

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：神経筋接合部・骨格筋の興奮伝達障害の病態解明と治療法開発研究
2. 研究開発代表者：大野欽司（国立大学法人名古屋大学）
3. 研究開発の成果

Laser capture microdissection (LCM)法により単離したマウス脊髄前角細胞(spinal motor neuron, SMN)の網羅的 transcriptome 解析により、分泌因子 R-spondin 2 (Rspo2)が SMN に特異的に発現していることを見いだした。Rspo2 ノックアウトマウス横隔膜の神経筋接合部(NMJ)の光顕・電顕による解析により NMJ の構造の破綻を認めた。培養細胞を用いた解析により、Rspo2 は agrin を必要としない AChR 集積活性を示すことを確認するとともに、NMJ に高発現の膜タンパク受容体 Lgr5 が Rspo2 の受容体であることを明らかにした。

さらに、LCM 解析にて新たに別の 2 分子が Rspo2 と同様に SMN に特異的に発現し、AChR 集積を誘導するという予備データを得て、ノックアウトマウスの解析を開始した。

CMS のエクソーム解析・全ゲノム解析にて CMS の一型に分類される Escobar 症候群においてアセチルコリン受容体 γ サブユニット遺伝子 *CHRNA1* に新規ミスセンス変異を同定し、研究代表者が 1996 年に報告したアセチルコリン受容体 α サブユニット(*CHRNA1*)のミスセンス変異(Ohno K et al. *Neuron* 17: 157-170, 1996)との類似性から、Escobar 症候群が胎児型 AChR のチャンネル動態異常であるとの仮説に基づき、Escobar 症候群の分子病態を解明するための電気生理学的な解析を開始した。

神経終末から放出をされる agrin は筋終板膜の LRP4 に結合し、LRP4 と共受容体を形成する膜タンパク MuSK のリン酸化を誘導する。リン酸化 MuSK はアセチルコリン受容体 (AChR) β サブユニットのリン酸化を誘導することにより AChR を筋終板へ集積をさせる。同時に LRP4 は特に骨において Wnt/ β -catenin シグナルに対する抑制性受容体として働く。2014 年度に CMS の一例において世界で初めて *LRP4* 遺伝子変異を同定し、LRP4 の第 3 ベータプロペラドメインの外周の遺伝子変異は agrin/LRP4/MuSK シグナル系を阻害し、ドメイン中央部は Wnt シグナル系を阻害することを明らかにした(Ohkawara B et al. *Hum Mol Genet* 23: 1856-1868, 2014)。2015 年度は別の CMS 患者の *LRP4* 遺伝子に世界 2 例目となる p.Glu1233Ala ホモ接合変異を同定し、2014 年度に報告した変異と同様に、p.Glu1233Ala 変異は agrin/LRP4/MuSK シグナル系を阻害することを報告した(Selcen D et al. *JAMA Neurol* 72: 889-896, 2015)。

iPS 樹立拠点機関（京都大学 CiRA, NCNP）との共同研究により、PP-iPSC, CMS-iPSC, SJS-iPSC の樹立を行い、MyoD の誘導により筋芽細胞への分化誘導が可能であることを確認した。

既認可薬のスクリーニングにより濃度依存的に AChR クラスター形成を促進する薬剤と末梢神経軸索延長を促進する薬剤を同定し、モデル動物において効果を確認した。

AChR α サブユニットの遺伝子変異における exon P3A のスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴを同定した。

骨格筋特異的に *GFPT1* 遺伝子エクソン 9 が含まれるスプライシング分子機構を解明した。CMS 患者において同定をした *GFPT1* 遺伝子ミスセンス変異が *GFPT1* 酵素活性を低下させることを明らかにするとともに、アンチセンスオリゴによる *GFPT1* エクソン 9 のスキッピングにより *GFPT1* 酵素活性を上昇させることが可能であることを実証した。

4. その他

特記事項はありません。