

## 科学的研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：82674  
 研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21200023  
 研究課題名（和文）筋萎縮医療を創出するための基盤研究

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanisms of muscle atrophy

## 研究代表者

重本 和宏 (SHIGEMOTO KAZUHIRO)  
 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・研究部長  
 研究者番号：40284400

研究成果の概要（和文）：運動神経細胞と筋の相互作用により相互が維持する機構が MuSK により制御され、未知の逆行性シグナルにより運動神経終末の機能が制御されることを明らかにした。逆行性シグナルの同定を目的として、モデルマウスの萎縮筋の発現遺伝子データベースを作成し運動神経細胞の初代培養を使い探索した。

研究成果の概要（英文）：We found that MuSK molecules, which are expressed at post synaptic membrane of NMJs, mediates unknown retrograde signaling which regulate presynaptic functions. We generated mouse expressed-genes database for atrophy-induced muscles to find the retrograde-signaling molecules.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
総計	23,800,000	7,140,000	30,940,000

研究分野：新学術領域（研究課題提案型）

科研費の分科・細目：

キーワード：筋萎縮、神経筋シナプス、逆行性シグナル、運動神経細胞、筋線維

## 1. 研究開始当初の背景

再生医学と iPS 細胞の臨床応用への期待から、人体の様々な組織由来の細胞を使った再生医療に向けて国を挙げた研究が展開されている。しかし、組織や臓器レベルの再生医療を最終目的と捉えるならば、万能分化細胞の技術だけでは組織レベルの再生に限界がある。発生期に組織が構築される過程や、成熟した組織の維持では、異なる細胞が様々なメカニズムにより時間的、空間的な相互作用を行うことから、その機構を

明らかにする必要がある。

身体機能の著しい障害をもたらす筋萎縮は、老化によるサルコペニア（加齢性筋肉減少症）、脊髄損傷、神経筋難病疾患の終末症状である。筋萎縮の過程は不可逆的に進み、再生させることは現在の医学では不可能である。筋と運動神経細胞は順行性と逆行性のシグナルを相互にやりとりして、機能と形態を維持している。さらに、筋と運動神経細胞や、それらの接合部(シナプス)は単純で均一な集団ではない。筋は速

筋性と遅筋性に分類され、その維持は同様に多様性のある運動神経細胞の複雑な相互作用が必要だが、その機構は全くわかっていない。原因の異なる筋萎縮（老化、神経筋難病、糖尿病、廃用性筋萎縮）では異なる筋の質的変化が報告されている。

## 2. 研究の目的

筋萎縮を対象とした、万能細胞から分化誘導した細胞を筋組織に根付かせる組織再建を目的とした再生医療を可能とするために、筋と運動神経の間の相互作用の異常という概念に基づく疾患群の解明と、運動神経細胞や筋を対象とした筋萎縮の治療法開発の基盤となる研究を遂行する。

- (1) 筋萎縮の疾患モデルを開発して筋と運動神経細胞の相互維持システムの解明
- (2) 逆行性シグナルの同定と治療法の開発
- (3) 速筋と遅筋の分化誘導因子と維持の分子機構の解明

## 3. 研究の方法

(1) Muscle-specific kinase (MuSK)は神経筋シナプスの筋側に発現しており、神経筋シナプスの発生に必要であるだけでなく、成熟したシナプスの維持にも必要である。補体欠損マウスに MuSK の細胞外ドメイン蛋白を免疫して自己抗体を産生させて、生体内の MuSK の機能をするすることで、筋力低下と筋萎縮の誘導させる。その筋萎縮疾患モデルマウスの筋電図の変化、シナプス（運動神経終末および筋側）の形態変化を光学顕微鏡、透過型と走査型電子顕微鏡で解析した。

(2) 逆行性シグナルによる運動神経終末の機能と MuSK の関係について解析するために、上記の方法で作成した疾患モデルマウスから摘出した横隔膜を使い、微量ガラス管電極法でナプス後膜 (MEPP: 微量終板電位) およびシナプス前膜 (QC: Quantal content) を測定した。

(3) プレシナプスのアセチルコリン放出を促進する 3,4-DAP (3,4-diaminopyridine) を動物モデルに投与して、逆行性シグナルに対する治療効果を、微量ガラス管電極法で MEPP と QC を測定して解析した。

(4) 逆行性シグナルの候補分子を明らかにするために、シビレエイの電気器官（神経筋シ

ナプス）で発現する mRNA から cDNA ライブラリーを作成して 2 万個のクローンを使って EST データベースを作成した。

(5) 生後 6 ヶ月、座骨神経切断、ギブス固定、老化マウス（生後 29 ヶ月）の各マウスの萎縮した筋から RNA を精製してマイクロアレイ発現解析を行い、データベースを作成した。

(6) マウス胎児の脊髄から運動神経細胞を採取して培養して、上記(4)と(5)のデータベースで絞り込んだ逆行性シグナル分子の機能解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 補体欠損マウスにリコンビナント MuSK 蛋白を免疫して、自己抗体を誘導すると顕著な筋力低下と筋萎縮がおきる。神経筋シナプスでは、シナプス後膜のアセチルコリン受容体 (AChR) 凝集減少、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性、シナプス膜の減少に加え、シナプス前膜（運動神経終末）からのアセチルコリン (ACh) 放出が顕著に減少することから、筋から運動神経終末への逆行性シグナルが存在しており MuSK に制御されていることがわかった (Mori et al, *Am J Pathol*, 2012)。MuSK のシグナル伝達はシナプス前膜の維持に対して正の制御だけでなく、負の制御機構も担う可能性を見いだした。 (Mori et al, *J Neuroimmunol*, 2012a)

(2) 運動神経終末のカリウムチャンネル阻害薬として知られ、最近では電位依存性カルシウムチャンネル作動性が報告されている 3,4-DAP をマウスモデルに投与すると、神経終末からの ACh 放出が増強することから、予備能力は存在していると考えられる。 (Mori et al, *J Neuroimmunol*, 2012b)

シナプスを介した運動神経終末と筋の相互維持シグナリング機構

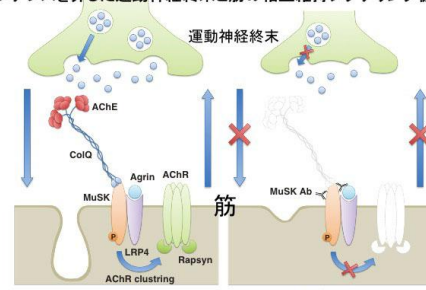


図1. MuSKは順行性、逆行性のシグナル伝達に必須である。自己抗体でMuSK機能が抑制されるとシナプスを介した相互維持作用が破綻して筋萎縮を発症する (Mori et al AJP 2012)。

(3) シビレエイの電気器官の発現遺伝子の 2 万個の EST データベースを作成した。

AChRs, rapsyn など神経筋シナプスで発現する遺伝子が確認されたが、MuSK や LRP4 遺伝子はその中に含まれていなかった。解析する cDNA クローンを増やす必要がある。

(4) 神経切断による萎縮筋、ギプス固定（廃用性萎縮筋）、加齢性萎縮筋と生後 6 ヶ月コントロール筋の発現遺伝子のマイクロアレイデータを作成して、各萎縮筋特異的に増強・減少する遺伝子群、また全萎縮筋で共通して発現が増強・減少する遺伝子群を明らかにすることができた。さらにその中で発現が増強する分泌蛋白を、逆行性シグナルの候補分子として得ることができた。

(5) マウス胎児の脊髄から運動神経細胞を高率（約 70%）に濃縮して初代培養する方法を確立することができた。運動神経細胞栄養因、神経細胞の機能制御因子の探索が可能となった。(4) で得られた候補分子のリコンビナントを作成して機能解析を開始しているが、期間内に同定することはできなかつたが、本課題の成果をもとに今後も引き続き研究を行う。

#### 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 Mori, S., Kishi, M., Kubo, S., Akiyoshi, T., Yamada, S., Miyazaki, T., Konishi, T., Maruyama, N., and Shigemoto, K. (2012). 3,4-Diaminopyridine improves neuromuscular transmission in a MuSK antibody-induced mouse model of myasthenia gravis. *Journal of neuroimmunology* 245, 75-78. (査読有) DOI:10.1016/j.jneuroim.2012.02.010
- ② Mori, S., Kubo, S., Akiyoshi, T., Yamada, S., Miyazaki, T., Hotta, H., Desaki, J., Kishi, M., Konishi, T., Nishino, Y., Miyazawa, A., Maruyama, N., and Shigemoto, K. (2012). Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis. *The American journal of pathology* 180, 798-810. (査読有) DOI:10.1016/j.ajpath.2011.10.031
- ③ Mori, S., Yamada, S., Kubo, S., Chen, J., Matsuda, S., Shudou, M., Maruyama, N., and Shigemoto, K. (2012). Divalent and monovalent autoantibodies cause dysfunction of MuSK by distinct mechanisms in a rabbit model of

myasthenia gravis. *Journal of neuroimmunology* 244, 1-7. (査読有) doi:10.1016/j.jneuroim.2011.12.005

- ④ Shigemoto, K., Kubo, S., Mori, S., Yamada, S., Akiyoshi, T., and Miyazaki, T. (2010). Muscle weakness and neuromuscular junctions in aging and disease. *Geriatr Gerontol Int* 10 Suppl 1, S137-147. (査読有) DOI: 10.1111/j.1447-0594.2010.00608.x
- ⑤ 重本和宏, 森秀一, 宮崎剛, 久保幸穂. サルコペニアの発症機構. *神経内科* 75(6): 584-588, 2011. (査読無)
- ⑥ 重本和宏, 森秀一, 宮崎剛, 久保幸穂: シナプスを介したサルコペニアの発症メカニズムとバイオマーカー. *日本老年医学会雑誌*, 48 (1), 42-43, 2011. (査読無)
- ⑦ 重本和宏, 森秀一, 宮崎剛, 久保幸穂: 運動神経細胞とサルコペニア. *Modern Physician*. 131, No. 11, 1308-11. 2011. (査読無)
- ⑧ 重本和宏, 森秀一, 宮崎剛, 久保幸穂. サルコペニアの発症機構. *神経内科* 75(6): 584-588, 2011. (査読無)
- ⑨ 大田潔江, 大田光熙, 重本和宏, (他一名). 抗MuSK抗体. *日本臨床. Vol. 68. Suppl. 633-6. 2010.* (査読無)
- ⑩ 重本和宏, 森秀一, 久保幸穂, 山田茂, 秋好沢諭, 宮崎剛. 神経筋接合部の異常と筋萎縮. *メジカルビュー社. 老年医学 update 2010-2011.* p135-p144, 2010. (査読無)
- ⑪ 重本和宏, 久保幸穂, 丸山直記. 神経筋接合部位の異常と筋力低下. *日本老年医学会雑誌*. 46(2):p106-113. 2009. (査読無)
- ⑫ 重本和宏, 丸山直記. サルコペニア（加齢性筋肉減少症）とそのバイオマーカー. *老年医学*. 47(6):p733-735. 2009. (査読無)

〔学会発表〕（計 13 件）

- ① Shigemoto, K.: A new synchronized model of myasthenia gravis caused by anti-MuSK antibodies. *International Conference on Nervous System Autoimmunity*. 2012. 1.27-30. Bangalore, India (招待講演)
- ② Mori S, Kubo S, Yamada S, Miyazaki T, Shigemoto K. Distinct mechanisms between divalent and monovalent MuSK antibodies involved with dysfunction of MuSK leading to myasthenia gravis. *Society for Neuroscience 2011*, 11.12-16. Washington, D. C.
- ③ Shigemoto K, Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T. Complement activation is dispensable for myasthenia gravis caused by MuSK antibodies. 10<sup>th</sup>

- International Congress of Neuroimmunology 2010, 26030, Barcelona, Spain.
- ④ Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Shigemoto K. Strategy to treatment of myasthenia gravis caused by MuSK antibodies using a synchronized experimental animal model. Society for Neuroscience 2010, 2010, 11/17 San Diego.
  - ⑤ Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Shigemoto K. Activation of complement is indispensable for myasthenia gravis caused by MuSK antibodies. Society for Neuroscience 2009, 2009, 10/17 Chicago.
  - ⑥ 森秀一, 久保幸穂, 岸雅彦, 小西哲郎, 重本和宏. 抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の発症メカニズムに基づく治療薬の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012, 5/25, 東京.
  - ⑦ 重本和宏. サルコペニアのメカニズム解明に向けて. 第 33 回日本基礎老化学会シンポジウム. 2011. 10. 8-9. 野田.
  - ⑧ 森秀一, 重本和宏. MuSK と Dok-7 の相互作用は神経筋シナプスの維持に重要である. 第 66 回日本体力医学会大会 2011. 9. 17 下関.
  - ⑨ Mori S, Kubo S, Yamada S, Miyazaki T, Shigemoto K. Distinct mechanisms between divalent and monovalent MuSK antibodies involved with dysfunction of MuSK leading to myasthenia gravis. 第 34 回日本神経科学学会大会 2011. 9. 15 横浜.
  - ⑩ Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Shigemoto K. New strategy to treatment of myasthenia gravis caused by MuSK antibodies using a synchronized experimental animal model. 第 33 回日本神経科学学会大会, 2010, 9/3 神戸
  - ⑪ 森秀一, 久保幸穂, 秋好沢諭, 山田茂, 宮崎剛, 重本和宏. 筋は逆行性シグナルにより筋・運動神経を維持する 第 33 回日本基礎老化学会大会. 2010, 6/18 名古屋.
  - ⑫ Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Shigemoto K. Activation of complement is indispensable for myasthenia gravis caused by MuSK antibodies. 第 32 回日本神経科学大会. 2009, 9/19 名古屋.
  - ⑬ 森 秀一, 久保幸穂, 秋好沢諭, 山田茂, 宮崎剛, 重本和宏. MuSK は神経筋シナプスの維持に重要である ~研究モデル動物の確立~ 第 32 回日本基礎老化学会大会. 2009, 6/27 横浜.

[図書] (計 1 件)

- ① Shigemoto, K. Kubo, S. Mori, S. Yamada, S. Miyazaki, T. Akiyoshi, T and Maruyama, S. The Immunopathogenesis of Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis Induced by Autoantibodies against Muscle-specific kinase. *Book title: Myasthenia gravis Diseases Mechanisms and Immune Intervention.* Editor: Premkumar Christadoss. Linus Publication, Inc. In Chaper 17, p304-323. 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

The Jackson Laboratory, USA

[http://jaxmice.jax.org/news/2012/Myasthenia\\_gravis.html](http://jaxmice.jax.org/news/2012/Myasthenia_gravis.html)

The Jackson Laboratory, USA

Podcast

<http://jaxmice.jax.org/multimedia/podcasts/20120524-Shigemoto.mp3>

東京都健康長寿医療センター研究所

老年病研究チーム 運動器医学

[http://www.tmghig.jp/J\\_TMIG/j\\_research/DA33.html](http://www.tmghig.jp/J_TMIG/j_research/DA33.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重本和宏 (SHIGEMOTO KAZUHIRO)

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・研究部長

研究者番号 : 40284400

(2)研究分担者

久保幸穂 (KUBO SACHIHO)

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・助手

研究者番号：00280769

宮崎剛 (MIYAZAKI TSUYOSHI)

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：50376480

山田茂 (YAMADA SHIGERU)

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：50508679

(H21-22:研究分担者)

(3)連携研究者 なし