

主論文の要旨

R-spondin 2 promotes acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction via Lgr5

〔 R-spondin 2 は Lgr5 を介して神経筋接合部での
アセチルコリン受容体のクラスタリングを促進する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻

運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：西田 佳弘 准教授)

中島 宏彰

【緒言】

神経筋接合部(NMJ)は脊髄運動神経細胞 (SMNs)と骨格筋との間に形成されるシナプスである。骨格筋の収縮はSMNsから放出されるアセチルコリンによってコントロールされている。神経筋の伝導が行われるためには、筋表面のアセチルコリンレセプター(AChR)が凝集する必要がある。AChRの凝集はSMNsから放出されるアグリンによって誘導されるが、発生初期はWntシグナルによって誘導される。

Rspoファミリーは細胞膜表面のLgr4や5に直接結合し、Wntシグナルを活性化することで様々な組織の発達や分化に関与している事が明らかとなってきた。しかし、Rspo2の神経やNMJにおける役割は不明である。今回我々は、Rspo2がSMNsから産生され、NMJにおいてLgr5と結合し、LRP4/MuSKシグナルを活性化することで、AChRの凝集を誘導することを明らかとしたので報告する。

【方法及び結果】

Rspo2はSMNsに発現するWnt関連遺伝子のうち、最も高発現な遺伝子である

6週令のC57BL6/Jマウス頸髄からSMNs及び後角細胞をレーザーマイクロダイセクション法にて切り出し(Fig. 1A-D)、RNAを抽出した。抽出したRNAをAffymetrix Exon 1.0 ST array及びRNA-sequencingを用いて網羅的に発現遺伝子を行ったところ、SMNsで10倍以上高発現している164の遺伝子を同定し、Rspo2は39のWnt関連遺伝子のうち、SMNsで最も高発現を示した(Fig. 1E)。次にin situ hybridizationを行い、Rspo2がSMNsに高発現していることを組織学的に確認した(Fig. 1F)。

Rspo2はLRP4/MuSKシグナルを活性化し、Agrinに非依存的にLgr5を介してWntシグナルを活性化させ、AChR凝集を誘導する

Rspo2は骨格筋の分化に関連する事が知られているため、Rspo2の発現を脊髄と骨格筋で比較検討した。その結果、Rspo2は胎生18.5日の脊髄において、骨格筋に比べ56倍高発現しており、脊髄有意の発現様式をとっていた(Fig 2A)。中でも、Rspo2はNMJに豊富に発現していたため(Fig 2B)、我々はRspo2のNMJにおける機能解析を行った。筋芽細胞株C2C12にRspo2を添加したところ、Rspo2はAChRの凝集を誘導した(Fig 2C)。次にRspo2のMuSK活性化における役割を明らかとするため、MuSKからの細胞内シグナル下流にあるactivating transcription factor 2 (ATF-2) luciferase reporter (ATF2-luc)の評価を行ったところ、Rspo2は本シグナルを活性化し(Fig 2D)、このシグナルはLRP4を強発現させることで更に活性化された。また、Rspo2によりMuSKのリン酸化が濃度依存性に誘導され(Fig 2E, F)、その効果はAgrinが誘導するAChRの凝集に対し、相加的な効果を示した(Fig 2C, G, H)。

Lgr5はNMJで発現を認め(Fig 3A, B)、C2C12でLgr5はRspo2と免疫沈降された。また、MuSKはLRP4共発現下でのみLgr5と免疫沈降されたため、Lgr5はLRP4を介してMuSKと結合している可能性が示唆された(Fig 3C)。また、Rspo2によるATF2-lucの活性化はLgr5をノックダウンすることで抑制され(Fig 3D)、Rspo2によるMuSKのリン酸化

化もLgr5のノックダウンによって抑制され、過剰発現によって促進された(Fig 3 E, F)。更に、C2C12を用いて形成した筋管においても、Lgr5をノックダウンすることで、Rspo2が誘導するAChRの凝集は抑制された(Fig. 3G, H)。以上の結果から、Lgr5はNMJにおけるRspo2のreceptorとして機能しており、LRP4を介してMuSKをリン酸化させ、AChR凝集を誘導する上で重要な働きを有している可能性が示唆された。

Rspo2欠損マウス(KO)ではAChR凝集及び、NMJの微細構造、シグナル伝達が障害されている

生体におけるRspo2の機能を解析するため、Rspo2 KOを用いて更なる検討を行った。Rspo2 KOは出生後すぐに呼吸困難のため死亡するが、SMNsの数には差を認めなかった(Fig 4A, B)。また、Rspo2はC2C12での早期筋形成に影響を与える可能性が報告されているため、筋肉の組織学的な形態観察を行ったが、有意差は認めなかった(Fig 4C-I)。以上より、生体でのRspo2はSMNsの生存や筋形成に影響を与えていない可能性が示唆された。

次に、Rspo2 KOにおけるNMJの形態を検討した。胎生18.5日の横隔膜におけるNMJの形態を観察したところ、Rspo2 KOでのNMJの面積はwild typeに比べ約2倍と大きくなっていった (Fig 5G, H)。一方で、synaptophysin陽性の神経終末に覆われているAChRの面積はRspo2 KOでも変わらず、Rspo2 KOにおいても神経終末は適切にNMJに到達している事が示された (Fig 5I)。

電子顕微鏡を用いてNMJの微細構造を観察したところ、Rspo2 KOではsynaptic cleftが広がっており、シナプス小胞が大きく、その数が少ない事が明らかとなった(Fig 5J, K and Table 1)。更にNMJでのシグナル伝達についても検討を行った結果、the miniature endplate potentials (MEPPs) やthe compound muscle action potentials (CMAPs) はRspo2 KOで障害を受けていた(Table 2)。以上の結果より、Rspo2はNMJでのAChRの凝集やシグナル伝達に重要な役割を有している可能性が示唆された。

【考察】

Rspo2は膜表面のLRP4を増加させ、Rspo2がLgrと結合することでユビキチン化を促し、FzdやLrpが安定化することが他の臓器で報告されている。NMJにおいても同様の機構でLRP4/MuSKを増加させ、AChR凝集を誘導している可能性が高いと考えられた。

また、Rspo2 KOでAChRの面積が増加し、その密度は低下していたが、この表現形はWnt4やCtnnb1 KOマウスといったWnt関連因子KOで報告された表現形と一致する。一方で、シナプス間隙の拡大はAgrin KOで報告されているものの、その他の遺伝子KOでは報告されていなかった。シナプス小胞の形態の異常はシナプス小胞のリサイクリング障害の際に認められることが多く、電気生理学的なMEPPの結果と一致していた。以上の結果より、Rspo2はAgrinやWnt KOのNMJにおける表現形と相同性があり、NMJにおけるAChR凝集やシグナル伝達に関与している可能性が高いと考えられた。

【結語】

Rspo2はNMJにおいてLgr5と結合し、Wnt依存性かつAgrin非依存性にLRP4を介してMuSKをリン酸化させ、AChR凝集を誘導する。