 5)。よって、ラミニン α 5鎖がシュワン細胞の分化を促進する可能性が示唆された。

坐骨神経では、*dy*マウスと*dy*^{+/+}マウスの神経内膜にはラミニン α 2鎖の発現は認められなかった (Fig. 6)。また、ラミニン β 鎖やラミニン γ 鎖は神経内膜に発現しているものの、ラミニン α 鎖の他のアイソフォームの代償的発現は認められなかった。これにより、坐骨神経のシュワン細胞の基底膜は、未知のラミニン α 鎖や他の接着因子が形成している可能性を示唆された。

電気生理学的検索で神経伝導速度を坐骨神経脊椎外側部から腓骨神経 (S-P)、脛骨神経 (S-T)、腓腹神経 (S-S)の遠位端までそれぞれ測定した。*dy*マウスでは坐骨神経の神経伝導速度は、WTマウスと比較してS-TとS-Sで10%程度低下しているものの有意差は無かった。*dy*^{+/+}マウスでは神経伝導速度は、WTマウスと比較して運動神経のS-PとS-Tで有意に遅延していた (Table 1)。*dy*^{+/+}マウスの神経伝導速度の遅延の背景としては、軸索直径の低下、髄鞘の厚さの非薄化、ランビエ絞輪の形態異常、特にランビエ絞輪の基底膜の断裂による影響が考えられた。

(結語) *dy*^{+/+}マウスにおいて、髄鞘形成が認められたことよりラミニン α 2鎖は、シュワン細胞の分化には必須ではないことが示唆された。また*dy*^{+/+}マウスの基底膜の欠損及び断裂が認められたことよりラミニン α 2鎖は基底膜形成に関与していると考えられた。

Table 1 坐骨神経伝導速度

	S-P	S-T	S-S
WTマウス	27.6 \pm 8.7 m/sec (n=5)*	27.2 \pm 4.4 m/sec (n=5)**	27.3 \pm 4.1 m/sec (n=5)
<i>dy</i> マウス	27.2 \pm 4.4 m/sec (n=4)	24.5 \pm 8.8 m/sec (n=3)	24.1 \pm 5.4 m/sec (n=5)
<i>dy</i> ^{+/+} マウス	19.4 \pm 4.1 m/sec (n=3)*	19.4 \pm 3.1 m/sec (n=3)**	20.2 \pm 6.1 m/sec (n=3)

*, ** P<0.05

S-P: 坐骨神経脊椎外側部～腓骨神経、S-T: 坐骨神経脊椎外側部～脛骨神経、S-S: 坐骨神経脊椎外側部～腓腹神経

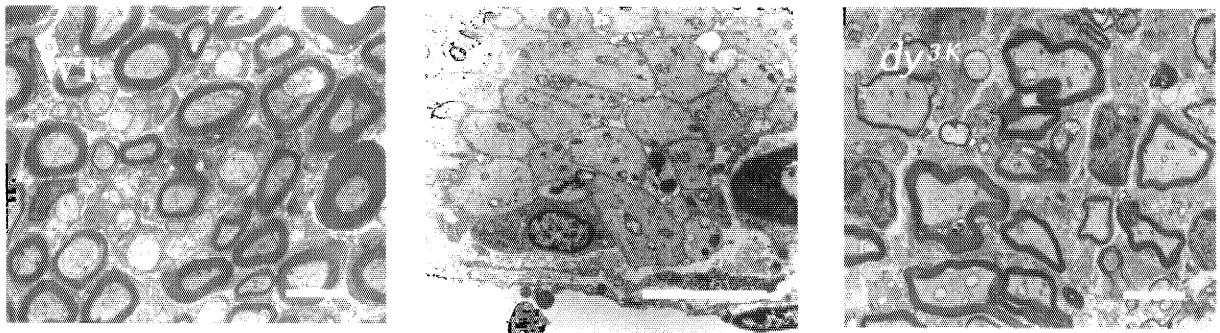


Fig. 1) 脊髄神経根の電子顕微鏡像

Scale bar: 5 μ m

ワイルドタイプマウス (WT) では髄鞘形成が認められるが、*dy*マウス (*dy*) では裸の軸索 (naked axon) が集簇するのが認められる。*dy^{3k}*マウス (*dy^{3k}*) では髄鞘の形成は認められるものの菲薄である。

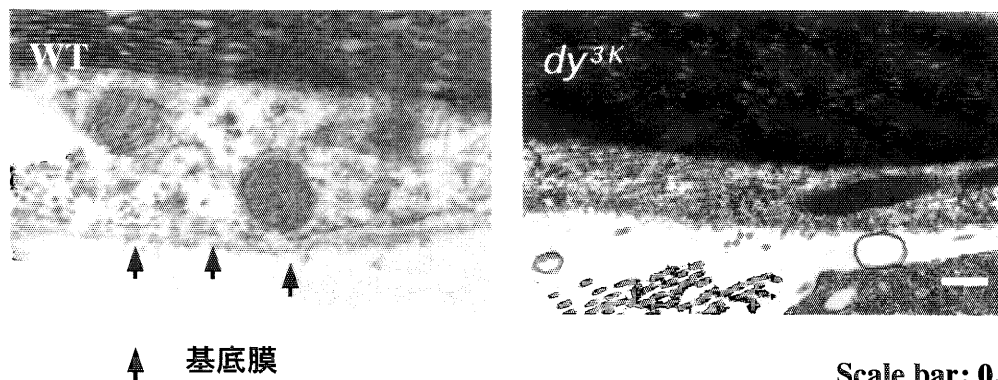


Fig. 2) 脊髄神経根のシュワン細胞の電子顕微鏡像

ワイルドタイプマウス (WT) では基底膜の形成が認められるが、*dy^{3k}*マウス (*dy^{3k}*) では基底膜の形成は認められない。

Scale bar: 0.2 μ m

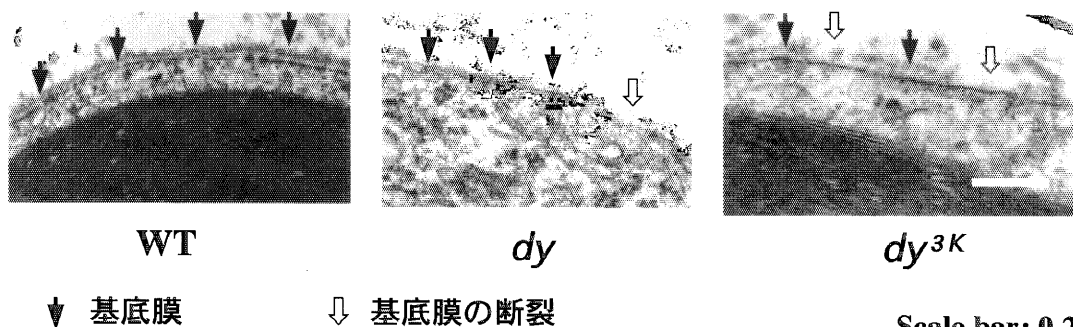


Fig. 3) 坐骨神経のシュワン細胞の基底膜の電子顕微鏡像

ワイルドタイプマウス (WT) では基底膜の連続性が認められるが、*dy*マウス (*dy*) と *dy^{3k}*マウス (*dy^{3k}*) では基底膜の断裂が認められる。

Scale bar: 0.2 μ m

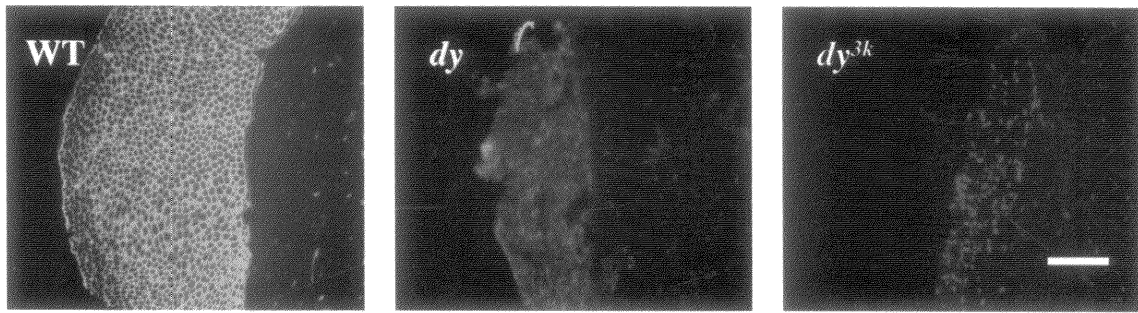


Fig. 4) 脊髄神経根のラミニン α 2鎖抗体による免疫組織化学染色 Scale bar: 50 μ m

ワイルドタイプマウス (WT) では神経内膜にラミニン α 2鎖の発現が認められるが、*dy*マウス (*dy*) と *dy*^{3k}マウス (*dy*^{3k}) ではラミニン α 2鎖の発現は神経内膜に認められない。

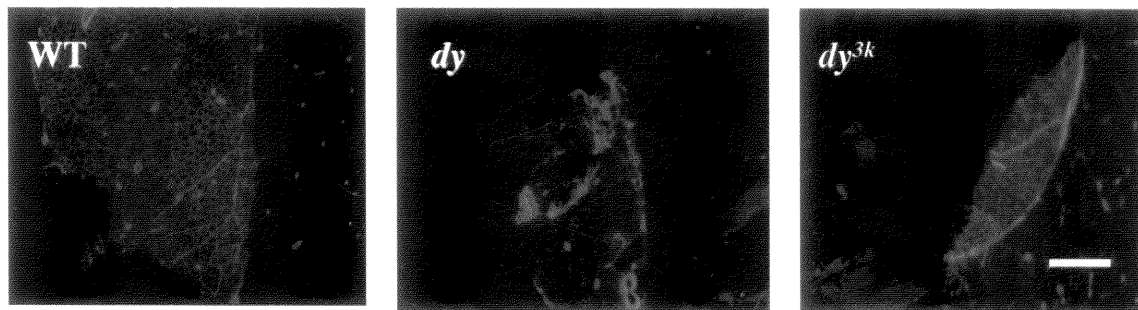


Fig. 5) 脊髄神経根のラミニン α 5鎖抗体による免疫組織化学染色

ワイルドタイプマウス (WT) と *dy*^{3k}マウス (*dy*^{3k}) では神経内膜にラミニン α 5鎖の発現が認められるが、*dy*マウス (*dy*) ではラミニン α 5鎖の発現は神経内膜で低下している。

Scale bar: 50 μ m

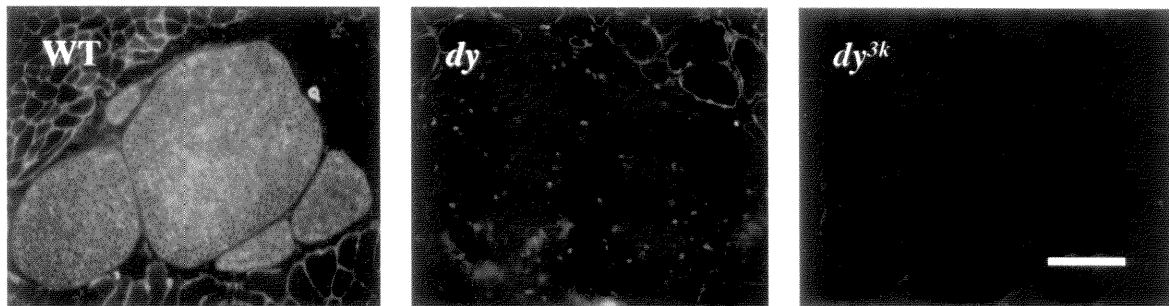


Fig. 6) 脊髄神経根のラミニン α 2鎖抗体による免疫組織化学染色

ワイルドタイプマウス (WT) では神経内膜にラミニン α 2鎖の発現が認められるが、*dy*マウス (*dy*) と *dy*^{3k}マウス (*dy*^{3k}) ではラミニン α 2鎖の発現は神経内膜に認められない。

Scale bar: 100 μ m