Perlecan is a Multifunctional Modulator in Development and Diseases

発生や疾患を調整するパールカンの多様な機能

Arikawa-Hirasawa, Eri^{1,2}

¹Research Institute for Diseases of Old Age and ²Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine,
2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan
FAX: 81-3-3814-3016, E-mail: ehirasaw@med.juntendo.ac.jp

Key Words: *perlecan, heparan sulfate proteoglycan, neuromuscular junction, mouse model, chondrodysplasia*

Abstract

Perlecan has multiple functions in cell growth and differentiation and tissue homeostasis. Recent studies with mutant mice and human genetic disorders have shed light into the *in vivo* functions of perlecan. Complete deficiency of perlecan results in embryonic and perinatal lethality with severe defects in cartilage, cephalic development and cardiovascular systems. In adult tissues, perlecan is essential for high density clustering of acetylcholinesterase (AChE) at the neuromuscular junction (NMJ) and partially functional mutations of perlecan result in myotonia and milder chondrodysplasia. Deletion of a short coding sequence including the HS attachment sites of the N-terminus of perlecan in mice revealed that the HS chains are not essential for development but play a role in supporting the integrity of the lens capsule, in promoting angiogenesis and tumor growth, and filtration in the kidney. *In vitro* studies indicate that many extracellular molecules and cell surface receptors interact with the HS chains and core protein of perlecan. Perlecan may work as a modulator for growth factor signaling and a ligand reservoir.

要 約

パールカンは細胞の成長や分化、組織機能に多様な働きをしている。近年、遺伝子改変マウスやヒト遺伝性疾患の研究を通じてパールカンの生体における機能が少しずつ解明されようとしている。パールカンが完全に欠損すると、軟骨、頭部、心血管系の異常を伴い、一部は胎生期、その他は周産期致死性を示す。また、パールカンは神経筋接合部にアセチルコリンエステラーゼを高濃度に局在させるのに必須であり、パールカンの機能部分欠損はミオトニアと骨格異常を呈する軽症型の遺伝性疾患の原因となる。パールカンのN-端に位置するヘパラン硫酸鎖(HS鎖)結合部位を欠損させた遺伝子改変マウスの解析からは、HS鎖が眼球レンズ包の機能保全、血管新生や腫瘍の成長、腎での濾過機構に重要であることが解った。このように、マウスモデルの解析により、パールカンのコアタンパク質やHS鎖が他の細胞外マトリックス分子や細胞表面受容体と相互作用することが解ってきた。パールカンは成長因子を捕らえて、その機能を調整しているようである。

A. Introduction

A specific class of proteoglycans, known as heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), has been paid attention in many different fields as a key regulatory molecule for crucial biological processes in embryonic development, inflammation, wound repair, and cancer. There are a number of genes for the core proteins of heparan sulfate proteoglycans, including four members of the syndecan family, the glypican family, perlecan, agrin, and collagen XVIII (1–4). Perlecan is expressed in all basement membranes and other matrices such as cartilage (5). The large protein core (400 kDa) of perlecan consists of five distinctive functional domains. The protein core is substituted with 2–3 heparan sulfate (HS) chains at the N-terminal domain I and one or two HS/chondroitin sulfate (CS) chains at the C-terminal domain V (6, 7). In certain

A. 序 文

ヘパラン硫酸プロテオグリカンは発生、炎症、創傷治癒、腫瘍形成における重要な生物学的活性を制御する分子群として各分野から注目されている。ヘパラン硫酸プロテオグリカンのコアタンパク質をコードする遺伝子は多く、代表的なものにシンデカンファミリー、グリピカンファミリー、パールカン、アグリン及びXVIII型コラーゲンなどがある(1–4)。パールカンは全ての基底膜と軟骨などの、マトリックスに発現する。パールカンの巨大なコアタンパク質は5つの機能ドメインに分かれており、N端のドメインIには2–3本のヘパラン硫酸鎖が、C端のドメインVには1–2本のヘパラン硫酸鎖もしくはコンドロイチン硫酸鎖が付く(5–7)。組織や発生の時期の違いによりこれらのGAG鎖はコンドロイチン硫酸鎖、デ

tissues or developmental stages, these GAG attachment sites could be substituted with other glycosaminoglycan chains, such as CS, dermatan sulfate (DS), HS/CS, CS/DS, or secreted as GAG-free glycoprotein (see the review of Jiang *et al.*, 2003(8)). These variations of GAG chains may imply diverse roles of perlecan in tissue development and functions. Perlecan binds extracellular matrix molecules, growth factors, and cell surface receptors. Perlecan has been implicated in a number of biological activities in human diseases. Recently, studies with gene knockout mice have been created (9, 10) and two different human genetic disorders have been identified as having perlecan gene mutations (11, 12). In this report, I will review *in vivo* functions of perlecan in development and diseases.

B. Biology of Perlecan Core and GAG Chains

B-1. Structure and Function of Perlecan Core

The amino acid sequence of mouse perlecan from cDNA cloning (6, 7) indicates that the protein core is 369 kDa in size and consists of five distinct domains (Fig. 1). Domain I contains an SEA (Sperm protein, Enterokinase, Agrin) module and three Ser-Gly-Asp peptide sequences, in which the serine residue is a site for heparan sulfate attachment (13). Domain II is similar to the cholesterol-binding region of the LDL receptor and domain III has homology with the short arm of laminin α chains. Domain IV is the largest domain and consists of 14 repeats of IgG-like motifs similar to those found in the neural cell adhesion molecule (N-CAM). Domain V has three globular subdomains, similar to the LG subdomain of

ルマタン硫酸鎖 (DS)、あるいは 2 種類の GAG 鎖のハイブリッド鎖に置き換わったり、GAG を付けない状態で分泌されたりする可能性があり (Jiang らの総説参照 (8) 2003)、これらの糖鎖の多様性がパルカンの発生や組織機能における多様性を生み出しているのかもしれない。パルカンは細胞外分子、成長因子、細胞表面受容体に結合し、ヒト疾患においても多くの事象に関わっている。近年、ノックアウトマウスが作製され (9,10)、さらに 2 種類のヒト遺伝性疾患がパルカンの遺伝子異常に起因することが解った (11,12)。本稿ではこれらの結果をふまえ、パルカンの生体における機能について概説する。

B. パルカンのコアタンパク質と GAG 鎖の機能

B-1. コアタンパク質の構造

パルカンの cDNA から得られたアミノ酸配列からパルカンのコアタンパク質は 369 kD に及ぶ巨大なもので、5 つのドメインからなる構造を持つことが解った (6,7)。ドメイン I は、SEA (Sperm protein, Enterokinase, Agrin) モジュールと SerGlyAsp のペプチドシーケンスを含み、この Ser 残基がヘパラン硫酸鎖結合部位である (13)。ドメイン II は、LDL 受容体のコレステロール結合部位に、ドメイン III はラミニン α 鎖の短腕に相同性を持つ。ドメイン IV は最も大きいドメインで

Fig. 1. Structure of perlecan and binding molecules. GAG chains are shown in red and blue in domains I and V, respectively. Domain I contains GAG attachment sites and an SEA module. Domain II has homology to low-density lipoprotein (LDL). Domain III is homologous to the short arm of laminin α chains. Domain IV consists of Ig-like repeats, similar to N-CAM. Domain V contains three globular domains homologous to C-terminal laminin α chain globular subdomains, which are interrupted by four EGF-like modules. Molecules bound to perlecan domains are shown under the schematic structure of perlecan.

laminin α chains, with interruptions by four EGF-like motifs, and can be substituted with HS and/or CS chains (14). These domains bind extracellular matrices (15–21), growth factors, and cell surface receptors (17).

The structures of mouse and human perlecan are very similar except that domain IV of mouse perlecan contains 7 more repeats of the IgG-like motifs, which increases the core protein to 466 kDa (18). The homologue of perlecan is also present in the basement membranes of *C. elegans* (20, 21) and *Drosophila* (15, 22). Mutations in the alternatively spliced perlecan gene in *C. elegans* produce defective muscle development and cause paralysis (23). Perlecan is implicated in supporting basement membrane structure, since it interacts with basement membrane components. The HS chains interact with collagen IV and laminins (reviewed in Bernfield *et al.*, 1999). The core protein also binds collagen IV, nidogen/entactin-1 and -2, and fibulin-2 (24, 25) (Fig. 1). Perlecan can self-aggregate into dimers and multimers via domain V *in vitro*. Domain V interacts with cell surface receptors such as $\alpha 1$ integrin and α -dystroglycan (14, 26), suggesting possible competitive action with laminin or agrin. Perlecan's ability to interact with many proteins and receptors suggests that perlecan provides structural support for the basement membrane and bridges matrix and cell interactions for the stable formation of tissue architecture.

B-2. GAG Chains of Perlecan

As described in the introduction, GAG chains of perlecan have some variation and modification. The size of the GAG chains also varies according to tissue and cell type (27, 28). Biological activity of perlecan may be varied due to different levels of modifications of these sugar chains. Genetically modified mice, in which the HS attachment sites at the N terminus of perlecan are deleted, survive embryonic development and are viable and fertile but develop small eyes (29). However, mutant mice exhibit significantly delayed wound healing, defective angiogenesis and retarded tumor growth (30). Although these results suggest that the HS chains of perlecan positively regulate angiogenesis *in vivo*, gene knockout of the whole perlecan molecule may result in different phenotypes. Additionally, the mutant mice without perlecan HS chain exhibited remarkable proteinuria when BSA was administered intraperitoneally, suggesting that HS chains of perlecan play an important role in glomerular filtration, especially for a large amount of proteins (31).

C. Perlecan in Embryogenesis

Expression of perlecan is detectable in a very early stage of embryogenesis. Perlecan is first expressed on the external trophectodermal cell surfaces of mouse blastocysts and its expression level increases in the peri-implantation period (32). Perlecan expression appears early in tissues

あり、N-CAM のイムノグロブリン様の繰り返し構造を持つ。ドメイン V は、EGF 様モチーフをはさんで、ラミニン α 鎖の LG サブドメインを 3 つ持つ。このドメイン V には、ヘパラン硫酸鎖もしくはコンドロイチン硫酸鎖が付く (14–16)。これらのドメインは細胞外マトリックスに結合する (15–21)。マウスとヒトのパールカンは構造が非常に似ているが、マウスのドメイン IV のイムノグロブリン様の繰り返し構造が 7 つ長いため、そのコアタンパク質は 466 kDa と大きくなる (18)。パールカンの相同体は、線虫 (20, 21) やショウジョウバエ (15, 22) にも存在し、線虫のパールカンのスプライシング変異は筋発生の異常による運動麻痺を引き起こすことが知られている (23)。パールカンは基底膜の構成成分と相互作用し、基底膜の構造に重要と考えられる。ヘパラン硫酸鎖は IV 型コラーゲン、各種ラミニンと結合するが、コアタンパク質も IV 型コラーゲン、ナイドジェン 1, 2、およびフィブリン 2 等と結合する (1, 24, 25)。パールカンは、ドメイン V の自己会合で 2 量体や多量体を形成することもあるとされる。このドメイン V は $\beta 1$ インテグリンや α ジストログリカン等の細胞表面受容体との結合能を持ち (14, 26)、ラミニンやアグリン等と競合してはたらく可能性もある。このようなパールカンの多様な結合能が基底膜を構造的に支持し、細胞とマトリックスを連結させ、組織形成を安定させていると考えられる。

B-2. パールカンの GAG 鎖

組織や細胞種の違いにより GAG 鎖の長さにも多様性があると考えられる。

先に序文で述べたようにパールカンに付く GAG 鎖の種類には多様性があるが、組織や細胞の種類によってその長さにも多様性がある (27, 28)。パールカンの生物学的活性の多様性はこのような GAG 鎖の可変性によっているかもしれない。N 端にあるヘパラン硫酸結合部位の小欠損を起こす遺伝子改変マウスは生存し、交配可能であることがわかった。このマウスは眼球が小さい以外は一見正常であるが、創傷治癒、血管新生が遅延し、腫瘍成長が遅いことが報告された (29, 30)。しかし、ヘパラン硫酸鎖欠損マウスの解析結果において、パールカンのヘパラン硫酸鎖が血管新生を促進していても、パールカン全体を欠損させた場合にはまた違った結果が得られる可能性もある。さらに、最近では、パールカンのヘパラン硫酸鎖が欠損したマウスに BSA の腹腔内投与を行った場合、著明なタンパク尿を引き起こすことが分かり、パールカンのヘパラン硫酸鎖が、分子量が大きな分子の糸球体濾過に重要な役割を担っていることが示された (31)。

C. 発生におけるパールカンの役割

パールカンは胚発生の非常に早期から発現する。パールカンはマウス胚盤胞の栄養外胚葉に最初に発現し、その後着床前後にその発現量が急速に増加する (32)。また、組織形成に

for vasculogenesis, including heart, pericardium, and major blood vessels (33). Perlecan is also expressed in developing cartilage, especially in the hypertrophic zone. During later stages of development, perlecan mRNA levels progressively increase, and its expression correlates with the onset of tissue differentiation of various parenchymal organs, including the developing kidneys, lungs, liver, spleen, and gastrointestinal tract. Despite ubiquitous expression in all basement membranes from very early embryonic stages, deficiency of perlecan does not affect implantation or early embryogenesis. Unexpectedly, perlecan-null mutation in mice causes perinatal lethal chondrodysplasia. Some of the perlecan-null mice die around embryonic day 10.5 with defects in cephalic development and cardiomyocyte basement membranes (9, 10). Perlecan-null mice, which survive beyond this stage develop skeletal dysplasia characterized by defective cartilage, short limbs and craniofacial abnormalities, and they die shortly after birth with respiratory failure (9).

D. Role of Perlecan in Cartilage Formation

Perlecan originally identified as a basement membrane component. It also expresses in cartilage throughout the entire developmental stages (5). Although perlecan is abundant in cartilage, the role of perlecan in cartilage development was not clear until perlecan mutant mice were created. Human disease caused by null mutations of perlecan has been identified and its phenotypes are very similar to perlecan-null mice (9).

D-1. Lethal Chondrodysplasia Phenotype of Perlecan-Null Mice

Cartilage of perlecan-null mice reveals a disorganized growth plate with reduced chondrocyte proliferation and differentiation and defects in endochondral ossification (9). The columnar structure of hypertrophic chondrocytes in the growth plate is severely disturbed in mutant mice. The vertebral bodies of mutant mice are reduced in height but their width is increased with multiple ossification centers at the periphery. The abnormalities of cartilage are not clear until about embryonic day 14.5, when endochondral ossification begins, and after this stage, abnormalities become progressively severe. Cartilage matrix in perlecan-null mice contains reduced and disorganized collagen fibrils and glycosaminoglycans in electron microscopy, suggesting that perlecan plays an important role in cartilage matrix formation. Perlecan-null growth plate also shows reduced chondrocyte proliferation and little expression of Indian hedgehog, a marker for prehypertrophic chondrocytes. Since FGF/FGFR3c signaling regulates chondrocyte differentiation and proliferation in the growth plate, these results may suggest that perlecan modulates FGF signaling in cartilage development. The phenotype of the growth plate of perlecan-null mice is similar to that caused by constitutively activating mutations

関与しており、心、血管の形成に伴い発現が明瞭化してくる。また、軟骨形成に際してもパールカンの発現が確認され、特に肥大軟骨層で強い発現を見る。E13.5以降の後期胚発生において、腎、肺、肝等の実質臓器の発達に伴いパールカンの発現量は徐々に増加していく (33)。このような発生初期からのユビキタスな発現パターンにもかかわらず、パールカンの欠損は着床や胚発生に大きな影響を与えず、軟骨異常による周産期致死という意外な結果を示した (9, 10)。パールカン欠損マウスの一部は E10.5 前後に心血管系や頭部の発生異常により死亡したが、この時期を乗り越えた胚は軟骨異常による短い四肢や頭蓋顔面の形成異常を特徴とする骨格異常を伴い出生後まもなく呼吸不全で死亡した (9)。

D. 軟骨形成におけるパールカンの機能

パールカンは、最初基底膜の構成成分として同定されたが、後に軟骨発生において発現し続けることが解った (5)。しかし、パールカンの軟骨発生における機能はそのノックアウトマウスが作製、解析されるまで良く解っていなかった。さらにヒトでのパールカン欠損疾患もノックアウトマウスの症状と非常によく似ていたことから、同定することができた (9)。

D-1. パールカン欠損マウスの致死性軟骨異形成症

パールカンノックアウトマウスは軟骨細胞の増殖分化に異常を来し、内軟骨性化骨が障害される。成長板の肥大軟骨のカラム構造がほとんど形成されなかった (9)。長管骨以外でも、椎体において太くて短いという特徴が観察され、やはり内軟骨性骨化の異常によると考えられる不規則な骨化中心を骨周辺部に多数認めた。この軟骨の異常は骨化が始まる E14.5 までははっきりしないが、その後次第に明確になっていく。パールカンが欠損した軟骨では、電顕で観察されるマトリックス中のコラーゲンフィブリルとグライコサミノグライカン量が減少し、コラーゲン線維構築が乱れている。パールカンが欠損すると成長板の前肥大軟骨層での軟骨細胞の増殖が低下し、通常前肥大軟骨層で特異的に発現されるインデアンヘジホグ (Ihh) が消失する。成長軟骨においては、FGF/FGF 受容体 3c が軟骨の増殖分化を制御しているので FGF の共受容体であるパールカンがこれらのシグナルを修飾している可能性が示唆される結果である。パールカン欠損マウスの成長板の異常はヒトにおける FGF 受容体 3 の活性型変異疾患の異常と類似 (34-36)、FGF 受容体 3 欠損マウスにおいて長管骨が伸長する異常とで反対の長管骨の短縮を引き起こす (37-39)。この

of *FGFR3* in humans (34–36) and is opposite to that of *Fgfr3*-null mice, which shows the extended growth plate (37–39). These results suggest that perlecan may be a negative regulator of *FGFR3* signaling for cartilage development. Perlecan may act as ligands/growth factors reservoir in the matrix and inhibit signaling in cartilage development.

D-2. Functional-Null Mutations in Humans with Dyssegmental Dysplasia, Silverman-Handmaker Type

Similarities of growth plate histology and X-ray findings for skeletal abnormalities of perlecan-null mice led to the identification of a human disorder called Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type (DDSH) (40). DDSH is a rare lethal autosomal recessive skeletal dysplasia characterized by anisospondyly and micromelia (41). The endochondral growth plate of DDSH patients is short and contains large and unfused calcospherites in the hypertrophic zone similar to that of the perlecan mutant mice. Immunostaining with an antibody to the perlecan core protein showed strong staining of the pericellular cartilage matrix in normal controls. However, there was little staining in the DDSH cartilage matrix, but there was significant staining of inclusion bodies within the cells. Similar immunostaining results were observed with cultured fibroblasts from DDSH patients. Biochemical analysis revealed that normal sized perlecan core protein was not detected in the condition media from DDSH fibroblasts, but several smaller sized proteins were detected in the cell lysates. Mutations in three DDSH patients are predicted to produce premature termination codons (40). Immunostaining reveals that truncated proteins are synthesized but not secreted. Thus, DDSH is caused by functional null mutations of the perlecan gene. Taken together with similar phenotypes of knockout mice, perlecan is indispensable for cartilage development.

D-3. Partially Functional Mutations in Humans with Schwartz-Jampel Syndrome

Phenotypic differences in DDSH and Schwartz-Jampel syndrome (SJS) appear to reflect differences in complete deficiency of perlecan and partially functional truncated perlecan. Unlike DDSH, SJS mutations result in different, abnormal forms of the perlecan molecule in reduced levels that are secreted into the extracellular matrix and are partially functional. Spanger *et al.* reported that other skeletal dysplasias previously identified as chondrodysplasias, such as kyphomelic chondrodysplasia, micromelic chondrodysplasia, and Burton's disease, could be reclassified based on a clinical examination as SJS (42). Mutation analyses of the perlecan gene will be required for diagnoses of chondrodysplasia and myotonic myopathy. These mutation searches may reveal a wider spectrum of the SJS phenotype in the near future.

D-4. Perlecan in Osteoarthritis

Cartilage samples from patients suffering from late-

ことは、パールカンが FGF 受容体 3 のシグナルを負に制御している可能性を示している。パールカンは成長因子などのリガンドを軟骨マトリックス中に貯留することにより、FGF シグナルに抑制的に働いているかもしれない。

D-2. Silverman-Handmaker 型 dyssegmental dysplasia はパールカンの機能欠損変異により発症する疾患である

我々は、パールカン欠損マウスの成長板病理所見と骨レントゲン写真所見の類似性からパールカン欠損により発症するヒト遺伝性疾患の同定に至った (40)。これは Silverman-Handmaker 型 dyssegmental dysplasia (DDSH) と称されるまれな疾患で、遺伝形式は常染色体劣性遺伝型である (41)。DDSH 患者の成長板は短く、肥大軟骨層に、特徴的な粗大石灰小球 (calcospherites) を認め、パールカン欠損マウスとよく似た特徴を示した。パールカンコアタンパク質に対する抗体による免疫染色では、パールカンは軟骨マトリックス、特に細胞周囲のマトリックスに強く存在するが、DDSH 患者ではそのような染色はほとんど認められなかった。同様に DDSH 患者培養線維芽細胞を用いた免疫染色でもパールカンはマトリックスで欠損していた。生化学的な検討でも、DDSH 線維芽細胞の培養上清中に正常な大きさのパールカンコアは検出されず、小さいサイズのフラグメントが細胞分画で確認された (40)。DDSH 患者で検出された遺伝子変異は premature termination を起こすことが予測され、免疫組織染色の結果から予測された短いタンパク質は合成されても細胞外に分泌されていないことが明らかとなった。このようにして、DDSH はパールカン遺伝子の機能完全欠損型変異に起因することが分かった。これら、ノックアウトマウスとヒト遺伝性疾患の類似性がパールカンの軟骨発生における重要性を示したわけである。

D-3. Schwartz-Jampel 症候群におけるパールカンの機能部分欠損

Schwartz-Jampel 症候群 (SJS) におけるパールカンの遺伝子変異は、最初ポジショナルクローニングと連鎖解析によって同定された (11,12)。SJS は常染色体劣性遺伝形式をとるまれな疾患であり、ミオトニアと軟骨異形成が合併する。しかしながら DDSH と異なり、SJS 患者は生存することができる。この違いはパールカンの機能欠損が完全欠損か、部分欠損かによると考えられる。SJS の変異によるパールカンタンパク質は、質的、量的に異常であるが、細胞の外に分泌され、マトリックスとして、部分的に機能する。Spranger らは、過去に軟骨異形成として同定された kyphomelic chondrodysplasia、micromelic chondrodysplasia、Burton 病は、今後さらに検討がすすめば、SJS として分類される可能性があることをしめした (42)。今後、ミオトニアや軟骨異常を伴う症例に対して、パールカン遺伝子の変異を検討することにより SJS の疾患スペクトラムに拡がり期待される。

D-4. 関節症におけるパールカン

進行期の関節症軟骨において関節変性の主要病変部にお

stage osteoarthritis reveal increased levels of perlecan in the area adjacent to the main osteoarthritis region (43). The elongated secretory type 2 cells in the area adjacent to the defective region, which were responsible for a regenerating attempt in diseased cartilage tissue, produce a large amount of perlecan. This induction of perlecan might be due to cellular attempt to stabilize the extracellular matrix. Furthermore, these type 2 cells deposit perlecan in the pericellular matrix, which may also contribute to increasing stabilization between chondrocytes and the matrix.

E. Role of Perlecan in the Neuromuscular Junction

Perlecan is present in muscle basement membranes and its expression is particularly enriched at the neuromuscular junction (NMJ) (44). The NMJ is a highly specialized structure, in which unique molecules (45), such as acetylcholinesterase (AChE), acetylcholine receptors (AChR), agrin, dystroglycans, rapsyn, and utrophin are clustered (Fig. 1). In skeletal muscles, acetylcholine (ACh) acts as a neurotransmitter. ACh binds AChR on the muscle cell surface, activates Na channels, and induces muscle contraction. AChE rapidly inactivates this process for muscle relaxation and recycling of ACh. The collagen-tail form (ColQ) of AChE is preferentially expressed in innervated regions of muscles and is shown to bind perlecan *in vitro* (46, 47). In the perlecan knockout mice, muscle development and differentiation appear to be normal, and the nerve terminals are normally formed at birth (44). Most clustering molecules are present at the NMJ of the mutant mouse muscles. However, AChE is absent at the newborn NMJ, although AChE protein is synthesized normally (44). Thus, perlecan is essential for high-density localization of AChE at the NMJ. Continuous activation of the muscle in SJS patients is likely to be caused by perlecan deficiency in NMJ.

F. Perlecan and Lipoprotein in Diabetes and Atherosclerosis

HSPGs have been implicated in the uptake and removal of atherogenic lipoproteins. Domain III of perlecan shares homology with the binding domain of LDL receptor and perlecan was demonstrated as an independent slow uptake kinetics receptor for LDL (48). Loss of perlecan in diabetic mice was also demonstrated to be responsible for delayed lipoprotein clearance, and hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia (49,50,51). Perlecan is detected in the atherosclerotic intimal lesions of apoE-null and LDLR-null mice (52) and may contribute to the retention of lipoproteins at the earliest stage of atherosclerosis. Perlecan is associated with advanced lesions of hypercholesterolemic nonhuman primates (53). Atherosclerosis was studied in heterozygous perlecan-null mice by crossing to apoE and LDL receptor knockout backgrounds. At 12 weeks, chow-fed apoE-null

マウスではパーレカンが増加していることが報告されている (43)。病変部には細長い形の分泌型の2型軟骨細胞があり、この細胞の存在は病変部軟骨の再生機構と考えられる。この細胞がパーレカンを大量に産生し、軟骨細胞が細胞外マトリックスを安定させようとしているのかもしれない。さらに、この2型細胞表面領域にはパーレカンが多く沈着しており、軟骨細胞と軟骨マトリックスの連結を強めているようである。

E. 神経筋接合部におけるパーレカンの機能

パーレカンは筋基底膜に存在するが、特に神経筋接合部 (NMJ) に多く存在する (44)。NMJ は特殊に分化した基底膜構造であり、アセチルコリンエステラーゼ (AChE)、アセチルコリン受容体 (AChR)、アグリン、ジストログリカン、ラフシン、ユートロフィン等の分子が特異的に集束している (45)。骨格筋において、アセチルコリン (ACh) は伝達物質として筋表面の受容体 (AChR) に結合し、Na チャネルを活性化し、筋を興奮、収縮させる。ACh はすみやかに分解され、筋の興奮は解除され、ACh は再利用される。AChE のコラーゲン様尾部ドメインは神経支配を受けた部分の筋細胞において強く発現し、パーレカンと結合する (46,47)。出生に至ったパーレカン完全欠損マウスでは、筋の発生、分化、神経支配はほぼ正常に観察された (44)。また、ほとんどの NMJ 集合分子は AChR と共に存在するが、AChE は生化学的に筋で存在するにも関わらず、NMJ に局在しないことが分かった (44)。このことからパーレカンが AChE を NMJ に濃縮してして局在させることに必須であることが解った。SJS における筋の持続収縮 (ミオトニア) は NMJ でのパーレカンの欠損と関連していると思われる。

F. 糖尿病、動脈硬化の病態におけるパーレカンとリポタンパク質の関与

HSPG は動脈硬化誘発性リポタンパク質の取り込みや排除に関与していると考えられている。パーレカンのドメイン III は LDL 受容体の結合部位と相同性があり、パーレカン自身が独立した LDL 受容体であることが示された (48)。糖尿病患者や糖尿病マウスの腎および他の器官においてパーレカンの減少が観察され、このことがリポタンパク質のクリアランスの低下を引き起こし、高コレステロール血症、高血糖の発症に関与していると考えられている (49、50、51)。

パーレカンはアポ E 欠損マウスや LDL 受容体欠損マウスの動脈硬化肥厚内膜に観察され、動脈硬化の初期病変においてはリポタンパク質の保持に関与している可能性がある (52)。パーレカンはヒト以外の動物の粥状硬化の進行期の病変部位に強く沈着し、その関与が示唆されている (53)。しかし、動脈壁に存在するパーレカンの意義はまだ正確にわかっていない。アポ E と LDL 受容体のノックアウトマウスにパーレカンをヘテロで欠損させた場合の粥状硬化症の変化について調べたところ、12 週間同じ食事をさせた後、パーレカンがヘテロで欠損したアポ E と LDL 受容体のノックアウトマウスでは、パーレカンを欠損しないアポ E と LDL 受容体のノックアウトマウス

mice with a heterozygous deletion had less atherosclerosis, but this difference was not significant at 24 weeks (54). These results suggest that the deficiency of perlecan causes less atherosclerosis in early lesions.

G. Conclusion

Perlecan is essential for the development of cartilage and myocardium and neural tube closure. It also plays important roles in various functions in adult tissues. The GAG chains of domain I of perlecan are dispensable in development but they may be important in adult tissue functions and remodeling. Recent studies with human genetic disorders associated with the perlecan gene demonstrate that perlecan is indeed a multifunctional proteoglycan. However, the mechanisms of the functions of perlecan in development and diseases remain to be elucidated.

スに比べて、粥状硬化症の初期変化が少なかった (54)。しかし、24 週後では大きな変化がなかった。この結果から、パールカンが欠損すると初期には粥状硬化症が起こりにくい可能性が示された。

G. 結 語

パーカンは、軟骨や心血管系の発生や、神経管の閉鎖などにおいて必須であるが、成体における他の組織の機能にも重要な働きを有している。パールカンのドメイン I に付着する GAG 鎖は発生には重要ではないようであるが、成体器官の機能や組織の再構築においては重要かもしれない。近年のパールカン遺伝子欠損疾患の解析からも、パールカンの多機能性が示されつつあり、さらに発生や疾患におけるパールカン機能の解明が望まれている。

References

- Bernfield, M. *et al.* (1999) *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 729–777
- Iozzo, R. V. (2001) *J. Clin. Invest.* **108**, 165–167
- Lin, X. (2004) *Development* **131**, 6009–6021
- Nakato, H., and Kimata, K. (2002) *Biochim. Biophys. Acta.* **1573**, 312–318
- Murdoch, A. D., Liu, B., Schwarting, R., Tuan, R. S., and Iozzo, R. V. (1994) *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 239–249
- Noonan, D. M. *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 16379–16387
- Noonan, D. M. *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 22939–22947
- Jiang, X., and Couchman, J. R. (2003) *J. Histochem. Cytochem.* **51**, 1393–1410
- Arikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J. R., and Yamada, Y. (1999) *Nat. Genet.* **23**, 354–358
- Costell, M. *et al.* (1999) *J. Cell Biol.* **147**, 1109–1122
- Nicole, S. *et al.* (2000) *Nature. Genetics.* **26**, 480–483
- Arikawa-Hirasawa, E. *et al.* (2002) *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 1368–1375
- Dolan, M., Horchar, T., Rigatti, B., and Hassell, J. R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4316–4322
- Brown, J. C., Sasaki, T., Gohring, W., Yamada, Y., and Timpl, R. (1997) *Eur. J. Biochem.* **250**, 39–46
- Friedrich, M. V., Schneider, M., Timpl, R., and Baumgartner, S. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 3149–3159
- Tapanadechopone, P., Hassell, J. R., Rigatti, B., and Couchman, J. R. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 680–690
- Iozzo, R. V. (1994) *Matrix Biol.* **14**, 203–208
- Murdoch, A. D., Dodge, G. R., Cohen, I., Tuan, R. S., and Iozzo, R. V. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 8544–8557
- Noonan, D. M., and Hassell, J. R. (1993) *Kidney Int.* **43**, 53–60
- Rogalski, T. M., Williams, B. D., Mullen, G. P., and Moerman, D. G. (1993) *Genes Dev.* **7**, 1471–1484
- Moerman, D. G., Hutter, H., Mullen, G. P., and Schnabel, R. (1996) *Dev. Biol.* **173**, 228–242
- Park, Y. *et al.* (2003) *Dev. Biol.* **253**, 247–257
- Rogalski, T. M., Mullen, G. P., Bush, J. A., Gilchrist, E. J., and Moerman, D. G. (2001) *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 171–176
- Talts, J. F., Andac, Z., Gohring, W., Brancaccio, A., and Timpl, R. (1999) *Embo. J.* **18**, 863–870
- Kramer, K. L., and Yost, H. J. (2003) *Annu. Rev. Genet.* **37**, 461–484
- Friedrich, M. V. *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.* **294**, 259–270
- Hassell, J. R. *et al.* (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4494–4498
- Molist, A. *et al.* (1998) *Eur. J. Biochem.* **254**, 371–377
- Rossi, M. *et al.* (2003) *Embo. J.* **22**, 236–245
- Zhou, Z. *et al.* (2004) *Cancer. Res.* **64**, 4699–4702
- Morita, H. *et al.* (2005) *J Am Soc Nephrol* **16**, 1703–1710
- Smith, S. E. *et al.* (1997) *Dev. Biol.* **184**, 38–47
- Handler, M., Yurchenco, P. D., and Iozzo, R. V. (1997) *Dev. Dyn.* **210**, 130–145
- Rousseau, F. *et al.* (1994) *Nature* **371**, 252–254
- Rousseau, F. *et al.* (1996) *Horm. Res.* **45**, 108–110
- Wilcox, W. R. *et al.* (1998) *Am. J. Med. Genet.* **78**, 274–281
- Ornitz, D. M. (2001) Regulation of chondrocyte growth and differentiation by fibroblast growth factor receptor 3. *Novartis Found Symp.* **232**, 63–76; discussion 76–80, 272–282
- Brodie, S. G., and Deng, C. X. (2003) *Pediatr. Pathol. Mol. Med.* **22**, 87–103
- Deng, C., Wynshaw-Boris, A., Zhou, F., Kuo, A., and Leder, P. (1996) *Cell* **84**, 911–921
- Arikawa-Hirasawa, E. *et al.* (2001) *Nat. Genet.* **27**, 431–434
- Aleck, K. A. *et al.* (1987) *Am. J. Med. Genet.* **27**, 295–312

42. Spranger, J., Hall, B. D., Hane, B., Srivastava, A., and Stevenson, R. E. (2000) *Am. J. Med. Genet.* **94**, 287–295
43. Tesche, F., and Miosge, N. (2004) *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 852–862
44. Arikawa-Hirasawa, E., Rossi, S. G., Rotundo, R. L., and Yamada, Y. (2002) *Nat. Neurosci.* **5**, 119–123
45. Sanes, J. R., and Lichtman, J. W. (1999) *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 389–442
46. Steen, M. S., and Froehner, S. C. (2003) *Trends. Neurosci.* **26**, 241–242
47. Rotundo, R. L. (2003) *J. Neurocytol.* **32**, 743–66
48. Fuki, I. V., Iozzo, R. V., and Williams, K. J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 25742–25750
49. Ebara, T. *et al.* (2000) *J. Clin. Invest.* **105**, 1807–1818
50. Conde-Knape, K. (2001) *Diabetes Metab. Res. Rev.* **17**, 412–421
51. Menne, J. *et al.* (2004) *Diabetes* **53**, 2101–2109
52. Kunjathoor, V. V., Chiu, D. S., O'Brien, K. D., and LeBoeuf, R. C. (2002) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 462–468
53. Evanko, S. P., Raines, E. W., Ross, R., Gold, L. I., and Wight, T. N. (1998) *Am. J. Pathol.* **152**, 533–546
54. Vikramadithyan, R. K. *et al.* (2004) *Atherosclerosis in perlecan heterozygous mice. J. Lipid. Res.* **45**, 1806–1812

Received on August 30, 2005, accepted on September 29, 2005

Profile of the Author

Eri Arikawa-Hirasawa is a neurologist who graduated from Juntendo University School of Medicine. She worked at the National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institute of Health for the past 5 years(1996-2001). She is now a Lecturer at Juntendo University. Her major interest has been in muscle disorders and neural development. She is now focusing on role extracellular matrix in diseases and development.