

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659673

研究課題名(和文)ES細胞由来運動神経細胞に対する神経筋接合部形成促進薬の網羅的探索法に関する研究

研究課題名(英文)Screening of a novel drug to activate the formation of neuromuscular junctions

研究代表者

平田 仁(Hirata, Hitoshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80173243

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):FDA既認可薬パネルを用いた網羅的スクリーニングを行い、薬剤AがMuSKのリン酸化作用を増強することによって、ATF2をリン酸化を促進することを確認した。また薬剤Aは、マウス筋芽細胞種であるC2C12細胞の筋管において、agrin単独に比べ、ACh-receptorの凝集を促進した。さらに薬剤Aは、マウスの神経再支配筋において、AChRサブユニットやCol-QといったRNAの発現を増加させ、神経伝導検査にてCMAPを増大させる傾向を認めた。

研究成果の概要(英文):During the formation of neuromuscular junctions (NMJs), binding of agrin to LRP4 induces MuSK phosphorylation, which activates ATF2 downstream of JNK and induces clustering of acetylcholine receptors (AChRs). We used the drug repositioning strategy, in which a drug already used for a specific disease is applied to treat another disease, to identify an FDA-approved drug that enhances the agrin/LRP4/MuSK signaling and NMJ formation. Drug A increases MuSK phosphorylation in dose-dependent manner. In C2C12 myotubes, number of AChR clusters were increased in the presence of Drug A together with agrin. Moreover, drug A increases the expression of AChR-e, rapsyn and Col-Q mRNAs in neurotization model mice.

研究分野：手外科学

キーワード：再生医療 神経筋接合部 drug repositioning 神経再支配

1. 研究開始当初の背景

今日、脊髄損傷をはじめとした重度神経損傷に対し、ES/iPS 細胞由来神経細胞移植による治療法の研究が活発に行われているが、移植神経細胞による神経回路網形成の制御についてはあまり考慮されていない。

一方、既に市販されている薬剤の未知の薬理作用を探索し、通常の適応とは異なる疾患の治療に用いる Drug repositioning 法は、安全性試験が不要で、開発費用がかからず、すぐに臨床応用可能というメリットがあり、近年注目されている手法である。

この Drug repositioning 法を用いて、神経損傷後の再生治療に際し、神経回路網形成能を最適化する薬物治療を開発することができれば、治療の有効性を高めることが可能となると期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経筋接合部形成を促進する既存薬を同定し、神経回路網形成能を最適化する薬理学的アプローチを確立することである。

3. 研究の方法

(1)神経筋共培養系の確立

In vitro での神経筋接合部形成能の評価のため、マウス胎児由来運動神経細胞、マウス iPS 細胞由来運動神経細胞、マウス胎児由来筋芽細胞、マウス筋芽細胞腫 C2C12 細胞、マウス iPS 細胞由来筋細胞をもちいて神経筋共培養を行い、神経筋接合部を作成した。

(2)FDA 既認可薬プレートをを用いた1次スクリーニング

第1次スクリーニングとして、1186 種類の FDA 既認可薬プレートをを用いて、候補薬の選定を行った。1 次スクリーニングには ATF-Luciferase (ATF-Luc) レポーターアッセイ法を用いた(文献)。HEK-293 細胞に ATF-Luc を MuSK、LRP4、neural agrin の各 cDNA とともに遺伝子導入し、細胞に MuSK/LRP4 複合体を共発現させ、10 μM の濃度で薬剤を添加し、プレートリーダー (PowerScan4) を使用して Luciferase の発光強度を測定することによって、JNK を介しての ATF2 の活性化能を評価した。この操作を3回繰り返して行い、上位6剤を1次候補薬とした。

(3)Western blotting 法を用いた2次スクリーニング

同定された候補薬の効果の確認と作用部位の検証のため、第2次スクリーニングとし、Western blotting 法を用いて薬剤の MuSK リン酸化作用の評価を行った。HEK-293 細胞に、FLAG タグをつけた MuSK と LRP4 の cDNA を遺伝子導入し、neural agrin とともに6種の1次候補薬をそれぞれ添加した。抗リン酸化

tyrosine 抗体を用いた免疫沈降後、Western blotting を行い、抗 FLAG 抗体でリン酸化 MuSK の発現量を評価した。その結果から、薬剤 A を第2次候補薬とし、同様の実験で、5、10、20、50 μM の薬剤 A を添加して、濃度差試験を行った。

(4)培養細胞を用いた薬剤有効性の確認

C2C12 細胞を培養し筋管を形成後、neural agrin 単独投与群と neural agrin+ 薬剤 A 投与群で ACh レセプター凝集能を比較した。ACh レセプターは bungarotoxin で蛍光免疫染色後、画像解析ソフト (MetaMorph) で評価した。

(5)神経再支配モデルマウスを用いた薬剤有効性の確認

前脛骨筋の支配神経である腓骨神経を切断し、脛骨神経を筋内へと移行する neurotization モデルマウスを使用し(文献)、薬剤の有効性の確認を行った。8 週齢、雄の C57/BL6 マウスの左後肢に手術を施行し、術後4週間、薬剤もしくは Placebo を経口ゾンデを使用して連日投与した。術後8週で各種解析を行った。薬剤 A 投与群と Placebo 群において、前脛骨筋の筋湿重量、神経伝導検査 (CMAP)、神経筋接合部関連遺伝子の mRNA 発現量を比較した。

4. 研究成果

(1)神経筋共培養を行い、in vitro での神経筋接合部の作成に成功した(図1)。しかし、薬剤の効果判定のための定量評価に耐えるほどの安定した共培養法の確立には至らなかった。

また、この過程で、京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) の協力のもと、マウス iPS 細胞の筋への分化と筋管の形成に成功した(図2)。

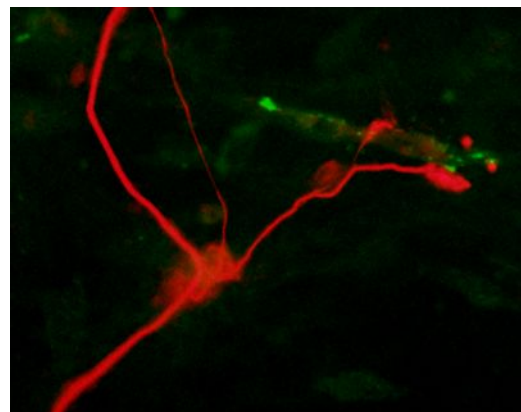


図1 神経筋共培養 (赤: TAU、緑: bungarotoxin)

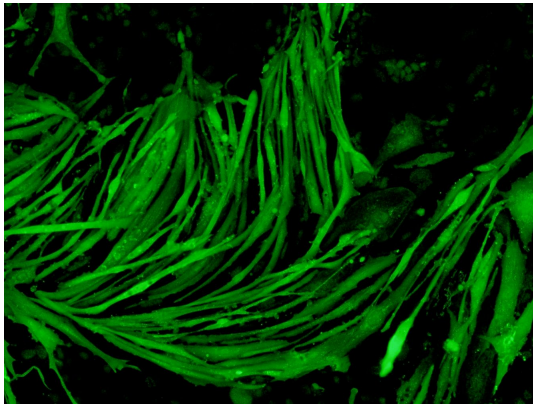


図 2 マウス iPS 細胞からの筋分化 (緑: myosin heavy chain)

(2)(3)第 1 次薬剤スクリーニングにて、薬剤 A~F の 6 種の 1 次候補薬を選定し、その後の第 2 次スクリーニングで、薬剤 A を 2 次候補薬とした (図 3-1)。また薬剤 A は、濃度依存的に MuSK のリン酸化を促進することを確認し (図 3-2)、それにより ATF2 のリン酸化作用を有すると考えられる。



図 3-1 第 2 次薬剤スクリーニングの結果 (Western blotting 法)

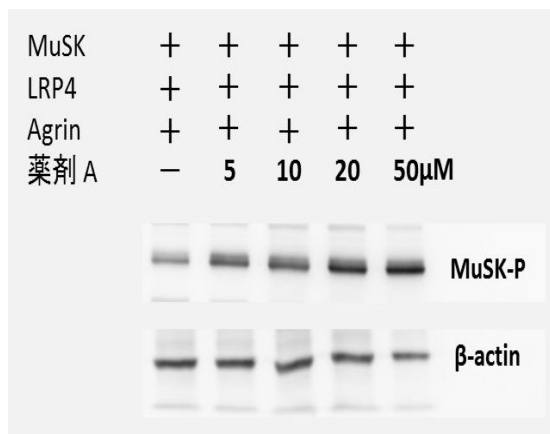


図 3 薬剤 A の濃度依存的 MuSK リン酸化作用 (Western blotting 法)

(4)C2C12 細胞の培養にて、ACh レセプターの cluster 数、トータルの蛍光強度とも薬剤 A

投与群で有意に高い結果となった (表 1)。

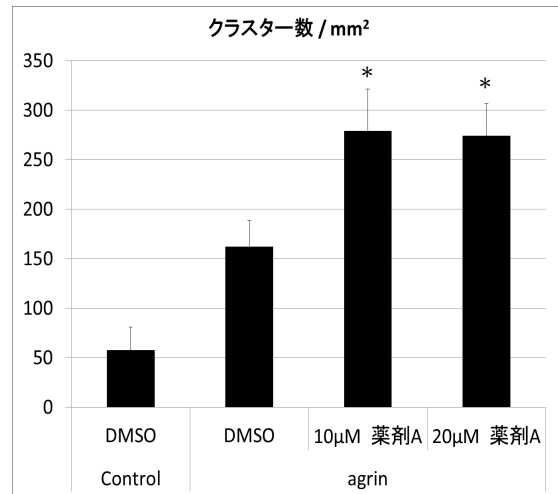


表 1 C2C12 筋管における ACh レセプターの cluster 数の比較 (* p<0.05)

(5) 神経再支配の指標となる筋湿重量の健側比では、有意差はないものの、薬剤 A 投与群で高い傾向にあった (表 2)。同様に神経筋接合部の機能を反映する CMAP も、有意差はないものの薬剤投与群で高い傾向にあった (表 3)。次いで、神経再支配筋における神経筋接合部関連遺伝子の mRNA 発現の解析では、AChR サブユニット、Col-Q、Rapsyn と有意差はないものの、いずれも薬剤投与群で高い結果となった (表 4-1~4)。

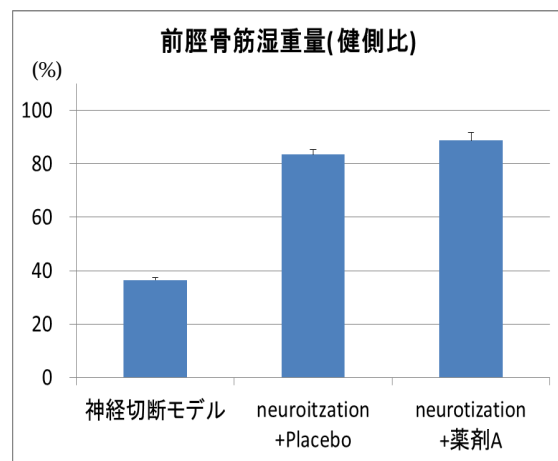


表 2 前脛骨筋湿重量 (n=10, p=0.12)

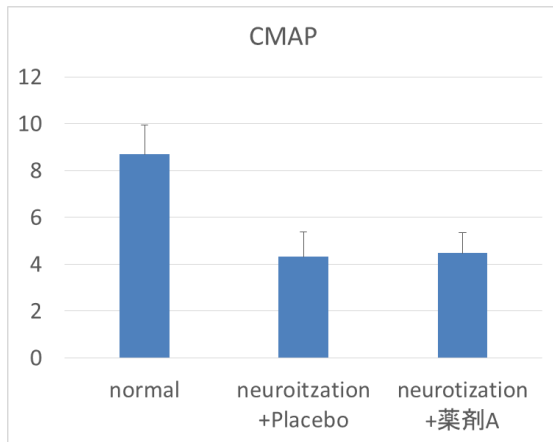


表 3 神経再支配筋の CMAP (n=5, p=0.09)

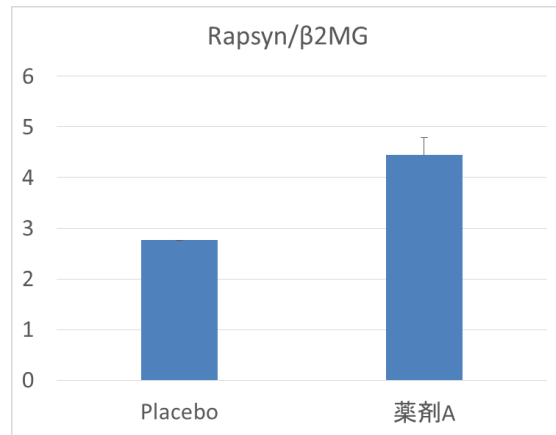


表 4-3 Rapsyn の mRNA 発現 (n=5, p=0.15)

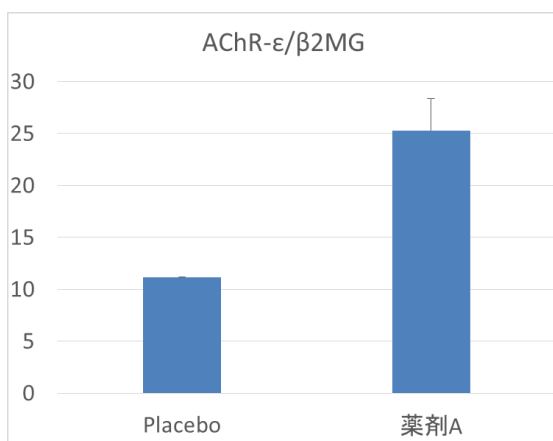


表 4-1 AChR サブユニットの mRNA 発現 (n=5, p=0.15)

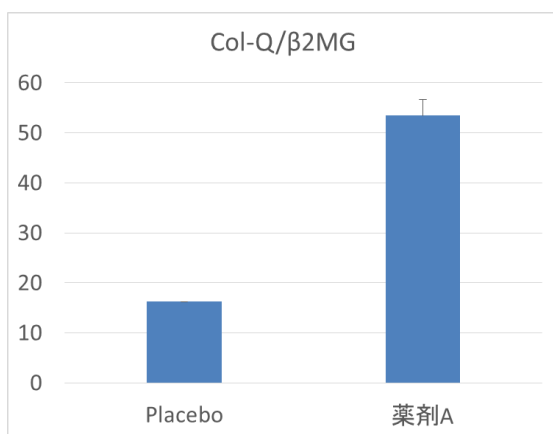


表 4-2 Col-Q の mRNA 発現 (n=5, p=0.05)

<引用文献>

Ohkawara B, Cabrera-Serrano M, Nakata T, et al. LRP4 third -propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum Mol Genet.* 2014; 23:1856-68.

Iwata Y, Ozaki N, Hirata H, et al. Fibroblast growth factor-2 enhances functional recovery of reinnervated muscle. *Muscle Nerve.* 2006;34:623-630.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

石井久雄、栗本秀、平田仁、神経筋接合部形成促進薬の探索、第 58 回日本手外科学会学術集会、2015 年 4 月 16 日～17 日、東京都新宿区、京王プラザホテル

石井久雄、栗本秀、平田仁、神経筋接合部形成促進薬の探索、第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、2014 年 10 月 9 日～10 日、鹿児島県鹿児島市、城山観光ホテル

6. 研究組織

(1)研究代表者

平田 仁 (HIRATA, Hitoshi)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：80173243

(2)研究分担者

栗本 秀 (KURIMOTO, Shigeru)
名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：70597856

大野 欽司 (OHNO, Kinji)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：80397455

烏橋 茂子 (TORIHASHI, Shigeko)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：90112961

水島 秀幸 (MIZUSHIMA, Hideyuki)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：80718403