

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06127

研究課題名(和文) 神経筋シナプス形成関連因子の網羅的探索と解析

研究課題名(英文) Elucidation of molecules and signaling pathways regulating neuromuscular junction formation

研究代表者

植田 亮 (Ueta, Ryo)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：10445025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経筋シナプス(NMJ)は運動神経と骨格筋の筋繊維(筋管)を結び、個体の運動制御に必須のシナプスである。その形成には筋管に存在する受容体型キナーゼMuSKと、その活性化により惹起される「NMJ形成シグナル」の駆動が重要である。「NMJ形成シグナル」の解明は、NMJ異常に起因する筋無力症に加え、筋萎縮性側索硬化症や加齢性の筋萎縮に伴う運動機能・筋力低下において観察される、NMJ形成不全に対する治療法確立において重要な位置付けにある。本研究においては、独自のスクリーニング系を構築し、NMJ形成関連分子候補を単離した。また、加齢に伴う運動機能低下に対するNMJ形成増強による治療に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は我々の運動機能制御に必須のNMJについて、その成り立ちの理解を深める点において学術的な意義を有する。加えて、本研究成果は、NMJ形成増強治療が加齢性の運動機能・筋力低下に有効である可能性を提示するもので、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社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：Neuromuscular junction (NMJ) is an essential synapse between motor neuron and skeletal muscle. The NMJ formation requires muscle specific receptor kinase MuSK and "NMJ formation signal" that is driven by MuSK activation. To elucidate the mechanisms underlying NMJ formation, we have constructed the high-throughput screening system and identified candidate molecules that regulate NMJ formation. Moreover, we successfully enhanced the motor function and muscle strength of aged mice by modulating NMJ formation signal.

研究分野：分子生物学

キーワード：神経生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経筋接合部 (NMJ) は運動神経の軸索末端と骨格筋の筋管 (筋繊維) を結ぶシナプスであり、個体の運動機能の制御に必須の役割を担う。NMJ においては、前シナプスから放出された神経伝達物質アセチルコリン (ACh) が、後シナプスに高度に凝集したアセチルコリン受容体 (AChR) に結合することで、神経の興奮が筋肉に伝達される。図 1 に NMJ 形成メカニズムの概要を模式的に示した。AChR 凝集を始めとする NMJ の後シナプス形成において、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ MuSK が必須の役割を担う。MuSK は共受容体 Lrp4 を介して運動神経由来の分泌タンパク質 Agrin によって活性化される。さらに所属研究室では、筋管内の Dok-7 が MuSK 活性化、ひいては NMJ 形成に必要であることを明らかにしていた。

NMJ の形成不全は、NMJ 異常に起因する筋無力症のみならず、筋ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) など、種々の神経筋疾患や加齢性筋萎縮・運動機能低下にも認められる。特に ALS については、遠位における NMJ 変性がより近位の軸索変性や運動神経の脱落を引き起こすという「dying-back」仮説が提唱されており、ALS モデルマウスに対し、人為的に NMJ 形成を促進させることで、NMJ からの軸索の離脱が抑制され、運動機能低下が軽減されることが、所属研究室を始め複数のグループにより報告されていた。以上の事実から、NMJ 形成メカニズムの理解は、幅広い神経・筋疾患の病態解明・治療法確立において重要な命題であることが認識されていた。

NMJ 形成においては、AChR 凝集のみならず後シナプス領域の核や細胞膜の形態や機能、遺伝子発現やシナプス間隙の構成成分等に特異的な変化が惹起され、多様な分子により構成されるシグナル経路の関与が予想されていた。加えて、Dok-7 の筋特異的過剰発現による MuSK 活性化が、前シナプスの拡大をも誘導する事実は、筋から運動神経への逆行性シグナルの存在も示唆していた。しかしながら、緩急開始当初、この経路で中核を担うと考えられている MuSK 活性化のメカニズム、および AChR が結合タンパク質である Rapsyn 等の関与により凝集するメカニズムについての解析は、代表者等の研究成果も含め進展が見られていたが、その間を繋ぐ「NMJ 形成シグナル」の実体についてはブラックボックスとされていた。

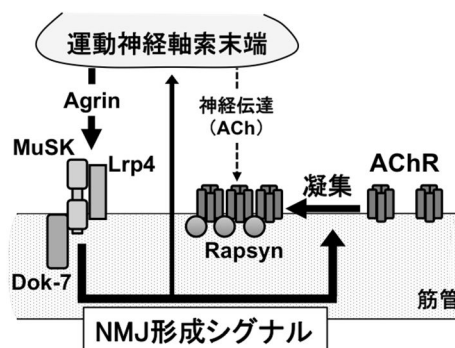


図 1 : NMJ 形成メカニズムの模式図。Agrin および Dok-7 により活性化された MuSK は未知の「NMJ 形成シグナル」経路を駆動する。「NMJ 形成シグナル」は AChR 凝集の形成を始めとする後シナプス構造の形成を惹起し、加えて前シナプス形成にも関与すると考えられる。

2. 研究の目的

以上の研究背景を踏まえ、本研究では、独自開発のハイスループットスクリーニング (HTS) による新たな NMJ 形成制御遺伝子の同定と NMJ 形成シグナルの理解を目的とした。その上で、NMJ 形成異常のシグナル、NMJ 構造・機能の観点からの理解を深め、特に高齢化社会の重要課題である加齢に伴う筋萎縮・運動機能低下における NMJ 形成不全の関与の解明と、その新たな治療基盤確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) HTS による 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した遺伝学的手法に基づくハイスループットスクリーニング (HTS) 系を利用して NMJ 形成制御遺伝子を網羅的に探索した。同定された NMJ 形成制御遺伝子候補について、アデノ随伴ウイルス (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) 加齢性運動機能・筋力低下における NMJ 形成不全の関与の解明とその治療法の開発

上述の通り、加齢に伴う筋萎縮や運動機能低下への NMJ 形成異常・機能低下の関与が指摘されていた。所属研究室では、ヒト DOK7 を過剰発現する AAV ベクター (AAV-D7) の投与により NMJ の形成を増強する治療法を開発し (NMJ 形成増強治療)、当該治療がある種の筋無力症や筋ジ

ストロフィー、筋萎縮性側索硬化症等の NMJ 形成不全を伴う多様な神経筋疾患モデルマウスの運動機能や生存期間を改善することを報告していた。加齢性運動機能低下における NMJ の役割を明確にし、かつ NMJ 形成増強治療の加齢性運動機能低下に対する有効性を検討するために、老齢マウス（2 年 齢；生存率は約 75%、NMJ の脱神経や運動機能の低下が顕著であり、加齢に伴う神経筋機能の解析に広く用いられている）に対する AAV-D7 投与を実施した。治療群・非治療群の NMJ 形態・機能、および筋萎縮の程度を、前後シナプスに局在する分子の蛍光免疫染色、運動神経の電気刺激に対する骨格筋の電気生理学的応答（複合筋活動電位；CMAP）の測定、および筋断面積の測定により評価した。また、治療前後の運動機能・筋力をロタロッド試験及び電気刺激に反応した骨格筋収縮力の測定により評価した。

4. 研究成果

(1) HTS による NMJ 形成制御遺伝子同定と NMJ 形成シグナル解明

独自に創出した NMJ 形成シグナルを指標とした HTS を実施し、NMJ 形成制御遺伝子候補群を同定することができた。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。

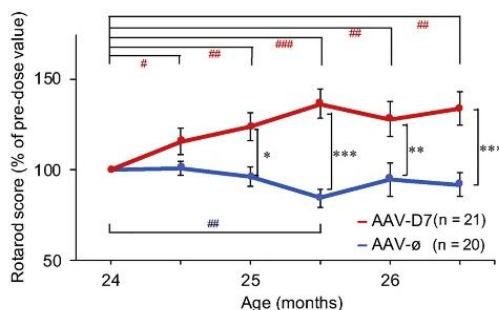


図5: AAV-D7 投与による老齢マウスの運動機能強化。治療群 (AAV-D7)、非治療群 (AAV-ø) の運動機能の変化を投与後 2 週ごとのロタロッド試験により評価した。

(2) 加齢性運動機能・筋力低下における NMJ 形成不全の関与の解明とその治療法の開発

AAV-D7 を 2 年 齢マウスに投与したところ、NMJ 形成の増強が観察され（図 2）、投与 4 か月後には加齢に伴い低下していた運動神経による骨格筋支配（脱神経）が改善していた（図 3）。

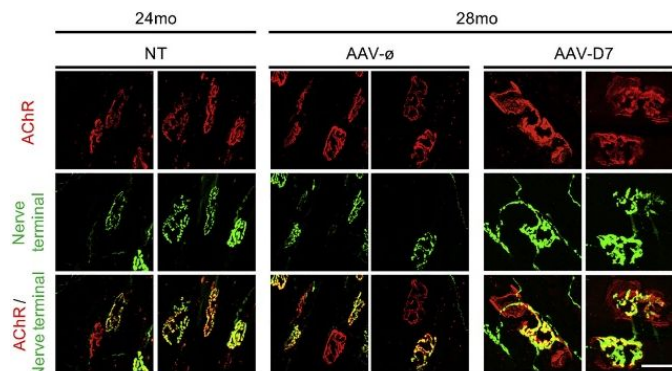


図2: AAV-D7 投与による老齢マウスの NMJ 形成増強。2 年 齢のマウスに対して NMJ 形成増強治療を施して 4 か月が経過した群 (28mo, AAV-D7)、空ベクターを投与した非治療群 (28mo, AAV-ø)、および治療を施す前の群 (24mo, NT) の後肢筋における NMJ 後シナプス (AChR, 赤) と前シナプス (Nerve terminal (24mo, AAV-D7)), 緑) を蛍光免疫染色により観察した。

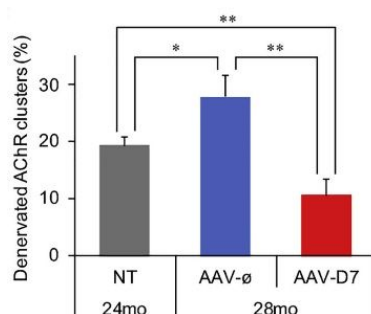


図3: AAV-D7 投与による老齢マウスの NMJ 脱神経の改善。図 2 で示した治療群 (28mo, AAV-D7)、非治療群 (28mo, AAV-ø)、および治療前群 (24mo, NT) の NMJ 蛍光染色像において、脱神経が生じた NMJ の割合 (運動神経による支配を受けていない AChR の割合) を算出した。

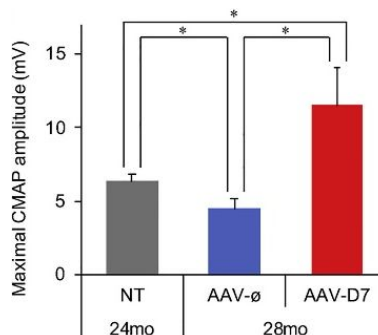


図4: AAV-D7 投与による老齢マウス複合筋活動電位の増強。治療群 (28mo, AAV-D7)、非治療群 (28mo, AAV-ø)、および治療前群 (24mo, NT) の坐骨神経刺激に応じて後肢筋 (前脛骨筋) に生じる複合筋活動電位を測定した。

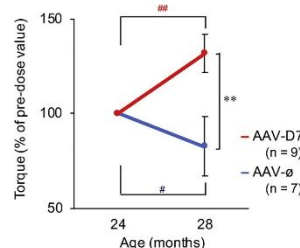


図6: AAV-D7 投与による老齢マウス筋力の強化。治療群 (AAV-D7)、非治療群 (AAV-ø) の投与前及び投与 4 か月後の筋力を電気刺激に反応した骨格筋の収縮力の測定により評価した。

またこの時、複合筋活動電位は非治療群及び治療を施す前に比して高値を示し（図4）、NMJ機能の改善の可能性が示唆された。

さらに、非治療群においては運動機能・筋力は加齢に伴い低下するのに対し、治療群においては治療前よりも強化されていた（図5、6）。

以上の結果から、加齢に伴う運動機能・筋力低下にNMJにおける脱神経の進行とNMJ機能異常が関与することが明確となり、NMJ形成増強治療によるNMJの運動神経支配の強化が加齢に伴う運動機能・筋力低下の有効な治療手段であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ueta Ryo, Sugita Satoshi, Minegishi Yoshihiko, Shimotoyodome Akira, Ota Noriyasu, Ogiso Noboru, Eguchi Takahiro, Yamanashi Yuji	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 ~ 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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		
英国	University of Oxford		