

氏名 大泉 寛明

CLAC-P/Collagen type XXV (*Col25a1*) はアルツハイマー病患者脳に蓄積する老人斑アミロイドの構成成分として同定された膜結合型のコラーゲンである。

CLAC-P の生理機能の解明を目指して、*Col25a1* ノックアウトマウスを作製したところ、骨格筋内における運動ニューロン軸索の分枝・伸長が完全に欠損し、その結果運動ニューロンが大規模な細胞死をきたして出生時に致死となることが示され、CLAC-P が骨格筋内軸索発達において必須の役割を果たすことが明らかとなった。一方、神経筋発生の初期段階である胎生 11.5 日齢 (E11.5) の時点で、*Col25a1* mRNA は運動ニューロンおよび標的骨格筋の両者に発現することが確認され、両組織に発現した CLAC-P が、運動ニューロン軸索の発達にそれぞれどのように寄与しているのかは不明であった。

本研究において申請者は、CLAC-P が発生期骨格筋内における運動ニューロン軸索の発達に果たす役割を明らかにする目的で、*Col25a1* 遺伝子の組織特異的ノックアウト (KO) マウスを作製し、その表現型を解析するとともに、マウス胎児脊髄前角 explant を用いた *in vitro* 共培養実験系を樹立して解析を行い、CLAC-P タンパク質が運動ニューロン軸索の伸長に果たす役割の解明を試みた。

組織特異的 *Col25a1* KO マウスの表現型解析

1. CLAC-P^{fllox} マウスの作製

Col25a1 遺伝子の第 2 エクソンの欠失はフレームシフトをきたす。そこで第 2 エクソンをターゲットとして、その両端に loxP 配列を配置した *Col25a1*^{fllox} マウスと、Cre リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウスとを交配することにより、Cre-loxP システムによる組織特異的 KO マウスを作出した。

2. 運動ニューロン特異的 *Col25a1* KO マウスの表現型解析

有糸分裂直後の運動ニューロンに特異的に発現する *Hb9* 遺伝子プロモーター下で Cre を発現する *Hb9-Cre* マウスと *Col25a1*^{fllox} マウスを交配し、運動ニューロン特異的 *Col25a1* KO マウスを作出した。*Hb9-Cre; Col25a1*^{fllox/fllox} マウスでは、E13.5 の時点で、運動ニューロンの軸索束の横隔膜筋層内への進入と、分枝・伸長が観察され、コントロールとなる同腹の *Col25a1*^{fllox/fllox} マウスと比較して、差異は認められなかった。さらに、E16.5 では、*Hb9-Cre; Col25a1*^{fllox/fllox} マウスの横隔膜において、運動ニューロン軸索末端と神経筋接合部のポストシナプスマーカーであるアセチルコリン受容体 (AChR) のクラスターが近接して存在し、神経筋接合部の形成が確認された。また、*Col25a1* KO では脊髄前角の運動ニューロンの大規模な脱落が生じたのに対し、運動ニューロン特異的 *Col25a1* KO マウスでは、運動ニューロン細胞体はコントロールと同程度に生存していることが確認された。さらに *Hb9-Cre; Col25a1*^{fllox/fllox} マウスは出生後も正常に成長し、繁殖能力を有した。これらの結果から、運動ニューロンにおける CLAC-P 発現は、運動ニューロン軸索の発達および生存に必要ではないと結論した。

3. 骨格筋特異的 *Col25a1* KO マウスの表現型解析

次に、筋細胞特異的な *HSA* 遺伝子プロモーター下で Cre を発現する *HSA-Cre* マウスと *Col25a1*^{fllox} マウスを交配し、骨格筋特異的 *Col25a1* KO マウスを作出して表現型解析を行った。E13.5 の時点で、*HSA-Cre; Col25a1*^{fllox/fllox} マウスの横隔膜では、運動ニューロン軸索束が骨格筋進入部位付近に認められたが、その後の分枝・伸長が完全に障害されていることが確認された。さ

らに、E15.5には横隔膜における運動ニューロン軸索が退縮し、完全に消失していた。運動ニューロンの支配を受けた骨格筋表面の AChR は、骨格筋の成熟とともに横隔筋中央部に限局して endplate band を形成することが知られている。骨格筋特異的 *Col25a1* KO マウスでは、径の小さい未成熟な AChR クラスターが幅広く分散して存在し、この所見は運動ニューロン軸索による神経支配を欠如した骨格筋の特徴に一致していた。一方、脊髓前角の運動ニューロンの細胞体は、ほぼ完全に消失していた。これらの表現型は、*Col25a1* KO マウスのそれと一致していた。これらの結果から、発生期の骨格筋に発現した CLAC-P が、運動ニューロン軸索束の骨格筋内での分枝・伸長に必須であり、その後の運動ニューロンの生存維持にも重要な役割を果たすことが明らかとなった。

脊髓前角 explant を用いた *in vitro* 共培養実験による CLAC-P の機能評価

CLAC-P タンパク質が運動ニューロン軸索に与える影響を *in vitro* で検証するため、低密度に培養した HEK293 細胞と、マウス胎児脊髓前角 explant との共培養実験系を樹立した。HEK293 細胞に mCherry とヒト CLAC-P を共発現し、*Hb9-GFP* トランスジェニックマウス由来の脊髓前角 explant から伸長した運動ニューロン軸索との相互作用を検討すると、CLAC-P 発現 HEK293 細胞特異的に GFP 陽性の運動ニューロン軸索の集簇が観察された。HEK293 細胞と接触する軸索の長さを計量すると、CLAC-P に類似した構造を有する 2 種類の膜結合型コラーゲン (Collagen XIII, XXIII) を発現するコントロール細胞、ならびに mock transfected cell に比して、CLAC-P 発現細胞では接触部分が有意に増大していた。

このように申請者は、組織特異的 *Col25a1* KO マウスの表現型解析から、骨格筋由来の CLAC-P/Collagen XXV が、標的骨格筋内における運動ニューロン軸索の分枝・伸長に必須の役割を果たすことを明らかにした。従来、細胞接着分子や神経栄養因子、細胞外マトリックス分子などの欠損により、骨格筋内の軸索伸長が部分的に阻害される例が知られていたが、単一分子の欠損により運動ニューロン軸索の分枝・伸長が完全に欠損する変異マウスは類例がなく、骨格筋に由来する必須因子としては CLAC-P が初めてのものである。*In vitro* 共培養実験において、CLAC-P 発現細胞の表面に運動ニューロン軸索が集簇したこと、CLAC-P がコラーゲン分子であることを考え合わせると、CLAC-P は運動ニューロン軸索と骨格筋細胞あるいは細胞外マトリックスを結合する細胞接着分子として機能する可能性がある。以上のように、本研究は神経筋支配の成立過程に関する神経科学的知見を大きく進展させたものと言える。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。