



Endoplasmic reticulum stress response in P104L mutant caveolin-3 transgenic mice

久我, 敦

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5329

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005329>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



Endoplasmic reticulum stress response in P104L mutant caveolin-3 transgenic mice

P104L変異カベオリン3トランスジェニックマウス
における小胞体ストレス応答の解析

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
神経内科学
(指導教員：戸田達史 教授)

久我 敦

研究の背景

1. 肢帯型筋ジストロフィーとはなにか

肢帯型筋ジストロフィー(LGMD; limb-girdle muscular dystrophy)という疾患名は当初進行性筋ジストロフィーのうち腰部部の筋が好んで侵され、常染色体劣性遺伝をとる疾患群を指していた¹⁾。その後、デュシェンヌ型/ベッカー型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー等を除いた、原因不明の筋疾患を広く指す用語として定着した。現在では優性遺伝のものをLGMD1、劣性遺伝のものをLGMD2と分類して、遺伝子が同定されたものから順に命名しているが、今日までにLGMD1A~1GとLGMD2A~2Nの合計21疾患が記載されている²⁾。すなわちLGMDは臨床的に類似した症状を呈するものの、遺伝学的には極めてヘテロな疾患群であるといえる。これらの疾患には、いずれも根本的な治療法がない。しかし遺伝学的に一致した患者集団を大規模に検討し難く、臨床研究が進まないとい

う現状がある。したがって治療法の開発を目指すには、モデル動物を用いた分子病態の理解が重要である。

2. カベオリン3の遺伝子異常によるLGMD1Cについて

細胞膜直下には直径60-100 nm大のプラスコ型の構造caveolaカベオラが存在している。caveolinカベオリンはこのcaveolaの主要構成成分として同定された約15 kDaの蛋白質で脂質代謝や細胞内輸送などに重要な役割を果たしている。3つのisoformがあり、caveolin-3は骨格筋に発現している。1998年Minettiらによる家系解析³⁾でcaveolin-3の遺伝子変異がLGMD1Cの原因であることが明らかとなった。患者骨格筋の筋鞘膜直下でcaveolin-3の免疫染色が陰性であった⁴⁾ため、まずcaveolin-3のノックアウトマウスが作製された。しかしノックアウトマウスには筋力低下などの表現型がほとんどみられなかった⁵⁾。またノックアウトマウスでは優性遺伝形式を説明できないことも問題であった。Galbiatiらは、LGMD1C家系で実際に報告された遺伝子変異に注目して、104番目のアミノ酸がprolineからleucineに置換された変異caveolin-3 (以下P104L変異cav3) の機能解析をin vitroで行った。彼らはP104L変異cav3は野生型とくらべて半減期が短いこと⁶⁾、caveolaへ到達せずゴルジ体へ集積すること⁷⁾などを明らかにした。

研究の目的

我々はLGMD1Cのモデルマウスとして、骨格筋特異的にP104L変異cav3を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、その表現型を報告してきた⁸⁾。本研究ではゴルジ体へ集積したP104L変異cav3が小胞体ストレス応答を惹起し、骨格筋でアポトーシスを誘導しているという仮説をたてて、その検証を試みた。

本研究の結果

1. P104L変異cav3トランスジェニックマウスは導入遺伝子量依存的に筋力低下・体重減少・筋組織変化を来す。

野生型 (以下Wt)・ヘミトランスジェニックマウス (以下hemi)・ホモトランスジェニックマウス (以下homo) の体重、握力、下肢骨格筋組織を生後4週から12週まで経時的に観察した。体重はWt>hemi>homoの順に小さく、握力測定でも同じ傾向を認めた。Wtとhomoでは体重・筋力の差が統計学的に有意であった (Scheffe's test, $p<0.05$)。大腿四頭筋、腓腹筋の単一筋線維面積を計測したところ、Wt>hemi>homoの順に面積が小さく、各群間の差はいずれも有意であった (Mann-Whitney U-test, $p<0.005$)。

2. 正常caveolin-3の発現量減少はP104L変異cav3遺伝子量に関連しない。

正常caveolin-3のみを認識する抗体を用いたウエスタンブロットで検討したところ、骨格筋での正常caveolin-3発現はWtと比べてhemiでは大幅に発現が少なかったが、homoではhemiよりもむしろ発現が多かった。

3. P104L変異cav3トランスジェニックマウス骨格筋では導入遺伝子量依存的に小胞体ストレス関連遺伝子の発現が増加している。

P104L変異cav3をマウス筋芽細胞C2C12で発現させるとゴルジ体へ集積した。目的で述べた仮説に基づき、小胞体ストレス関連遺伝子の発現を検討した。分子シャペロンGRP78と、その下流でアポトーシスを誘導する転写因子CHOPのRNA発現がWt<hemi<homoの順に増加

しており、Wtとhomoでの差が有意であった。GRP78は蛋白レベルでも有意に発現が増加していた。転写調節因子eIF2 α は小胞体ストレスにตอบสนองしてリン酸化される。eIF2 α の発現はRNAレベル、蛋白レベルとも変化はなかったが、リン酸化eIF2 α に対する特異的抗体を用いたウェスタンブロットではWtと比べて hemi, homoで有意な増加を認めた(各群間の有意差はいずれもScheffe's test, $p < 0.05$ で検定)。

4. P104L変異cav3トランスジェニックマウス骨格筋ではアポトーシスが誘導されている。

TUNELアッセイでアポトーシスを定量化して検討した。1000筋線維あたりのTUNEL陽性の筋線維数はWt < hemi < homoの順に増加していた (Scheffe's test, $p < 0.05$)。

5. P104L変異cav3トランスジェニックマウス骨格筋では抗アポトーシス因子Dad1の発現が増加している。

Dad1 (defender against apoptotic cell death) はラット培養細胞の薬剤誘発性細胞死に関する温度感受性変異をレスキューする遺伝子としてクローニングされたものでBcl-2の下流に位置する。Dad1の発現をRNAレベルで検討したところ、Wt < hemi < homoの順に有意に増加していた (Scheffe's test, $p < 0.05$)。

考察

ある疾患が常染色体優性遺伝形式をとるとき、その原因遺伝子の発現量や機能が正常の50%では疾患を発症する場合 (ハプロ不全) あるいは変異遺伝子産物が正常対立遺伝子産物の機能を阻害する場合 (dominant negative effect) の2つの可能性が考えられる。caveolin-3は小胞体でホモオリゴマーを形成し、ゴルジ体を経て、caveolaへ輸送される。in vitroの解析から正常caveolin-3は変異caveolin-3とヘテロオリゴマーを形成すると不安定化してcaveolaへ到達できない可能性が考えられ、この仮説はdominant negative effectを説明する。実際、LGMD1C患者骨格筋では筋鞘膜直下でcaveolin-3の免疫染色が陰性である²⁾。しかしノックアウトマウスでは骨格筋に表現型が現れなかった³⁾。さらに本研究で変異caveolin-3の遺伝子発現量を増やすと正常caveolin-3の発現量がむしろ増えたことから、ヘテロオリゴマーの不安定化のみで病態を説明することはできなかった。

そこで我々はゴルジ体に集積した変異caveolin-3が小胞体ストレスを惹起してアポトーシスを誘導するという仮説をたてて、①体重や筋力の減少、筋線維組織の変化、②骨格筋における小胞体ストレス応答とアポトーシスを実証した。興味深いことに①、②はともに導入した変異cav3遺伝子量に相関する現象として確認された。

病態を代償する経路としてはDad1の発現増加を介したものが想定された。Dad1は本来アポトーシス抵抗性遺伝子としてクローニングされたものだが、現在は小胞体でN型糖鎖合成に関与する糖転移酵素として機能すると考えられている⁴⁾。小胞体における蛋白の翻訳後修飾やミスフォールド蛋白質の選別に糖鎖付加が重要である。Dad1の発現増加は変異cav3蛋白質のフォールド異常修正や分解に影響して病態を改善している可能性がある。Dad1の発現を増加させることはLGMD1Cの治療ターゲットの1つであると考えられた。

まとめ

LGMD1CのモデルマウスであるP104L変異caveolin-3のトランスジェニックマウスの表現型を解析して、P104L変異caveolin-3の骨格筋におけるdominant negative effectを生体内で初めて実証し、病態にアポトーシスが関与している可能性を示した。

参考文献

- 1) Rocha, CT, et al. (2010) Curr. Neurol. Neurosci. Rep., 10 : 267-276.
- 2) Minetti, C, et al. (1998) Nat. Genet., 18 : 365-368.
- 3) Hagiwara Y, et al. (2000) Hum. Mol. Genet., 9 : 3047-3054.
- 4) Galbiati F, et al. (1999) J. Biol. Chem., 274 : 25632-25641.
- 5) Galbiati F, et al. (2000) J. Biol. Chem., 275 : 37702-37711.
- 6) Sunada Y, et al. (2001) Hum. Mol. Genet., 10 : 173-178.
- 7) Ohsawa Y, et al. (2004) Hum. Mol. Genet., 13 : 151-157.
- 8) Kelleher DJ, et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 : 4994-4999.

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2200号	氏 名	久我 敦
論文題目 Title of Dissertation	Endoplasmic reticulum stress response in P104L mutant caveolin-3 transgenic mice P104L 変異カベオリン3 トランスジェニックマウス における小胞体ストレス応答の解析		
審査委員 Examiner	主 査 竹 島 泰 弘 Chief Examiner 副 査 竹 縄 忠 臣 Vice-examiner 副 査 寺 島 俊 雄 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【背景】

細胞膜直下には直径60-100 nm大のフラスコ型の構造caveolaが存在している。caveolinはこのcaveolaの主要構成成分として同定された約15kDaの蛋白質で脂質代謝や細胞内輸送などに重要な役割を果たしている。3つのisoformがあり、caveolin-3は骨格筋に発現している。1998年にcaveolin-3の遺伝子変異がLGMD1Cの原因であることが明らかとなった。まずcaveolin-3のノックアウトマウスが作製されたが、ノックアウトマウスには筋力低下などの表現型がほとんどみられなかった。またノックアウトマウスでは優性遺伝形式を説明できないことも問題であった。Galbiatiらは、LGMD1C家系で実際に報告された遺伝子変異に注目して、104番目のアミノ酸がprolineからleucineに置換された変異caveolin-3(以下P104L変異cav3)の機能解析をin vitroで行った。彼らはP104L変異cav3は野生型とくらべて半減期が短いこと、caveolaへ到達せずゴルジ体へ集積することなどを明らかにした。

【研究の目的】

本研究ではゴルジ体へ集積したP104L変異cav3が小胞体ストレス応答を惹起し、骨格筋でアポトーシスを誘導しているという仮説を立てて、その検証を試みた。

【結果】

1. P104L変異cav3 トランスジェニックマウスは導入遺伝子量依存的に筋力低下・体重減少・筋組織変化を来す。

野生型(以下Wt)・ヘミトランスジェニックマウス(以下hemi)・ホモトランスジェニックマウス(以下homo)の体重、握力、下肢骨格筋組織を生後4週から12週まで経時的に観察した。体重はWt>hemi>homoの順に小さく、握力測定でも同じ傾向を認めた。大腿四頭筋、腓腹筋の単一筋線維面積を計測したところ、Wt>hemi>homoの順に面積が小さかった。

2. 正常caveolin-3の発現量減少はP104L変異cav3遺伝子量に関連しない。

骨格筋での正常caveolin-3発現はWtと比べてhemiでは大幅に発現が少なかったが、homoではhemiよりも発現が多かった。

3. P104L変異cav3 トランスジェニックマウス骨格筋では導入遺伝子量依存的に小胞体ストレス関連遺伝子の発現が増加している。

P104L変異cav3をマウス筋芽細胞C2C12で発現させるとゴルジ体へ集積した。分子シャペロンGRP78と、その下流でアポトーシスを誘導する転写因子CHOPのRNA発現がWt<hemi<homoの順に増加していた。GRP78は蛋白レベルでも有意に発現が増加していた。転写調節因子eIF2αは小胞体ストレスに応答してリン酸化される。リン酸化eIF2αに対する特異的抗体を用いたウェスタンブロットではWtと比べてhemi, homoで増加を認めた。

4. P104L変異cav3トランスジェニックマウス骨格筋ではアポトーシスが誘導されている。

1000 筋線維あたりの TUNEL 陽性の筋線維数は Wt<hemi<homo の順に増加していた。

5. P104L変異cav3トランスジェニックマウス骨格筋では抗アポトーシス因子Dad1の発現が増加している。

Dad1 (defender against apoptotic cell death) はラット培養細胞の薬剤誘発性細胞死に関する温度感受性変異をレスキューする遺伝子としてクローニングされたものでBcl-2の下流に位置する。Dad1 の発現を RNA レベルで検討したところ、Wt<hemi<homo の順に有意に増加していた。

【考察】

caveolin-3 は小胞体でホモオリゴマーを形成し、ゴルジ体を経て、caveola へ輸送される。in vitro の解析から正常 caveolin-3 は変異 caveolin-3 とヘテロオリゴマーを形成すると不安定化して caveola へ到達できない可能性が考えられ、この仮説は dominant negative effect を説明する。実際、LGMD1C 患者骨格筋では筋鞘膜直下で caveolin-3 の免疫染色が陰性である。しかしノックアウトマウス では骨格筋に表現型が現れなかった。さらに本研究で変異 caveolin-3 の遺伝子発現量を増やすと正常 caveolin-3 の発現量がむしろ増えたことから、ヘテロオリゴマーの不安定化のみで病態を説明することはできなかった。

そこで我々はゴルジ体に集積した変異 caveolin-3 が小胞体ストレスを惹起してアポトーシスを誘導するという仮説をたてて、①体重や筋力の減少、筋線維組織の変化、②骨格筋における小胞体ストレス応答とアポトーシスを実証した。

病態を代償する経路としては Dad1 の発現増加を介したものが想定された。Dad1 は本来アポトーシス抵抗性遺伝子としてクローニングされたものだが、現在は小胞体で N 型糖鎖合成に関与する糖転移酵素として機能すると考えられている。小胞体における蛋白の翻訳後修飾やミスフォールド蛋白質の選別に糖鎖付加が重要である。Dad1 の発現増加は変異 cav3 蛋白質のフォールド異常修正や分解に影響して病態を改善している可能性がある。Dad1 の発現を増加させることは LGMD1C の治療ターゲットの 1 つであると考えられた。

本研究は、LGMD1C について、モデルマウスである P104L 変異 caveolin-3 のトランスジェニックマウスを用いて分子病態を研究したものであるが、従来報告の無かった、LGMD1C における小胞体ストレス応答とアポトーシスの関与について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。