

論文の内容の要旨

論文題目 Dok-7/MuSK シグナルによる NMJ 形成・維持機構の解明

氏名 江口 貴大

神経筋接合部 (neuromuscular junction : NMJ) は、運動神経軸索末端の前シナプス領域と筋管の中央部に形成される後シナプス構造を連結する化学シナプスであり (図 1)、運動神経による骨格筋収縮の制御、ひいては、呼吸を含む運動機能の制御に不可欠の役割を果たす。NMJ の形成・維持や機能の破綻は易疲労性の筋力低下を特徴とする、遺伝性の先天性筋無力症候群 (congenital myasthenic syndromes : CMS) や自己免疫性の重症筋無力症 (myasthenia gravis : MG) などの原因となる。また、近年、筋萎縮性側索硬化症などの運動神経変性疾患や筋ジストロフィーにおいても NMJ 形成不全との関連が示されている。それゆえ、NMJ 形成・維持機構の解明はこれらの神経・筋疾患の病態解明や診断・治療技術の開発にも結びつく重要な研究課題である。

哺乳類の NMJ では、運動神経の軸索末端から神経伝達物質アセチルコリン (acetylcholine : ACh) が放出され、筋管の後シナプス構造に凝集する ACh 受容体 (ACh receptor : AChR) に結合することにより、筋収縮が惹起される。この NMJ の形成・維持には、筋特異的な受容体型チロシンキナーゼ (muscle-specific kinase : MuSK) と運動神経由来の MuSK 活性化因子 agrin が必須である (図 1)。agrin は MuSK の共受容体である低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質 4 (low-density lipoprotein receptor-related protein 4 : Lrp4) に結合することにより MuSK を活性化する。他方、私の所属する研究グループは筋内在性の細胞内タンパク質 Dok-7 が MuSK に必須の活性化因子として働き、NMJ 形成に必要であることを発見した。さらに、私の所属グループは、(a) Dok-7 は MuSK の細胞内領域に直接作用し、MuSK を活性化する、(b) 骨格筋特異的に Dok-7 を強制発現させたマウス (Dok-7 Tg マウス) においては MuSK 活性化が亢進し、NMJ 形成が高

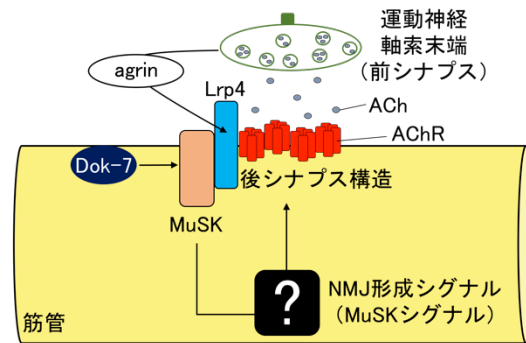


図 1. NMJ 形成の概念図

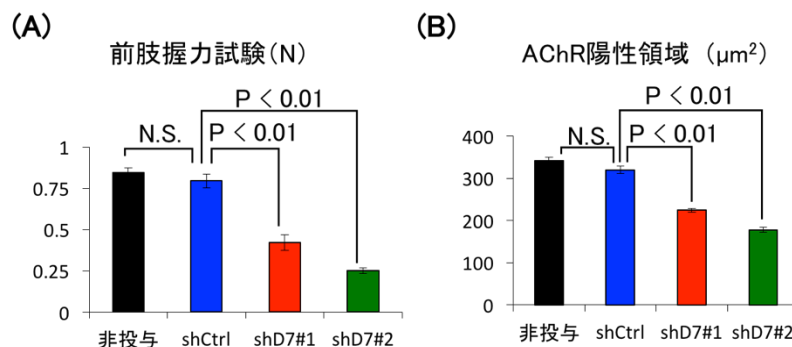
胎生期の NMJ 形成には agrin と Dok-7 により活性化されるチロシンキナーゼ MuSK が不可欠であるが、出生後の NMJ 維持における Dok-7 の必要性は検証されていなかった。また MuSK の活性化により駆動される NMJ 形成シグナルの実体も解明されていない。ACh、アセチルコリン。AChR、ACh 受容体。

度に増強される、(c) 培養筋管細胞においては agrin による MuSK 活性化に Dok-7 が必要である、(d) ヒト *DOK7* 遺伝子の劣性(潜性)変異が NMJ 形成不全を伴う肢帯型の先天性筋無力症(*DOK7* 型筋無力症)の原因となる等を見出し、Dok-7 による MuSK 活性化機構とその不全による筋無力症の発症機構を解明してきた。しかしながら、出生後に遺伝子欠損を誘導するマウスを用いた解析などにより、MuSK や agrin、Lrp4 が胎生期の NMJ 形成のみならず、出生後の NMJ 維持にも必要であることは示されていたが、Dok-7 が出生後の NMJ 維持にも必要であるか否かは検証されていなかった。また、Dok-7 依存的な MuSK 活性化を起点とする NMJ 形成シグナル (MuSK シグナル) の実体も解明されていない (図 1)。そこで、私は、Dok-7/MuSK シグナルによる NMJ 形成・維持機構の解明を目的として、(1) 出生後の NMJ 維持における *dok-7* 遺伝子発現の重要性の解明と (2) NMJ の形成・維持に重要な MuSK 下流遺伝子の同定を目指した。

(1) 出生後の NMJ 維持における *dok-7* 遺伝子発現の重要性

出生後の Dok-7 の役割を調べるために、骨格筋への遺伝子導入に優れたアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus : AAV) を用いて、マウス *dok-7* 遺伝子の発現を抑制する 2 種類の shRNA 発現ベクター (AAV-shD7#1 と #2)、及び、コントロールとして、非標的 shRNA を発現する AAV ベクター (AAV-shCtrl) を作製した。これらの AAV ベクターをマウス (2 週齢) の腹腔に投与し、投与 8 週後 (10 週齢) に解析を行った。その結果、AAV-shD7#1、#2 の投与による長趾伸筋 (extensor digitorum longus : EDL) での *dok-7* 遺伝子の発現低下が明らかとなり、人為的かつ後天的な *dok-7* 遺伝子の発現抑制が確認された。さらに、AAV-shD7 投与群では体重の減少や、運動機能異常を示す尾懸垂時の hindlimb clamping (後肢の抱擁)、近位筋の筋力低下の特徴である thoracolumbar kyphosis (胸椎と腰椎の間の異常な彎曲) が認められた。そこで、運動機能を定量的に評価するために、前肢握力試験 (図 2A)、ロータロッド試験、ぶらさがり試験を行ったところ、いずれの試験においても AAV-shD7 投与群の運動機能の低下が示された。次に、EDL を対象に共焦点蛍

図 2. *dok-7* 遺伝子の発現抑制による前肢握力の低下と NMJ の縮小



AAV-shCtrl、及び、AAV-shD7#1、#2 をマウス (2 週齢) の腹腔に投与し、投与 8 週後 (10 週齢) で解析した。コントロール群に対し、AAV-shD7 投与マウスでは、(A) 前肢握力の低下と (B) EDL における個々の後シナプス構造 (AChR 陽性領域) の縮小が認められた。平均値 ± SEM。N.S.、有意差なし。(図は Eguchi et al., *Genes Cells*, 21:670-676, 2016 より改変)

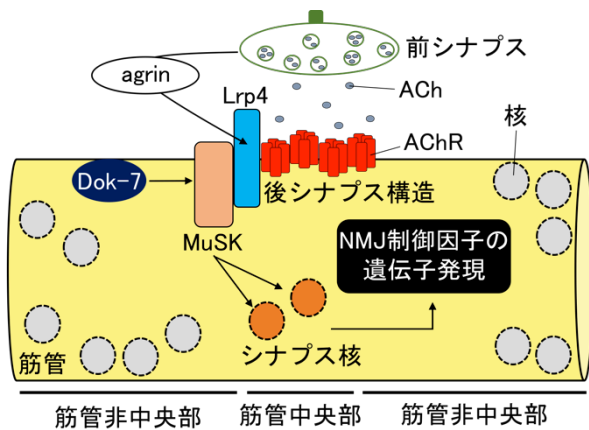


図 3. シナプス核における、NMJ 制御因子の MuSK 依存的な遺伝子発現の概念図

Dok-7 や agrin により活性化された MuSK は、筋管中央部のシナプス核選択的に、多くの NMJ 制御因子の遺伝子発現を誘導する。

光顕微鏡を用いて、NMJ の形態学的な解析を行った。NMJ の後シナプス構造を AChR に結合する蛇毒である α -bungarotoxin により、また、運動神経を軸索マーカーである neurofilament-L、及び、前シナプスマーカーである synapsin-1 に対する抗体により標識して得られた NMJ 画像を定量的に解析した結果、コントロール群に対し、AAV-shD7 投与群では NMJ 領域の指標となる後シナプス構造の縮小が認められた (図 2B)。さらに、MuSK 依存的に遺伝子発現が制御される NMJ 制御因子 (次項にて詳説) として AChR のサブユニットをコードする遺伝子 ($AChR\alpha 1$ 、 $AChR\epsilon$) と *MuSK* の発現レベルを定量 RT-PCR により解析したところ、AAV-shD7 投与群ではこれらの遺伝子の発現レベルが低下していることも判明し、MuSK シグナルの減弱が示唆された。以上より、*dok-7* 遺伝子の出生後の正常な発現レベルが NMJ の維持に必要であることが示された。(Eguchi T., et al., *Genes Cells*, 21:670-676, 2016)

(2) NMJ の形成・維持に重要な MuSK 下流遺伝子の同定

上述の通り、Dok-7 依存的な MuSK 活性化を起点とする NMJ 形成・維持機構は解明されていないが、その理由の一つは、MuSK シグナル下流の NMJ 制御因子 (NMJ の形成・維持・機能に重要な因子) が殆ど同定されていないことにある。筋管は線維状の多核細胞であるが、MuSK は筋管中央部の NMJ 近傍の核選択的に、AChR サブユニットや MuSK 自身などの NMJ 制御因子の遺伝子発現 (転写) を誘導する (図 3)。その結果、これらの転写産物は筋管中央部に限局すると考えられている。これまで私の所属グループでは、上述の Dok-7 Tg マウスの横隔膜筋において、MuSK 活性化の亢進による NMJ 形成の増強に伴い、筋管中央部での *MuSK* や $AChR\alpha 1$ の発現が亢進することを見出していた。そこで、私は、未知の NMJ 制御因子についても Dok-7 Tg マウスの筋管中央部でその遺伝子発現が亢進している可能性を考え、(1) 筋管の非中央部と比較して、中央部で高発現している、(2) 筋管中央部での遺伝子発現が WT マウスに比べ、Dok-7 Tg マウスにおいて亢進している、という 2 つの指標を満たす遺伝子群を網羅的な遺伝子発現解析により絞り込むことにより、NMJ の形成・維持に重要な新規 NMJ 制御因子の候補遺伝子を高感度を選

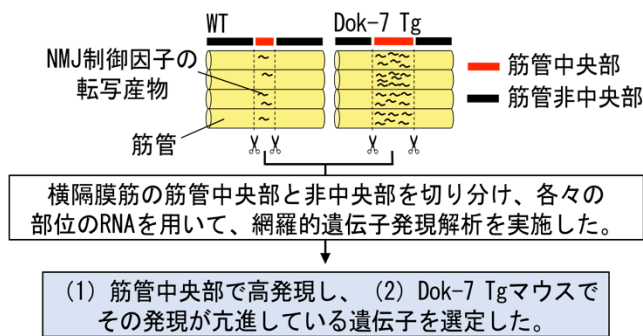


図 4. 新規 NMJ 制御因子の探索の概念図

WT マウスに比べ、Dok-7 Tg マウスでは筋管中央部での既知の NMJ 制御因子 (*MuSK*、*AChR α 1*) の遺伝子発現が亢進する。そこで、本研究では、WT と Dok-7 Tg マウスの筋管中央部と非中央部における網羅的遺伝子発現解析を行い、(1) と (2) の両者の指標を満たす新規 NMJ 制御因子の候補遺伝子を選定した。

定することを立案した (図 4)。本研究では、横隔膜筋を用いて、WT マウスと Dok-7 Tg マウスの筋管中央部と非中央部を単離し、それらの遺伝子発現プロファイルを、mRNA シークエンスを用いて網羅的に比較することにより、上述の 2 つの指標を満たす遺伝子群を選定した。その結果、10 遺伝子からなる、新規 NMJ 制御因子をコードする遺伝子の候補群を得ることに成功した。その中でも、筋管中央部での高発現と Dok-7 Tg マウスにおける発現増強が顕著であった Z 遺伝子*に着目した (*脚注参照)。まず、定量 RT-PCR により、8 週齢マウスの横隔膜における Z 遺伝子の発現レベルを解析し、筋管中央部での高発現と Dok-7 Tg マウスにおける発現増強を確認した。さらに、Whole-mount *in situ* hybridization により、胎生 18.5 日齢のマウス横隔膜における Z 遺伝子の転写産物の発現レベルや局在を検討したところ、WT、Dok-7 Tg マウスともに筋管中央部に限局した発現が認められ、Dok-7 Tg マウスにおいてはその発現が増強していた。次に、NMJ 形成・維持における Z 遺伝子の重要性を調べるために、前項で使用した AAV-shRNA ベクター系を用いて、Z 遺伝子の発現抑制ベクターを作製した。さらに、解析する骨格筋あたりの力価を高めるために各 AAV ベクターをマウス (8 週齢) の前脛骨筋に直接投与し、その 8 週後 (16 週齢) に NMJ の形態学的な解析を実施した。その結果、Z 遺伝子の発現抑制が、上記 AAV-shD7 による *dok-7* の発現抑制と同程度に、後シナプス構造の断片化を引き起こすことが判明し、当該 Z 遺伝子が NMJ の維持に重要な役割を担うことが示唆された。現在、NMJ 形成・維持における Z 遺伝子の役割を解明するために、全身、および筋特異的 Z 遺伝子欠損マウスの作出を進めている。今後は、他の NMJ 制御因子の候補についても同様の解析を行い、Dok-7/MuSK による遺伝子発現制御を受ける NMJ 形成・維持に重要な因子の同定を進めていく。

*：本論文の一部 (NMJ の形成・維持に重要な MuSK 下流遺伝子の同定) は学術誌に投稿予定であるため、新規 NMJ 制御因子の候補を Z と表記する。