

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14575

研究課題名(和文) 神経筋疾患の克服を目指す新規治療技術の開発

研究課題名(英文) Development of a new method to treat neuromuscular diseases

研究代表者

手塚 徹 (Tezuka, Tohru)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：50312319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経筋接合部(NMJ)は骨格筋収縮の運動神経支配に必須のシナプスである。NMJの形成不全は様々な神経筋疾患に認められ、NMJ形成を標的としたこれらの疾患の治療法の開発・検討が重要である。これまで、我々はDOK7発現ベクターの投与によりNMJの形成を増強する手法を作り、ある種の先天性筋無力症や筋ジストロフィーのモデルマウスに対する有効性を実証していた。この知見を基に、本研究では、神経筋疾患の克服を目指す新規治療技術の開発を更に進めた。中でも、筋萎縮性側索硬化症(ALS)のモデルマウスに対する上記ベクターの有効性を示したことは根本的な治療法がまだ無い当該疾患の克服に向け意義があると言える。

研究成果の概要(英文)：The neuromuscular junction (NMJ) is a synapse between a motor neuron and skeletal muscle and is required for muscle contraction. Defects in NMJ formation are found in various neuromuscular diseases including myasthenia, muscle dystrophy, and motor neuron degenerative diseases, suggesting that enhancement of NMJ formation mitigates pathology of these diseases. In this study, treatment with an adeno-associated virus vector carrying the DOK7 gene, an essential gene for NMJ formation, was demonstrated to enhance the formation of NMJs, motor activity, and life span in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a progressive, multifactorial motor neuron degenerative disease.

研究分野：分子生物学

キーワード：神経筋接合部

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 神経筋接合部と神経筋疾患：神経筋接合部 (Neuromuscular junction, NMJ) は運動神経の軸索末端と骨格筋を結び、運動機能に不可欠のシナプスである。その形成・維持・機能の異常は遺伝性 (先天性筋無力症候群) あるいは、自己免疫性 (重症筋無力症など) の筋無力症の原因となる。さらに、近年、筋ジストロフィーや運動神経変性疾患 (筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) や脊髄性筋萎縮症 (Spinal muscular atrophy, SMA)) などの難治性の神経筋疾患においても、NMJ 形成不全が認められ、その重要性が注目されていた。

(2) NMJ の形成・維持機構、MuSK とその活性化因子 Dok-7：NMJ の形成と維持は筋特異的な受容体型チロシンキナーゼ MuSK (Muscle-specific kinase) によって制御されている。申請者が所属する研究室 (東京大学医科学研究所腫瘍抑制分野) では独自に単離した Dok-7 (Downstream of tyrosine kinases-7) が MuSK の活性化に不可欠の細胞内因子として働く NMJ 形成制御因子であり、その遺伝子異常が NMJ 形成不全を伴う先天性筋無力症 (DOK7 型筋無力症) を引き起こすこと、一方で、Dok-7 の強制発現により MuSK 活性化、さらには NMJ 形成が亢進することを見出した (Science, 312: 1802-1805, 2006; Science, 313: 1975-1978, 2006; Science Signal., 2: ra7, 2009)。

(3) 新規 NMJ 形成増強技術の作出：以上の発見を踏まえ、我々は、Dok-7 の強制発現により MuSK シグナル (NMJ 形成シグナル) の活性化を誘導する手法を作出し、その手法によって NMJ 形成を増強する、ひいては、NMJ 形成不全を伴う神経筋疾患を治療することを試みた。ヨーロッパで遺伝子治療薬としての使用が承認されているアデノ随伴ウイルス (AAV, Adeno-associated virus) を用いて、Dok-7 の発現ベクター (AAV-D7) を作出した。この AAV-D7 を我々が樹立した DOK7 型筋無力症のモデルマウスに投与したところ、非投与の当該モデルマウスは NMJ 形成不全を伴って、生後 3 週以内に死亡するのに対し、投与マウスは NMJ 形成の亢進、運動機能の回復、生存期間の延長を示し、新規 NMJ 形成増強技術である AAV-D7 の有効性が証明された (Science, 345: 1505-1508, 2014)。さらに、Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーのモデルマウスに対しても、AAV-D7 の投与による生存日数と運動機能の改善が認められ、複数の神経筋疾患モデル (先天性筋無力症候群と筋ジストロフィー) に対する新規 NMJ 形成増強技術 (AAV-D7 を用いた治療技術) の有用性が示された。

(4) 未解明の点：先天性筋無力症候群と筋ジストロフィーは筋原性の疾患であり、ALS や SMA などの運動神経変性疾患に対する AAV-D7 の有効性は不明であった。また、MuSK には

Dok-7 に加え、運動神経由来の糖タンパク質である Agrin が MuSK の共受容体 Lrp4 を介して活性化因子として働き、NMJ 形成・維持に必須の役割を担うことが知られていた。申請者らは、MuSK 活性化因子 Agrin と Dok-7 の違いを検討した結果、Agrin は Dok-7 では代替できない、MuSK 活性化以外の機能を持ち、その機能が生後の NMJ 維持に必須であることを発見した (PNAS, 111:16556-11561, 2014)。この結果は Dok-7 とは別の NMJ 形成制御因子の強制発現は、Dok-7 の強制発現とは相異なる分子機構で NMJ 形成を増強できる可能性を示唆していた。

## 2. 研究の目的

新規 NMJ 形成増強技術として、様々な神経筋疾患に対する、Dok-7 を始めとする NMJ 形成制御因子の強制発現の有効性をさらに検討し、神経筋疾患の治療の基盤となることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) AAV-D7 の運動神経変性疾患への効果の検討：上述の通り、Dok-7 を強制発現させる AAV ベクター (AAV-D7) の有効性は、先天性筋無力症候群 (その中の DOK7 型筋無力症) と筋ジストロフィー (その中の Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー) のモデルマウスにおいては実証されたが、他の先天性筋無力症候群や筋ジストロフィーのモデルマウス、さらには、運動神経変性疾患のモデルマウスに対しての効果は調べられていなかった。そこで、運動神経変性疾患の 1 つである筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS、指定難病) を選び、当該モデルマウスに対する AAV-D7 の効果を検討することにした。

(2) ALS の症状と治療の現状：ALS は上位運動ニューロンと下位運動ニューロンが選択的、進行性に変性し消失していく多因子性の疾患である。ALS では随意運動や嚥下・呼吸が障害され、症状の進行は比較的急速で、発症から死亡までの平均期間は約 3.5 年とされている。ALS の進行を遅らせる作用のある薬として、グルタミン酸による興奮毒性に対しての神経細胞保護作用を持つとされるリルゾールとフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンがあるが、根本的な治療法は確立されていない。

(3) ALS のモデルマウス：ALS は家族性と孤発性に大別され、全体の約 5-10% が家族性 ALS とされる。家族性 ALS の約 2 割では、フリーラジカルを処理する酵素 (SOD1, superoxide dismutase 1) の遺伝子変異が報告されている。これまでに種々の ALS モデルマウスが樹立されているが、最も使われているマウスが、家族性 ALS の変異 (G93A) を持つ SOD1 のトランスジェニックマウス

(SOD1-G93A Tg マウス)である。そこで、本研究では ALS のモデルマウスとして、SOD1-G93A Tg マウスを選択し、このオスのモデルマウスに対する AAV-D7 の効果を検討した。

(4) AAV の作製とマウスへの投与方法：本研究では、我々の以前の研究 (Science, 345: 1505-1508, 2014) と同様に、骨格筋への導入効率が高い血清型 (AAV9 型) を使用し、HEK293 細胞を用いて AAV-D7 および比較対照となる AAV-EGFP (Enhanced green fluorescent protein, 緑色蛍光蛋白質を発現する) を作製し、密度勾配超遠心法により精製したもの ( $1.2 \times 10^{12}$  vg) をマウスに尾静脈投与した。

(5) ALS モデルマウスに対する AAV-D7 の効果の検討 (その 1 : 組織学的な解析) : まず、ALS モデルマウスに対する AAV-D7 の効果を組織学的な解析により検討した。本研究は治療への展開を目指すため、発症後に AAV-D7 を投与する必要があった。用いたモデルマウス (C57BL/6 背景) は 90 日齢で発症初期の病態を示すことが他のグループから報告されていた。そこで、組織学的な検討においては、90 日齢で AAV-D7 を静脈投与し、120 日齢にて解析した。マウスは安楽殺の後、組織を摘出し、横隔膜筋の NMJ 形成、前脛骨筋の筋萎縮、脊髄の運動神経変性を調べた。横隔膜筋の NMJ 形成は NMJ の前シナプス領域蛋白質 (Synapsin1) に対する抗体と後シナプス領域に局在するアセチルコリン受容体に結合する蛇毒 ( $\alpha$ -bungarotoxin) を用いたホールマウント蛍光染色像を共焦点顕微鏡で取得・定量解析することで評価した。前脛骨筋の筋萎縮はその横断面のパラフィン切片の HE 染色像を取得し、筋繊維のサイズを定量することで評価した。脊髄の運動神経変性は、脊髄横断面の凍結切片のニッスル染色像から運動神経細胞数を、抗 Neurofilament 抗体を用いた蛍光染色像から軸索のサイズを定量することで評価した。

(6) ALS モデルマウスに対する AAV-D7 の効果の検討 (その 2 : 生存・運動機能に対する効果の解析) : これらの解析においては、個々の ALS モデルマウスの発症日を同定した上で、AAV-D7 を投与する必要があった。そこで、本研究ではモデルマウスの前肢筋力をグリッptest で計測し、設定した基準より落ちた日を発症日と定義し、直後に AAV-D7、または、AAV-EGFP を投与した。生後および発症後のマウスの生存日数を見ると共に、マウスの自発運動を自動測定装置で測った。

#### 4 . 研究成果

(1) ALS モデルマウスに対する AAV-D7 の効果 (その 1 : 組織学的な解析) : ALS の発症メカニズムとしては、いくつかのモデルが出されている。その 1 つとして、まず NMJ の変性(前シナプス領域の縮小と後シナプス領域から

の運動神経の脱離)が起こり、その後、運動神経の変性に至るというモデルが提唱され、このモデルを支持する結果がモデル動物・臨床検体の解析から報告されている。上記研究方法(5)での解析により、120 日齢のマウスにおいて、野生型マウスと比較して、AAV-D7 を投与しなかった ALS モデルマウスでは前シナプス領域の縮小と後シナプス領域からの運動神経の脱離が確認された。これに対し、AAV-D7 投与群の ALS モデルマウスでは前シナプス領域の縮小、後シナプス領域からの運動神経の脱離の両者において、その異常が軽減された。以上より、AAV-D7 には ALS モデルマウスに対する NMJ 保護効果があることが判明した。次に、ALS の重要な組織病態の 1 つである筋萎縮について検討した。ALS での筋萎縮は NMJ 形成不全が原因で起こるというモデルも提唱されている。AAV-D7 非投与群の ALS モデルマウスは筋萎縮 (筋繊維サイズの縮小) を示したが、AAV-D7 投与群ではサイズの縮小が軽減されており、AAV-D7 は ALS モデルマウスの筋萎縮も抑制することが示された。ALS の最も著名な組織病態である運動神経細胞の変性についても検討したが、生存している運動神経の細胞数、運動神経軸索の萎縮 (サイズの縮小) とも、AAV-D7 投与群と非投与群との間に差異は無く、今回の条件においては、AAV-D7 は運動神経細胞の変性に対する保護効果は認められなかった。

(2) ALS モデルマウスに対する AAV-D7 の効果 (その 2 : 生存・運動機能に対する効果の解析) : 個別に発症を判定した ALS モデルマウスに AAV-D7 あるいは対照となる AAV-EGFP を投与した結果、生存日数は AAV-EGFP 投与群では生後平均 154.4 日、発症後 50.3 日であったのに対し、AAV-D7 投与群では生後平均 166.3 日、発症後 64.2 日といずれの指標でも有意に延長した。さらに、自発運動能も、AAV-D7 非投与群と比較して、AAV-D7 投与群の ALS モデルマウスでは改善が認められた。以上より、発症後の AAV-D7 投与は ALS モデルマウスに対し、生存の延長、運動機能の改善に有効であることが示された。

(3) 考察 : これまで AAV-D7 による NMJ 形成増強技術はある種の先天性筋無力症と筋ジストロフィーに有効なこと分かっていたが、今回新たに、運動神経変性疾患の代表と言える ALS に対しても有効であることが実証された。AAV-D7 は運動神経細胞の細胞死に対する抑制効果は認められなかったが、この結果は AAV-D7 と運動神経細胞保護手法(リルゾール投与など)の併用がより効果的である可能性を示唆する。今後は、他の ALS モデルマウスやよりヒトに近い実験動物での ALS モデルに対する AAV-D7 の効果を検討することが重要である。また、AAV-D7 の効果がまだ検討されていない神経筋疾患が多くあり、AAV-D7 の有用性はさらに広がることが期待される。他方、Dok-7 以外の NMJ 形成制御因子 (Agrin など) についても、その強制発現系の構築や効果の

検討を行ったが、これについてはより詳細な解析が必要であると考えている。

#### 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4件)

Miyoshi Sadanori、Tezuka Tohru、Arimura Sumimasa、Tomono Taro、Okada Takashi、Yamanashi Yuji、*DOK7 gene therapy enhances motor activity and life span in ALS model mice.*、EMBO Molecular Medicine、査読有、Vol.9、No.7、2017、pp.880 - 889、DOI:10.15252/emmm.201607298

② Ueta Ryo、Tezuka Tohru、Izawa Yosuke、Miyoshi Sadanori、Nagatoishi Satoru、Tsumoto Kouhei、Yamanashi Yuji、*The carboxyl-terminal region of Dok-7 plays a key, but not essential, role in activation of muscle-specific receptor kinase MuSK and neuromuscular synapse formation.*、Journal of Biochemistry、査読有、Vol.161、No.6、2017、pp.269 - 277、DOI:10.1093/jb/mvw073

③ Eguchi Takahiro、Tezuka Tohru、Miyoshi Sadanori、Yamanashi Yuji、*Postnatal knockdown of dok-7 gene expression in mice causes structural defects in neuromuscular synapses and myasthenic pathology.*、Genes to Cells、査読有、Vol.21、No.6、2016、pp.670 - 676、DOI:10.1111/gtc.12370

江口貴大、手塚徹、三好貞徳、山梨裕司、*神経筋接合部(NMJ)の形成・維持機構とNMJ形成増強治療*、CLINICAL CALCIUM、査読無、Vol.27、No.3、2017、pp.89 - 95、DOI: CliCa1703413419

〔学会発表〕(計2件)

三好貞徳、手塚徹、有村純暢、伴野太郎、岡田尚巳、山梨裕司、*神経筋接合部の形成増強による筋萎縮性側索硬化症(ALS)マウスの病態改善と延命*、第3回日本筋学会、2017年

② 江口貴大、手塚徹、三好貞徳、山梨裕司、*生後のNMJの維持におけるDok-7の役割*、第2回日本筋学会、2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

手塚 徹 (TEZUKA, Tohru)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：50312319

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4)研究協力者

( )