

# 博士論文（要約）

Dok-7/MuSKシグナルによるNMJ形成・維持機構の解明

江口 貴大

## 目次

### 略語一覧

### 第一章 序論

### 第二章 実験材料と実験方法

### 第三章 出生後の NMJ 維持における Dok-7 の重要性の解明

#### [1] はじめに

#### [2] 結果

- 1) 出生後の *dok-7* 遺伝子の発現抑制により運動機能が低下する
- 2) 出生後の *dok-7* 遺伝子の発現抑制により NMJ が縮小する
- 3) 出生後の *dok-7* 遺伝子の発現抑制により NMJ 制御因子の遺伝子発現が減弱する

#### [3] 考察・今後の展望

### 第四章 NMJ の形成・維持に重要な MuSK 下流遺伝子の同定

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

### 第五章 結語

### 引用文献

### 謝辞

## 略語一覧

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開



## 第一章 序論

骨格筋は多数の筋管（筋線維）によって構成される随意筋であり、個々の筋管は数百から数千の筋芽細胞が融合することによって形成される多核の細胞である（1）。その細胞質にはミオシンフィラメントやアクチンフィラメントを主成分とする筋原線維が内包され、これが筋管の収縮を担っている（図1）。骨格筋の収縮は、脊髄前角に存在する運動神経によ

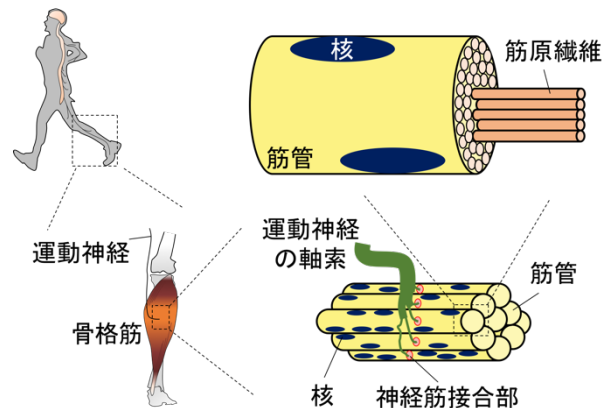


図1. 骨格筋と神経筋接合部の構造(概念図)

骨格筋の主な構成要素である筋管（筋線維）は、数多くの筋原線維を内包する多核の細胞である。神経筋接合部(NMJ)は、運動神経の軸索末端と筋管中央部を連結する唯一のシナプスであり、呼吸を含めた運動機能に必須である。

って厳密に制御されている（2）。運動神経は、その軸索末端と筋管の中央部とで形成される神経筋シナプス（neuromuscular junction : NMJ、神経筋接合部）を介して、骨格筋の神経支配を行っている。哺乳類の神経筋伝達においては、アセチルコリン（acetylcholine : ACh）が神経伝達物質として働く。運動神経の電氣的興奮に応じて、運動神経軸索末端の前シナプス領域から ACh が放出され、後シナプス領域に高度に凝集するイオンチャネル型の ACh 受容体（ACh receptor : AChR）に結合する（図2）。ACh の結合により AChR のイオンチャネルが開くと、 $\text{Na}^+$ イオンなどが流入し、終板電位が発生する（3）。その結果、筋管の細胞膜に存在する電位依存性  $\text{Na}^+$ チャネルが開くと、 $\text{Na}^+$ の流入により活動電位が発生する。細胞膜が細胞内に陥入する管状の膜構造（T 管）に活動電位が到達すると、電位センサーであるジヒドロピリジン受容体（dihydropyridine receptor : DHPR）の構造変化によって、当該受容体と結合する筋小胞体上のリアノジン受容体 1（ryanodine receptor 1 : Ryr1）の  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル活性により

筋小胞体から  $\text{Ca}^{2+}$  が放出される。最終的に、この  $\text{Ca}^{2+}$  がトロポニン C (troponin C : TnC) と結合することにより、筋原線維のアクチンとミオシンの相互作用が起これ、筋収縮が惹起される。このように、NMJ は神経筋伝達、ひいては骨格筋の収縮に必須の構造であり、NMJ の異常は、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) や Lambert-Eaton 筋無力症 (Lambert-Eaton myasthenic syndrome : LEMS) を引き起こす (4, 5)。また、近年、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) 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 の異常が示されている (6, 7)。

出生時には呼吸・運動機能が備わっていることから明らかなように、筋管の後シナプス構造と運動神経の軸索末端とが対合した機能的な NMJ の形成は胎生期に起こっており、その後、後述のような成熟過程を含め、NMJ は維持される (8, 9)。本論文では

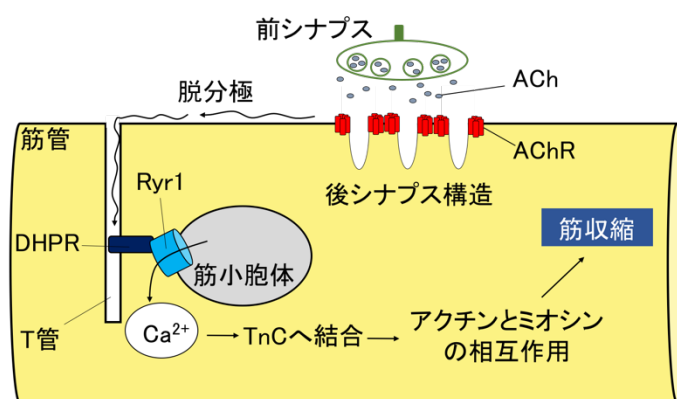


図 2. 骨格筋の収縮 (概念図)

哺乳類の NMJ では、運動神経軸索末端の前シナプス領域からアセチルコリン (ACh) が放出され、筋管側の後シナプス構造に凝集するイオンチャンネル型 ACh 受容体 (AChR) に結合する。その結果、AChR の開口を経て、筋管の細胞膜が脱分極を起これ。T 管に局在するジヒドロピリジン受容体 (DHPR) は細胞膜の脱分極を感知して、リアノジン受容体 1 (Ryr1) を介して、筋小胞体から  $\text{Ca}^{2+}$  を放出させる。 $\text{Ca}^{2+}$  がトロポニン C (TnC) に結合することにより、筋原線維のアクチンとミオシンの相互作用が可能となり、筋収縮が惹起される。

前者を NMJ の形成、後者を NMJ の維持と定義する。マウスにおいては、まず胚発生中期に、筋管の中央部に後シナプス構造が形成され (図 3A、pre-patterning と呼ばれる)、その後、胚発生後期に、運動神経の軸索が後シナプス領域に伸展し、NMJ が形成される (図 3B)。出生後から成獣へと発達する期間において NMJ は構造的な変化を伴いながら成熟する (9)。出生直後の後シナプス構造は楕円形であり、出生後 3 週の間にはプレッツェル様の形態に変化し、筋管の成長に伴って、後シナプス構造の面積も拡張する。また、後シナプス構造においては細胞膜の陥入により junctional folds と呼ばれる襞状の構造が形成されるが、出生後の成熟過程で細胞膜の陥入が亢進し、この襞上構造が確立される。この襞の頂上部には AChR が、底部には Na<sup>+</sup>チャネルがそれぞれ局在しており、このような空間的な配置が効率的な神経筋伝達に寄与していると考えられている (10)。また、新生仔の NMJ においては、筋管は複数の運動神経による神経支配を受けていること (多重神経支配) が知られているが、出生後 2 週の間にはシナプスの刈り込みが行われ、単一の運動神経による神経支配を受けようになる (9)。このような、出生後における NMJ の成熟過程を経て、効率的な神経筋伝達と NMJ の構造的な安定化が達成される。老齢マウスの NMJ では、後シナプス構造の断片化や AChR の減少、多重神経支配、また、運動神経軸索末端の萎縮や脱離、軸索膨化、発芽などが認められ、加齢による NMJ 維持の破綻が運動機能低下の一因であると理解されている (11, 12)。

筋管中央部における AChR の高度な凝集を含む、胎生期の NMJ 形成過程では、筋特異的に発現する受容体型チロシンキナーゼ (muscle-specific kinase : MuSK) が必須の役割を担っている (図 3)。事実、DeChiara らは MuSK 欠損マウスにおいては、NMJ 形成が認められず、出生直後に死亡することを示している (13)。この MuSK の活性化因子として知られている agrin においては、細胞種ごとに異なるアイソフォームが産

生・分泌されるが (14)、特に運動神経に由来する agrin は、非運動神経由来の agrin と比べ、AChR の凝集形成能が著しく高いことが知られている (15)。このような運動神経由来の agrin による MuSK 活性化と NMJ 形成機構は古くより知られており (16, 17)、その直接の受容体として MuSK と複合体を形成する低密度リポ蛋白質受容体関連蛋白質 4 (low-density lipoprotein receptor-related protein 4 : Lrp4) が Kim らと Zhang らによって同定された (18, 19)。しかしながら、前述の通り、胎生期の NMJ 形成においては、まず胚発生中期に、筋管の中央部にて MuSK 依存かつ運動神経・ agrin 非依存的に後シナプス構造が形成され、続く胚発生の後期に、運動神経の軸索が後シナプス領域に伸展し、 agrin 依存的に NMJ が形成されることが (図 3)、MuSK や agrin の遺伝子欠損マウスなどの解析から明らかにされた (8, 13, 16, 20)。それゆえ、胚発生中期

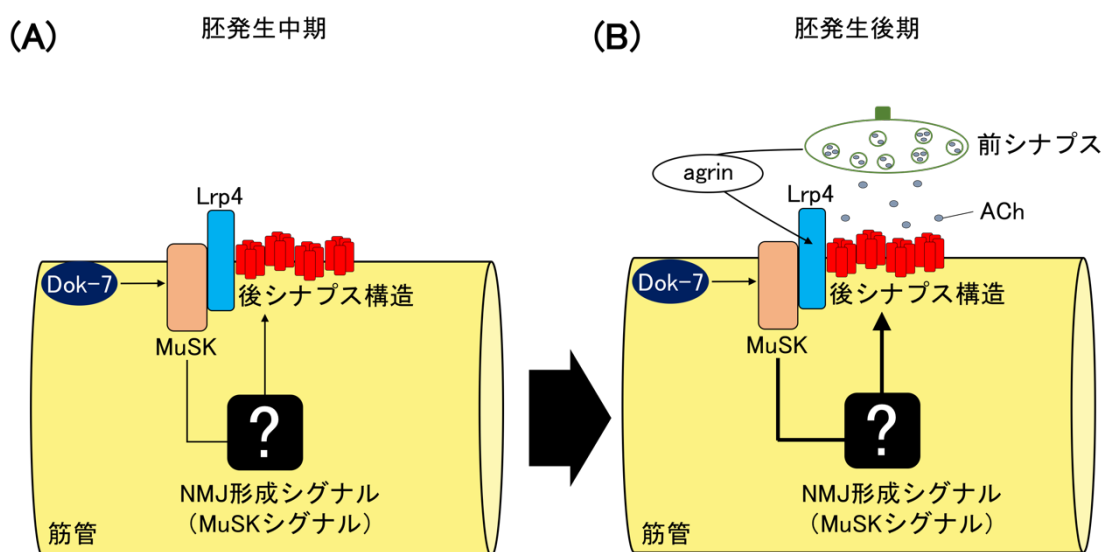


図 3. 胎生期の NMJ 形成 (概念図)

(A) 胚発生中期の筋管中央部において、運動神経・ agrin 非依存的に後シナプス構造が誘導され、AChR の凝集が形成される。この後シナプス分化は MuSK 依存性であり、その活性化には Dok-7 と Lrp4 が必須であると考えられている。(B) 胚発生後期に運動神経の軸索が筋管中央部に到達し、NMJ が形成される。運動神経由来の agrin は、MuSK の共受容体である Lrp4 に直接結合することで MuSK をさらに活性化し、その結果、後シナプス構造が安定化する。しかしながら、MuSK の活性化により駆動される NMJ 形成シグナル (A,B) の実体はほとんど理解されていない。

の運動神経・ agrin 非依存的な後シナプス形成を支える筋自律的な MuSK 活性化機構の存在が予想されていた。そのような状況の中、私の所属グループは、新規 Dok (Downstream of tyrosine kinases)ファミリー分子として Dok-7 を同定し(図 4)、Dok-7 が細胞内領域に直接結合することで MuSK を活性化することや、MuSK 依存的な後シナプス構造や NMJ の形成に必須の役割を果たすことを発見した (21, 22)。事実、MuSK 欠損マウスと同様に、Dok-7 欠損マウスにおいては、NMJ が形成されず、出生直後に呼吸不全により死亡する (21)。

さらに、私の所属グループは、a)培養筋管細胞において、Dok-7 が agrin による MuSK の活性化に必須であること (22)、b)骨格筋特異的に Dok-7 を過剰発現させたトランスジェニックマウス (Dok-7 Tg マウス) では、MuSK 活性化の亢進に伴い、NMJ 形成が

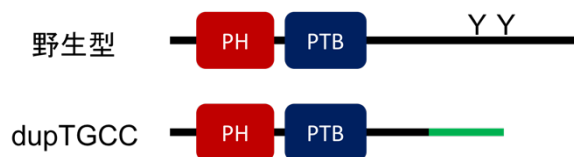


図 4. Dok-7 の構造

ヒト Dok-7 は 504 アミノ酸残基から構成され、その N 末端側には脂質分子との結合に重要な pleckstrin homology (PH)ドメインと Asn-Pro-X-Tyr (NPXY)モチーフとの結合に重要な phosphotyrosine-binding (PTB)ドメインを、C 末端側には 2 つの Src homology 2 (SH2) 標的配列(図では 2 つの Y で示す)を有する。DOK7 型筋無力症患者で最も多く認められる変異は c.1124\_1127dupTGCC (dupTGCC)フレームシフト変異であり、当該変異は SH2 標的配列を含む C 末側領域の約半分を欠失させ、本来とは異なる読み枠によるアミノ酸配列を付加させる (p.Ala378SerfsX30、図では緑線で示す)。私の所属グループは、PH ドメイン、PTB ドメイン、および SH2 標的配列のいずれもが培養筋管細胞における Dok-7 依存的な MuSK 活性化に重要であることを示している(53)。事実、PHドメインやPTBドメインの変異や、SH2 標的配列を欠失させる変異は DOK7型筋無力症を引き起こす。他方、私の所属グループと Hallock らは Dok-7 の SH2 標的配列に Crk ファミリー分子が結合し、Dok-7 がアダプター蛋白質として機能し得ることを示している。さらに、Hallock らの筋特異的 Crk/Crk-L 二重欠損マウスの解析により、NMJ 形成における Crk と Crk-L の重要性が示されている(77)。しかしながら、Crk/Crk-L が Dok-7 との結合を介して、NMJ 形成・維持に寄与するかは未解明であり、Dok-7 のアダプター機能の重要性は不明である。なお、DOK7 遺伝子の機能喪失型 (loss-of-function) の異常は致死性の胎児無動変形疾患 (fetal akinesia deformation sequence : FADS) を引き起こすことも知られている(51)。

増強されること (22)、c) 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) の原因となること (23)、d) *DOK7* 型筋無力症患者で最も多く認められる変異 (c.1124\_1127dupTGCC) に相応するフレームシフト変異を両アレルに有する *Dok-7*-knock-in マウスは筋無力症様の病態を示すこと (24) などを見出してきた。以上の結果から、胎生期においてはまず筋自律的な後シナプス構造の形成が *Dok-7* による MuSK 活性化により誘導され、その後、運動神経由来の agrin が MuSK をさらに活性化することで NMJ が形成・維持されると考えられている (図 3)。

一方、出生後の NMJ の維持においても、胎生期の NMJ 形成と同様に、MuSK とその活性化が重要であると考えられる。事実、MuSK や agrin、Lrp4 については、遺伝子欠損マウスを用いた解析などにより、NMJ の維持にも必要であることが示されている (25 - 28)。それゆえ、*Dok-7* も胎生期の NMJ 形成のみならず、出生後の NMJ の維持においても必要であることが示唆されるが、これまで出生後の維持における *Dok-7* の重要性は検証されていなかった。そこで、本研究では、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた *dok-7* 遺伝子の発現抑制実験により、出生後における *Dok-7* の役割について検討を加えた (第三章)。

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開



## 第二章 実験材料と実験方法

### 動物実験、および遺伝子組換え実験の実施について

動物実験、および遺伝子組換え実験においては関係法令を遵守し、本学部局（医科学研究所）の動物実験委員会、遺伝子組換え生物等安全委員会による実験計画の事前承認のもとに行った。

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開



### 第三章 出生後の NMJ 維持における Dok-7 の重要性の解明

#### [1] はじめに

序論で述べた通り、筋特異的な受容体型チロシンキナーゼである MuSK は胎生期の NMJ 形成と出生後の NMJ 維持の両者において必須の役割を果たしている (13, 25, 26)。さらに、運動神経由来の MuSK 活性化因子 agrin、および agrin と直接結合する MuSK の共受容体 Lrp4 についても、胎生期の NMJ 形成だけでなく、出生後の NMJ 維持にも必須であることが出生後特異的な遺伝子欠損マウスの解析により明らかにされている (16, 27, 28, 40)。他方、私の所属グループが MuSK に必須の細胞内活性化因子として発見した Dok-7 については、それが胎生期の NMJ 形成に必須であることに加え (21)、ヒト *DOK7* 遺伝子の劣性 (潜性) 変異が先天性筋無力症候群の原因となることや (23)、骨格筋での Dok-7 の強制発現が胎生期、出生後のいずれにおいても MuSK の活性化と NMJ 形成を亢進させることが示されている (22, 24)。しかしながら、Dok-7 が出生後の NMJ の維持に重要であるか否かは検証されていなかった。アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus : AAV) は骨格筋への遺伝子導入に優れており (41)、当該ウイルスを用いた shRNA 導入系 (AAV-shRNA) は骨格筋での遺伝子発現抑制に幅広く使用されている (42)。そこで、本研究では、マウス *dok-7* 遺伝子を標的とした shRNA を発現する AAV ベクターを作製し、出生後のマウスに投与することで、出生後における *dok-7* 遺伝子の発現抑制が NMJ の構造異常や筋無力症様の病態を引き起こすか否かについて検討を加えた。

## [2] 結果

### 1) 出生後の *dok-7* 遺伝子の発現抑制により運動機能が低下する

AAV-shRNA は個体における遺伝子の機能解析に使用されており (42)、AAV 血清型 9 (AAV9) は骨格筋への遺伝子導入に優れている (41)。そこで、マウス *dok-7* 遺伝子の発現を抑制するために、*dok-7* 遺伝子を標的とした 2 種類の shRNA を設計し、U6 プロモーターの制御下で当該 shRNA を発現する AAV9 ベクター (AAV9-shD7#1、#2) を作製した (図 7A)。なお、shD7#1 と #2 とで標的とする塩基配列は重複していない (表 1)。また、当該ベクターの感染細胞を可視化するため、CMV プロモーターの制御下で EGFP を発現するように設計した。陰性コントロールとしては、非標的 shRNA (特定の標的遺伝子を持たない shRNA) を発現する AAV ベクター (AAV9-shCtrl) を作製した。まず、2 週齢マウスに対し、これらのベクター ( $2 \times 10^{11}$ vg) を腹腔投与により全身性に導入した。予備的な解析により、AAV9-shD7#1 あるいは #2 投与群では、10 週齢 (AAV ベクター投与 8 週後) において筋無力症様の症状 (後述) が顕著に認められたため、当該週齢での解析を実施した。また、AAV 投与マウスの種々の骨格筋における EGFP の発現を蛍光顕微鏡で検討したところ、見かけ上、長趾伸筋 (extensor digitorum longus : EDL) での発現が最も高かったため、解析対象として EDL を選定した。マウス骨格筋内在性の Dok-7 蛋白質を検出できる抗体を本解析時に入手することができなかったため、AAV ベクターによる発現抑制効果は *dok-7* 遺伝子の発現レベルで評価した。10 週齢 (AAV ベクター投与 8 週後) における EDL の *dok-7* 遺伝子の発現レベルを定量 RT-PCR により検討したところ、AAV9-shD7#1、あるいは #2 投与群においては、非投与群と比較して、*dok-7* 遺伝子の発現レベルがそれぞれ 36.5%、30.1% にまで低下しており、出生後における *dok-7* 遺伝子の発現抑制が認められた (図 7B)。他方、

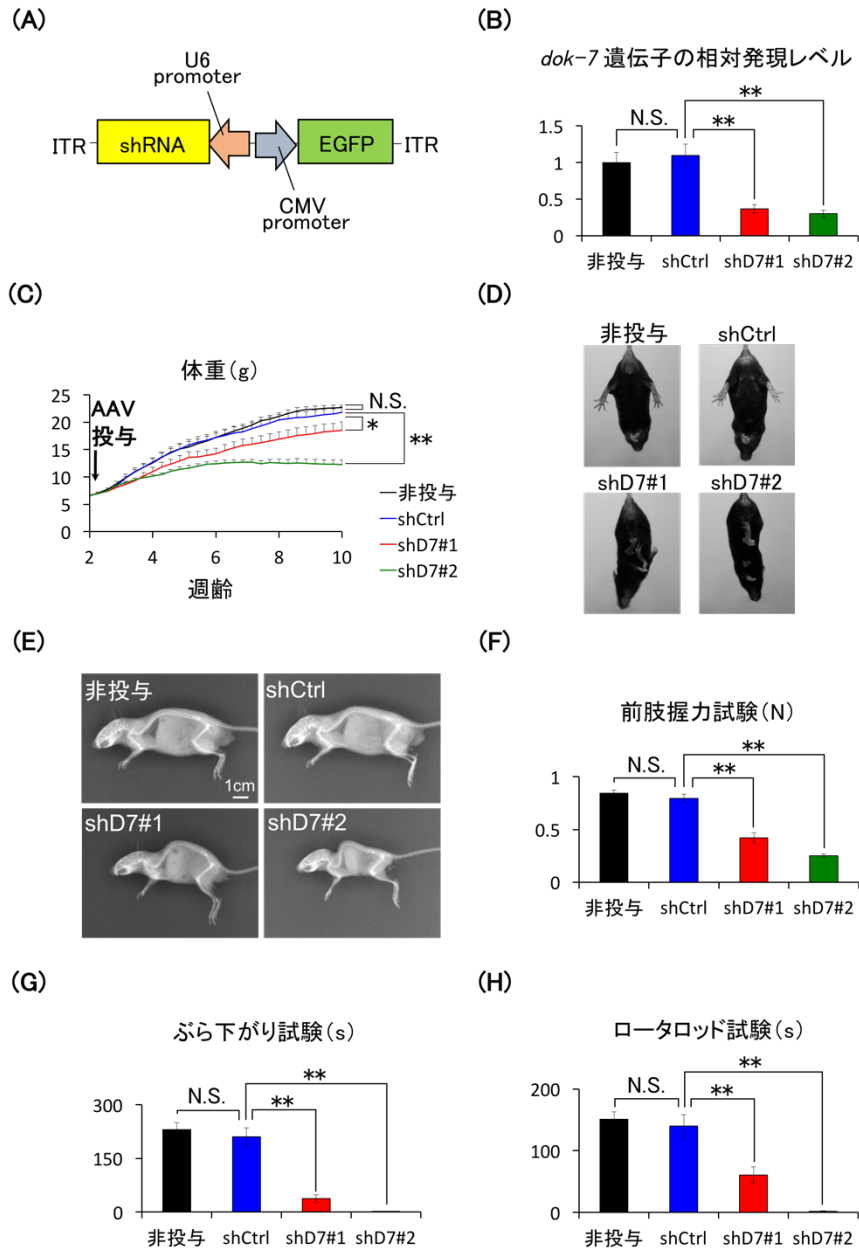


図 7. 出生後の *dok-7* 遺伝子の発現抑制により筋無力症様の症状が引き起こされる

(A) 使用した AAV ベクターの模式図。ベクターは shRNA 発現カセットと EGFP 発現カセットを含んでいる。ITR (inverted terminal repeat) は、AAV ゲノム両末端の T 字型のヘアピン構造であり、ウイルス粒子へのパッケージングなどに必要である。(B) AAV9-shD7 の投与により、EDL における *dok-7* 遺伝子の発現レベルが減少する。10 週齢マウス (AAV 投与 8 週後) における *dok-7* の mRNA レベルを定量 RT-PCR により測定した。各個体の *dok-7* 遺伝子の発現レベルは *hprt* 遺伝子の発現レベルで標準化し、非投与マウスの値を 1 とした (各グループにつき  $n = 5$ )。 (C) AAV9-shD7 の投与により体重が減少する (各グループにつき、 $n = 5 - 10$ )。統計解析は 10 週齢で行った。 (D) AAV9-shD7 の投与により 10 週齢マウスにおいて hindlimb claspings が引き起こされる。 (E) AAV9-shD7 の投与により thoracolumbar kyphosis が引き起こされる。X 線撮影により 10 週齢でのマウス全体像を示した。 (F - H) AAV9-shD7 の投与により運動機能が低下する。10 週齢マウスに対し、前肢握力試験 (F) では握力 (newton, N) を、ぶら下がり試験 (G) とロータロッド試験 (H) では落下するまでの時間 (秒, s) を測定し、それぞれの値を運動機能の指標とした (各グループにつき、 $n = 5 - 10$ )。平均値  $\pm$  標準誤差。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、N.S.、not significant (有意差なし)。 (Eguchi et al., *Genes Cells*, 21:670-676, 2016 より改変)

AAV9-shCtrl 投与群と非投与群に有意な差は認められなかった (図 7B)。前述の通り、AAV9-shD7#1、あるいは#2 投与群には筋無力症様の症状が認められた。10 週齢における AAV9-shD7#1、あるいは#2 投与群の体重は、AAV9-shCtrl 投与群と比較して、有意な差を持って減少していた (図 7C)。また、AAV9-shD7#1、あるいは#2 投与群は尾懸垂時に運動機能の異常を示す形質の一つである hindlimb clasping (後肢の抱擁) (43 - 45) を示した (図 7D)。さらに、これらのマウスにおいては、近位筋の低下の指標となる thoracolumbar kyphosis (胸椎と腰椎の間の異常な彎曲) (46 - 48) が認められた (図 7E)。以上の結果より、AAV9-shD7#1、あるいは#2 投与群では筋力の低下を含めた、運動機能の低下が予想された。そこで、これらのマウスの運動機能を定量的に評価するために、前肢握力試験 (図 7F)、ぶら下がり試験 (図 7G)、および、ロータロッド試験 (図 7H) を行ったところ、いずれの試験においても AAV9-shD7#1、あるいは#2 投与群の運動機能の低下が認められた。しかしながら、AAV9-shCtrl 投与群と非投与群には運動機能の有意な差は認められなかった。以上の結果より、出生後の *dok-7* 遺伝子の正常な発現レベルが正常な運動機能に必要であることが示された。

## 2) 出生後の *dok-7* 遺伝子の発現抑制により NMJ が縮小する

次に、出生後の *dok-7* 遺伝子の発現抑制が NMJ の維持に与える影響を調べた。哺乳類の殆どの骨格筋では、NMJ は各筋管の中央部に一つ形成され、運動神経の軸索末端は AChR が高度に凝集した後シナプス構造 (AChR クラスター) と対合している。10 週齢マウスの EDL の NMJ を可視化するために、NMJ の後シナプス構造を AChR に結合する蛇毒である  $\alpha$ -bungarotoxin により、また運動神経を軸索マーカーである neurofilament-L、および前シナプスマーカーである synapsin-1 に対する抗体により蛍光標識した (図 8A)。共焦点顕微鏡により得られた NMJ 画像を解析した結果、AAV9-shD7#1、あるいは#2 投与群のいずれも AChR クラスターと運動神経の軸索末端

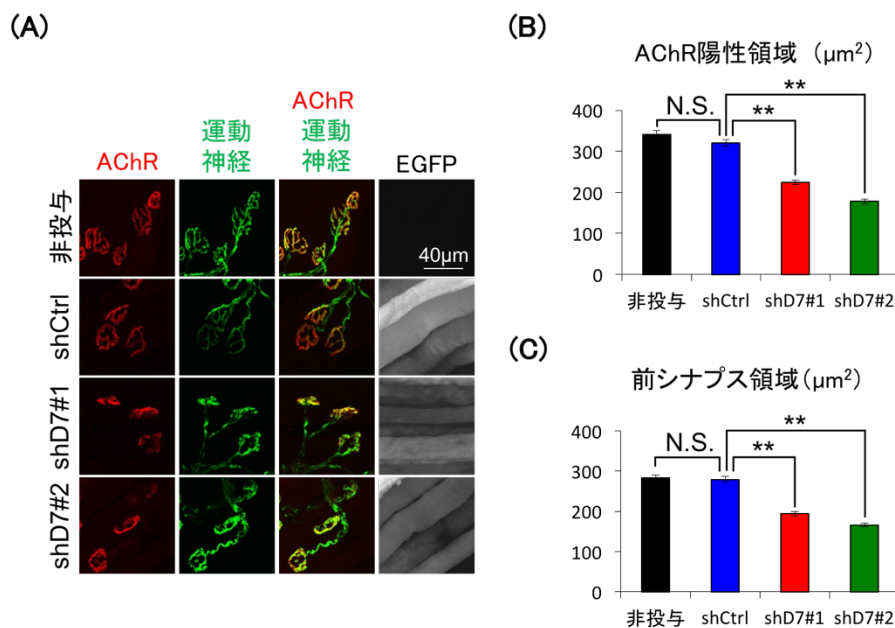


図 8. 出生後の *dok-7* 遺伝子の発現抑制により NMJ が縮小する

(A) 10 週齢マウスの EDL における NMJ を Whole-mount 染色により可視化した。運動神経の軸索とその末端 (前シナプス) は neurofilament-L と synapsin-1 に対する抗体を用いて染色し (緑)、AChR は  $\alpha$ -bungarotoxin を用いて染色した (赤)。AAV の感染は EGFP の発現により確認した。(B) EDL における各 NMJ の AChR クラスター面積を定量した (3 匹のマウスより 200 以上の NMJ を解析した)。(C) EDL における各 NMJ の運動神経軸索末端の面積を定量した (3 匹のマウスより 200 以上の NMJ を解析した)。平均値  $\pm$  標準誤差。\*\* $P < 0.01$ 、N.S., not significant (有意差なし)。(Eguchi et al., *Genes Cells*, 21:670-676, 2016 より改変)

の対合は認められたものの、コントロール群と比較して、各 AChR クラスターの面積は有意に減少していた (図 8B)。また、AAV9-shD7#1、あるいは#2 投与群では AChR クラスターに対合する運動神経の軸索末端の面積も減少していた (図 8C)。以上の結果より、出生後の *dok-7* 遺伝子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。

### 3) 出生後の *dok-7* 遺伝子の発現抑制により NMJ 制御因子の遺伝子発現が減弱する

NMJ の形成・維持において、MuSK の活性化を起点とする細胞内シグナル (MuSK シグナル) が MuSK 自身や AChR サブユニットを含む NMJ 制御因子 (NMJ の形成・維持・機能に重要な因子) の遺伝子発現を制御していることが知られている (29 - 31、図 5)。これまで、私の所属グループでは、骨格筋における Dok-7 の強制発現が MuSK の活性化を増強し、*MuSK* や *AChR $\alpha$ 1* の遺伝子発現を亢進させることを示してきた (22)。

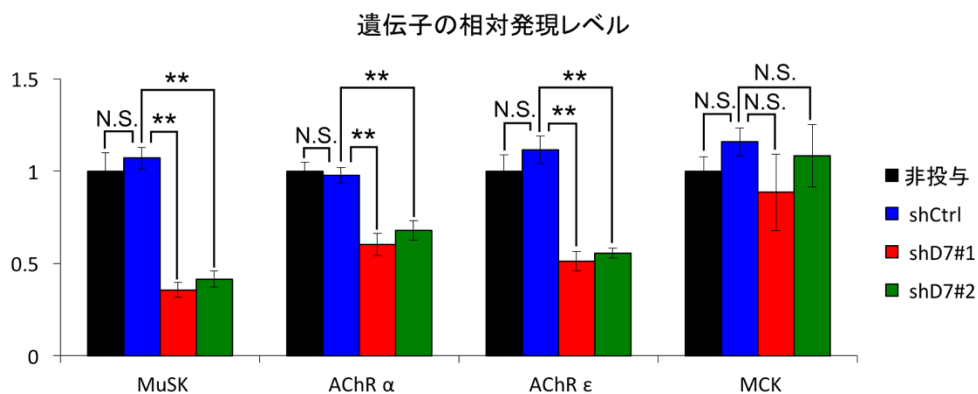


図 9. 出生後の *dok-7* 遺伝子の発現抑制により NMJ 制御因子の遺伝子発現が減弱する

10 週齢マウスの EDL における MuSK、AChR サブユニット ( $\alpha$ 1 と  $\epsilon$ )、および筋クレアチンキナーゼ (muscle creatine kinase : MCK) の mRNA レベルを定量 RT-PCR により解析した。定量した 4 遺伝子の発現レベルそれぞれについて、*hprt* 遺伝子の発現レベルで標準化し、非投与マウスの値を 1 とした (各グループにつき、 $n = 5$ )。平均値  $\pm$  標準誤差。\*\* $P < 0.01$ 、N.S.、not significant (有意差なし)。(Eguchi et al., *Genes Cells*, 21:670-676, 2016 より改変)

そこで、出生後における *dok-7* 遺伝子の発現抑制が MuSK シグナルに与える影響を調べるために、NMJ 制御因子の遺伝子発現レベルを定量 RT-PCR により評価した。コントロール群と比較して、AAV9-shD7#1、あるいは#2 投与群においては、EDL における *MuSK* と AChR サブユニットをコードする遺伝子 (*AChR $\alpha$ 1*、*AChR $\epsilon$* ) の発現レベルが有意な差を持って減少していた (図 9)。他方、筋管全域で発現し、NMJ との関連が報告されていない筋クレアチンキナーゼ (muscle creatine kinase : MCK) の遺伝子発現レベルには、有意な変化は認められなかった。以上の結果より、出生後における *dok-7* 遺伝子の発現抑制は骨格筋における MuSK シグナルを減弱させることが示唆された。

### [3] 考察・今後の展望

*DOK7*型筋無力症の患者の多くは幼少期以降に発症し、20-30代に発症する例も報告されている(49, 50)。これらの知見から *DOK7*型筋無力症の多くが出生後のNMJ維持の破綻によって発症することが示唆されている。しかしながら、*DOK7*遺伝子の機能喪失型(loss-of-function)の異常は致死性の胎児無動変形疾患(fetal akinesia deformation sequence : FADS)を引き起こすことも報告されている(51)。それゆえ、*DOK7*遺伝子の機能喪失型ではない異常についても、NMJ形成を含めた胎児の発達に影響を与えることが予想され、出生後のDok-7の発現がNMJの維持に必要であるか否かは未確定であった。本研究では、AAV9-shD7#1、および#2を用いて、出生後における*dok-7*遺伝子の発現抑制が運動機能の低下を含めた筋無力症様の症状を引き起こすことを示した(図7)。しかしながら、本研究で用いたAAV9は骨格筋だけではなく、*dok-7*が発現している心臓を含めた他の臓器にも感染するため(21, 41)、AAV9-shD7#1、あるいは#2投与群に認められる筋無力症様の症状は、骨格筋以外の組織における*dok-7*遺伝子の発現抑制によって引き起こされた可能性も考えられた。しかしながら、私の所属グループでは、*DOK7*型筋無力症患者で最も多く認められる変異(c.1124\_1127dupTGCC)に相応するフレームシフト変異を両アレルに有し、短命で運動機能が著しく低下するDok-7-knock-inマウスを作出しており、当該マウスに対し、骨格筋特異的にDok-7を過剰発現させると、その生存期間と運動機能が正常レベルと同程度まで回復することを見出していた(24)。それゆえ、AAV9-shD7#1、あるいは#2投与群に認められた筋無力症様の症状は、骨格筋における*dok-7*遺伝子の発現抑制に起因するものと考えられる。しかし、AAV9-shD7#1と#2投与群を比較すると、EDLにおける*dok-7*発現抑制のレベルに大きな差がないにも関わらず、運動機能障害の程度



や体重変化の差が大きかった。これについては、EDL 以外の筋組織が未解析であり、また筋萎縮も未検討である。今後、種々の筋組織について、*dok-7* 遺伝子および Dok-7 蛋白質の発現レベルの定量解析、NMJ の形態学的解析や筋繊維の組織学的解析、および NMJ 制御因子の遺伝子発現レベルの定量解析を行う必要がある。

第一章で述べたように、*DOK7* 型筋無力症に最も高頻度に認められる c.1124\_1127dupTGCC 変異を含め、当該疾患に認められるナンセンス変異やフレームシフト変異の多くは Dok-7 の C 末側に存在する 2 箇所の Src homology 2 (SH2) 標的配列を欠失させる (図 4) (52)。私の所属グループは、この配列がアダプター分子である Crk の SH2 ドメインとの結合と培養筋管での MuSK 活性化に重要であることを発見している (53)。事実、当該 SH2 標的配列を欠失した Dok-7 変異体を発現する上記 Dok-7-knock-in マウスでは、骨格筋での MuSK 活性化が減弱していた (24)。加えて、Dok-7 の N 末側に存在する、MuSK 活性化に重要な PH ドメインと PTB ドメインの中にミスセンス変異を持つ症例が発見されており (52, 53)、これらの変異を導入した Dok-7 変異体では培養筋管細胞での MuSK 活性化能が低下することが示されている (53)。以上より、*DOK7* 型筋無力症の発症は MuSK 活性化能の減弱に起因すると考えられている。しかしながら、SH2 標的配列、PH ドメイン、PTB ドメイン以外の領域における *DOK7* 変異が筋無力症の原因になることも知られており、このような変異においては、Dok-7 の発現レベルの低下がその病因として議論されている (52)。事実、終止コドンの read through 変異 (1513>C) は HEK293 細胞 (ヒト胎児腎臓細胞) での強制発現系において Dok-7 タンパク質の発現レベルを減弱させることが報告されており (54)、Dok-7 タンパク質の合成・分解調節機構と筋無力症の関連が示唆されている。それゆえ、出生後の *dok-7* 遺伝子の正常な発現レベルが NMJ の維持に必要であるとい

う本研究結果を踏まえ (図 8)、今後、*DOK7* 遺伝子の発現を司る cis 領域や転写制御因子の解析から、*DOK7* 遺伝子の転写調節機構を解明し、当該機構の破綻により発症する筋無力症例を検索していくことが重要である。

前述の通り、胎生期の NMJ 形成において、MuSK の活性化に必須の役割を担う分子 Dok-7、agrin、Lrp4 のうち、agrin と Lrp4 については、出生後の NMJ の維持にも必要であることが示されていた (27, 28)。本研究により、出生後の *dok-7* 遺伝子の正常な発現レベルが NMJ の維持と MuSK 依存的な NMJ 制御因子の遺伝子発現に重要であることが明らかになった (図 8, 9)。以上より、胎生期の NMJ 形成のみならず、出生後の NMJ の維持においても、agrin と Dok-7 の協調的な MuSK の活性化が重要であることが示唆される。しかしながら、これまで私の所属グループは、agrin が出生後の NMJ 維持においてのみ必要な、MuSK 活性化以外の機能を有することを示している (55)。また、collagen  $\alpha 3-6$  (IV) 鎖や細胞外マトリックス蛋白質 biglycan は胎生期の NMJ 形成には不要であるが出生後の NMJ 維持には重要であることが知られている (56, 57)。これらの知見は胎生期の NMJ 形成と出生後の NMJ 維持を制御する分子機構が必ずしも同一ではないことを示している。それゆえ、NMJ の形成・維持における Dok-7 の作用機序を解明するには、発生・発達段階ごとに、Dok-7 が関わるシグナル経路を明らかにすることが重要と考えられる。

#### 第四章 NMJ の形成・維持に重要な MuSK 下流遺伝子の同定

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開



当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開



当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

## 第五章 結語

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

## 引用文献

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開



当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開



当該部分については、5年以内に雑誌などで刊行予定のため、非公開

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、日頃の研究や論文作成において、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学医科学研究所 癌・細胞増殖部門 腫瘍抑制分野 山梨 裕司教授に深く感謝します。また、様々な実験手法や論理的な思考法を丁寧にご指導いただいた手塚徹助教に深く感謝します。ミーティングや日頃のディスカッションにおいて的確なアドバイスをいただいた植田 亮助教と有村 純暢助教に深く感謝します。AAV の力価測定や組織からの RNA 抽出などで、多大なるご助力をいただいた八神 貴子さんに深く感謝します。様々な事務手続きで、いつも丁寧な対応をして頂いた横田 奈美さんに深く感謝します。困難の多い研究生生活において、いつも支えてくださった銭林 美香さんに深く感謝します。マウスの運動機能解析や NMJ の染色などの手法を丁寧、かつ細かく教えていただきました三好 貞徳氏に深く感謝します。日頃のディスカッションを通して、深い洞察に基づくご指摘をいただきました如澤 浩樹氏に深く感謝します。ラボ生活に限らず、多くの面で助けていただいた菅野 達央氏に深く感謝します。網羅的な遺伝子発現解析でご助力いただいた齊藤 麻子さんに深く感謝します。その他、ラボ生活で苦楽をともにし、自分を支えてくれた皆様に深く感謝します。また、自分の研究生生活を理解し、支えてくれた家族に深く感謝します。