様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　６ 月　２ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：基盤研究(A)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｈ０１５３２

研究課題名（和文）神経筋シナプス形成シグナルと形成不全の解明

研究課題名（英文）Signaling in NMJ formation and its synaptopathy

研究代表者
山梨　裕司（Yamanashi, Yuji）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：４０２０２３８７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　32,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、「細胞内分子Dok-7による骨格筋特異的な受容体型キナーゼMuSKの活性化」が神経筋シナプス（NMJ）の形成に必須であり、その異常がNMJ形成不全による筋無力症の原因となることを発見した。さらに、NMJ形成を増強する新たな治療技術を創出し、NMJ形成不全を呈する多様な疾患モデルマウスに対する有効性を実証した。そこで、NMJ形成シグナルの実体解明と、筋力・運動機能の低下に伴うNMJ形成不全の病態生理学的な意義の解明を目的とする本研究を実施した。その結果、新たなNMJ形成制御分子が見出され、また、加齢性のNMJ形成不全に伴う筋力・運動機能低下に対するNMJ形成増強治療の有効性が実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究の成果は、独自に開発したNMJ形成増強治療が、多様な要因により惹起される加齢性の筋力・運動機能の低下に有効である可能性を提示するものであり、高齢化社会における生活の質の向上に資する医療技術としての発展が期待される点において高度な社会的意義を有している。さらに、本研究は我々の運動機能制御に必須のNMJについて、その成り立ちや病態、治療メカニズムの理解を深める点においても大きな学術的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：We previously demonstrated that the activation of the muscle-specific receptor kinase MuSK by the cytoplasmic protein Dok-7 is essential for NMJ formation, and that mutations in the human DOK7 gene underlie NMJ synaptopathy (DOK7 myasthenia). Moreover, we developed a novel therapeutic approach that enhances NMJ formation in living animals. In this study, we aimed to understand molecular mechanisms underlying NMJ formation and pathophysiological significance of NMJ defects associated with muscle weakness and motor dysfunction. Indeed, we successfully identified signaling molecules that regulate NMJ formation. Also, we demonstrated that the above-mentioned novel therapeutic approach enhances innervation at NMJs together with muscle strength and motor activity in aged mice, demonstrating pathophysiological significance of age-related NMJ defects.

研究分野：分子生物学

キーワード：神経筋シナプス　シグナル伝達　神経科学

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

神経筋シナプスは神経筋接合部（NMJ：Neuromuscular Junction）とも呼ばれ、運動神経の軸索末端と筋管（筋繊維）中央部の後シナプス構造を連結し（図１）、アセチルコリン（ACh）を伝達物質とする骨格筋収縮の運動神経支配に必須の役割を担っている。NMJ 形成（維持を含む）は筋特異的な受容体型チロシンキナーゼ MuSK によって制御されており、MuSK は共受容体である Lrp4 を介して運動神経由来の蛋白質 Agrin によって活性化される（図２）。しかしながら、我々は独自に単離した骨格筋内のアダプター様分子 Dok-7 が MuSK の細胞内領域に直接作用し、活性化することが MuSK 依存的な後シナプス構造の形成、ひいては NMJ の形成に必須であることを発見した。さらに、ヒト DOK7 の遺伝性疾患として DOK7 型筋無力症を発見し、それが Dok-7 の MuSK 活性化能の減弱による NMJ の形成不全によって神経筋伝達効率が低下し、骨格筋が萎縮して筋力が低下する NMJ 形成不全疾患であることを解明した。また、NMJ の自己免疫疾患である重症筋無力症（MG）についても、Lrp4 に対する自己抗体陽性の MG を発見し、NMJ 形成不全との関連を解明した。加えて、Dok-7 が Agrin による細胞外からの MuSK 活性化にも必須であることを示し、胚発生の過程では Dok-7 による筋管内での MuSK 活性化が後シナプス構造の形成を筋管自律的に誘導し、その後、骨格筋組織に伸展してきた運動神経由来の Agrin による MuSK のさらなる活性化によって NMJ が形成されることを解明した（図２）。

図１：神経筋シナプスの模式図

また、我々は、上記の過程で筋特異的に Dok-7 を高発現するトランスジェニック（Dok-7 Tg）マウスを作出し、その高発現が筋管での MuSK 活性化を増強し、前シナプスを含めた NMJ 全体を拡張することを発見していた。この事実は筋管内の MuSK シグナルだけでなく、筋管から運動神経に作用する逆行性シグナルの存在とその増強をも示すものである。さらに、Dok-7 Tg マウスに Agrin 欠損を導入すると、Dok-7 による高度な MuSK 活性化は維持されるにも関わらず、胎仔期に形成された NMJ が出生後の数週間で退縮・消失することが判明し、出生後の NMJ の維持に必要な、MuSK 活性化とは異なる、新たな Agrin シグナルの存在が提示された（図２）。しかしながら、逆行性シグナルを含む MuSK シグナルや新規 Agrin シグナルの実体は未解明の課題として残されていた。

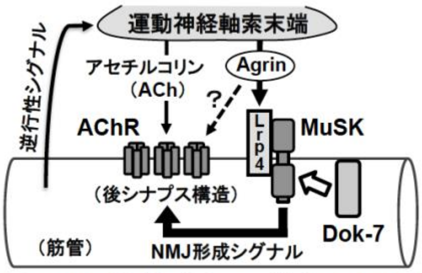

図２：NMJ形成シグナルの模式図。Dok-7が活性化したMuSK（キナーゼ）は運動神経由来のAgrinによるさらなる活性化を受け、ACh受容体（AChR）が凝集する後シナプス構造と運動神経軸索末端を結ぶNMJの形成を誘導する。破線は独自に発見した新規Agrinシグナル（本文に詳述）。運動神経に作用する逆行性シグナルの実体は不明。

一方、本研究開始当初の知見として、NMJ の形成不全が NMJ の異常を直接の病因とする筋無力症だけでなく、筋ジストロフィー（MD）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）や加齢性の筋萎縮（サルコペニア等）などにも認められることが判明していた。そこで、我々は NMJ 形成不全に起因する運動機能障害（筋力低下）を NMJ 形成シグナルの増強によって改善する汎用治療の可能性に思い至った。事実、アデノ随伴ウイルス（AAV）を用いた Dok-7 発現ベクター（AAV-D7）の発症後の投与が、DOK7 型筋無力症マウスや常染色体優性 Emery-Dreifuss 型 MD（AD-EDMD）マウスの NMJ を拡張することで、運動機能の改善と延命効果をもたらすことを発見し、NMJ 形成不全の治療標的としての重要性を実証した。さらに、代表的な運動神経変性疾患である ALS のモデルマウスでも発症後の AAV-D7 投与が NMJ の変性や筋萎縮を抑制すると共に運動機能の改善と延命効果をもたらすことを実証し、NMJ 形成不全による筋萎縮・運動機能障害を標的とする、個々の病因に拠らない汎用治療技術としての NMJ 形成増強治療の開発を世界の最前線で進めていた。

２．研究の目的

以上の学術的な背景を踏まえ、本研究では、その実体が不明な逆行性シグナルを含む MuSK シグナルや新規 Agrin シグナルの解明と独自開発のスクリーニング系による新たな NMJ 形成制御遺伝子の同定を通じた、NMJ 形成シグナルのより広範な視点からの理解を目的とした。その上で、NMJ の形成異常と NMJ の構造・機能連関の理解を深めることにより、高齢化社会の重要課題である加齢性の筋力・運動機能低下の分子病態解明を含めた、NMJ 形成不全の病態生理学的な意義の解明とそれに基づく新たな治療基盤の確立を目指した。

３．研究の方法

(1) MuSK シグナルや新規 Agrin シグナルの解明

①逆行性シグナルを含む MuSK シグナルの解明

Dok-7　Tg マウスや Dok-7 発現ウイルス（AAV-D7）を投与したマウスは高度な MuSK 活性化によ

る巨大なNMJを形成し、また、独自に作出したDOK7型筋無力症マウスはMuSK活性化の減弱により極めて小さなNMJを形成する。このようなマウスの筋管や運動神経を用いた蛋白質、核酸レベルの網羅的な発現解析を行うことで、逆行性シグナルを含む、NMJ形成制御因子の同定を進めた。同定されたNMJ形成制御因子候補について、AAVベクターを用いたマウス個体における発現増強・抑制実験、および遺伝子改変マウスの作出・解析により、マウス個体レベルのNMJ形成制御機能の解明を進めた。

②新規Agrinシグナルの解明
　上述の通り、Agrinを欠失したDok-7 Tg（Agrin-KO;Dok-7 Tg）マウスではDok-7によるMuSKの高度な活性化が維持されるにも関わらず、胎仔期に形成されたNMJが出生後の数週間で退縮・消失する。この事実は、NMJの維持にはAgrinによる、MuSK活性化以外の新規Agrinシグナルが必須であることを意味する。そこで、出生直後のAgrin-KO;Dok-7 TgマウスにAAVベクターを用いて種々のAgrin変異体を導入し、新規Agrinシグナルに必要なAgrinの最小領域を検討すると共に、当該領域に対する会合分子の探索を実施した。

(2) NMJ形成制御遺伝子の同定とNMJ形成シグナルの解明
 独自に創出したNMJ形成シグナルを指標とするスクリーニング系を用い、NMJ形成制御遺伝子の探索を実施した。さらに、選定されたNMJ形成制御遺伝子候補について、AAVベクターを用いたマウス個体における発現増強・抑制実験、および遺伝子改変マウスの作出・解析により、マウス個体レベルのNMJ形成制御機能の解明を進めた。

(3) NMJ形成異常とNMJの構造・機能連関の理解
 NMJの異常な拡張を示しながらも運動機能の明らかな異常を示さないDok-7 Tgマウスに着目し、電子顕微鏡によるNMJ微細構造の解析、共焦点蛍光顕微鏡による機能分子の局在解析、並びにNMJの電気生理学的な機能解析を実施した。

(4) 加齢に伴うNMJ形成不全の病態解明と治療基盤の確立
　若齢マウス（３～４ヶ月齢）と老齢マウス（２４ヶ月齢）の比較により、加齢に伴うNMJ形成不全と筋萎縮、運動機能低下との関連を解析した。さらに、AAV-D7の投与による老齢マウスのNMJ形成不全や筋萎縮、筋力・運動機能低下に対する治療効果を検証した。また、化合物による治療薬開発基盤の確立を目指し、項目(2)と同様のスクリーニング系を用いた化合物ライブラリーからのNMJ形成増強化合物の探索を進めた。

４．研究成果
(1) MuSKシグナルや新規Agrinシグナルの解明
①逆行性シグナルを含むMuSKシグナルの解明
 マウス骨格筋のNMJ形成部位において特異的に発現し、かつMuSK活性化時に発現が亢進する遺伝子群を同定した。さらに、これらの遺伝子産物のうち、MuSK活性化に応じて高度にリン酸化されるタンパク質キナーゼファミリー分子を単離し、当該キナーゼの機能阻害変異体のマウス骨格筋における過剰発現によりNMJ形成不全が惹起されることを見出し、個体におけるNMJ形成制御機能を示唆する結果が得られた。また、他の膜貫通型のタンパク質については、マウス骨格筋における発現抑制によるNMJ形成不全が観察され、やはり個体におけるNMJ形成制御機能が示唆された。上記２分子については当該分子をコードする遺伝子の全身および骨格筋特異的な欠損マウスを作出し、現在そのNMJ形成における生理的機能の解明を進めている。また、骨格筋でのDok-7発現増強時の逆行性シグナルにより発現が変動する運動神経遺伝子群をRNAseq解析により同定し、その機能解析を開始した。

②新規Agrinシグナルの解明
Agrin分子内の機能領域の解析を進め、そのC末端領域の変異体では新規Agrinシグナルが誘導できないことを示唆する結果を得た。現在、Agrin-KO;Dok-7 Tgマウスの骨格筋から、正常なC末端領域に結合し、その変異体には結合しないタンパク質の精製・同定を進めている。

(2) NMJ形成制御遺伝子の同定とNMJ形成シグナルの解明
 独自に創出したNMJ形成シグナルを指標とするスクリーニングを実施することで、複数のNMJ形成制御遺伝子候補を選定した。そのうち、膜結合型タンパク質分解酵素ファミリー分子については、マウス骨格筋における発現抑制によるNMJ形成不全の惹起が観察され、個体におけるNMJ形成制御機能が示唆された。当該分子をコードする遺伝子の欠損マウスを作出し、現在そのNMJ形成における生理的機能の解明を進めている。

(3) NMJ形成異常とNMJの構造・機能連関の理解
　Dok-7 Tgマウスにおいて、神経筋伝達は野生型マウスに対して有意に増強されたが、その程度はNMJの異常な拡張に比して軽微であった。また、電子顕微鏡によるNMJ微細構造の解析から、Dok-7 TgマウスのNMJに結合する運動神経軸索末端（前シナプス）にて神経伝達物質（ア

セチルコリン：ACh）を内包するシナプス小胞と、シナプス小胞が ACh を放出する部位(active zone）の密度の減少、並びに後シナプスを形成する筋細胞膜の褶曲構造（junctional fold）の密度と大きさの減少が明らかになった。さらに、NMJ 形成に重要なシュワン細胞のシナプス間隙への浸潤が観察され、骨格筋における Dok-7 の過剰発現は NMJ を拡張すると同時に、NMJ の微細構造に変化をもたらし、NMJ の病的な機能増強を抑制することが明らかとなった。

(4) 加齢に伴う NMJ 形成不全の病態解明と治療基盤の確立
加齢に伴って進行する NMJ における運動神経脱離（運動神経結合の喪失）および運動機能の低下が顕著な老齢マウス（２４ヶ月齢）に対し AAV-D7 による NMJ 形成増強治療を実施したところ、NMJ における運動神経結合が誘導され、NMJ を介した運動神経刺激に対する骨格筋の電気生理学的な応答、並びに運動機能と筋力の有意な増強が見出された。この発見により、加齢に伴う運動機能・筋力の低下に対する NMJ 形成増強治療の有効性が明らかとなった。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3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 Ueta R, Sugita S, Minegishi Y, Shimotoyodome A, Ota N, Ogiso N, Eguchi T, Yamanashi Y	４．巻 23
２．論文標題 DOK7 Gene Therapy Enhances Neuromuscular Junction Innervation and Motor Function in Aged Mice	５．発行年 2020年
３．雑誌名 iScience	６．最初と最後の頁 101385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101385.	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 Eguchi T, Tezuka T, Fukudome T, Watanabe Y, Sagara H, Yamanashi Y	４．巻 523
２．論文標題 Overexpression of Dok-7 in skeletal muscle enhances neuromuscular transmission with structural alterations of neuromuscular junctions: Implications in robustness of neuromuscular transmission	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	６．最初と最後の頁 214-219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.12.011.	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 Munezane H, Oizumi H, Wakabayashi T, Nishio S, Hirasawa T, Sato T, Harada A, Yoshida T, Eguchi T, Yamanashi Y, Hashimoto T, Iwatsubo T	４．巻 29
２．論文標題 Roles of Collagen XXV and Its Putative Receptors PTPσ/δ in Intramuscular Motor Innervation and Congenital Cranial Dysinnervation Disorder	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Cell Reports	６．最初と最後の頁 4362-4376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.11.112.	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 －

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　1件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 山梨裕司
２．発表標題 神経筋シナプス（NMJ）形成シグナルとNMJ標的治療
３．学会等名 第6回 日本筋学会学術集会（招待講演）
４．発表年 2020年

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計1件

産業財産権の名称	発明者	権利者
Methods and Compositions for Treatment of Age-Related Dysfunction	山梨　裕司、植田亮、杉田　聡、峯岸慶彦	国立大学法人東京大学
産業財産権の種類、番号	**出願年**	**国内・外国の別**
特許、63034506（米国仮出願）	2020年	外国

〔取得〕　計0件

〔その他〕

－

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
研究分担者	植田　亮 (Ueta Ryo) (10445025)	東京大学・医科学研究所・助教 (12601)	
研究分担者	手塚　徹 (Tezuka Tohru) (50312319)	東京大学・医科学研究所・助教 (12601)	

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関