

平成22年 5月 1日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19700364  
 研究課題名（和文） 神経筋接合部信号伝達障害に対するタンパク標的治療法の開発研究  
 研究課題名（英文） Protein anchoring therapy for disorders of signal transmission at the neuromuscular junction  
 研究代表者  
 伊藤 美佳子(Mikako Ito)  
 名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：60444402

## 研究成果の概要：

神経筋接合部の collagen Q (ColQ) 欠損による終板アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 欠損症に対するタンパク係留療法の開発を行った。アデノ随伴ウイルスベクターを介して COLQ 遺伝子を Colq ノックアウトマウスに導入したところ、顕著な運動機能の回復が見られ、神経筋接合部に ColQ が集積し AChE 活性があることが確認できた。ColQ は神経筋接合部に集積する細胞外分子であるため、自らの係留シグナルにより生体内の筋組織に伝達・補充され、治療効果が高く現れたと考えられる。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,000,000 | 0       | 2,000,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
|        |           |         |           |
|        |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 390,000 | 3,690,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 神経・筋肉生理学

キーワード：分子欠損症・神経筋接合部・ collagen Q

## 1. 研究開始当初の背景

先天性筋無力症候群 (congenital myasthenic syndromes) は、神経筋接合部の先天的分子欠損症により神経筋伝達障害が起こる疾患群である。先天性筋無力症候群において欠損・

変異をする分子には、(1) 骨格筋ニコチン作動性アセチルコリンレセプター (AChR)、(2) アセチルコリンエステラーゼをシナプス基底膜に係留する collagen Q (ColQ)、(3) 神経終末のコリン・アセチルトランスフェラーゼ (ChAT)、

(4) AChR を endplate に集積させる rapsyn, (5) 骨格筋電位依存性ナトリウムチャンネル、(6) 神経終末より放出される agrin のレセプター MuSK、(7) MuSK 信号伝達系の下流に位置する Dok-7 がある。これら分子欠損症の多くでそれぞれの分子病態に応じた治療法が存在するが、Co1Q 欠損症による終板 AChE 欠損症に対する治療法は全く存在せず、致死的な経過を辿ることが多い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は Co1Q 分子のシナプス基底膜親和性を利用したタンパク標的療法の開発を行い、細胞外マトリックス分子欠損症に対する汎用の遺伝子治療方法の開発を目指すことである。

## 3. 研究の方法

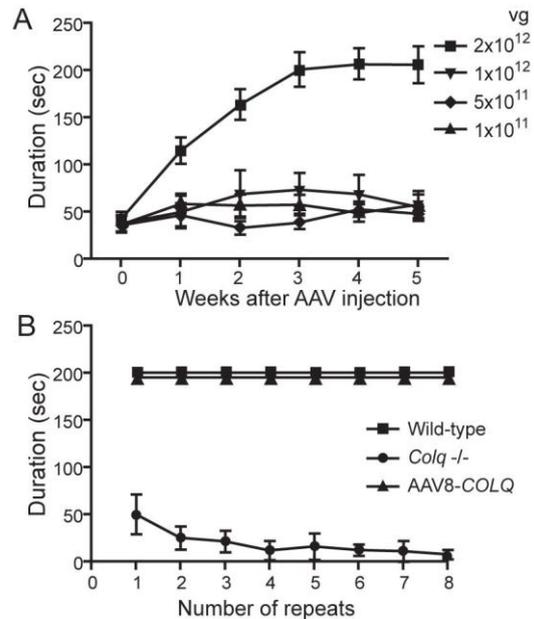
AAV ベクターは、神経・筋・肝細胞等の非分裂細胞に対し一回の導入で長期的な遺伝子発現が得られ、また安全性の点でも非病原性・低免疫原性など他のウイルスベクターに比べ利点が多い。ここでは筋肉組織への親和性が高い serotype8 を選び用いた。AAV ベクターは、pAAV-CMV-MCS (stratagene 社) を用いて、骨格筋において高活性を示す CMV promoter の下流に *COLQ* をつないだコンストラクトを作製し、AAV8-helper ベクターと共にリン酸カルシウム法により HEK293 細胞にトランスフェクションした。得られた rAAV を精製しマウスに静注、筋注した。3 週間後にその効果を、運動試験、組織細胞化学実験、電気生理実験により検証した。

## 4. 研究成果

AAV ベクターは pAAV-CMV-*COLQ* と、Co1Q と共に GFP を発現する pAAV-CMV-*COLQ*-IRES-*EGFP* のコンストラクトを用いた。AAV8 型 capsid をコードする Helper plasmid と cotransfection を HEK293 細胞に行い、rAAV8-Co1Q と rAAV8-Co1Q-EGFP の 2 種類の

組替え AAV を作製した。強イオン膜を用いて精製した後、*Co1Q*<sup>-/-</sup>マウスの尾静脈より全身投与 ( $\sim 2 \times 10^{12}$  genome copies) を行った。

投与 2 週間後から、ロタロッドでの運動テストに改善効果が見られ、4 週間後には、運動テストと疲労テストで正常マウスと同成績まで回復した (図 1 A, B)。



治療マウスの骨格筋の組織切片を作成し、図 1 (A) 治療マウスのロタロッドテスト。10rpm/min で加速回転するロタロッドに乗る秒数。WT マウスは 240 秒以上、KO マウスは平均 40 秒である。(B) 疲労テスト。10rpm のロタロッドに乗せ、落下後すぐ乗せるを繰り返した。

AChE 染色を行うと、 $\alpha$ バンガロトキシンで染まる AChR 部位に、活性染色が見られた。また、Co1Q 抗体による免疫染色においても、同じ部位でシグナルが検出され、神経筋接合部において Co1Q が集積していることが確認できた (図 2)。

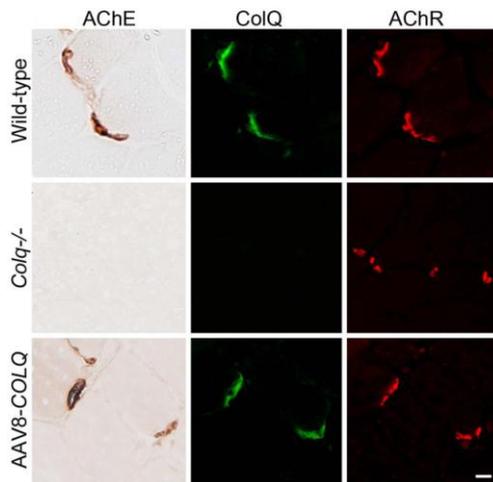


図2 WT、KO、治療マウスの筋切片においてAChE 活性染色、ColQ 抗体染色、 $\alpha$ バンガロトキシンを用いたAChR 検出を行った。治療マウスでは筋組織の神経筋接合部でのColQ とAChE の集積が観察された。

また、シヨ糖勾配遠心法により、治療マウスの骨格筋中のAChE-formを検出したところ、未治療群では見られなかった $A_4$ 、 $A_8$ 、 $A_{12}$  forms AChE-ColQ が検出された(図3)。

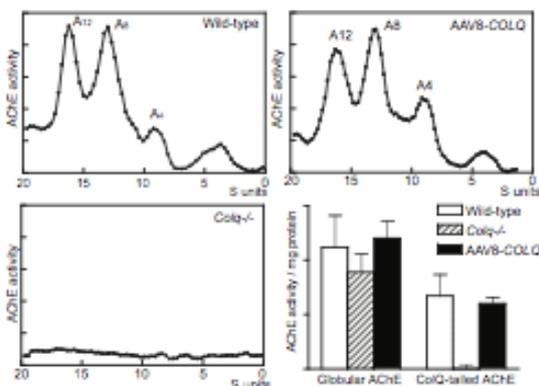


図3 シヨ糖勾配遠心法による $A_4$ 、 $A_8$ 、 $A_{12}$  forms の分離。治療マウスではKOでは存在しない $A_4$ 、 $A_8$ 、 $A_{12}$  forms が出現した。また、筋組織中のAChE 活性はWT の80%まで上昇した。

以上の結果から、AAV8 を介してCOLQ の遺伝子導入により、発現したCol1Q がAChE と複合体を形成し神経筋接合部に係留すること、ま

た治療マウスは、運動機能テストから筋無力症状が正常値まで回復したことが明らかになった。Col1Q は基底膜に係留シグナルを持つ細胞外タンパクであるため、生体内で遺伝子導入された細胞の割合が低くても、自らの細胞外集積により、十分量を獲得できたと考えられる。

さらに、遺伝子導入を行なったCol1Q-/-マウスを用い、微小板電位、終板電位、複合筋活動電位などの生理学的検査と電子顕微鏡を用いた神経筋接合部のシナプス部位の観察を行った結果、正常化傾向が見られた。今後、筋無力症状の機能回復が可能なウイルス投与量の最低値の決定、組換え $A_{12}$ -AChE の腎糸球体基底膜などへの異所性集積や抗Col1Q抗体の出現など、遺伝子導入の安全性を検討する必要がある。

本研究にて開発する遺伝子治療法は、細胞外分子欠損症に対するタンパク分子の補充に非常に有効であると思われるため、collagen Q 欠損症だけでなく、perlecan 欠損症、laminin  $\alpha_2$  欠損症、 $\alpha$ -dystroglycanopathy をなどの細胞外マトリックス・タンパク欠損症への効果も期待できる。今後、これらの分子欠損症の治療研究を行い、汎用の治療法として確立が期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ①Ohno K, Ito M, Masuda A. Molecular bases and therapeutic strategies in defective neuromuscular transmissions: lessons learned from a prototypical synapse. 日本神経精神薬学雑誌 Aug;29(4):145-51. 2009 review

② Ito M, Masuda A, Jinno S, Katagiri T, Krejci E, Ohno K. **Viral vector-mediated expression of human collagen Q in cultured cells.** *Chem Biol Interact* 175, 346-348, 2008 査読有

〔学会発表〕 (計 3 件)

① Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K, rAAV8-Mediated Protein Anchoring of Asymmetric Acetylcholinesterase (Ache) to the Synaptic Basal Lamina at the Neuromuscular Junction (NMJ). 48th Annual Meeting. The American Society for Cell Biology, Dec 16, 2008, San Francisco, USA

② Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Masuda A, Yoshimura T, Takeda S, Krejci E, Ohno K: Adeno-associated virus serotype 8-mediated targeting of asymmetric acetylcholinesterase to the synaptic basal lamina at the neuromuscular junction. 38th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Nov 19, 2008, Washington DC, USA

③ Ito M, Suzuki Y, Okada T, Takeda S, Fukudome T, Yoshimura T, Krejci E, Ohno K, rAAV8-mediated protein anchoring therapy for congenital defect of collagen Q. 第 14 回日本遺伝子治療学会総会 2008 年 6 月 13 日 札幌医科大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 美佳子 (Mikako Ito)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 60444402