

研究テーマ***DOK7*型筋無力症の解明と治療法開発の基礎研究**

1. 緒言

筋無力症は骨格筋収縮の運動神経支配に必須のシナプスである神経筋接合部 (NMJ: Neuromuscular junction) の形成及び機能不全によって発症する疾患であり、その名の通り、易疲労性の筋力低下を特徴とする。筋無力症の多くは重症筋無力症 (MG: Myasthenia gravis) やランバート・イートン筋無力症のような自己免疫疾患と遺伝性疾患である先天性筋無力症候群 (CMS: Congenital myasthenic syndromes) に大別される。MGについてはその多くがNMJの神経筋伝達物質であるアセチルコリン (ACh: Acetylcholine) の受容体 (AChR: ACh receptor) に対する自己抗体によって発症し、また、ランバート・イートン筋無力症はNMJの前シナプス部位にて機能するカルシウムチャネルに対する自己抗体によって発症する。一方、CMSについてもAChRやAChの合成、分解酵素等のNMJ関連因子の遺伝子異常が原因として知られているが、原因遺伝子が未知の病態が多く残されている。

我々の研究グループは細胞内チロシンリン酸化シグナルを研究する過程で、独自に同定したアダプター分子Dok-1の類縁分子としてDok-7を同定し^{1), 2)}、それがアダプター様構造をもつにもかかわらず、NMJの形成に必須の受容体型チロシンキナーゼであるMuSKの活性化因子として、MuSKと同じく、NMJの形成に不可欠の役割を担っていることを発見した^{2), 3)}。さらに、NMJの形成不全を伴う肢帯型の先天性筋無力症がDok-7の様々な変異によるMuSK活性化能の低下によって発症することを突き止め、*DOK7*型筋無力症 (*DOK7* myasthenia) と言う新たな疾患概念を確立した^{4), 5)}。そこで、*DOK7*型筋無力症の解明と治療法の開発を念頭に、当該疾患のモデル動物を用いた分子病態の解明とその制御法の探索を目的とする本研究を実施した。

2. 方法

I) モデルマウスの樹立と病態解析

本研究においては、所謂ノックインマウスの作成とDok-7欠損マウスへの変異型*DOK7*遺伝子 (トランスジェーン) の導入により、*DOK7*型筋無力症の原因となる遺伝子変異をもつモデルマウスを作成し、その病態解析を進める。

II) モデルマウスを利用した治療法開発の基礎研究

上述の通り、申請者らは*DOK7*型筋無力症に伴う変異がDok-7のMuSK活性化能を減弱、もしくは欠失させることを解明している。そこで、本研究においては、Dok-7を高発現するトランスジェニックマウスと上記のモデルマウスを交配し、Dok-7の人為的な高発現による病態の改善について検討を加える。同時に、筋疾患への使用が期待されるAAV (アデノ随伴ウイルス) 等のベクターによる遺伝子導入法を利用して、各モデルマウスの骨格筋に正常なDok-7の発現を導入し、「遺伝子治療」の可能性を検討する。

3. 結果

I) モデルマウスの樹立と病態解析

本課題のために、まず、変異型*DOK7*遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを樹立し、Dok-7欠損マウスとの交配を進めた。その結果、変異型*DOK7*遺伝子を発現するDok-7欠損マウスの樹立に成功した。しかしながら、恐らく変異型*DOK7*遺伝子の過剰発現のために、当該マウスには筋無力症様の病態は認められなかった。そこで、現在、変異型*DOK7*遺伝子の低発現マウスを樹立し、その解析を進めると共に、同様の変異もつノックインマウスの作出を進めている。

II) モデルマウスを利用した治療法開発の基礎研究

本課題のために、まず、Dok-7を骨格筋にて高発現するトランスジェニックマウスを樹立した。その結果、筋管全域にわたるDok-7の高発現によって、正常なNMJ形成部位である筋管中央部分でのNMJ形成シグナルの増強効果が確認された³⁾。さらに、NMJを形成することができないDok-7欠損マウスにこのトランスジーンを導入したところ、筋管中央部でのNMJ形成の促進効果が確認された。*DOK7*型筋無力症のモデルマウスの作出が遅れていることを踏まえ、他の先天性筋無力症のモデルマウスに当該トランスジーンを導入したところ、やはり、筋管中央部でのNMJ形成の亢進が確認された。また、これらの結果を踏まえ、病態発症後のモデルに対するAAVベクターを用いた遺伝子治療法の開発に着手し、既にウイルスコンストラクトの作出に成功している(武田伸一博士らとの共同研究)。

4. まとめ

本研究により、骨格筋の全域にわたるDok-7の過剰発現によって筋管中央部でのNMJ形成シグナルが増強されることが判明し、また、ある種の筋無力症モデルマウスにおけるNMJ形成の促進効果が確認された。残念ながら、*DOK7*型筋無力症モデルの作出には至っていないが、その過程において、変異型Dok-7であっても、その過剰な発現は筋無力症病態の回避に十分であることが強く示唆された。しかしながら、現実の治療技術の開発には筋無力症様病態の発症後に実行可能な技術の開発が不可欠である。この点において、現在開発中のDok-7発現AAVベクターを用いた遺伝子治療実験の実施を急ぐ必要がある。また、低分子化合物による治療技術の開発も重要な課題であるが、多くの化合物が標的分子の機能阻害剤であることを考えると、Dok-7/MuSKを介したNMJシグナルの抑制機構についても、その解明を急ぐ必要がある。

以上の通り、本研究によって得られた知見は*DOK7*型筋無力症の治療法開発の基盤となるべき重要な情報と言える。

5. 謝辞

本研究に対するDavid Beeson博士、本村政勝博士、武田伸一博士らの研究グループからの御貢献に謝意を表すと共に、財団法人病態代謝研究会からの御支援に深謝いたします。

6. 発表論文、参考文献

- 1) Yamanashi, Y. & Baltimore, D. : Identification of Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok. *Cell*, **88**: 205-211, 1997.

- 2) Okada, K., Inoue, A., Okada, M., Murata, Y., Kakuta, S., Jigami, T., Kubo, S., Shiraishi, H., Eguchi, K., Motomura, M., Akiyama, T., Iwakura, Y., Higuchi, O., & Yamanashi, Y.: The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science*, **212**: 1802-1805, 2006.
- 3) Inoue, A., Setoguchi, K., Matsubara, Y., Okada, K., Sato, N., Iwakura, Y., Higuchi, O., & Yamanashi, Y.: Dok-7 activates the muscle receptor kinase MuSK and shapes synapse formation. *Science Signaling*, **ra7**, 2009.
- 4) Beeson, D., Higuchi, O., Palace, J., Cossins, J., Spearman, H., Maxwell, S., Newsom-Davis, J., Burke, G., Fawcett, P., Motomura, M., Muller, J., Lochmuller, H., Slater, C., Vincent, A., & Yamanashi, Y.: Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junctional synaptopathy. *Science*, **213**: 1975-1978, 2006.
- 5) Hamuro, J., Higuchi, O., Okada, K., Ueno, M., Iemura, S., Natsume, T., Spearman, H., Beeson, D., & Yamanashi, Y.: Mutations causing DOK7 congenital myasthenia ablate functional motifs in Dok-7. *J. Biol. Chem.*, **283**: 5518-5524, 2008.