

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2014～2015
課題番号：26893111
研究課題名(和文) Fgf18の神経筋接合部形成に対する役割の解明

研究課題名(英文) Role of Fgf18 for neuromuscular junction

研究代表者

伊藤 研悠 (ITO, KENYU)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10732638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：人が動くには脳からの信号を神経に伝え、神経筋接合部(NMJ)を経て筋肉に伝わることで成り立つ。神経や筋肉の研究と同様にNMJも重要と考えた。Fibroblast growth factor (FGF)は血管新生、創傷治癒に関係する成長因子の一つである。本研究ではFGFの中でもFGF18に注目した。FGF18が欠損したマウスのNMJに異常を認めた。また成長過程において中枢神経である脊髄と筋肉においてFGF18は高発現していた。これらよりFGF18は脊髄と筋肉細胞より特異的に分泌され、NMJの形成に作用すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mechanism of regeneration of neuromuscular junction (NMJ) connecting nerves and muscles has not been fully elucidated. The purpose of this study was to analyze the effect of fibroblast growth factor (Fgf)18 for NMJ. The increase expression pattern of Fgf18 during embryonic stage to postnatal was seen in both muscle and spinal cord. Also, abnormalities were observed in the formation of the NMJ and axons in the diaphragm of the Fgf18 knockout mice. From these results, Fgf18 is secreted specifically from muscle cells and spinal motor neurons, and it was thought to be a molecule that acts positively to the formation of the NMJ.

研究分野：整形外科学

キーワード：fibroblast growth factor Fgf18 神経筋接合部 脊髄 アセチルコリン受容体 MuSK

1. 研究開始当初の背景

近年 iPSC、幹細胞などの細胞移植の発展により再生不可能と言われていた脊髄運動神経においても再生の可能性があるとマーモセット猿などで証明されてきている(Iwanami A. *Journal of Neuroscience Research*:80,2005, Tsuji O. *PNAS*:107:28, 2010)。一方で運動神経細胞やその軸索の再生医療が確立されたとしても運動機能を再生するためには神経からの信号を骨格筋に伝達する 神経筋接合部(NMJ)の再生が次のステップとして必要となる。NMJ の再生メカニズムを知るためには、まずその発生様式や分子構築を解明することが足掛かりとなる。

NMJ は文字通り運動神経と筋を接合するシナプスであり、脊椎動物においてその信号はまず運動神経終末より神経伝達物質であるアセチルコリン(Ach)を分泌し、次に Ach が骨格筋に発現しているアセチルコリン受容体(AchR)に結合することで伝達する。この NMJ の形成や構築の最初のステップは神経終末から分泌される Agrin が重要である事がわかっている。Agrin が LRP4 と結合することで、LRP4 と MuSK の相互作用を増強し、MuSK の細胞内ドメインリン酸化が亢進され、細胞内のシグナルに伝達され、最終的に AchR を NMJ 領域に重合させる(研究業績 1, Bergamin E. *Mol. Cell*:39,2010, Hallock P. *Genes Dev*:24,2010)。また神経終末(NT)側を構築させるため、骨格筋に発現する LRP4 が逆行性シグナルを活性化していることも示された(Yumoto N. *Nature*:489,2012)。以上より 筋肉細胞、運動神経 NT の双方の NMJ の構築に LRP4 を中心とする複合体が重要であるが、その活性化のメカニズムの詳細は未知の部分が残っている。

近年、前述した因子以外に、NMJ シナプス分化を促す因子として細胞外に分泌されるシグナル伝達因子が注目されている。Wnt シグナルを活性化する Wnt4 は MuSK を活性化し NMJ の形成を維持すること (Strochlic L. *PLoS One*:7,e29976,2007)、また Wnt4 は MuSK を活性化し NMJ の形成を維持することも報告された (Strochlic L. *PLoS One*:7,e29976,2007)。LRP4 は Wnt シグナル伝達経路を抑制する因子としても機能することからも、この結果は非常に興味深い。一方、FGF シグナルを活性化する FGF 7/10/22 が骨格筋由来タンパク質として報告された(Fox MA. *Cell*:129,2007)。FGF シグナルは Wnt シグナルと様々な細胞の運命決定で関与することから、組織構築や維持におけるこれら 2 つのシグナルの相互作用が注目されている。そこで、このような分泌因子が NMJ 構築・維持に関係があるのではないかという仮定に至った。

今回、所属研究室で独自に行われた、脊髄運動神経細胞の組織からの単離とこの細胞で高発現している遺伝子を Exon Array 解析ならびに次世代シーケンサーによって網羅的に解析したところ、前述したようなシグナルと関連があるものとして Wnt シグナルの標的遺伝子であり、FGF シグナルを活性化する Fgf18 が運動神経細胞において特異的に発現していることがわかった。そこで、FGF18 が NMJ 構築に関わるか検討したところ、培養細胞において FGF18 は Agrin に依存せずに MuSK をリン酸化する能力をもつことが明らかになった。以上より FGF18 は生体内において MuSK を介して NMJ の構築・維持に重要な役割を有している因子であると考えた。

2. 研究の目的

脊髄損傷などで外傷を負った場合、運動神経細胞やその軸索に損傷が生じることで、骨格筋につながるシナプス、神経筋接合部(NMJ)も変性する。近年運動神経やその軸索の構築のメカニズムが明らかにされることで、運動神経再生の可能性とその臨床応用が現実味を帯びてきた。一方で神経と筋肉をつなぐNMJの構築、維持、変性、および再生のメカニズムは十分に解明されておらず、NMJ再生は運動機能の回復への次の課題となっている。そこで、本研究はNMJ発生と維持の分子メカニズムの詳細を明らかにすることで、再生への足掛かりとすることを目的に行う。

具体的には、近年NMJの発生と維持に重要な因子を探索するために我々が独自に行った脊髄運動神経細胞の発現遺伝子の網羅的解析結果より、この細胞において発現が高い因子 *Fgf18* (Fibroblast growth factor 18) のNMJ形成における役割を解析する。本研究の目的ではNMJ構築・維持における *Fgf18* の役割を解析し、NMJ再生の一助となることである。

3. 研究の方法

Fgf18 ノックアウトマウスのNMJの形態と機能解析として(1) NMJの免疫組織学的にて検討し、その構造を観察する。つぎに(2)脊髄運動神経及び筋での電気生理学的機能検査を行う。さらに(3) NMJの形態を電子顕微鏡下で詳細に解析する。(4) *Fgf18* ノックアウトマウス (*Fgf18*-KO)の運動神経細胞と筋肉細胞をそれぞれ単離・培養し、その発生過程を詳細に観察する。さらに *Fgf18* ノックアウトマウスより得た初代運動神経細胞と筋肉細胞よりNMJを作製してその形態を観察する。またシグナルのメカニズムを明らかにするために(5) *FGF18*

たんぱく質のLRP4複合体形成やそのリン酸化に対する機能解析を行う。

4. 研究成果

マウス(BL-6, 6週齢)脊髄切片より運動(前角)神経細胞と後角神経細胞を単離し、発現している mRNA をエクソンアレイおよび次世代シーケンサーを用いて網羅的に比較、検討した結果、様々な Fibroblast growth factor (*Fgf*) が同定された。(Fig1)

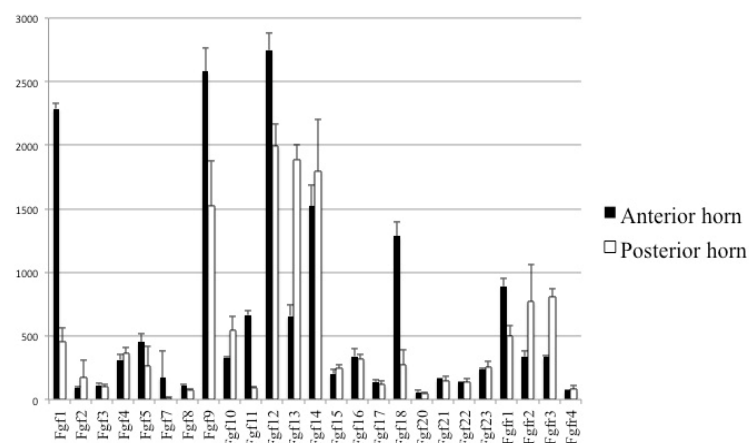


Fig 1. Expression of *FgFs* in anterior horn and posterior horn of spinal cord.

Fgf1, *Fgf9*, *Fgf12*, *Fgf14*, and *Fgf18* were enriched in the anterior horn. However, *Fgf9*, *Fgf12*, and *Fgf14* were also enriched in the posterior horn. *Fgf1* (5.0-fold change) and *Fgf18* (4.7-fold change) were specific in the anterior horn

その中でも *Fgf18* 遺伝子は脊髄前角に有意に発現していた。(Fig2)

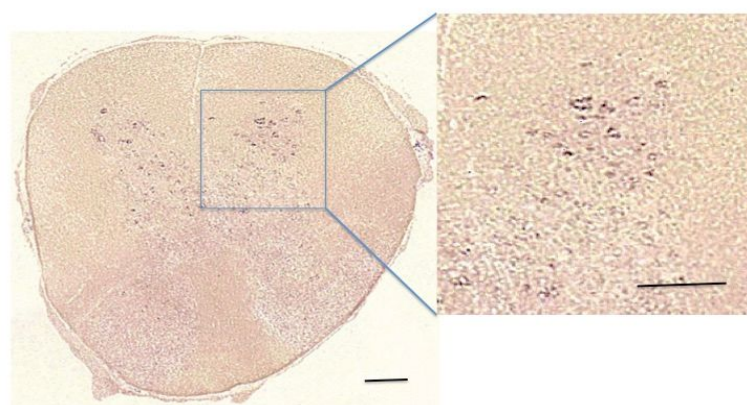


Fig 2. In situ Hybridization of *Fgf18*.

Thoracic spinal cord of C57BL/6J mouse. The motor neurons in anterior horn were stained purple. Scale bar, 200µm.

さらに E13.5, 15.5, 17.5, P1, P7, P20 で出生したマウス (BL-6) の脊髄と筋肉を採取し Fgf18 mRNA の発現量を Q-PCR を用いて定量した。Fgf18 は脊髄成長段階において E15.5 で発現量にピークを向かえ次第に低下していった。一方、筋肉においては E13.5 でピークを向かえ、以降低下していった。Fgf18 は E13.5 から E15.5 において脊髄や筋肉で高い発現をしており器官形成に重要であると考えられた。

そこで筋管細胞上に発現するアセチルコリン受容体の重合を Fgf18 など付加して観察した。筋管細胞は cell line である C2C12 細胞を分化培養し作成した。これに control、アグリン蛋白、Fgf18 蛋白、Fgf18 蛋白+Fgf 受容体阻害剤を付加した。アグリン蛋白、Fgf18 蛋白を付加した筋管細胞において有意にセチルコリン受容体の重合を認めた。さらに Fgf18 蛋白に Fgf 受容体阻害剤を付加することでアセチルコリン受容体の重合数は減少した。

運動神経細胞に対する Fgf18 の作用をみるために、運動神経細胞を単離培養し Fgf18 を付加した。Primary motor neuron は E13.5 マウス脊髄前角より単離培養した。単離後、培養液中に Fgf18 を加えたものと加えなかったもので比較すると、Fgf18 を加えたもので運動神経細胞軸索の伸長を有意に認めた。

さらに Fgf18 の神経筋接合部における作用を同定するために LRP4、MuSK に注目した。生体内において神経筋接合部形成の際、LRP4 を介し MuSK がリン酸化されることで構築・維持される。そこで HEK 細胞に過剰に LRP4 と MuSK を発現させ MuSK のリン酸化を評価した。アグリンを加えると MuSK がリン酸化されることが以前より証明され重要とされていた。そこで今回アグリンをコントロールと

して用いた。LRP4、MuSK を過剰発現した HEK 細胞にアグリンを加えると MuSK はリン酸化されコントロールの妥当性をみた。アグリンを加えず、Fgf18 をこの HEK 細胞に加えても MuSK はリン酸化された。

以上より Fgf18 は筋肉細胞においてはアセチルコリン受容体の重合を助け、神経細胞においては軸索伸長を助長しているものと考ええる。さらに Fgf18 は生体内において MuSK を介して神経筋接合部の構築・維持に重要な役割を有している因子であると考えられた。

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)

[学会発表](計3件)

伊藤研悠、脊髄前角に有意に発現する Fgf18 遺伝子の神経に対する作用、第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、2014 年 10 月 9 日、城山観光ホテル(鹿児島県、鹿児島市)

伊藤研悠、脊髄前角に発現する Fibroblast growth factor 同定とその運動神経細胞に対する役割、第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会、2015 年 10 月 22 日、富山国際会議場(富山県、富山市)
Kenyu Ito、Role of Fgf18 gene derived from anterior horn of spinal cord for neuron、2015 Orthopaedic Research Society Annual Meeting、March/30/2015、Las Vegas (United States of america)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 研悠 (KENYU, Ito)

名古屋大学医学部附属病院・医員

研究者番号：10732638

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

大河原 美静 (OHKAWARA, Bisei)

名古屋大学・大学高等研究院・特任講師

研究者番号： 80589606