

令和元年5月26日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01851

研究課題名(和文) 神経筋シナプスを標的としたサルコペニアのバイオマーカー確立に向けた研究

研究課題名(英文) Establishment of biomarker targeting neuromuscular junction in sarcopenia

研究代表者

森 秀一 (Mori, Shuichi)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：30508677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経筋シナプス(運動神経と骨格筋のつなぎ目)の構造維持に必須の分子であるMuSK (muscle-specific kinase) がサルコペニアのバイオマーカーとして有用ではないかと考え、筋萎縮のモデル動物を用いて、MuSKの血中濃度と病態の関係からその特徴を明らかにすることを目的とした。血中MuSKは神経筋シナプスの状態を忠実に反映し、簡易的に測定可能であることから、サルコペニアや筋萎縮性側索硬化症(ALS)の前臨床試験において治療効果をモニタリングできるバイオマーカーとして利用可能であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、筋量の低下を検出するために用いられている画像診断やバイオマーカーは長期間の経過観察を必要とする。一方、本研究で用いたバイオマーカーはサルコペニアの発症機序に基づく特異性の高い分子を標的とするため、その変化は「筋量」ではなく「筋萎縮に至るシグナル」を反映することになる。それ故、筋萎縮の前駆症状を既存のバイオマーカーよりも短期間の観察で簡易的に検出することが可能である。これにより、筋萎縮の早期の検出と治療開始が可能になっていくと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Several lines of evidence indicate disassembly of neuromuscular junction (NMJ) in aged muscles, suggesting that dying-back axonal degeneration is involved with pathology of sarcopenia as well as that of ALS. Therefore, development of biomarkers that reflects condition of NMJ is important for early detection and monitoring of altering motor function so that more timely interventions may ensure.

MuSK (muscle-specific kinase), a receptor-type tyrosine kinase, plays an essential role in maintaining integrity of NMJ. Although MuSK is a transmembrane protein, we detected extracellular region of MuSK protein in mouse serum. In this study, we demonstrated that serum MuSK protein has potential to more easily and accurately detect condition of NMJ using animal model for muscle atrophy and provide evidence that it is an available marker for evaluating progression and therapeutic benefit in preclinical studies of sarcopenia and ALS.

研究分野：神経筋生理学・生化学

キーワード：神経筋シナプス バイオマーカー MuSK

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

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会に突入しつつある現在の日本にとって、サルコペニア（加齢に伴う筋萎縮と筋力の低下）への対策が社会的要請の強い重要な課題となってきた。現在、サルコペニアの診断は筋量の減少を画像解析で検出する方法が主に用いられているが、これらの測定は大型の機器を必要とすることに加え、サルコペニアのリスクが高い高齢者を早期に見出すことは難しい。サルコペニアを迅速に診断して適切な治療を早期に開始するためにも、骨格筋の状態を正確にモニタリングし、低コストで利用できる血中バイオマーカーを所定の臨床診療に取り入れることが望まれている。しかし、これまで検討されてきたサルコペニアに関連した血中バイオマーカーは筋萎縮に対して特異的ではなく、臨床症状との相関も弱いという欠点がある。従って、サルコペニアの発症機序に基づいた特異性の高い分子を探索することがバイオマーカー同定の近道であると考えられるようになってきた。

近年、運動神経と骨格筋のつなぎ目である末梢の神経筋シナプスから中枢の運動神経細胞へと徐々に変性が生じるという「dying-back 仮説」がサルコペニアの有力な機序として提唱されている。特に、刺激伝達の効率化のために複雑に特殊化されている神経筋シナプスの形態が変化することはサルコペニア発症の primary event と見なされており、この変化を反映する分子が特異性の高いバイオマーカーになり得ると考えられていた。

2. 研究の目的

神経筋シナプスの筋側に特異的に発現する受容体型チロシンキナーゼの MuSK (muscle-specific kinase) は神経筋シナプスの構造維持に必須の分子であり、その機能が抑制されると神経筋シナプスの変性が引き起こされて筋萎縮・筋力低下が生じる。MuSK は本来、受容体型タンパク質として細胞膜に固定されている分子であるが、これまでにマウスの血清中に MuSK の細胞外ドメインが遊離して存在していることが確認された。膜貫通タンパク質の遊離という特異的な反応が筋萎縮に至る機序を反映している可能性が高いと考え、MuSK がサルコペニアのバイオマーカーとして有用ではないかという仮説を立てた。本研究では、筋萎縮のモデル動物を用いて、筋および神経筋シナプスの機能・形態の変化を経時的に解析することで、MuSK の血中濃度と病態の関係からバイオマーカーとしての MuSK の特徴を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

全ての動物実験は東京都健康長寿医療センター研究所・動物実験委員会の承認を得て行った。

(1) 除神経による筋萎縮モデルの作製

麻酔状態のマウスの殿部の筋を切開して坐骨神経を露出させた。持続的な除神経を誘導する際には、坐骨神経を約 5 mm 切除し、3 日後、7 日後、14 日後に血清と筋を採取した。また、一過性の除神経後に再神経支配を誘導する際には、坐骨神経を極細ピンセットの先端で 30 秒圧迫して挫滅させ、7 日後、14 日後、28 日後に血清と筋を採取した。コントロールのマウス (Sham) には筋の切開による坐骨神経の確認のみを行い、除神経マウスと同様に血清と筋を採取した。

(2) 神経筋機能の測定

Toe spread test では、マウスの後肢の指の開き具合を観察して得点化 (0~2 点) した。Wire hanging test では、マウスが回転させた金網に捉まっている時間 (最長 90 秒) を測定した。

(3) 血清 MuSK 濃度の測定

AlphaLISA (PerkinElmer) による定量アッセイ系を構築した。抗 MuSK モノクローナル抗体 A を AlphaLISA アクセプタービーズに化学結させ、ビオチン標識した抗 MuSK モノクローナル抗体 B をストレプトアビジンドナービーズ結合させた。2 つのモノクローナル抗体が MuSK タンパク質に結合すると 2 種のビーズが近接して発光シグナルが検出されるため、シグナルの検量線を作成して血清中の MuSK 濃度を定量した。

(4) 神経筋シナプスの形態解析

マウスの前頸骨筋の縦断切片を作製して免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。プレシナプス側の運動神経終末の染色には抗 synaptophysin 抗体を使用し、ポストシナプス側の AChR 凝集の染色には蛍光標識した α -bungarotoxin を使用した。AChR 凝集上の synaptophysin の染色領域を基にしてシナプスの神経支配状況を評価した。また、抗 MuSK 抗体を使用して、AChR 凝集上 (シナプス領域) とそれ以外の領域 (シナプス領域外) での染色性を比較した。

(5) MuSK タンパク質の検出

抗 MuSK 抗体を用いてマウスの腓腹筋のホモジネートまたは血清から MuSK タンパク質を免疫沈降させ、ウェスタンブロット (IP-WB) によって検出した。

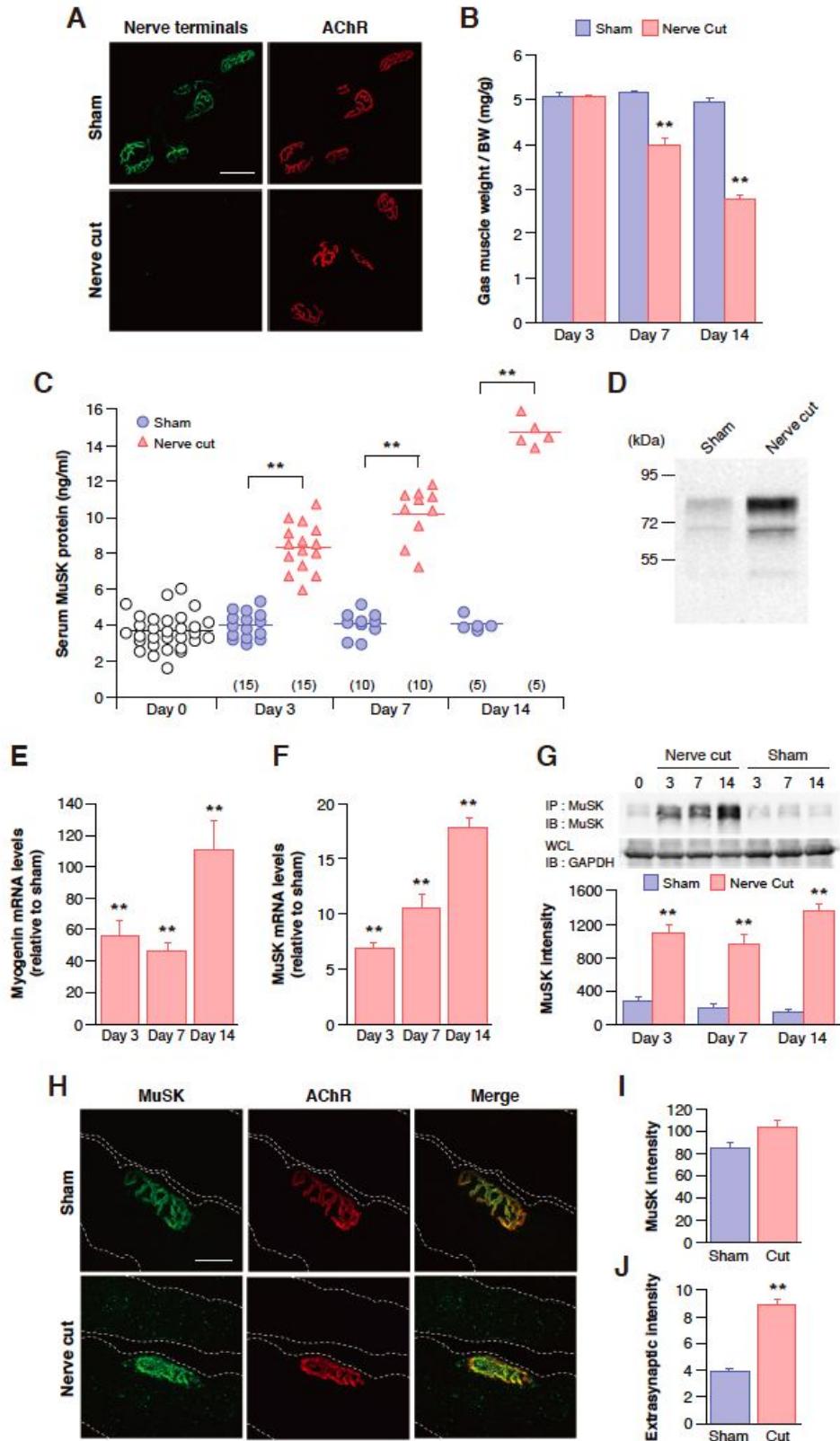
(6) 骨格筋の遺伝子発現解析

マウスの腓腹筋から回収した RNA から cDNA を合成し、リアルタイム PCR によって myogenin と MuSK の遺伝子発現レベルを相対定量した。内部標準遺伝子として GAPDH を用いた。

4. 研究成果

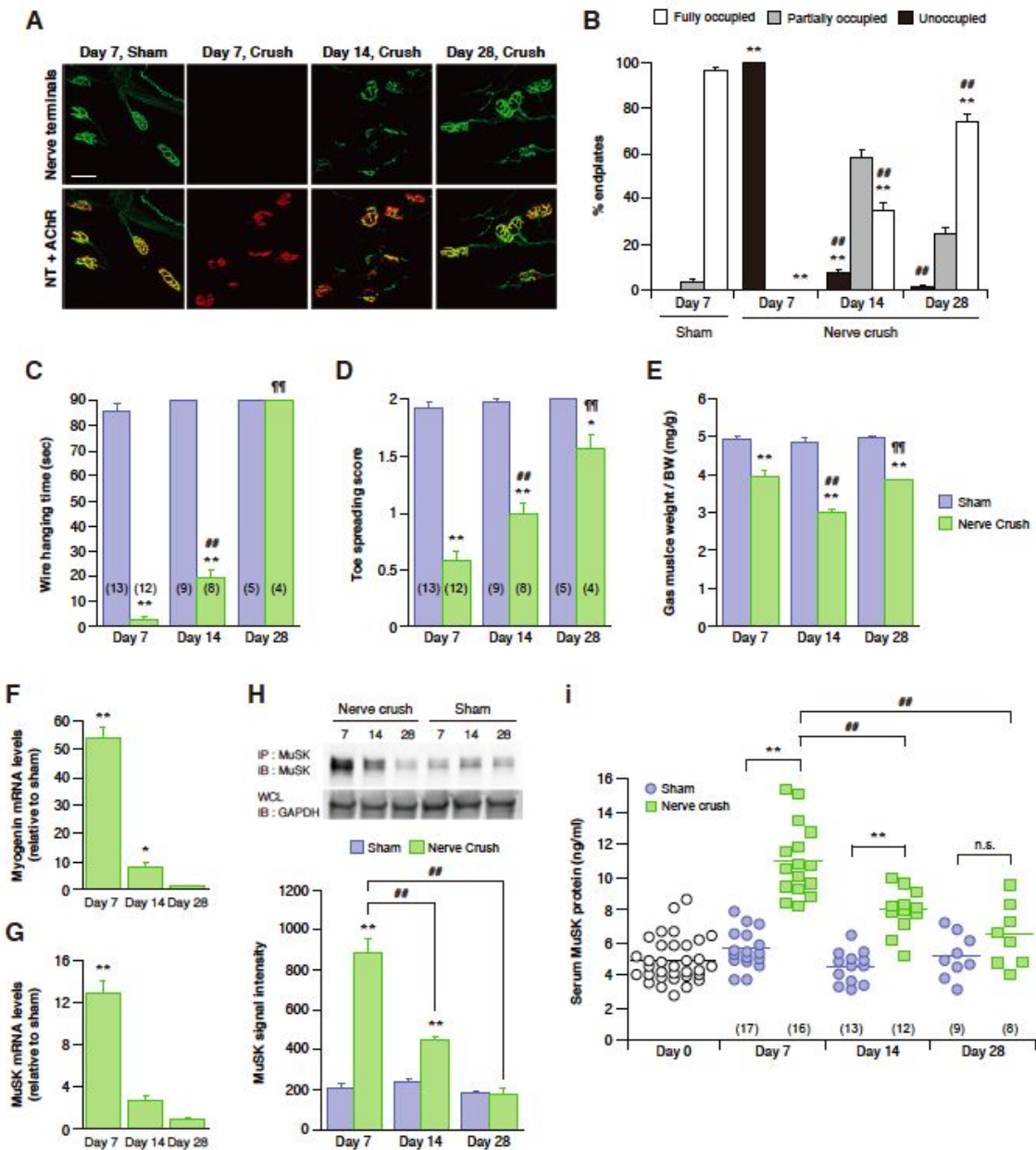
(1) 血中 MuSK 濃度は筋の除神経によって増加する

坐骨神経の切除によって急速 (3 日以内) に下肢の筋の除神経が生じ [図 A]、その後 (7 日後以降) に筋重量の低下が認められた [図 B]。一方、切除 3 日後には血清中の MuSK 濃度の有意な上昇が認められた [図 C]。マウスの血清を用いた IP-WB でも MuSK が検出され [図 D]、質量分析では細胞外領域のペプチド断片が複数同定された。従来、MuSK の発現は神経筋シナプスの領域に局在しているが [図 H]、筋の除神経は筋特異的な転写因子である myogenin の発現上昇を誘導し [図 E]、それによって MuSK の mRNA およびタンパク質の発現上昇を筋全体 (神経筋シナプス領域外) で誘導する [図 F~J]。従って、血中 MuSK 濃度は神経筋シナプスで生じている神経支配の変化 (除神経) を反映し、筋量の低下に先行して上昇することが示された。



(2) 血中 MuSK 濃度は筋の再神経支配に応じて可逆的に変化する

坐骨神経の挫滅によって一過性に筋の除神経が生じるが、その後 (7 日後以降) は筋の神経支配が徐々に回復し [図 A, B]、神経筋機能にも改善が認められた [図 C, D]。一方、筋量の回復は再神経支配よりもやや遅れて (14 日後以降) 認められた [図 E]。Myogenin の mRNA レベルと同様に、MuSK の mRNA およびタンパク質の発現は除神経によって一過性に上昇するが、再神経支配に伴って徐々に減少し、基底状態へと戻った [図 F~H]。同様に、血清中の MuSK 濃度も一過性的上昇と基底状態への回帰が認められた [図 I]。従って、血中 MuSK 濃度は筋の神経支配状況を反映し、筋量の変化に先行して可逆的に変化する事が示された。



近年、サルコペニアや筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では、「dying-back pathology」によって神経筋シナプスが治療標的として注目されてきており、前臨床試験で多くの治療法や治療薬が検討されている。血中 MuSK タンパク質は神経筋シナプスの状態を忠実に反映し、簡易的に測定可能であることから、これらの治療効果をモニタリングできるバイオマーカーとして利用可能であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- (1) Motohashi N, Uezumi A, Asakura A, Ikemoto-Uezumi M, Mori S, Mizunoe Y, Takashima R, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Shigemoto K. Tbx1 regulates inherited metabolic and myogenic abilities of progenitor cells derived from slow- and fast-type muscles. *Cell Death Differ* in press, 2018 (査読あり). DOI: 10.1038/s41418-018-0186-4.

- (2) 重本 和宏, 森 秀一, 本橋 紀夫, 高嶋 留美. サルコペニア・フレイルの基礎研究の現状. *日本臨床* 76: S189-S193, 2018 (査読なし).
- (3) 重本 和宏, 森 秀一, 本橋 紀夫, 高嶋 留美. サルコペニアの概念とその診断方法. *病理と臨床* 36: 128-134, 2018 (査読なし).
- (4) 重本 和宏, 森 秀一, 本橋 紀夫, 高嶋 留美. フレイルのバイオマーカー探索. *診断と治療のABC* 137: 67-73, 2018 (査読なし).
- (5) 重本 和宏, 森 秀一, 本橋 紀夫, 高嶋 留美. サルコペニア・フレイルのメカニズムと脳卒中. *分子脳血管病* 17: 119-122, 2018 (査読なし).
- (6) Mori S, Motohashi N, Takashima R, Kishi M, Nishimune H, Shigemoto K. Immunization of mice with LRP4 induces myasthenia similar to MuSK-associated myasthenia gravis. *Exp Neurol* 297: 158-167, 2017 (査読あり). DOI: 10.1016/j.expneurol.2017.08.006.
- (7) Nishimune H, Badwi Y, Mori S, Shigemoto K. Dual-color STED microscopy reveals a sandwich structure of Bassoon and Piccolo in active zones of adult and aged mice. *Sci Rep* 6: 27935, 2016 (査読あり). DOI: 10.1038/srep27935.
- (8) 重本 和宏, 森 秀一, 本橋 紀夫. サルコペニアにおける神経系の関与. *診断と治療のABC* 112: 40-46, 2016 (査読なし).
- (9) 重本 和宏, 森 秀一, 本橋 紀夫, 高嶋 留美. サルコペニア・フレイルの基礎. *腎と透析* 80: 617-621, 2016 (査読なし).

〔学会発表〕(計5件)

- (1) 森 秀一. NMJ 由来タンパク質の血中バイオマーカーとしての有用性の検討. 第73回日本体力医学会大会, 2018.
- (2) 森 秀一. 抗Lrp抗体陽性重症筋無力症の自己免疫動物モデルの作成と病態解析. 第5回若手による骨格筋細胞研究会, 2017.
- (3) 森 秀一. Lrp4 の機能抑制による神経筋刺激伝達の変化. 第72回日本体力医学会大会, 2017.
- (4) Mori S. Generation of experimental model of myasthenia gravis with anti-Lrp4 antibodies via active immunization. 第40回日本神経科学大会, 2017.
- (5) 森 秀一. 抗Lrp4抗体陽性重症筋無力症のマウス病態モデルの作成. 第5回日本比較病理学研究会, 2017.

〔その他〕

ホームページ等

https://www.tmghig.jp/research/publication/news/pdf/rj_no284.pdf