

令和元年5月20日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06707

研究課題名(和文) 神経筋接合部における増殖因子の役割

研究課題名(英文) The roles of growth factors in neuromuscular junction

研究代表者

大河原 美静 (Ohkawara, Bisei)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80589606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経筋接合部(NMJ)とは、脊髄運動神経と骨格筋を結ぶシナプスである。未だNMJ形態形成、成熟に関わる因子の全容が明らかでなく、既知の因子の作用機序も十分に解明されていない。本研究では、NMJ形成に関わる増殖因子やその下流のシグナル伝達経路を明らかにするために研究を行い、Rspo2やFGF18に代表される分泌因子がNMJの機能に必要なMuSKの活性化やAChRの集積を制御し、最終的にNMJの成熟や維持に関わっていることを証明した。加えて、IGF、TGFbeta、hedgehogがNMJ形成に関与する可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NMJの増殖因子の機能を知ることで、神経シナプス形成における増殖因子の役割を知るための基盤となる知識を得られる。AChRなどNMJで機能する分子の先天的な遺伝子変異によってもたらされる先天性筋無力症候群の病態研究にもつながる。

研究成果の概要(英文)：The neuromuscular junction (NMJ) is a synapse that connects the spinal motor and skeletal muscle fiber. Factors involved in NMJ morphogenesis and maturation has not been yet elucidated, and the mechanism of the known factors in NMJ has not been fully elucidated. In this study, we investigated to identify growth factors involved in NMJ formation and signal transduction pathways downstream of them. We showed that the secretion factors such as Rspo2 and FGF18 are required for NMJ function to activate MuSK activation and/or AChR. We also showed that these factors are involved in the maturation and maintenance of NMJ. In addition, we suggested that IGF, TGFbeta and hedgehog may be involved in NMJ formation.

研究分野：細胞外増殖因子とそれが活性化するシグナル伝達経路

キーワード：神経筋接合部 シグナル伝達経路 増殖因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

神経筋接合部 (Neuromuscular Junction、NMJ) は最も古くから研究が行われてきたシナプスであり、運動神経の神経終末から分泌される神経伝達物質であるアセチルコリン (acetylcholine、ACh) が、筋肉側終板に集積をしたアセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor、AChR) に結合することにより骨格筋収縮が誘発される。AChRなどNMJで機能する分子の先天的な遺伝子変異は神経筋接合部の信号伝達の欠損を引き起こし、筋力低下と易疲労性を主張とする先天性筋無力症候群の原因となる。しかし、未だNMJ形成に関わる因子の全容が明らかでなく、既知の因子の作用機序も十分に解明されていない為、原因が同定できないNMJ病態が数多く存在する。

2012年に、NMJにおけるAChRの集積には、神経細胞の神経終末より特異的に分泌される agrin が先導的な役割をしている事が報告された。agrin は筋管細胞側で発現している LRP4 と MuSK という2つの受容体型膜蛋白質と agrin/LRP4/MuSK 複合体を形成し、MuSKの細胞内ドメインをリン酸化する事により、細胞内のシグナル伝達経路を活性化する。この MuSK シグナル伝達経路は筋肉側終板に AChR の集積を促進する一方で、NMJ 近傍の核で NMJ を構成するたんぱく質の発現を誘導し、複雑な形態を持つ機能的なシナプスが形成される。ショウジョウバエでは、この agrin/LRP4/MuSK ではなく、Wnt、BMP、IGF、TGFbeta、Notch などの増殖因子が NMJ 形成に関与していることが知られている。しかし、脊椎動物では Wnt、FGF、Neuregulin 以外のシグナル伝達経路は全く同定されておらず、また agrin/LRP4/MuSK シグナル伝達経路や AChR の集積におけるその機能や役割も解析されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、Wnt、Neuregulin、FGF 以外の増殖因子が agrin が誘導する細胞内のシグナル伝達経路または NMJ 形成に影響を及ぼすのかを明らかにし、その詳細な分子作用機構を解明したい。特にショウジョウバエの解析などから BMP、IGF、TGFbeta、TNF、hedgehog、VEGF、notch という7つのシグナル伝達経路の関わりが考えられたため、これらのシグナル伝達経路を特異的に活性化もしくは阻害する化学化合物を用いて、まず各シグナル伝達経路の役割を検討した。最終的にそれぞれのシグナル伝達経路で機能する因子の NMJ における役割を筋管細胞で解析することを目的とした。本研究で、NMJ 形成に関わる新たなシグナル伝達経路を明らかにするだけでなく、個々の増殖因子やその周辺因子を同定し、その生理学的な意味を明らかにしたい。

## 3. 研究の方法

本研究の前段階として、BMP、IGF、TGFbeta、TNF、hedgehog、VEGF、notch という7つのシグナル伝達経路を細胞内外から制御する因子が NMJ 領域で多数発現していることを見出していた。そこで、研究計画は以下の3つのステップに沿って各シグナル伝達経路を解析した。

- ・ステップ1：(1)各シグナル伝達経路の agrin/LRP4/MuSK シグナル伝達経路への影響を解析
- ・ステップ2：(2)各シグナル伝達経路の AChR 集積における影響を筋管培養細胞において解析
- ・ステップ3：(3)各シグナル伝達経路を構成する個々の因子の NMJ 形成における機能解析

ステップ1は、HEK293細胞において各シグナル伝達経路を活性化する(活性化剤)もしくは抑制する化学化合物(阻害剤)を用いて、効率よく機能解析を行った。ステップ2、3では、時期特異的に筋管培養細胞を活性化剤もしくは阻害剤で処理し、各シグナル伝達経路の NMJ 形成における生理的な意味を探った。

## 4. 研究成果

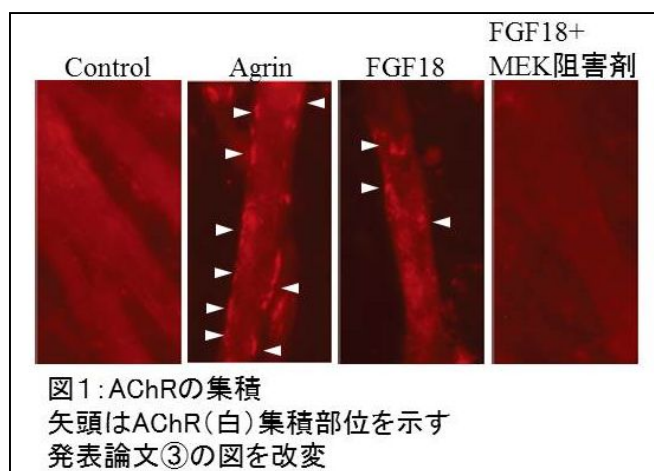
(1) ステップ1：各シグナル伝達経路のagrin/LRP4/MuSKシグナル伝達経路への影響を解析（平成28年度）

運動神経細胞より分泌され、NMJシナプス形成に重要な働きを持つagrinはその受容体であるLRP4/MuSKに結合し、その下流のシグナル伝達経路を活性化。本研究では、agrin/LRP4/MuSKがその下流としてJNKを活性化することで、転写因子ATF2の転写活性を誘導することに注目し、ATF2の活性に依存してルシフェラーゼたんぱく質を発現するATF2-Lucレポーターを用いて実験を行った。具体的には、ヒト胎児腎細胞HEK293にAgrim、LRP4、MuSKを過剰発現させルシフェラーゼたんぱく質の量を指標に、候補となる7つの分泌型増殖因子BMP、IGF、TGFbeta、TNF、hedgehog、VEGF、notchの活性化剤または阻害剤が、agrin/LRP4/MuSKシグナル伝達経路にどのように影響しているかを検討した。その結果、(1)- TNF(阻害剤Thalidomide)、notch(阻害剤DAPT)についてはこの因子の下流のシグナル伝達経路を化合物で阻害しても、レポーターの活性化度合いに変化はなかった。一方、(1)- hedgehogの阻害剤であるHPI-1はこのレポーター活性を阻害した。加えて、他のシグナル伝達経路（BMP、IGF、TGFbeta、VEGF）に関しては、活性化剤・阻害剤や濃度の結果に統一性が見られず、今後の検討課題となった。

これらの結果は、HEK293細胞においてはTNF、VEGF、notchシグナル伝達経路がAgrim/LRP4/MuSKシグナル伝達経路に直接関わらないこと、HPI-1はhedgehogシグナル伝達経路の転写因子であるGli1の阻害剤であることからGli1はagrin/LRP4/MuSKシグナル伝達経路の細胞内領域において正の役割を果たしていること、が考えられた。

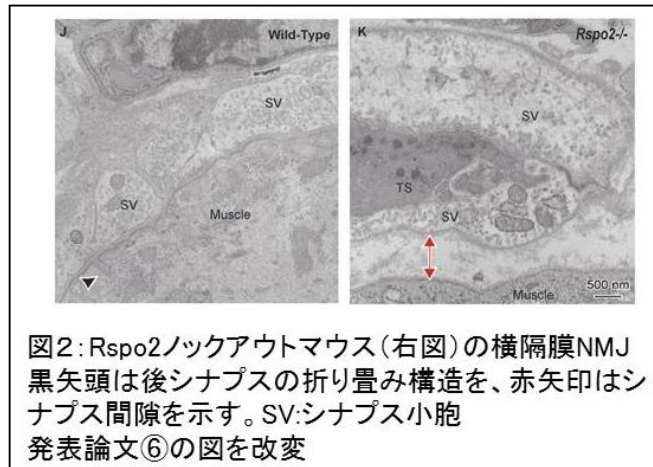
(2) ステップ2：各シグナル伝達経路のNMJ形成における影響を筋管培養細胞において解析（平成29年度）

本研究以前にFGFシグナル伝達経路の受容体であるFGFR2がAChRの集積に影響なくNMJの形態形成に必要であるという報告がされていた(Fox M.A., et al., *Cell*, 2007)。一方、本研究においてポジティブコントロールとして使用していたFGF18の研究により、(2)- 運動神経細胞で発現するFGF18がAgrimと同様にAChRの集積を誘導し、その誘導はFGF、BMPやVEGFシグナル経路の一端を担うMEK1の阻害剤であるPD98059で阻害されることがわかった(図1)。加えて、FGF18ノックアウトマウスにおいてはAChRのサブユニットの1つであるChrne、AChの分解に関わるCo1qやAche、加えてLrp4遺伝子の発現が抑制されていることもわかった。さらに、この結果はNMJの形態形成や機能が異常になることと一致した。この結果から、AChRの集積やその後のNMJ形態形成を様々なシグナル伝達経路がagrin/LRP4/MuSKシグナル伝達経路を介さずに制御していることが考えられ、(1)で想定した7つのシグナル伝達経路がC2C12筋管細胞においてAChRの集積を制御している可能性がまだ残っていると考えた。そこで、これらの活性化剤と阻害剤を用いて、Agrimが誘導するAChRの集積を解析した。具体的には、C2C12筋芽細胞を5日間2%ウマ血清培地で培養することで筋管細胞に分化させ、その細胞にAgrimと活性化剤もしくは阻害剤を添加して18時間後にAChRの集積を染色で確認した。その結果、(2)- BMP(PD98059)、IGF(BV02)、TGFbeta(SD208)、TNF(Thalidomide)、notch(DAPT)を添加しても筋管細胞のサイズに変化はなく、またagrinが誘導



するAChRの集積にも変化を及ぼさなかった。ダンシルカダヴェリンはシグナル伝達経路の多くがそれを活性化する際に必要としているクラスリン依存型のエンドサイトーシスを阻害する。

(2)- AChRの集積に関して、ダンシルカダヴェリンを含むいくつかの化学化合物は筋肉細胞のサイズを縮小させた。一方、面白い事にこの実験でポジティブコントロールとして使用していた



Wntシグナル伝達経路の研究により、(2)- Wntシグナル伝達経路の阻害剤でもAChRの集積に対して阻害するものと阻害しない、もしくは活性化するものがあることが確認された。また、(2)- Wntシグナル伝達経路を活性化する細胞外分泌因子Rspo2のノックアウトマウスにおいてはMuSKのリン酸化やAChRの集積に加え、NMJの形態形成やそのシナプス機能が阻害されることがわかった(図2)。アノマイシンはBMP、TGFbeta、VEGF、FGFが活性化するシグナル伝達経路の一端を担うMAPキナーゼを活性化する。(2)- アノマイシンを含むいくつかの化学化合物は筋間細胞のサイズを変化させずに、agrinが誘導するAChRの集積に影響を及ぼした。しかし、(2)- AChRの集積を測定する方法は従来の予想通りダイナミックレンジ狭い事もわかった。

以上の結果から、agrin/LRP4/MuSKシグナル伝達経路やAChRの集積に対して各シグナル伝達経路が一方向で作用しているのではなく、各シグナル伝達経路を構成する因子のそれぞれが異なったメカニズムで作用していることが予想された。

(3)ステップ3:各シグナル伝達経路を構成する個々の因子のNMJ形成における機能解析(平成30年度)

(2)-の結果から1つのシグナル伝達経路を構成する因子が同様の役割を持つわけではないことが予想されたことから、シグナル伝達経路を構成する複数の因子を対象にした研究をすすめる必要があった。また、本来個々の因子の作用をshRNAを用いて内在の遺伝子の発現をノックダウンし効果を検討する予定であったが、機能するshRNAを設計・合成・探索するには時間がかかる。現在の所、TNFとnotch以外の5つのシグナル伝達経路がAChRの集積を制御する可能性があったため、特に効果が強かったTGF、IGFシグナル伝達経路に関与する構成因子の研究に集中し、これら因子の阻害剤もしくは活性化剤を複数追加して、(2)の実験を再度繰り返した。またこの(2)の実験結果はダイナミックレンジが狭いことから、さらにコントロールとして、平成29年3月にNMJにおけるAChRの集積に必要であると報告されたYAPシグナル伝達経路(Zhao K et al., J.Neurosci, 2017)の阻害剤であるヴェルテポルフィンを追加した。この結果、(3)- IGF、TGF、hedgehogシグナル伝達経路、様々な経路の下流で機能するMAPシグナル伝達経路の活性化剤や阻害剤はAChRの集積に対して一定の効果が得られたため、今後報告する予定である。

以上の結果は、IGF、TGF、hedgehogシグナル伝達経路はほ乳類細胞においてAChRの集積に影響すると結論付けられた。一方、Rspo2やFGF18に代表される分泌因子はagrin/LRP4/MuSKシグナル伝達経路やAChRの集積に多段階で影響したりもしくは影響せずに、最終的なNMJの成熟や維持に関わっている可能性が示唆された。この事は、BMP、IGF、TGFbeta、TNF、hedgehog、VEGF、notchが何らかの形で最終的なNMJの成熟や維持に関わっている可能性を完全否定するものではない事を意味し、今後の研究につなげたいと考えている。

5 . 主な発表論文等  
( 研究代表者は下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 8 件 )  
すべて査読有

Okura T, Ohkawara B, Takegami Y, Ito M, Masuda A, Seki T, Ishiguro N, Ohno K., Mianserin suppresses R-spondin 2-induced activation of Wnt/  $\beta$ -catenin signaling in chondrocytes and prevents cartilage degradation in a rat model of osteoarthritis. *Sci Rep*. 2019 Feb 26;9(1):2808 査読有, doi: 10.1038/s41598-019-39393-x.

Ito, K., Ohkawara, B., Yagi, H., Nakashima, H., Tsushima, M., Ota, K., Konishi, H., Masuda A., Imagama S., Kiyama, H., Ishiguro, N., and \*Ohno K., Lack of Fgf18 causes abnormal clustering of motor nerve terminals at the neuromuscular junction with reduced acetylcholine receptor clusters. *Sci. Rep.*, 2019 Jan 11;8(1):434. 査読有, doi: 10.1038/s41598-017-18753-5.

Li J, Ito M, Ohkawara B, Masuda A, Ohno K., Differential effects of spinal motor neuron-derived and skeletal muscle-derived Rspo2 on acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction. *Sci Rep*. 2018 Sep 11;8(1):13577. 査読有, doi: 10.1038/s41598-018-31949-7.

Miyamoto, K., Ohkawara, B., Ito, M., Masuda, A., Hirakawa, A., Sakai, T., Hiraiwa, H., Hamada, T., Ishiguro, N., and Ohno, K., Fluoxetine ameliorates cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *PLoS One*. 2017 Sep 19;12(9):e0184388. 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0184388.

Lin, Y., Ohkawara, B., Ito, M., Misawa, N., Miyamoto, K., Takegami, Y., Masuda, A., Toyokuni, S., and \*Ohno, K., Molecular hydrogen suppresses activated Wnt/  $\beta$ -catenin signaling. *Sci Rep*. 2016 Aug 25;6:31986. 査読有, doi: 10.1038/srep31986.

Takegami, Y., Ohkawara, B., Ito, M., Masuda, A., Nakashima, H., Ishiguro, N., and \*Ohno, K., R-spondin 2 facilitates differentiation of proliferating chondrocytes into hypertrophic chondrocytes by enhancing Wnt/  $\beta$ -catenin signaling in endochondral ossification. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Apr 22;473(1):255-64. 査読有, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.03.089.

Nakashima, H., Ohkawara, B., Ishigaki, S., Fukudome, T., Ito, K., Tsushima, M., Konishi, H., Okuno, T., Yoshimura, T., Ito, M., Masuda, A., Sobue, G., Kiyama, H., Ishiguro, N., and \*Ohno K., R-spondin 2 promotes acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction via Lgr5. *Sci Rep*. 2016 Jun 22;6:28512. 査読有, doi: 10.1038/srep28512.

Selcen, D., Ohkawara, B., Shen, X.M., McEvoy, K., Ohno, K., and \*Engel, A.G., Impaired Synaptic Development, Maintenance, and Neuromuscular Transmission in LRP4-Related Myasthenia. *JAMA Neurol*. 2015 Aug;72(8):889-96. 査読有, doi: 10.1001/jamaneurol.2015.0853.

[ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

大河原美静, Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in chondrocytes for cartilage degradation of osteoarthritis、分子生物学会ワークショップ、2018年11月28日、

Bisei Ohkawara、Mianserin suppresses R-spondin2-induced activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in chondrocytes、Wnt Research Conference、2018年9月12 - 14日

Bisei Ohkawara、Wnt-related molecules at mammalian neuromuscular junction、Wnt Gordon Research Conference、2017年8月6 - 11日

大河原美静、神経筋接合部の構成因子としてのCTGFの役割、CCNファミリー研究会、2016年8月27日

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 1 件 )

名称 : R - スポンジン 2 による Wnt/ $\beta$ -カテニン

発明者 : 大河原美静、大野欽司、大倉俊昭、石黒直樹

権利者 : 名古屋大学

種類：特許  
番号：2018-050199  
出願年：2018  
国内外の別：国内

取得状況（計1件）

名称：末梢神経障害治療薬  
発明者：大野欽司、石黒直樹、大河原美静、八木秀樹  
権利者：国立大学法人名古屋大学、大日本住友製薬  
種類：特許  
番号：特願 2017-543552(P2017-543552)  
取得年：2017  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

研究分担者、研究協力者  
なし

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、研究者個人に帰属されます。