

主論文の要旨

Lack of Fgf18 causes abnormal clustering of motor nerve terminals at the neuromuscular junction with reduced acetylcholine receptor clusters

Fgf18 の欠損は神経筋接合部におけるアセチルコリン受容体減少を伴った運動神経終末の非特異的クラスタリングの原因となる

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
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)

伊藤 研悠

【緒言】

神経筋接合部 (NMJ) は脊髄にある運動神経細胞(spinal motor neurons, SMNs)と筋肉細胞を結ぶシナプスで、シナプスの信号伝達にはアセチルコリンとその受容体であるアセチルコリン受容体 (AChR) を利用している。よって、シナプスの信号を効率よく伝達するために、筋肉細胞側のシナプス領域 (終板) で AChR が集積することが必要である。AChR 集積は、胎生期に SMNs の神経終末から分泌される Agrin が筋肉細胞側で発現する受容体と結合し、細胞内のシグナル伝達を介して誘導される。近年、Agrin 以外に Wnts、TGF- β 、glial cell-derived neurotrophic factor、Rspo2 などが AChR 集積や NMJ 形成とその信号伝達に関与していることが証明されている。

Fibroblast growth factors (FGFs)はヒトとマウスにおいて 22 種類が同定されており、4 つの FGF 受容体(FGFR1-4)のいずれかに結合し、たんぱく質キナーゼである MEK1 を介したシグナル伝達経路を活性化する。ニワトリ胎仔より単離・培養した SMNs にいくつかの FGFs(FGF4,6,7,9,10,17,18,22,23)を作用させると、神経軸索の伸長や分枝を促進することが知られている。

FGF18 は FGFs に属し、胎生期において骨の形成に必須の因子である。中枢神経組織においては、*Fgf18* 遺伝子はマウス胎仔の中脳や小脳、8 週令ラットの大脳に発現が確認されている。FGF18 はニワトリより単離したアストロサイトやミクログリアの分裂を促進すること、SMNs の神経軸索の分枝を促進することがわかっている。しかし、FGF18 の胎生期における AChR 集積や NMJ 形成に対する役割は不明であった。

本研究の目的は、SMNs で *Fgf18* 遺伝子の発現が見られたことから、FGF18 の AChR 集積と NMJ 形成に対する役割を検討することである。

【方法および結果】

<*Fgf18* は SMNs において高発現する>

脊髄での *Fgf18* 遺伝子の発現を確認するため 6 週令の C57BL6/J マウス頸髄より Laser microdissection 用いて前角細胞と後角細胞を切り出し、mRNA を抽出した。前角細胞と後角細胞での発現量の比を算出し、前角細胞で高発現する遺伝子群を同定した。その遺伝子群の中に *Fgf18* 遺伝子が含まれており、*Fgf18* 遺伝子の発現量は後角細胞に比べて前角細胞で 4 倍以上であった。この前角細胞での発現は 8 週令マウスの脊髄を用いた *in situ* hybridization の結果でも証明された(Fig.1A,B)。また NMJ が形成される胎生期における *Fgf18* 遺伝子の発現量をマウスの脊髄と横隔膜にて quantitative RT-PCR を用いて評価した。横隔膜では胎生期 13.5 日で発現がピークに達しているのに対し、脊髄では NMJ の形成時期である胎生期 15.5 日で高発現していることがわかった(Fig.1C)。以上の結果より FGF18 は NMJ の形成時期において SMNs で発現し、何らかの役割をもっていることが示唆された。

<*Fgf18* 欠損マウス(KO)では AChR 集積、NMJ 形成とシグナル伝達が障害されている>

FGF18 の NMJ 形成に対する役割を調べるために、この遺伝子をノックアウト(KO)したマウスの NMJ を詳しく観察した。KO と野生型マウスの胎生期 18.5 日での横隔

膜を観察したところ、横隔膜に達する SMNs の神経軸索の数や長さには変わりがない (Fig.2A,C,D)のに対し、AChR 集積の面積が 1/3 に減少していた (Fig.2B,E,F)。

電子顕微鏡にて NMJ の微細構造も観察すると、KO マウスでは前シナプス領域が肥大し (Fig.3A,B)、Synaptic Vesicles (SV) がまばらになっていた (Fig.3C,D)。一方で、筋肉細胞の筋繊維構造には差を認めなかった (Fig.3E,F)。FGF18 の筋肉細胞に対する役割を詳しく検討するために C2C12 筋管細胞にリコンビナント FGF18 を処理した。その結果、FGF18 は Agrin と同様に AChR 集積を誘導し、その誘導は MEK1 インヒビターによって抑制されたことから、FGF18 が細胞内のシグナル伝達経路を介して AChR 集積を誘導していることがわかった (Fig.4A,B)。

加えて quantitative RT-PCR を用いて横隔膜の筋肉の状態を評価した。野生型と比較して KO マウスでの筋分化に関する遺伝子 (*Pax7, Myf5, Myh1*) の発現は変化がなかったが、NMJ で機能する遺伝子 (*Chrne, Colp1q*) の発現は減少していた (Fig.5)。さらに NMJ シナプスの信号伝達についても検討を行った。KO マウス横隔膜における Miniature endplate potentials (MEPPs) の強度と頻度が、前脛骨筋における compound muscle action potentials (CMAPs) の強度が著しく障害されていた (Table1)。以上の結果から、FGF18 は AChR 集積の誘導、加えて NMJ 形成とそのシグナル伝達に必須であることが示唆された。

【考察】

本結果より、*Fgf18* 遺伝子は胎生期脊髄の特に前角細胞で高発現していることが初めて明らかにされた。他論文においても、胎生期 15.5 日の脳皮質、胎生期 10.5 日の中脳での発現が検出されていることから、FGF18 は胎生期中枢神経系において重要な分泌たんぱく質であると考えられる。蛍光顕微鏡または電子顕微鏡観察より FGF18 が AChR 集積と NMJ 形成に関与していることが認められた。NMJ 形成に関わる遺伝子の発現が低下していること、シナプスの信号伝達が障害されていることから NMJ 形成において FGF18 が重要な役割を持つことが示唆された。

【結語】

FGF18 は NMJ において胎生期において AChR 集積と NMJ 形成に重要な役割を担っている。