

論文の内容の要旨

The role of α 1-syntrophin in skeletal muscle regeneration

骨格筋再生過程において α 1-syntrophin が果たす役割

横田 俊文

α 1-Syntrophin は Dystrophin 複合体構成タンパク質の一つで、Dystrophin, Utrophin 及び Dystrobrevin に結合する。Syntrophin には5種のアイソフォームが同定されているがそれらの中で α 1-Syntrophin は骨格筋において最も主要に発現し、筋形質膜直下及び特に神経筋接合部 (NMJs) に強い発現を見る。同分子の機能は詳細に理解されておらず、同分子の欠損マウスにおいて筋変性等の明らかな組織学的異常は見い出されされていない。しかし同分子はレセプター等機能分子の膜への局在化に関与する PDZ ドメインを持つことから、多数の機能分子を膜にアンカー-シグナル伝達に関与することが推測され、実際に少なくとも神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 及び水チャネル Aquaporin-4 が α 1-Syntrophin の PDZ ドメインにより膜に局在化されることが明らかになっている。

Dystrophin 欠損により引き起こされる Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、男児約 3,500 人に1人の割合で発症する代表的な遺伝性筋疾患である。同疾患は骨格筋の変性・壊死を主病変とするが、それに続く筋再生においても障害が認められ、筋再生を上回る壊死が進行するため筋力低下をもたらす。これまで DMD の発症機序については Dystrophin 欠損に伴い筋形質膜の Dystrophin 結合タンパク質の発現が消失することから、Dystrophin 複合体構成タンパク質の発現や機能の解析が進められてきた。それにより同複合体は3つのグループ- Dystroglycan 複合体、Sarcoglycan 複合体、及び

Syntrophin や Dystrobrevin を含む細胞内タンパク質一に分類され、筋形質膜の裏打ち構造としての役割を中心に理解されてきた。しかし同疾患の再生障害については形質膜裏打ち仮説だけでは説明できない。また筋再生障害について同複合体が直接関与するのか、あるいは筋変性/再生サイクルに伴う二次的現象であるのかについても不明である。

そこで本研究では同複合体の中で PDZ ドメインを持ち機能分子の足場タンパク質としてシグナル伝達系への関与が予想される $\alpha 1$ -Syntrophin が骨格筋再生において重要な役割を持つ可能性に注目した。同分子欠損マウスの筋障害後の再生能について検討するため、筋形質膜を特異的に障害しそれに続く自発的再生を惹起する蛇毒 Cardiotoxin (ctx) による筋再生モデルを用いた。ここでは8週齢の正常マウス (C57/BL6) 及び $\alpha 1$ -Syntrophin 欠損マウス ($\alpha 1\text{syn}^{-/-}$) 前脛骨筋 (TA) に対しそれぞれ 10 μ M の Cardiotoxin (0.1ml) を筋肉注射し再生誘導後1日~24週時における骨格筋再生過程を詳細に調べた。また非処置の対側を対照とした。

はじめに同変異マウスにおける骨格筋再生能を調べるため、再生誘導後の前脛骨筋重量の変化を測定した (図1a)。すると予想外にも同変異マウスでは再生誘導後2~12週時において同様の処置を施した正常マウスに比べ有為な筋重量増加が認められた。一方で非処置のマウスでは両グループ間に差は無かった。

そこで同変異マウスの筋再生過程を組織学的に検討するため TA 筋の最大直径部位の横断切片を Hematoxylin & Eosin 染色、及び免疫組織化学により比較した。すると再生誘導後2週時までの期間、及び非処置マウスにおいては正常マウスとの間に組織学的に顕著な差は見られずまた免疫組織化学においても筋発生に関与する Myogenic helix-loop-helix 転写因子群の発現や、Laminin- $\alpha 2$ 鎖、Dystrophin 及び Myosin

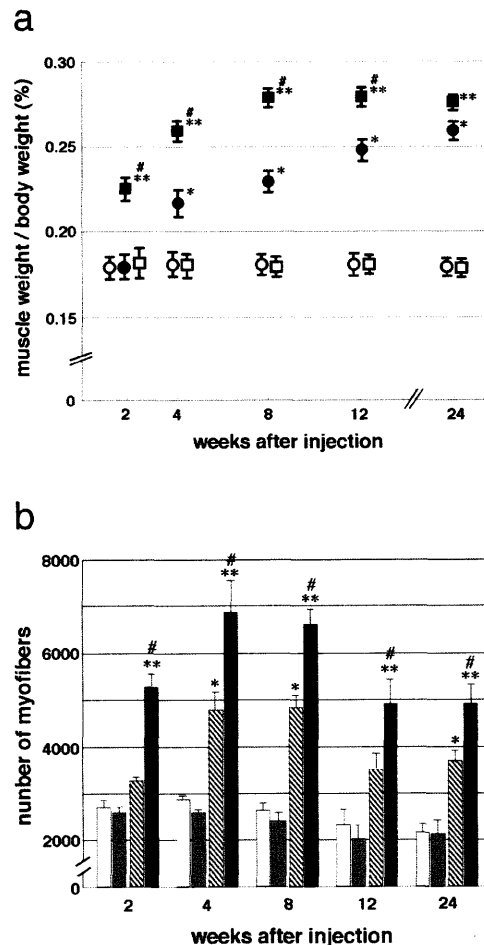


図1 Cardiotoxin 処理後の TA 筋重量と筋線維数の変化

(a) # $P < 0.05$; ctx 処理後の正常マウス (●) 及び $\alpha 1\text{syn}^{-/-}$ (■) 間で有為。* $P < 0.05$; 非処置 (○) 及び ctx 処理後の正常マウス間で有為。** $P < 0.05$; 非処置 (□) 及び ctx 処理後の $\alpha 1\text{syn}^{-/-}$ 間で有為。(b) * $P < 0.05$; 非処置 (white bars) 及び ctx 処理後 (hatched bars) の正常マウス間で有為。# $P < 0.05$; 非処置 (gray bars) 及び ctx 処理後 (black bars) の $\alpha 1\text{syn}^{-/-}$ 間で有為。** $P < 0.05$; ctx 処理後の正常マウス及び $\alpha 1\text{syn}^{-/-}$ 間で有為。Mean \pm S.E.M.

heavy chain (MHC) のアイソフォームなどの発現についても両グループ間で差は認められなかった。しかし再生誘導後 2 週時以降においては、同欠損マウス再生筋では正常マウス再生筋に比べ顕著な筋肥大（筋横断面積の増加）が認められた。さらに狭角での観察では広範に渡り DMD に特徴的に見られる分割線維を認めた（図示さず）。

次に、同欠損マウス再生筋重量の増加が筋線維の過形成 (Hyperplasia) によるものであるのか、あるいは筋線維自体の肥大 (Hypertrophy) を反映しているのかを検討することを考えた。TA 筋最大横断切片中の筋線維数をカウントし、Cardiotoxin 注射後 2 ~ 2 4 週時、及び非処置のマウスについて比較を行った（図 1 b）。すると非処置の TA 筋においては両グループ間で差は認められないにも関わらず、Cardiotoxin 処理後では上記の全ての時期において欠損マウスの方が筋線維数が有為増加していた。これを先述の組織像の観察と考え合わせると、同変異マウス再生筋筋線維数の増加はおそらく多数の分割線維を反映したものであろうと考えられる。

次に同変異マウスの筋肥大とそれを生ずる Fiber type との関連性について調べるため、MHC アイソフォーム特異的抗体により筋線維を分類し、同時に組織中の単線維の横断面積 (Cross-sectional area: CSA) を測定してこれらの相関を調べた。その結果、非処置マウスの CSA については両グループ間で平均値及び分散において差は認められなかったが、再生誘導後 2 週時以降では同変異マウスの方が平均値及び分散ともはるかに上昇していた。さらに同変異マウスの再生筋では非処置のマウスには見られない大径の線維が多数見られ、それらの線維は主に IIb type 線維であった。したがって同変異マウス再生筋の肥大は主に Type IIb 線維に生ずると結論された（図示さず）。

次に同変異マウス再生筋における MHC アイソフォームの構成比を定量的に同定するために、Glycerol SDS-PAGE 法を用いて MHC アイソフォームの分離と定量解析を行った。すると非処置のマウスでは両グループ間に差は見られなかったが、同欠損マウス再生筋では再生誘導後 1 週時において同様に処置した正常マウスに比べ MHC IIa が有為減少し、速筋型にシフトしていた。この時期では後述の Wire net holding test において同

表 1 Cardiotoxin 処理後 4 週時における TA 筋の収縮張力

Parameter	正常マウス		α 1syn ^{-/-}	
	non-injected	injected	non-injected	injected
L_0 , mm	11.82 ± 0.53	11.19 ± 0.37	11.15 ± 0.44	11.01 ± 0.47
TA weight, mg	15.40 ± 1.10	17.10 ± 1.56	14.71 ± 1.20	17.95 ± 1.28 ^A
TA CSA, mm ²	1.23 ± 0.05	1.38 ± 0.08	1.27 ± 0.12	1.56 ± 0.11 ^{A, B}
twitch force, mN	43.75 ± 10.01	69.55 ± 14.13 ^A	41.89 ± 5.10	35.32 ± 4.51 ^C
tetanic force, mN	145.29 ± 32.67	217.59 ± 32.18 ^A	140.90 ± 18.05	127.72 ± 14.91 ^C
specific twitch force, mN/mm ²	35.57 ± 8.14	50.40 ± 10.24	33.00 ± 4.02	22.64 ± 2.89 ^{A, C}
specific tetanic force, mN/mm ²	118.01 ± 28.25	161.17 ± 23.84 ^A	110.95 ± 16.09	79.95 ± 10.89 ^{A, C}

Mean ± S.E.M. n=5-8 ^A, P<0.05; 対側非処置 TA 筋との間で有為。 ^B, P<0.01; ^C, P<0.001, 正常マウス ctx 処置 TA 筋との間で有為。 Mann-Whitney's U-test による。

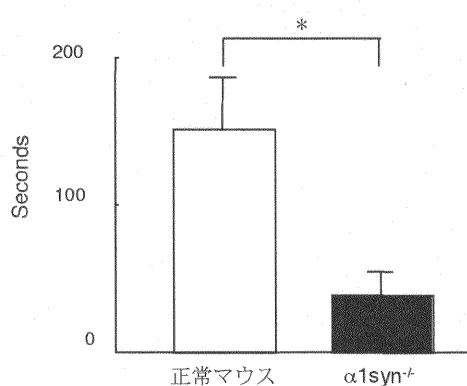


図2 筋再生時における $\alpha 1\text{syn}^{-/-}$ マウスの運動能力の低下
 $P < 0.05$, mean \pm S.E.M.

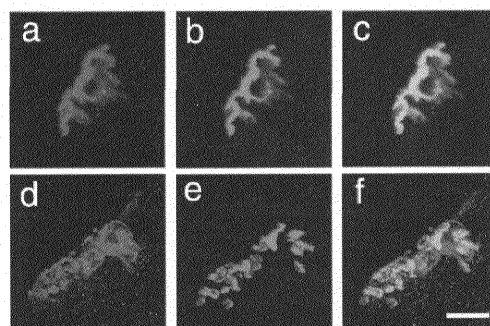


図3 $\alpha 1\text{syn}^{-/-}$ マウス再生筋における NMJs 形成異常
 正常マウス (a-c) 及び $\alpha 1\text{syn}^{-/-}$ マウス (d-f) NMJs の Utrophin (a, d), Acetylcholine receptor (b, e) 染色及び重ね合わせ像 (c, f)

変異マウスの持久性運動能力の低下が認められることから MHC 構成比の変化が同変異マウス筋再生時の運動能力の低下に関与している可能性が示唆された。一方で再生後4週時、及び非処置マウスでは MHC 構成比に差が無いことから、筋再生異常が MHC 構成比の異常だけでは説明できないことも同時に明らかになった (図示さず)。

骨格筋では Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) が筋線維の肥大を引き起こす因子として知られる。そこで Northern blotting 法を用いて IGF-1 mRNA 発現量を定量し、IGF-1 の筋肥大への関与の可能性を検討した。その結果、非処置時には正常マウスと同じレベルであったが再生2及び4週時の同変異マウスでは同様に処置した正常マウスに比べ有為な発現量が上昇し最大で非処置時の約 180% にまで達したことから、筋肥大に IGF-1 が関与する可能性が示唆された (図示さず)。

では同欠損マウスにおいて筋再生時に顕著な肥大を引き起こす要因は何であろうか。我々は筋再生時に同欠損マウスの収縮張力が十分に回復しないために代償的に肥大を生じている可能性があると考えた。そこで同変異マウスの単離骨格筋に電気刺激を加え発生張力を測定したところ、非処置時には正常であったが、筋再生4週時の発生張力は正常マウスに比べ有為に低下していた (表1)。さらに同欠損マウスの持久性の運動能力を調べるため Wire net holding test を行った。すると非処置時には正常マウスとの間に成績の差は見られないにも関わらず、再生誘導1週間後においては同変異マウスの成績が有為に低下していた (図2)。

$\alpha 1$ -Syntrophin は NMJs において強い発現が見られることから、次に同変異マウスの運動能力低下が NMJs の異常により引き起こされている可能性を検討するため、共焦点レーザー顕微鏡により NMJs の組織学的観察を行った (図3)。すると筋再生時において同欠損マウスの Nerve gutter が浅い形態的異常が認められた。さらに免疫組織化学により、同欠損マウスでは NMJs におけるジストロフィン複合体の局在が Acetylcholine receptor と完全に一致しない異常所見が観察された。このことから $\alpha 1$ -Syntrophin が NMJs における Dystrophin 複合体の局在を制御している可能性が示唆された。

DMD 患者、並びに犬、猫、マウスといったあらゆる筋ジストロフィーモデル動物はいずれも早期においてある程度の筋肥大のフェーズを経る。本研究により $\alpha 1$ -Syntrophin が DMD など Dystrophin 欠損骨格筋の再生時に見られる神経筋接合部の形態異常、張力の低下及び骨格筋肥大の少なくとも一部の責任分子である可能性が示唆された。