

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82611

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19945

研究課題名(和文) 神経筋シナプス保護による筋萎縮抑制

研究課題名(英文) Inhibition of muscle atrophy by protection of neuromuscular junction

研究代表者

若月 修二 (Wakatsuki, Shuji)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第五部・室長

研究者番号：00378887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮は神経難病や生活習慣病によっても生じ、認知症と並んで介護予防の面からも社会的要請の強い重要な研究課題である。本提案では、神経筋接合部(NMJ, neuromuscular junction)の変性として筋萎縮を捉え、「NMJを保護することが筋萎縮抑制につながる」という仮説の実験的な検証を試みた。本研究により、軸索変性を抑制する複数の小分子化合物が見出され、そのなかのEGFR阻害剤の投与により、軸索変性を抑制(遅延)させた動物個体では、腓腹筋重量の低下が抑制された。これらの結果から、軸索変性を止め、あるいは遅延させることにより、NMJを機能的に保護できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋萎縮は認知症と並び社会的要請の強い重要な研究課題であるが、現在の医学では完全に萎縮した筋を回復させることは不可能である。そのため、筋萎縮の予防法や治療法の開発など、革新的な医療の創成が求められているが、筋萎縮の病態が出現するメカニズムは未だ十分に理解されていない。本研究では「NMJの変性として筋萎縮を捉え、NMJを変性から保護することが筋萎縮の抑制につながる」との仮説を実験的に検証する。本研究により、NMJを介する神経・筋の相互維持システムの理解が深まるとともに、筋萎縮から筋を保護・温存する方法論に基づく治療法の創成が期待される。

研究成果の概要(英文)：Muscular atrophy is also caused by neurodegenerative disorders and lifestyle diseases, and like dementia, it is an important research topic of strong social demand. In this study, we experimentally tested the hypothesis that protection of the neuromuscular junction (NMJ) leads to the inhibition of muscle atrophy. In animals treated with an EGFR inhibitor, a small molecule found to inhibit axonal degeneration, gastrocnemius muscle weight loss was markedly reduced. These results suggest that functional protection of the NMJ by preventing or delaying axonal degeneration may inhibit the progression of muscle atrophy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：軸索変性 筋萎縮 神経保護 神経筋接合部 活性酸素種 ユビキチンリガーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

軸索変性は神経難病のみならず代謝異常や炎症により生じる機能障害など、さまざまな神経障害に共通する特徴である。研究代表者の若月は軸索変性を促進するユビキチンリガーゼ ZNRF1 を発見した (Wakatsuki et al. Nat Cell Biol. 2011)。ZNRF1 は普段は活性を示さないが、変性がスタートした軸索では NADPH オキシダーゼが産生する活性酸素種 (ROS) を介して EGF 受容体が活性化し、ZNRF1 の Tyr103 をリン酸化して活性を亢進させた (図 1)。これらの発見は、ROS がシグナル伝達因子の如く ZNRF1 を活性化し、軸索を変性させることを明らかにした (Wakatsuki et al. J Cell Biol. 2015; Commun Integr Biol. 2016)。

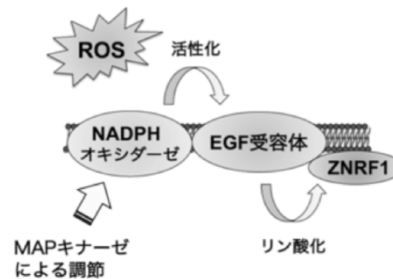


図 1. 酸化ストレスによる EGFR-ZNRF1 シグナルの活性化は神経変性を促進する。

神経筋接合部 (NMJ) は脊髄運動ニューロンと筋との間に形成されるシナプスである。坐骨神経繊維を実験的に切断して除神経を施した筋では、正常マウスでは除神経の 2-3 日後には、筋萎縮に先行して NMJ の膨大化とそれに続いて軸索が退縮する。しかしながら、さまざまなストレスにより誘導されるダメージからニューロンを保護するフェノタイプをもつ自然発症変異マウス *wlds* (wallerian degeneration slow) では軸索構造が保たれ、NMJ を介する電気的活動が維持される (Coleman & Freeman. Annu Rev Neurosci. 2010)。このようなフェノタイプをもつマウスが存在することは、軸索変性を阻止、乃至は遅延させることにより、NMJ を機能的に保護できる可能性を示唆した。

後肢懸垂をさせた筋萎縮モデルでは NMJ の膨大化や軸索の退行性変性など運動ニューロンが変性する (Tintignac. et al. Physiol. Rev. 2015)。筋萎縮に伴う NMJ の形態的変化の誘導メカニズムは不明な点が多いが、活性酸素種 (ROS) による酸化ストレスにより誘導されること (Milton. et al. PNAS. 2011)、運動ニューロン終末でのオートファジー活性が関与すること (Shen & Ganetzky. J Cell Biol. 2009) など、軸索変性の誘導・進行の分子メカニズムと共通する部分が多い。これらのことから、研究代表者は NMJ を変性から保護することが筋萎縮の抑制につながる、との仮説を検証しようとするに至った。

2. 研究の目的

筋萎縮は、筋萎縮脊索硬化症などの神経難病や糖尿病などの生活習慣病によっても生じ、認知症と並んで介護予防の面からも社会的要請の強い重要な研究課題である。しかしながら、現在の医学では完全に萎縮した筋を回復させることは不可能であり、筋萎縮の予防法や治療法の開発など、革新的な医療の創成が求められている。これまでに、筋肉細胞内で蛋白分解が高まることが筋萎縮の進行に寄与することが示されているが、筋萎縮の病態が出現するメカニズムについては未だ十分な理解が得られていない。

本研究では NMJ 保護に着目し、筋を萎縮から保護する方法論の確立を目指した。そのため、*wlds* フェノタイプ、並びに ZNRF1 阻害による NMJ 保護の観点からこの仮説を実験的に検証し、

1. 筋を萎縮から保護するシステム、2. 筋萎縮が出現するメカニズム の二点を解明し、筋萎縮から筋を保護・温存する方法論に基づく新しい治療方法の創成を目指して開始された。

3. 研究の方法

本研究では、研究代表者が同定した軸索変性を促進する ZNRF1 の活性制御機構を詳しく調べ、

これを阻止することが NMJ の保護、ならびに筋萎縮の抑制方法として有効かどうかを検討した。

① ZNRF1 のリン酸化/活性化制御に関する解析

ZNRF1 の活性制御メカニズムを、軸索変性モデルを用いて *in vitro*、*in vivo* の両面から実験的に検討した。*in vitro* 軸索変性モデルではマウス胚より調製した後根神経節を培養して軸索を伸長させた後、神経節を取り除くことで細胞体から切り離された軸索が変性する過程を経時観察した。変性の進行度は軸索を構成する微小管の免疫染色像を ImageJ などの画像解析ツールを用いて分析し、定量的かつ簡便に評価する。*in vivo* のモデルは坐骨神経変性モデルを用いた。このモデルでは坐骨神経を挫滅した後に、阻害剤などの小分子化合物を染み込ませたコラーゲンゲルを挫滅部位に与え、挫滅部位より末梢側の軸索変性を定量することで保護効果を評価した (Saito et al. Sci Rep. 2016)。

i. NADPH オキシダーゼの活性化機構に関する解析

ZNRF1 のリン酸化/活性化は ROS により制御されている (Wakatsuki et al. J Cell Biol. 2015)。変性する軸索における ROS 産生は NADPH オキシダーゼ阻害剤により抑制され、これと呼応して ZNRF1 のリン酸化/活性化が抑制される。マウスには NOX1-4、DUOX 1、2 の 6 種類の NADPH オキシダーゼ活性サブユニットが存在する。軸索変性における NADPH オキシダーゼの生理的役割を明らかにするため、loss of function、gain of function に基づく双方向性のアプローチにより、ZNRF1 のリン酸化/活性化を指標に NOX の活性化制御に関わる細胞内シグナルを精査した。

ii. ZNRF1 阻害剤の探索

上述の軸索変性モデルを用いて、ZNRF1 リン酸化/活性化、軸索変性を抑制する小分子化合物の同定を試みた。リン酸化型 ZNRF1 を特異的に認識する in-house の抗 ZNRF1 pY103 抗体を用いて、イムノブロット、免疫染色により ZNRF1 のリン酸化/活性化を評価した。

4. 研究成果

① NADPH オキシダーゼの活性化機構に関する解析

軸索変性は NADPH オキシダーゼ阻害剤により阻害される (Wakatsuki et al. J Cell Biol. 2015)。マウスには NOX1-4、DUOX 1、2 の 6 種類の NADPH オキシダーゼ活性サブユニットが存在する。ROS 産生に関わる NOX を確定するため、RNA 干渉により各種 NADPH オキシダーゼ活性サブユニットの発現を抑制したところ、NOX2 の発現抑制が強く ZNRF1 のリン酸化を阻害した。NOX の活性調節因子 p47 は自身のリン酸化に依存して NADPH オキシダーゼ活性を調節している (Nat Rev Immunol. 2004)。HA タグを付加した p47 蛋白を後根神経節神経細胞に発現させ、軸索変性を誘導したところ、p47 蛋白のセリンリン酸化レベルが変性軸索において増加し、MAP キナーゼ阻害剤により著しく低下した。p47 蛋白には MAP キナーゼによってリン酸化される複数のセリン残基が存在する。これらのセリン残基をアラニン残基に置換した複数の非リン酸化型 p47 蛋白を作製し、後根神経節神経細胞に発現させ、セリンリン酸化レベルを調べ、変性により軸索においてリン酸化されるセリン残基を特定した。

② ZNRF1 阻害剤の探索

軸索変性モデルを用いて、ZNRF1 リン酸化/活性化、軸索変性を抑制する小分子化合物の同定を試みた。

- ・ネラチニブ (HKI-272) や WZ4002 などの EGFR 阻害剤
- ・gp91-ds tat ペプチドなど、NOX 複合体形成を阻害する小分子化合物
- ・Y103 を含む ZNRF1 の部分アミノ酸配列から作製したリン酸化デコイペプチド

EGFR 阻害剤は ZNRF1 リン酸化/活性化、軸索変性を抑制した。gp91-ds tat ペプチドは NOX2

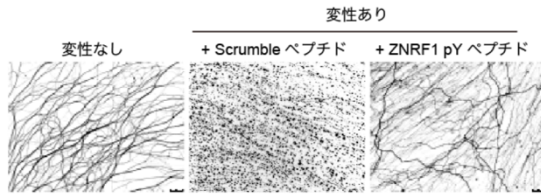


図2. ZNRF1 pY-tat は軸索変性を抑制する。

複合体形成を阻害し、ZNRF1 リン酸化/活性化、軸索変性を抑制した。Y103 を含む ZNRF1 の部分アミノ酸配列から作製したリン酸化デコイペプチドは、*in vitro* キナーゼアッセイ (Wakatsuki et al. J Cell Biol. 2015) によりリン酸化させ、抗リン酸化チロシン抗体を用いた ELISA により、チロシンリン酸化の亢進を確認した。細胞膜透過性を賦与するために tat 配列を付加した ZNRF1 pY-tat を培養モデルに用いたところ、ZNRF1 リン酸化/活性化、軸索変性を抑制した (図2)。

③ 動物個体を用いた検討

in vivo のモデルは坐骨神経変性モデルを用いた。②で保護効果を認めた小分子化合物を染み込ませたコラーゲンゲルを挫滅部位に与え、挫滅部位より末梢側の軸索変性を定量した (Saito et al. Sci Rep. 2016)。ニューロフィラメントに対する免疫染色、ならびにウェスタンブロットによる定量したところ、EGFR 阻害剤では抑制効果を認めたが、gp91-ds tat ペプチド、ならびに ZNRF1 pY-tat ペプチドは効果を認めなかった。ZNRF1 リン酸化をウェスタンブロットで確認したところ、EGFR 阻害剤ではリン酸化阻害を認めたが、両ペプチドではリン酸化阻害を認めなかった。EGFR 阻害剤を投与した個体では、腓腹筋重量の減少が非投与個体と比べて抑制された。

筋萎縮は、臥床を余儀なくされた場合には、若い健常人の筋にも生じる。適切な運動習慣が加齢性筋肉減少症 (サルコペニア) を予防すること、筋力トレーニングなどの運動療法が筋萎縮からの回復に有効であることは知られており、したがって、筋には萎縮へ向かうカスケードが常在するが、筋を制御する運動ニューロンと筋の間にはこの萎縮のカスケードと拮抗するシステムが存在すると考えられる (森ら. 医学のあゆみ. 2013)。本研究では NMJ の変性として筋萎縮を捉え、「NMJ を変性から保護することが筋萎縮の抑制につながる」という仮説の実験的な検証を試みた。軸索保護を指標とした培養モデルの評価系により、軸索の構造を壊すユビキチンリガーゼ ZNRF1 のリン酸化/活性化を阻害する小分子化合物を複数同定した。また、NAPDH オキシダーゼを介する ZNRF1 の活性化機構の詳細を明らかにすることができた。*in vivo* の解析では、EGFR 阻害剤投与により軸索変性を抑制 (遅延) させた個体において、腓腹筋重量の低下が抑制された。この結果は、軸索変性を止める、あるいは遅延させることにより NMJ を機能的に保護できる可能性を示唆した。EGFR 阻害剤を除く小分子化合物は *in vivo* の解析において変性保護効果を認めなかったため、研究開始当初計画した筋萎縮モデルへの投与実験に着手できなかった。gp91-ds tat ペプチドならびに ZNRF1 pY-tat ペプチドの投与では、変性する坐骨神経における ZNRF1 のリン酸化の抑制が認められなかった。これらのペプチドは *in vitro* の解析では十分な抑制効果を示すことから、送達方法に問題があると考えられた。Oi らは、後根神経節の血管内皮あるいはニューロンの表面に表出するペプチド (homing peptide; ~7 アミノ酸長) を標的とする分子に神経保護作用を有する因子を結合させて運搬し、ニューロンに取り込ませる方法を開発し報告している (Neurosci Lett. 2008)。今後はこのような方法を含めて送達デザインを再考する必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Araki Toshiyuki, Wakatsuki Shuji	4. 巻 139
2. 論文標題 Regulation of neuronal/axonal degeneration by ZNRF1 ubiquitin ligase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 21 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2018.07.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Numata-Uematsu Yurika, Wakatsuki Shuji, Nagano Seiichi, Shibata Megumi, Sakai Kazuhisa, Ichinohe Noritaka, Mikoshiba Katsuhiko, Ohshima Toshio, Yamashita Naoya, Goshima Yoshiro, Araki Toshiyuki	4. 巻 139
2. 論文標題 Inhibition of collapsin response mediator protein-2 phosphorylation ameliorates motor phenotype of ALS model mice expressing SOD1G93A	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 63 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2018.08.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saitoh Fuminori, Hagiwara Hiroko, Wakatsuki Shuji, Araki Toshiyuki	4. 巻 139
2. 論文標題 Carboxymethylation of CRMP2 is associated with decreased Schwann cell myelination efficiency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 58 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2018.08.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 氏家悠佳、若月修二、荒木敏之	4. 巻 53
2. 論文標題 低酸素応答による末梢神経髄鞘化制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本応用酵素協会誌	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wakatsuki Shuji, Tokunaga Shinji, Shibata Megumi, Araki Toshiyuki	4. 巻 216
2. 論文標題 GSK3B-mediated phosphorylation of MCL1 regulates axonal autophagy to promote Wallerian degeneration	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 477 ~ 493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201606020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imai Satoshi, Koyanagi Madoka, Azimi Ziauddin, Nakazato Yui, Matsumoto Mayuna, Ogihara Takashi, Yonezawa Atsushi, Omura Tomohiro, Nakagawa Shunsaku, Wakatsuki Shuji, Araki Toshiyuki, Kaneko Shuji, Nakagawa Takayuki, Matsubara Kazuo	4. 巻 7
2. 論文標題 Taxanes and platinum derivatives impair Schwann cells via distinct mechanisms	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-05784-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wakatsuki Shuji, Araki Toshiyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Specific phospholipid scramblases are involved in exposure of phosphatidylserine, an "eat-me" signal for phagocytes, on degenerating axons	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Communicative & Integrative Biology	6. 最初と最後の頁 e1296615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19420889.2017.1296615	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 荒木敏之、若月修二	4. 巻 31
2. 論文標題 神経軸索変性の分子メカニズム	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Dementia Japan	6. 最初と最後の頁 252 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Wakatsuki S. and Araki T.
2. 発表標題 GSK3B-mediated phosphorylation of MCL1 regulates axonal autophagy to promote Wallerian degeneration.
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wakatsuki S.
2. 発表標題 GSK3B-mediated phosphorylation of MCL1 regulates axonal autophagy to promote axonal degeneration.
3. 学会等名 The Cold Spring Harbor Asia conference on Latest Advances in Development and Function of Neuronal Circuits (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Araki T. and Wakatsuki S.
2. 発表標題 Regulation of neuronal apoptosis and axonal degeneration by ZNRF1 ubiquitin ligase.
3. 学会等名 8th Asia Pacific International Congress of Anatomists (APICA) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 若月修二、荒木敏之
2. 発表標題 「ワークショップ：精神・神経疾患の基礎研究～プロテオスタシスの視点から」細胞内pH調節系のシナプス形成への寄与
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒木敏之、若月修二
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼZNF1を介した神経細胞死と軸索変性の制御機序
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 氏家悠佳、若月修二、荒木敏之
2. 発表標題 末梢神経髄鞘化における低酸素応答系の関与
3. 学会等名 第137回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒木敏之、若月修二
2. 発表標題 神経軸索傷害後のミトコンドリアMCL1リン酸化の下流シグナル
3. 学会等名 第17回日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 若月修二、荒木敏之
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼZNF1が制御する神経変性の分子メカニズム
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会)(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 若月修二、荒木敏之
2. 発表標題 イオン恒常性の破綻による精神疾患発病機構の解明
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 若月修二、荒木敏之
2. 発表標題 イオン恒常性の破綻による精神疾患発病機構解明
3. 学会等名 平成29年度精神・神経疾患研究開発費27-7「ゲノム編集技術を用いたモデル動物作出による精神神経疾患の病態解明」班 班会議
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加門正義、若月修二、荒木敏之
2. 発表標題 DM1疾患特異的iPS細胞におけるCTGリピート伸長メカニズムの解明
3. 学会等名 2017年度第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加門正義、若月修二、荒木敏之
2. 発表標題 DM1疾患特異的iPS細胞におけるCTGリピート伸長メカニズムの解明
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

NCPNからのお知らせ
<https://www.ncnp.go.jp/news/news.html?no=407>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----