
神経筋疾患ならびに axonal guidance に おける N-CAM の意義

(課題番号 04670481)

平成 4、5 年度科学研究費補助金
一般研究 (C) 研究成果報告書

平成 6 年 3 月

研究代表者 箭 原 修

(旭川医科大学医学部 講師)

は し が き

N-CAM (N-cell adhesion molecule)は細胞表面にある糖蛋白で immunoglobulin family に属する細胞接着因子の一つである。

近年、細胞-細胞間、細胞-基質間分子の研究の発展は著しく、N-CAMの他にも数多くの細胞接着分子が発見され、その遺伝子構造も明らかにされてきた。N-CAMは細胞接着を介して、発生、分化、形態形成に大きく関与している。最近N-CAMには、isoformが見いだされ、それぞれのisoformの働きに大きな関心がよせられている。しかし、N-CAMと神経筋疾患患者の筋線維についてはほとんど解明されてない。本研究では、N-CAMが神経筋疾患にどのように関わっているのか、またN-CAMの各isoformが筋や脊髄の発生分化にどのような役割をはたしているのか検討した。

本研究の成果から、N-CAMは筋の再生に重要であり、多発性筋炎、筋緊張性ジストロフィー症、肢帯型筋ジストロフィー症では、再生筋にN-CAMの発現を認めたが、神経原性の筋萎縮側索硬化症では認めなかった。これらはN-CAMが再生筋のマーカーとして有用であることを示した

ものである。

また in situ hybridization を用いた N-CAM の isoform の検討から transmembrane form (brain and spinal domain) は運動神経細胞が発生する時期に脊髄前角部で強く発現し、その直後に MSD form (muscle specific domain) が myotube に認められ、N-CAM が axonal guidance としての働きと筋細胞の分化に重要な因子であると考えた。

ラット心筋では N-CAM は胎生 12 日目より出現した。またその出現は時間的、空間的に変化し、心筋の形態発生に大きな役割をはたしていることなどが得られた。

研究組織

研究代表者： 箭原 修（旭川医科大学医学部 講師）

研究経費

平成4年度	1,100	千円
平成5年度	1,000	千円
計	2,100	千円

研究発表

1. 学会誌

- 1) 竹内克呂、箭原 修、南 宏明、長根忠人、菊池健次朗

心筋の分化におけるN-CAMの意義

心筋代謝と構造 (in press)

- 2) Osamu Yahara, Kazuki Hashimoto, Takashi Kimura, Hiroshi Minami.

Serum manganese superoxide dismutase in patient with neuromuscular diseases.

Internal Medicine(submitted)

2. 口頭発表

- 1) 箭原 修、山下裕久、南 宏明、小野寺壮吉、橋本和季、黒田健司、

木村 隆

神経筋疾患患者における血清Mn-Superoxide dismutaseの診断的意義について

第89回日本内科学学会, 1992年4月

- 2) 箭原 修、南宏明、山下裕久、小野寺壮吉、橋本和季、木村隆

脊髄ならびに筋の分化におけるN-CAMの意義

第33回日本神経学会 1992年5月

- 3) Osamu Yahara, Kazuki Hashimoto, Takashi Kimura, Hiroshi Minami.

Serum manganese superoxide dismutase in patient with neuromuscular diseases.

11th International meeting on neuromuscular diseases. September, 1992

- 4) 竹内克呂、箭原 修、南 宏明、長根忠人、菊池健次朗

心筋の分化におけるN-CAMの意義

第57回日本循環器学会、1993年3月

- 5) 箭原 修、竹内克呂、長内 忍、南宏明、山下裕久、菊池健次朗

神経疾患におけるSODの免疫組織学的検討

第90回日本内科学会 1993年4月

- 6) 箭原 修、竹内克呂、南 宏明、山下裕久、菊池健次朗、木村隆、

橋本数季、小野克彦

神経筋疾患におけるN-CAMの意義

第34回日本神経学会 1993年5月

- 7) Osamu Yahara, Kazuki Hashimoto, Takshi Kimura, Satoshi Koyama,

Hiroaki Minami, Chikashi Koumura, Kenjioru Kikuchi

Immunoreactive CuZn-SOD and Mn-SOD of skeletal muscles in normal subjects and patients with neuromuscular diseases.

15th world congress of neurology, September 1993

研究成果

1. 研究目的

N-CAMは神経や筋に存在する免疫グロブリンスーパーファミリー分子の仲間、カルシウム非依存性の接着因子である。N-CAMをコードするmRNAは、選択的スプライシングによって少なくとも4種類存在し、transmembrane form, GPI link form, muscle specific form, secreted formがある。なかでもtransmembrane formは中枢神経（脊髄、大脳）に、MSD formはmuscleに特異的である。

N-CAMについて以下に述べた項目について研究目的とした。

(1)神経筋疾患で、筋の再生にN-CAMがどのように関わっているか

これは、ヒト正常筋と各神経筋疾患患者の筋生検凍結切片を用いてN-CAMの出現とその分布について検討した。神経筋疾患のなかで筋疾患と神経疾患での筋線維にN-CAMの活性に違いがあるのか、あるとすればどのような筋線維に認められるのか。これらを研究することで、神経筋疾患で細胞接着因子であるN-CAMの働きを明かにし、神経筋疾患患者の予後や治療効果判定の指標の一つとする。ま

た近年行なわれつつある筋移植や myoblast injection 治療の効果判定にも貢献できると思われる。接着因子の作用を高めることで、これが growth factor としての役割を今後担う可能性もある。

(2)筋の発生や分化において N-CAM がどのように関わっているか、また axonal guidance の意義について

リボプローベを用いた in situ hybridization (ISH) の方法で、embryo mouse で N-CAM の発現時期と部位について検討した。なかでも MSD form は他の isoform とどのように違うのか、それらを mRNA のレベルから、筋の再生能と分化能における N-CAM の isoform の働きを明らかにする。末梢神経の axonal guidance における N-CAM の働きについて、胎生期に脊髄前角から末梢に axon を出すが、これに①筋因子の存在が必要なのか、②その存在は myoblast あるいは myotube なのか、脊髄の運動神経細胞や末梢神経線維と筋因子との関連を解明する。

(3)心筋の発生と分化における N-CAM の働きについて

N-CAM が心筋の発生と分化における関わりを免疫組織化

学的に検討し、細胞骨格蛋白の一つであるデスミン、および筋細胞収縮蛋白の一つであるミオシンと検索から、それぞれの出現時期、出現部位を比較した。

これらの項目について以下実験をおこなった。

2. 神経筋疾患で、筋の再生にN-CAMがどのように関わっているか。

(1) 実験方法

N-CAMと特異的に反応するモノクローナル抗体を用いた。この抗体（岡山大学医学部、小野克彦先生から供与）はヒト小脳ではN-CAMの3つのisoform(180kD, 140kD, 125kD)を認識し、ヒト神経筋疾患筋では140kD, 125kDの2つが認められた。このモノクローナル抗体を用いてヒト正常筋と神経筋疾患である筋萎縮側索硬化症(ALS), Kugelberg-Welander(K-W), 肢帯型筋ジストロフィー症(LG), 筋緊張性ジストロフィー症(MyD) 多発性筋炎(PM)の生検筋凍結切片をABC法で染色し、免疫組織化学的な検索をおこなった。さらにデスミンのモノクローナル抗体(DAKO, D33)やacridine orange nucleic acid fluorescence(AO)をもちいてN-CAMとの関連を検討した。

(2) 結果

正常筋では筋線維に活性はなかったが、neuromuscular junctionにN-CAMの活性が認められ、筋内神経線維にも活性があった。疾患筋では、肢帯型筋ジストロフィー症、

筋緊張性ジストロフィー症、多発性筋炎、K-WでN-CAMの活性があり、その程度は、多発性筋炎(Fig.1)で強く、再生筋に認められた。しかしdegenerativeな変化が強い筋萎縮側索硬化症では活性がなかった。デスミンもその程度は弱いN-CAMと同じ様な傾向が示された。AOは多発性筋炎で強く認められた。

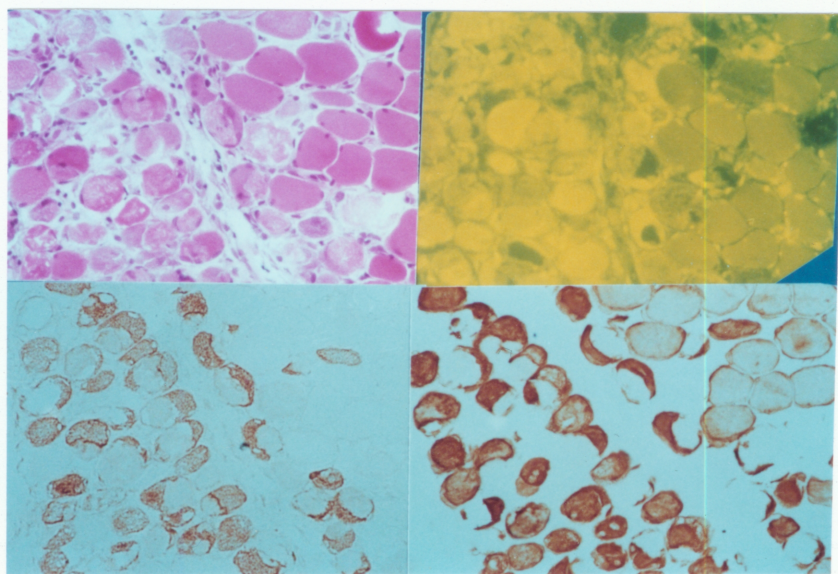


Fig.1 多発性筋炎におけるN-CAM

左上:HE, 右上:AO, 左下:抗N-CAM, 右下:抗desmin

(3) 考案

N-CAMは神経筋疾患では、筋の再生が認められ、筋疾患

に強く発現した。この理由として、筋が再生するとき、筋の発生分化と同じ経過をたどって再生が生じたと推測した。In vitroのC2 mouse muscle cell lineではN-CAMはmyoblastからmyotubeの時期に発現するから、疾患筋でN-CAMの発現を見たのもこの時期に一致する。タイプ染色での検討を行っていないが、再生線維はタイプ2Cが多く、おそらくN-CAMにactivityを持つものの中に、この線維があると推測するが、本実験ではこれを確認していない。この点は大変興味あるところなので、今後検索が必要である。多発性筋炎ではA0が、再生筋に強く活性があったが、これはmRNAの増加を示すものである。神経疾患のなかでK-Wは、ALSと違いN-CAMの発現が認められたが、degenerativeのなかに再生のfactorがあり、ALSとの予後の違いを示唆する。N-CAMの発現は筋再生を示すものであり、再生筋のマーカーになると考えた。

(4) 結論

N-CAMは神経筋疾患の再生筋に認められた。とくに筋原性疾患ではその活性があり、その中でも多発性筋炎では強かった。N-CAMは再生筋のマーカーになると思われた。

3. 筋の発生と分化にN-CAMがどのように関わっているか、
また axonal guidance の意義について

(1) 実験方法

In situ hybridization のための probe 作製は ① embryo mouse の bud, spinal cord, cerebral を摘出し、これらから total RNA を抽出、② oligo primer と逆転写酵素を用いて template DNA を作製、③ PCR を使用して cDNA を増幅、④ RNA polymerase で N-CAM の各イソフォームの ^{35}S RNA probe を作り、その長さは平均 100 bp にした。probe strength は 10^5 CPM / μl の riboprobe を in situ hybridization にもちいた。cDNA の coding 部位は いずれ exon 内で、intron 部位を含まないように作製した。

胎生 8 日以後から newborn までの各胎生日齢 embryo mouse を作製する。いずれの embryo mice を 4% para-formaldehyde-リン酸緩衝液で固定した。脱水後パラフィン包埋し、脊髄レベルで 8 μ 接片を作製し、(1) で作った ^{35}S riboprobe を用いて Wilkinson の方法に基づいて in situ hybridization を行い、emulsion は K-5 (Ilford), expouser time は平均 8 日、各 isoform の N-CAM で mRNA の

出現部位と時期を決めた。

(2) 研究結果

in situ hybridization を用いた方法で、ラットの胎生について検討し、Transmembrane form(180,140)は胎生10日目、脊髄の前角部、ganglionに発現し始めた。以後 newbornになるまで前角部から脊髄全体にび慢性に発現が認められたが、発現の程度は弱くなっていき、down regulation が認められた。MSD formは胎生12日目から myotome に存在し、以後 newborn まで認められた (Fig. 2, 3, 4, 5)。GPI-link form、secreted form は脳、脊髄、末梢神経、筋肉に発現を認めなかった。

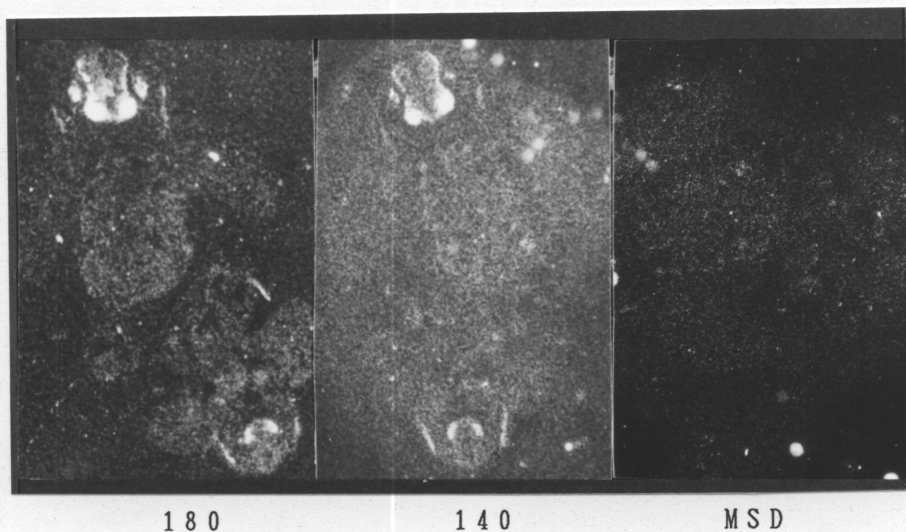
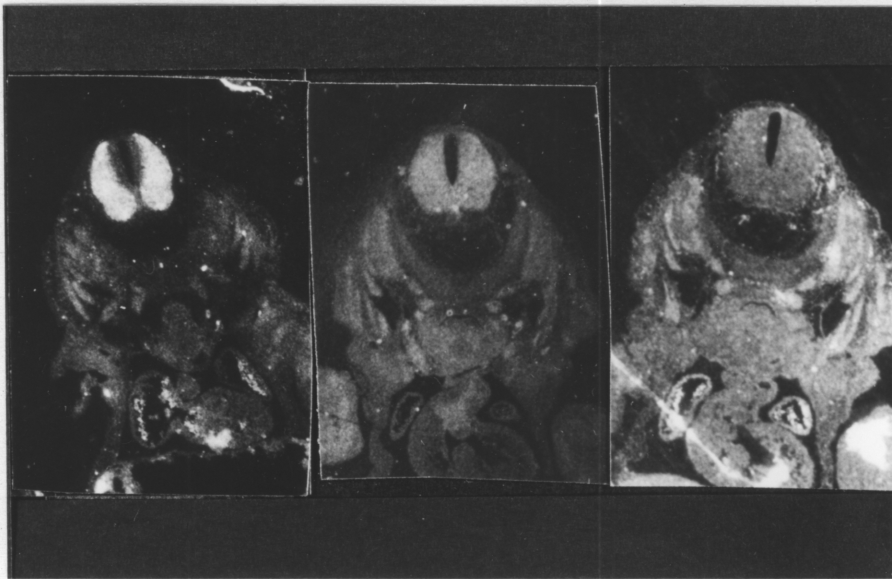


Fig. 2 Embryo 11days

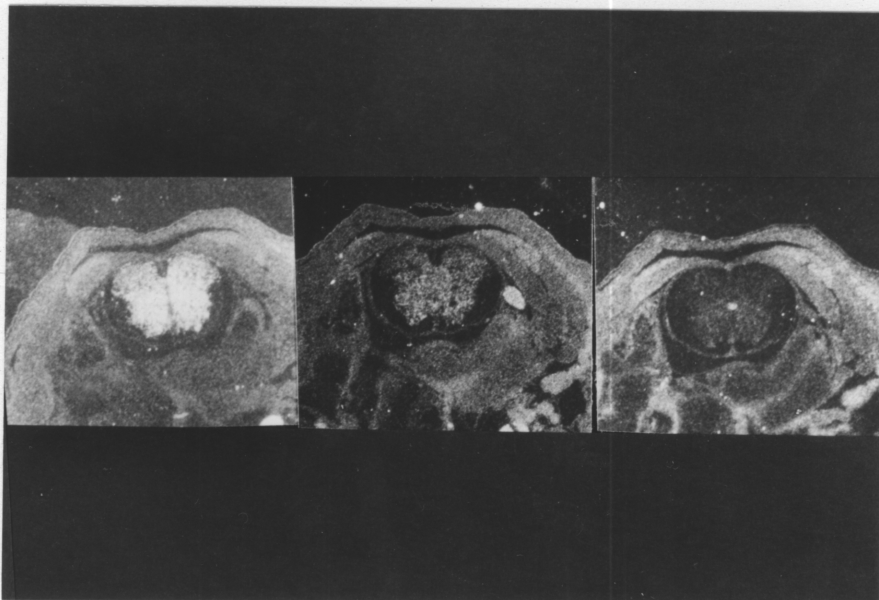


180

140

MSD

Fig. 3 Embryo 13 days



180

140

MSD

Fig. 4 Embryo 18 days



Fig. 5 Embryo 18days

Sagital section on trasmenbrane form(180)

(3) 考案

一般にラットでは myoblast の fusion により myotube の出現は胎生 12 日目からといわれており、N-CAM の MSD の form がこの時期から発現したのは、N-CAM が接着因子としての働きだけでなく、細胞の分化を integrate しているものと思われた。また胎生 10 日目に myotome で発現するまえに transmembrane form は脊髄前角部に、おそらくここで前角細胞が形成され、この細胞から運動神経が出現し、末梢の筋細胞に向かって伸展する。この時の筋細胞は myoblast であるが、神経細胞が axon を伸ばして、筋細胞に到達する時期に myotube に変化していく。N-CAM が myoblast から myotube に switch on させる働きがあるだけでなく、myotube があるところに、axon が伸展していき、axonal guidance にも働いていると考えた。

transmembrane form (brain and spinal domain) は運動神経細胞が発生する時期に脊髄前角部で強く発現し、その直後に MSD form (muscle specific domain) が myotube に認められ、N-CAM が axonal guidance としての働きと筋細胞の分化に重要な因子であると思われた。

今回の問題点として、GPI や secret form は発現が認め

られなかった。おそらく脊髄や筋は量的には少ないとためと考えた。

(4) 結論

N-CAMの各 isoform のなかで、MSD form は myotube, transform は脊髄前角部に発現が認められ、N-CAM は筋の分化と axonal guidance に関与していると思われた。

3. 心筋の発生と分化におけるN-CAMの働きについて

(1) 方法

胎生10, 11, 12, 13, 14, 18, 日、生後2日および成熟ラット (Sprague-dawley系) を用いた。実験動物は20-24℃の室温下に水道水と市販の固形飼料 (日本クレア、CE-2) を自由に与えて飼育した。ペントバルビタールナトリウム (20mg/ml) で腹腔内麻酔後、胎生11~14日は胎児のまま、胎生18日~成熟ラットは心臓を摘出し、液体窒素で冷やしたイソペンタンで瞬間凍結させた。Cryostatを用い、8 μ mの心筋凍結切片を作製した。N-CAMモノクローナル抗体と、デスミン抗体 (Dako社製)、ミオシン重鎖 (slow) 抗体 (Novocastra Laboratories社製) を用いて、ABC法で免疫組織化学的に染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

また、心疾患を有さないヒト剖検心についてもN-CAMの発現に関して検討した。

(2) 結果

N-CAMは胎生10, 11日には認められず、胎生12日より出現した。出現部位では、12日目には心外膜にのみ認められ、13日目に心筋の最外側部、次いで14日目に心室中隔

上部、肉柱に強く出現した。18日目には、ほぼ心室全体に染色性が認められた。成熟ラットでは、胎生期に比べ染色性は低下していた。また、成熟ラットでは筋細胞接合部に強く認められたが、Z帯には認められなかった。

デスミンはすでに胎生10日で発現していた。その染色性は、発現早期より強く、成熟するにつれ徐々に低下してきた。成熟ラットでは、N-CAMと違い、Z帯に強く認められた。

ミオシン重鎖 (slow) も胎生10日ですでに出現していた。しかし、デスミンと異なり、その染色性は成熟しても低下しなかった。

また、心疾患を有さないヒト剖検心においても、N-CAMは介在板に発現していた。

(3) 考案

今回の実験では、ラット心筋にもN-CAMが存在し、その出現時期が胎生12日目であることが確認された。また、出現する部位も特定の部位から徐々に全体に広がり、染色性も増強していくことがわかった。しかし、成熟ラットでは染色性は低下しており、出生後はダウンレギュレ

ーションを受けているものと思われた。

心筋組織におけるN-CAM出現が、時間的空間的に変化する理由については、今回の実験だけからは確認できない。しかし、心筋組織が形態的に成熟する時期に一致してN-CAMは出現、増強しており、出生後に減少することから心筋組織の形態発生に関わっている可能性が考えられた。

また、N-CAMが神経組織に親和性が強いことを考えると、心臓の神経支配の発達に先駆的な役割を果たしている可能性も考えられた。N-CAMは収縮蛋白や骨格筋蛋白が筋線維形態を形成したあとに作用するものと思われる。

心筋の骨格タンパクであるデスミンと、収縮タンパクであるミオシン重鎖（slow type）は、N-CAMが出現する前の、胎生10日目で既に強く出現しており、N-CAMは心筋でのデスミン、ミオシン重鎖の発現には、直接関与していないものと考えられた。

さらに、ラットのみならず、ヒト心筋にもN-CAMが介在板に発現され、心筋線維をつなぐ働きをしており、接着に強く関与していると思われる。しかし、その意義にかんしては明らかでなく、今後の検討課題である。

(4) 結論

細胞接着分子の一つである N-CAMが、ラット心筋の発生においてどのような役割を果たしているかを調べるため、免疫組織化学的手法を用いて検討した。N-CAMは胎生12日目より出現した。またその染色性は時間的、空間的に変化し、心筋の形態発生に重要な役割を果たしているものと考えられた。