

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00496

研究課題名（和文）NMJ形成シグナルの理解に基づく多様な神経筋疾患の克服

研究課題名（英文）Signaling in NMJ formation and therapeutic intervention against neuromuscular disorders

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） 34,800,000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・維持に必須であり、その異常がNMJ形成不全（DOK7型筋無力症と命名）の原因となることを発見した。さらに、NMJ形成を増強する遺伝子治療技術を創出し、加齢変容を含む多様なNMJ形成不全に対する有効性を実証した。本研究では独自に見出したタンパク質リン酸化シグナルとカルシウム関連シグナルによるNMJ形成・維持と運動機能制御の重要性を解明し、CaMKII を標的とする筋萎縮治療技術の開発を進めた。さらに、それらの作用機構の解明を進めると共に、新規NMJ標的治療開発の基礎研究を推進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記の「研究成果の概要」で述べた通り、我々は神経筋シナプス（NMJ）形成を増強する遺伝子治療の有効性を多様な疾患・病態モデルマウスにおいて確立してきた。その際、加齢変容によるNMJからの運動神経脱離に対し、当該治療が運動神経の再結合、つまりNMJの再生を促すことを発見した。それ故、本研究の成果には、生理的なNMJ形成・維持機構と人為的なNMJ形成増強技術の両者を統合的に理解することで、より広範な視点から、我々の呼吸を含む運動機能制御に必須のNMJを理解すると共に、加齢性の筋力低下を含む多様な神経筋疾患の克服に資するNMJ形成・再生増強技術を開発する点において、高度の学術的、社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：We previously demonstrated that the activation of the muscle-specific receptor kinase MuSK by its essential, cytoplasmic activator Dok-7 is required for NMJ formation and maintenance, and that mutations in the human DOK7 gene underlie NMJ synaptopathy (DOK7 myasthenia). Moreover, we developed the novel therapeutic approach, DOK7 gene therapy, that enhances not only the formation/maintenance but also the reinnervation/regeneration of NMJs in mice. In this study, we aimed to understand molecular mechanisms underlying NMJ formation/maintenance/regeneration and pathophysiological significance of NMJ defects associated with muscle weakness and motor dysfunction, including sarcopenia. Indeed, we successfully identified some protein-phosphorylation signals and calcium-related signals that are important for NMJ formation and maintenance and for motor activity. Also, we advance basic research on another modality of NMJ-targeting therapeutics.

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

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う。NMJ 形成 (維持を含む) は筋特異的な受容体型チロシナーゼ 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 に対する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)。

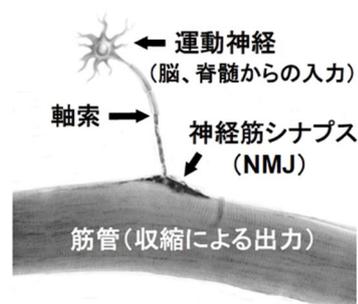


図1: 神経筋シナプスの模式図

他方、我々は筋特異的に Dok-7 を高発現するトランスジェニック (Dok-7 Tg) マウスを作成し、その高発現が筋管中央部に局在する MuSK の更なる活性化を誘導し、前シナプスを含めた NMJ 全体を拡張することも発見している。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 欠損を導入することで、Dok-7 による高度な MuSK 活性化によって、胎仔期の Agrin 非依存的な NMJ 形成が可能であることを確認している。興味深いことに、この Agrin 欠損 Dok-7 Tg マウスにおいては、MuSK の高度な活性化は維持されているにも関わらず、胎仔期に形成された NMJ が出生後の数週間間で退縮・消失することが判明し、胎仔期の NMJ 形成には不要でありながら、出生後の NMJ 維持には必要な、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。

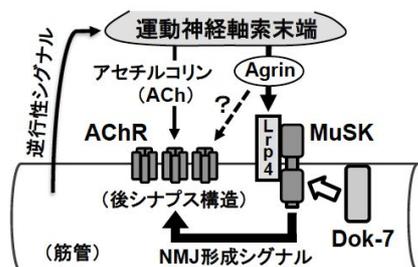


図2: NMJ形成シグナルの模式図。Dok-7 が活性化した MuSK (キナーゼ) は運動神経由来の Agrin によるさらなる活性化を受け、ACh 受容体 (AChR) が凝集する後シナプス構造と運動神経軸索末端を結ぶ NMJ の形成を誘導する。破線は独自に発見した新規 Agrin シグナル (本文に詳述)。運動神経に作用する逆行性シグナルの実体は不明。

さらに、本研究開始当初の知見として、NMJ の形成不全との関連が 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) や加齢性の筋力・運動機能低下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) を用いたヒト DOK7 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、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、MuSK シグナルを中心とする 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、独自に開発した NMJ 形成増強治療の作用機序や治療効果の理解を深めることで、生理的な NMJ 形成・維持機構と人為的な NMJ 形成増強技術の両者を統合的に理解し、我々の呼吸を含む運動機能制御に必須の NMJ の理解を深め、また、加齢性の筋力低下を含む多様な神経筋疾患の克服に資する新規治療技術開発を推進する。

3. 研究の方法

(1) 独自に見出した新規 NMJ 形成制御因子の作用機構の理解に基づく NMJ 形成シグナルの解明

NMJの形成に重要な制御因子やその mRNA の多くは、MuSK 依存的に筋管中央部に発現し、NMJ 形成制御機能を発揮する。事実、MuSK が高度に活性化する Dok-7 Tg マウスでは筋管中央部におけるそれらの発現が亢進している (*Science Signal.*, 2: ra7, 2009)。そこで、Dok-7 Tg マウスの筋管中央領域と非中央領域における遺伝子発現の比較解析を行い、NMJ 形成制御因子の候補を絞り込んだ。さらに、それらの発現や機能の抑制・阻害実験によりある種のカルシウムシグナル関連分子 (仮称: Cap-A) とタンパク質リン酸化酵素 (仮称: PK-Z) の NMJ 形成における重要性を見出すに至った。本研究では Cap-A と PK-Z に関する以下の研究を実施した。

Cap-A シグナルの解明

上記の通り、我々は Cap-A の mRNA 発現が筋管中央部特異的であり、それが Dok-7 を筋特異的に高発現し、MuSK が恒常的に活性化されている Dok-7 Tg マウスで亢進することを見出した。さらに、in situ ハイブリダイゼーション法で Cap-A 転写産物の局在について検討したところ、筋管中央部に限局した発現とその Dok-7 Tg マウスでの亢進が確認された。それ故、Cap-A を MuSK 下流の NMJ 形成制御因子の重要な候補として捉え、マウス骨格筋での発現抑制や、筋特異的な遺伝子欠損マウス (Cap-A mKO) の作出等による機能解析を実施した。

PK-Z/Y シグナルの解明

Cap-A 遺伝子と同じく、PK-Z 遺伝子の mRNA も MuSK 依存的に筋管中央部特異的な高発現を示すことを見出した。そこで、PK-Z を MuSK 下流の NMJ 形成制御因子の候補として捉え、PK-Z 機能阻害変異体の骨格筋での強制発現や、PK-Z とその類縁分子である PK-Y の筋特異的な二重欠損マウス (PK-Z/Y mKO) の作出等による機能解析を実施した。

(2) NMJ 形成シグナルに関する知見に基づく新規治療技術の開発

上記のシグナル研究の知見に基づく新規治療技術の開発研究を以下のように実施した。

STK-E 機能阻害ペプチド (仮称: SIP) を用いた治療技術開発

前項(1)の研究で作出した Cap-A の筋特異的な遺伝子欠損マウス (Cap-A mKO) の解析により (後述) Cap-A mKO マウスの骨格筋である種の細胞内タンパク質 (仮称: CPD) の発現が有意に亢進していることを見出した。そこで、CPD 下流のセリン・スレオニンキナーゼ (仮称: STK-E) の機能阻害ペプチド (仮称: SIP) を用いた治療介入の可能性に思い至り、SIP 発現アデノ随伴ウイルス (AAV-SIP) を作出し、その治療技術としての適否に関する解析を実施した。

CaMKII を標的とする治療技術開発

本研究の過程において、NMJ からの運動神経脱離により Ca²⁺/カルモジュリン依存性キナーゼ II (CaMKII) のアイソフォームである CaMKII β の発現が亢進し、また、CaMKII β を含む複数のタンパク質キナーゼに対する阻害剤 (KN-93) により NMJ からの運動神経脱離による筋萎縮が部分的に抑制されるという既報の知見に着目した。そこで、活性化型、もしくは不活性化型の CaMKII β 変異体を発現するアデノ随伴ウイルスを作出し、CaMKII β の治療標的としての適否に関する解析を実施した。

(3) 新たな NMJ 標的治療の技術基盤の確立

我々は NMJ 形成シグナル制御活性を呈する化合物を独自のスクリーニング技術によって見出した。そこで、当該化合物投与を基盤とする NMJ 標的治療開発に関する解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 独自に見出した新規 NMJ 形成制御因子の作用機構の理解に基づく NMJ 形成シグナルの解明

Cap-A シグナルの解明

独自のスクリーニング系により選定した NMJ 形成制御遺伝子候補のうち、Cap-A 遺伝子については、マウス骨格筋での発現抑制による NMJ 形成不全が観察され、個体における NMJ 形成制御機能が示唆された。そこで Cap-A を筋特異的に欠損した Cap-A mKO マウスにおける NMJ 形成制御に関する解析を実施したところ、当該マウスが緩徐進行の NMJ 形成異常を呈することが明らかになった。この結果により Cap-A シグナルが個体レベルの NMJ 形成制御に重要な役割を担うことが判明した。現在、Cap-A シグナルの解明を目指し、Cap-A mKO マウスを用いたオミックス解析等を進めている。

PK-Z/Y シグナルの解明

独自のスクリーニング系により選定した NMJ 形成制御遺伝子候補のうち、PK-Z 遺伝子については、マウス骨格筋での PK-Z 機能阻害変異体の強制発現による NMJ 形成不全が観察され、個体における NMJ 形成制御機能が示唆された。そこで PK-Z とその類縁分子 PK-Y を筋特異的に二重欠損した PK-Z/Y mKO マウスにおける NMJ 形成制御に関する解析を実施したところ、PK-Z もしくは PK-Y それぞれの単独欠損マウスとは異なる、顕著な NMJ 形成異常を観察した。この結果により、PK-Z/Y シグナルが個体レベルの NMJ 形成制御に重要な役割を担うことが判明した。現在、PK-Z/Y シグナルの解明を目指し、PK-Z/Y mKO マウスを用いたオミックス解析等を進めている。

(2) NMJ 形成シグナルに関する知見に基づく新規治療技術の開発

STK-E 機能阻害ペプチド（仮称：SIP）を用いた治療技術開発

緩徐進行の NMJ 形成異常を呈することが明らかになった Cap-A mKO マウスの骨格筋における CPD の発現亢進を踏まえ、CPD 下流の STK-E に対する機能阻害ペプチド（仮称：SIP）を発現する AAV-SIP を Cap-A mKO マウスの骨格筋に投与したところ、その NMJ 形成異常が改善されることを発見し、SIP が阻害する STK-E の新規治療標的としての可能性が示された。現在、AAV-SIP の作用機構の解明を目指し、Cap-A mKO マウスを用いたオミックス解析等を進めている。

CaMKII を標的とする治療技術開発

CaMKII の不活性化型（K43M）または活性化型（T287D）変異体の骨格筋における強制発現により、筋量や筋力がそれぞれ増加または減少することを見出し、CaMKII の骨格筋萎縮に対する治療標的としての可能性を示した。現在、複数タイプの筋萎縮に対する AAV-CaMKII -K43M 投与の効果を検討している。また、治療標的としての CaMKII シグナルの解明を目指し、CaMKII やその変異体（K43M または T287D）を強制発現した骨格筋に対するオミックス解析等を進めている。

(3) 新たな NMJ 標的治療の技術基盤の確立

NMJ 形成シグナル制御活性を呈する化合物の投与により、ある種の疾患モデルマウスにおける有効性を確認した。現在、その作用機構の解明と有効性を最大化する構造展開に向けた基礎的研究を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Eguchi Takahiro, Yamanashi Yuji	4. 巻 589
2. 論文標題 Adeno-associated virus-mediated expression of an inactive CaMKII mutant enhances muscle mass and strength in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 192 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.027	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 江口 貴大、山梨 裕司	4. 巻 72
2. 論文標題 特集 新組織学シリーズ : 骨格筋-今後の研究の発展に向けて . 骨格筋組織を支える細胞の役割・応答 神経筋接合部(NMJ)の形成・維持メカニズム-NMJを標的とした治療技術の開発を目指して	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 527 ~ 531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.2425201435	査読の有無 無
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 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 Webster RG, Vanhaesebrouck AE, Maxwell SE, Cossins JA, Liu W, Ueta R, Yamanashi Y, Beeson DMW	4. 巻 29
2. 論文標題 Effect of salbutamol on neuromuscular junction function and structure in a mouse model of DOK7 congenital myasthenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hum. Mol. Genet.	6. 最初と最後の頁 2325-2336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddaa116.	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山梨裕司
2. 発表標題 神経筋接合部を標的とする筋疾患の新規治療法の開発
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江口貴大、依田実朗、山梨裕司
2. 発表標題 CDK5活性化因子p35を起点とした神経筋シナプス形成・維持制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第8回 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江口貴大、范文蘭、山梨裕司
2. 発表標題 骨格筋における変異型CaMKII の強制発現は筋肥大を誘導する
3. 学会等名 第7回 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江口貴大、范文蘭、山梨裕司
2. 発表標題 A study of therapeutic interventions aimed at enhancing neuromuscular junction innervation and skeletal muscle mass
3. 学会等名 The 16th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2021年

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

1. 発表者名 江口貴大、杉田聡、峯岸慶彦、下豊留玲、太田宣康、小木曾昇、植田亮、山梨裕司
2. 発表標題 神経筋接合部 (NMJ) の形成増強治療は老齡マウスにおけるNMJの神経結合を増強し、運動機能と筋力を強化する
3. 学会等名 第6回 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江口貴大、杉田聡、峯岸慶彦、下豊留玲、太田宣康、小木曾昇、植田亮、山梨裕司
2. 発表標題 DOK7発現ベクターの投与は老齡マウスのNMJにおける神経結合を増強し、運動機能と筋力を強化する
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔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
研究 分担 者	江口 貴大 (Eguchi Takahiro) (60845056)	東京大学・医科学研究所・助教 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	荒川 正行 (Arakawa Masayuki) (90398868)	公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員 (72801)	
研究分担者	植田 亮 (Ueta Ryo) (10445025)	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