

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390221

研究課題名(和文) 神経筋接合部の正常構築と分子病態研究

研究課題名(英文) Molecular bases and their regulations of mRNA aberrations in neuromuscular transmission defects and other muscular diseases

研究代表者

大野 欽司 (Ohno, Kinji)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80397455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法によりマウス脊髄前角細胞特異的にRspo2が発現することを見出し、Rspo2がagrinの80%のAChRクラスターリング活性を有することを明らかにした。さらにRspo2の筋側受容体がLgr5であることを明らかにし、Rspo2はagrinに次ぐ重要なAChRクラスターリング誘導因子であることを明らかにした。

先天性筋無力症候群の新規原因遺伝子としてLRP4を同定した。LRP4の第3プロペラドメイン内の部位特異的に神経筋接合部信号伝達障害ならびに骨形成障害が起きることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Laser capture microdissection of mouse spinal motor neurons revealed that Rspo2 is highly expressed in spinal motor neurons. Rspo2 induces acetylcholine receptor (AChR) clustering, which is ~80% as potent as agrin. We propose that Rspo2 is an essential AChR clustering-inducing molecule after agrin.

We identified that mutations in LRP4 cause congenital myasthenic syndrome. Mutations in the 3rd beta-propeller domain of LRP4 cause either a defect in neuromuscular signal transmission or a defect in osteogenesis in a position-specific manner.

研究分野：神経遺伝情報学分野

キーワード：先天性筋無力症候群 神経筋接合部 RSP02 LGR5 LRP4

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、先天性筋無力症候群 (congenital myasthenic syndromes, CMS) において、(1) 骨格筋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係留する collagen Q、(3) コリンアセチルトランスフェラーゼ、(4) AChR を筋終板に集積させる rapsyn、(5) 骨格筋ナトリウムチャンネル、(6) plectin の欠損分子病態の研究を行ってきた。

CMS は世界中から 800 症例以上が報告されてきたが本邦の確定診断例は研究代表者らが米国 Mayo Clinic で遺伝子診断を行った 2 例のみであった。研究代表者らは本研究において 21 例の新規 CMS 臨床診断を行い 17 例において *CHRNB1*, *CHRND*, *CHRNE*, *COLQ*, *DOK7*, *GFPT1* の 6 種類の既存遺伝子に変異を同定した。いずれも founder effect を認めない遺伝子変異であり、本邦にも欧米と同様に多くの未診断 CMS 症例が存在する可能性が示唆される。

CMS の候補原因遺伝子は脊髄前角細胞ならびに神経筋接合部 (neuromuscular junction, NMJ) の筋終板に発現する分子であるが、NMJ 構築分子の全貌はまだ明らかではない。agrin/LRP4/MuSK シグナル系が AChR クラスタリングに重要であることが報告されているが、agrin 欠損モデルマウスにおいても不完全ながら NMJ が形成される。Wnt も AChR クラスタリングに重要であるが、その受容体ならびに modulator が明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、神経筋接合部 (neuromuscular junction, NMJ) の正常分子構築をさらに明らかにするとともに CMS の分子病態解明を行うことである。研究代表者らは、本邦において 21 症例の新規 CMS 症例の遺伝子診断を行い、うち 17 症例において 6 種類の遺伝子の変異を同定した。

(2) 加えて、本研究では、NMJ の正常分子構

築をさらに解明するとともに、CMS 症例における新たな遺伝子変異を同定し、同定をされた変異分子の病態分子機構を明らかにすることにより、機能的な裏付けのある CMS 候補遺伝子を増やし、同定をした変異分子の病態分子機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 本邦 CMS 症例に対して exome capture resequencing 解析、ならびに、whole genome resequencing 解析を行い、Sanger sequencing により確認を行う。変異分子のタンパクレベル、細胞レベルにおける機能を解析する。

(2) レーザーキャプチャーマイクロディセクション法によりマウス脊髄前角細胞 (spinal motor neuron, SMN) を単離しマイクロアレイ解析ならびに RNA-seq 解析により網羅的な遺伝子発現を調べた。脊髄後角領域細胞をコントロールとして、SMN 特異的に発現をする遺伝子を同定し、ノックアウトマウスの解析を行い、NMJ に対する影響を精査する。

## 4. 研究成果

(1) 出生後呼吸促進にて呼吸管理が必要であった CMS 女児が、反復神経刺激にて 13-16% の CMAP の減衰を認め CMS の診断を受けた。抗コリンエステラーゼ剤は無効であった。17 歳時の肋間筋生筋にて神経筋接合部が不整で小さく、超微形態観察にて神経筋接合部終板サイズならびに  $\alpha$ -bungarotoxin 結合能が正常の約 50% であった。

Exome capture resequencing 解析にて LRP4 の p.Glu1233Lys (EK) ヘテロ変異と p.Arg1277His (RH) ヘテロ変異を同定した。父親は EK ヘテロ変異を持っていた。母親の DNA は採取ができなかった。EK 変異と RH 変異は LRP4 第 3 ベータプロペラドメインに存在し、p.Glu1233 と p.Arg1277 は脊椎動物

で高度に保存をされていた。

MuSK リン酸化を定量するための JNK-responsive ATF2-luciferase reporter 解析を HEK293 細胞を用いて行ったところ、EK 変異と RH 変異は、agrin 付加による ATF2 活性化を誘導できなかった。また、Western blot 解析でも、EK 変異と RH 変異は、agrin 付加による MuSK リン酸化を誘導できなかった。

TopFlash-luciferase reporter による Wnt/-catenin シグナル解析では、Wnt3a の LRP4 による抑制効果は EK 変異と RH 変異で減弱をせず、両変異は Wnt シグナル系に対して影響がないと思われた。

C2C12 マウス筋芽細胞株に対して Lentivirus-shLrp4 を導入し、内在性 Lrp4 を抑制した。この系に正常ならびに変異 LRP4 を導入したところ、agrin による MuSK リン酸化が誘導できなかった。さらに agrin によるアセチルコリン受容体のクラスタリングも誘導できなかった。

*In vitro* plate-binding assay では、EK 変異と RH 変異は、LRP4 の MuSK との結合能を低下させ、さらに LRP4 の agrin との結合能を低下させた。

第 3 ベータプロペラドメインには sclerostosis-2 の原因となる p.Arg1170Trp (RW)変異と p.Trp1186Ser (WS)変異が報告をされている。これらの変異を我々の変異と同様の手法で解析をしたところ、RW 変異と WS 変異は agrin 誘導 ATF2-luciferase 活性化に影響を与えず、LRP4-agrin 結合、LRP4-MuSK 結合にも影響を与えなかった。一方、RW 変異と WS 変異は、Wnt3a の LRP4 による抑制効果を欠損していた。

LRP4 第 3 ベータプロペラドメインの 3D モデリングを行ったところ、我々の EK 変異と RH 変異は LRP4 の第 3 ベータプロペラドメインの外周に位置し、一方、sclerostosis-2 の RW 変異と WS 変異は同ドメイン中央部に

位置することが予測をされた。

人工的なアミノ酸置換をドメイン外周部に 2 カ所(p.Ile1287Ala, IA; p.Val1252Ala, VA)、ドメイン中央部に 2 カ所(p.Tyr1256Ala, YA; p.Asn1214Ala, NA)導入し、上記と同様のアッセイを行ったところ、ドメイン外周部は agrin/LRP4/MuSK シグナル系に關与をし、ドメイン中央部は Wnt シグナル系に關与をすることが明らかになった。

(2) 正常マウス脊髄より約 2000 個の SMN を LCM 法により単離し、Affymetrix exon array 解析ならびに RNA-seq 解析を行った。脊髄後角の細胞群をコントロールとして解析を行い Wnt 関連分泌タンパク Rspo2 が SMN に特異的に高発現していることを見いだすとともに、*in situ* hybridization により確認を行った。Rspo2 は SMN 特異的なマーカーである ChAT, HB9, Isl1/2 に比べて SMN 特異性は低かったが、Rspo2 はいずれの SMN 特異的なマーカー遺伝子よりも高発現であった。また、Rspo2 は Wnt 関連タンパクの中で SMN に最も高発現であった。

Rspo2 ノックアウトマウスの解析にて、Rspo2 は脊髄における SMN 細胞数に影響を与えなかった。また横隔膜筋分化にも影響を与えなかった。Rspo2 は横隔膜神経の分岐パターンをわずかに低下させる方向に働いていた。しかし、SMN 一時培養細胞に Rspo2 を加えると、neurite の分子がむしろ増加しており、Rspo2 の neurite branching への影響は primary event とは考えられなかった。

一方、Rspo2 ノックアウトマウスは横隔膜の NMJ 領域が拡大し、NMJ における神経終末と AChR の共局在が減弱していた。電子顕微鏡でも神経終末と筋終板の構造の破壊とともに、シナプス小胞の数の減少を認めた。さらに反復神経刺激にて筋複合活動電位の異常減衰を認め、微小終板電位(MEPP)の頻度も顕著に減少していた。

培養細胞による解析では、Rspo2 は agrin

非存在下に AChR 集積活性を示した。Rspo2 による AChR 集積活性は agrin の約 80%であった。さらに NMJ に膜タンパク受容体 Lgr5 が高度に発現することを見だし、Lgr5 のノックダウンにより Rspo2 の AChR 集積活性が消失することを見いだした。さらに、免疫沈降実験により Rspo2 と Lgr5 が結合すること、Lgr5 と MuSK が LRP4 存在下に結合することを見出した。これらのことから Lgr5 が NMJ における Rspo2 の受容体であることを明らかにすることができた。

CMS の exome capture resequencing 解析, whole genome resequencing 解析において RSPO2 と LGR5 を候補遺伝子として解析を行ったが、原因遺伝子変異と思われるものは同定ができなかった。

#### 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 12 件 )

1. Azuma Y, Nakata T, Tanaka M, Shen XM, Ito M, Iwata S, Okuno T, Nomura Y, Ando N, Ishigaki K, Ohkawara B, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Sokabe M, Ohno K. Congenital myasthenic syndrome in Japan: Ethnically unique mutations in muscle nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Neuromuscular Disorders* 2015, 25: 60-69.  
DOI: 10.1016/j.nmd.2014.09.002  
( 査読有 )
2. Nasrin F, Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Takeda J, Ohno K. HnRNP C, YB-1 and hnRNP L coordinately enhance skipping of human MUSK exon 10 to generate a Wnt-insensitive MuSK isoform. *Sci Rep* 2014, 4: 6841.

DOI: 10.1038/srep06841.

( 査読有 )

3. Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Ohtsuka K. Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for dissecting the mechanisms of anti-MuSK myasthenia gravis. *J Mol Neurosci* 2014, 53: 359-361.

DOI: 10.1007/s12031-013-0170-x

( 査読有 )

4. Yamashita Y\*, Matsuura T\*, Kurosaki T, Amakusa Y, Kinoshita M, Ibi T, Sahashi K, Ohno K. LDB3 splicing abnormalities are specific to skeletal muscles of patients with myotonic dystrophy type 1 and alter its PKC binding affinity. *Neurobiol Disord* 2014, 69: 200-205. \*Equal contribution.

DOI: 10.1016/j.nbd.2014.05.026.

( 査読有 )

5. Ohkawara B, Cabrera-Serrano M, Nakata T, Milone M, Asai N, Ito K, Ito M, Masuda A, Ito Y, Engel AG, Ohno K. LRP4 third beta-propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum Mol Genet* 2014, 23: 1856-1868.

DOI: 10.1093/hmg/ddt578.

( 査読有 )

[ 学会発表 ] ( 計 16 件 )

1. Rahman MA, Nasrin F, Masuda A, Ohe K, Takeda J, Ohno K  
Alternative splicing of human MUSK exon 10 is physiologically regulated by multiple

splicing regulatory cis-elements and  
cognate trans-factors  
RNA Biology meeting, Cold Spring Harbor  
Asia Conference (Poster), Suzhou, China  
Nov 10-14, 2014

2. Ohno K, Shibata A, Okuno T, Rahman  
MA, Azuma Y, Masuda A  
IntSplice: A tool to predict aberrant  
splicing of an SNV at intronic  
positions -50 to -3  
64th Annual Meeting of the American  
Society of Human Genetics (Poster), San  
Diego, California, USA  
Oct 18-22, 2014
3. Ohno K  
Maintenance of the neuromuscular junction  
and its aberrations in hereditary and  
autoimmune disorders  
Guarda-Symposium 2014 on the Molecular  
and Cell Biology of the Neuromuscular  
System, Guarda, Switzerland  
Sep 1, 2014

〔図書〕(計 1 件)

1. Ohno K, Ohkawara B, Ito M, Engel AG.  
Molecular Genetics of Congenital  
Myasthenic Syndromes. *eLS*. John  
Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2014,  
Epub ahead of print (1-11).  
<http://www.els.net> [doi:  
10.1002/9780470015902.a0024314]

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：骨格筋増量剤及びその用途  
発明者：大野欽司、石黒直樹、飛田哲朗、松  
下雅樹  
権利者：国立大学法人名古屋大学  
種類：特許  
番号：特願 2014-176248

出願年月日：2014年8月29日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

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

### (2)研究分担者

増田 章男 (MASUDA, Akio)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：10343203

伊藤 美佳子 (ITO, Mikako)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：60444402

大河原 美静 (OHKAWARA, Bisei)  
名古屋大学・高等研究院・特任講師  
研究者番号：80589606