

平成30年 5月22日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08312

研究課題名(和文)筋ジストロフィーの新治療法開発

研究課題名(英文)development of a new remedy for muscular dystrophies

研究代表者

堀尾 嘉幸(Horio, Yoshiyuki)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：30181530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：筋ジストロフィー(MD)の治療薬はステロイドホルモンのみで長期の有用性は未確認である。本グループは長寿遺伝子SIRT1の活性化薬レスベラトロールがMDに治療効果をもたらすことを世界で初めて見出した。

MDでは大隅博士が発見したオートファジーの機能が下がり、DNAを欠損した不良ミトコンドリアが溜まって活性酸素量が高くなること、レスベラトロールはオートファジー(マイトファジー)を促進して細胞をきれいにすることを見出した。MDの患者さんにレスベラトロールを24週間連続投与すると、肩の挙上力や外転力が約2倍となり、32項目による運動機能評価も有意に増加しレスベラトロールがMDに有効であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：There exists few remedy to muscular dystrophies (MD) except glucocorticoids, but there is no report of glucocorticoids for extending walking ability more than 2 years. We found that resveratrol, an activator of SIRT1, is effective on dystrophin-deficient mdx mice. In the present study, we found that autophagy of damaged mitochondria containing deleted mitochondria DNA was suppressed in mdx mice. Damaged mitochondria liberate high levels of reactive oxygen species (ROS). Resveratrol reactivated the autophagy, which cleared damaged mitochondria and reduced ROS. Administration of resveratrol to 11 MD patients for 24 weeks showed resveratrol was effective on MD. Resveratrol significantly increased motor function and enhanced muscle strength with quantitative muscle testing. Thus, resveratrol will be a promising remedy for MD.

研究分野：病態生化学

キーワード：SIRT1 レスベラトロール 筋ジストロフィー オートファジー マイトファジー 活性酸素 臨床研究

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

過剰発現させると寿命が延びる Sir2 (Kaebellian ら 1998) のホモログの脱アセチル化酵素である SIRT1 はヒストンの他いろいろな転写関連因子を脱アセチル化して多彩な生体機能に関与する (Horio ら *Clin Sci* 2011)。申請者は SIRT1 が酸化ストレス耐性をもたらす (Tanno *et al.* *JBC* 2010)、この働きには FOXO1, 3, 4 が関与する (Hori *et al.* *PLoS One* 2013) ことを明らかとした。筋ジストロフィー症の骨格筋では活性酸素量 (ROS) が高いが、レスベラトロールによる SIRT1 活性化は ROS を抑制する他、遅筋と速筋の筋量を増加させるなど治療効果を持ち (Hori *et al.* *JPET* 2011)、そのメカニズムにアセチル化酵素 p300 の SIRT1 による脱アセチル化とユビキチン化による分解が関与することを SIRT1 ノックアウトマウスを用いて明らかとした (Kuno *et al.* *JBC* 2013)。SIRT1 活性化が筋ジストロフィーに治療効果を持つことは、申請者らの報告後、世界で 4 つの研究グループから報告された (Selsby *et al.* *PLoS One* 2012; Gordon *et al.* *Clin Nutr* 2013; Ljubcic *et al.* *Am J Physiol* 2014; Chalkiadaki *et al.* *PLoS Genet* 2014)。

### 2. 研究の目的

(A) SIRT1 の骨格筋、心筋での機能を明らかにする (B) ヒト筋ジストロフィーに対して SIRT1 活性化薬投与の安全性と有効性を確認することを目的とする。

### 3. 研究の方法

SIRT1 活性化剤であるレスベラトロールをエサに混ぜて (0.04 g, 0.4 g, 4 g/kg food) 筋ジストロフィーモデル (mdx マウス) に 56 週間投与し、その作用について、筋繊維の太さの変化、中心核をもつ幼弱筋線維数の変化を調べた。また、運動能を反転ネット試験、ロタロッド試験で、筋の崩壊を知るために血中のクレアチンキナーゼの量を測定した。心筋機能は心エコーで検討した。

さらに、ミトコンドリアオートファジー (マイトファジー) の障害が病態進行に関与する可能性を調べるために、オートファジー関連遺伝子の発現量、オートファジーフラックス、組織活性酸素 (ROS) 量、さらにミトコンドリア DNA の変異を測定した。心臓でマイトファジーの変化を組織学的に検討した。レスベラトロールが SIRT1 を介してオートファジーを進めて ROS 量を減少させるか調べるために、C2C12 筋芽細胞を用いて、アンチマイシンによるミトコンドリア障害で誘発された ROS がレスベラトロールで減少するか、その減少にオートファジーが関与しているかを調べた。また、オートファジーを促進させ

る FOXO3 がレスベラトロールにより増加するかを検討した。

ヒト筋ジストロフィーへのレスベラトロールの治療効果を調べるために、同意を得た 11 名の筋ジストロフィー患者さんを対象としたレスベラトロールの長期投与 (6 ヶ月) の臨床研究を札幌医科大学付属病院で行った。血中クレアチンキナーゼの変化、筋力の変化、運動機能評価を行うとともに副作用についても調べた。

### 4. 研究成果

mdx マウスでは正常マウスと比較してオートファジーとマイトファジー関連遺伝子の発現とオートファジーフラックスが低下していることを見出した。mdx マウスにレスベラトロールを投与すると、オートファジーとマイトファジー関連遺伝子の発現が増加し、オートファジーフラックスも回復し、心筋ではマイトファジーが亢進していた。レスベラトロール投与により FOXO3a の核移行と発現量の増加が起こり、オートファジーの亢進はレスベラトロールにより活性化された SIRT1 が FOXO3a を脱アセチル化、活性化して核移行を進めてその転写活性の増加を介して、オートファジーとマイトファジー関連遺伝子の発現が起きるものと考えられた。一方、心筋ではミトコンドリア DNA の欠失が mdx マウスに起きていること、レスベラトロールの投与によりミトコンドリアの欠失 DNA の量が有意に減少することを見出した。ミトコンドリア DNA の欠失すると、ミトコンドリアは脱分極を起こし、ROS を産生することがすでに多数報告されている。このミトコンドリア DNA の欠失があるにもかかわらず、mdx マウスではマイトファジーが低下してマイトファジーで処理されることがないために組織 ROS の増加が起きることがきわめて高い。ヒトドゥシャンヌ型筋ジストロフィーでも、オートファジーの低下が報告されていることから、ヒトにおいてもマイトファジー低下による欠失 DNA を持ったミトコンドリアの増加が起きて、組織の ROS を高めている可能性がきわめて高く、レスベラトロールなどマイトファジーの促進薬の高い治療効果が説明できる。

ヒトのドゥシャンヌ型 (12~39 歳) 5 例、ベッカー型 (21~46 歳) 4 例、福山型 (12 歳、17 歳) 2 例の患者さんの協力を得て、レスベラトロールの投与を行った。投与は 500 mg/日を 8 週間、500 mg x 2 回/日を 8 週間、500 mg x 3 回/日を 8 週間の計 24 週間行った。肩甲骨の拳上力について測定できた 10 名の平均は 24 週間後に 2 倍となり有意な筋力の増加が観察された。3 倍以上の増加を示した

方もいた。また、7名の方が測定できた肩の外転の力も有意に増加して平均で2倍以上の増加が観察された。一方、ものをつまむ力については増加を示す方もいたが、全体では有意な増加は観察されなかった。Duchenne 型、Becker 型では遠位筋よりも近位筋に対してレスベラトロールが筋力増加をもたらす傾向が見られたのは、遠位筋のほうが先に筋力低下が起きてすでに病態が進んでしまっているためである可能性も考えられた。被験者全員で測定された 32 項目の測定による運動機能評価 (MFM) では投与開始 16 週間後で 38.5、投与開始 24 週間後で 38.4 と有意な上昇が見られた。一方、血中クレアチンキナーゼは一部の患者で低下が見られたものの全体では有意な低下は見られなかった。但し、採決前の安静について特に患者には要請していなかったこともクレアチンキナーゼの値が変動していることに影響したと考えている。副作用については下痢があり、4 名が grade I、2 名が grade 2 であり、grade 2 となったうちの 1 名については投与 1500 mg としたあとに発症したため、投与量を 1000 mg に下げて投与を継続した。その他の副作用では腹痛が 3 名、上気道感染症が 2 名、多形紅斑が 1 名であったが、副作用は下痢で用量を下げた 1 名を除いていずれも一過性のものであった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Kuno A, Tanno M, Horio Y. The effects of resveratrol and SIRT1 activation on dystrophic cardiomyopathy. *Ann N Y Acad Sci*. 1348, 46-54, 2015. doi: 10.1111/nyas.12812. PMID: 26109180 (査読有)
2. Kuno A, Horio Y. SIRT1: A Novel Target for the Treatment of Muscular Dystrophies. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;6714686. doi: 10.1155/2016/6714686. PMID:27073590 (査読有)
3. Hamada H, Shimoda K, Horio Y, Ono T, Hosoda R, Nakayama N and Urano K. Pterostilbene and Its Glucoside Induce Type XVII Collagen Expression. *Nat Prod Commun*. 12, 85-86, 2017. 0.1155/2016/6714686. (査読有)
4. 久野篤史、細田隆介・堀尾嘉幸 筋ジストロフィーの新治療法の開発 *Medical Science Digest* Vol. 42 (13), 511-515, 2016. (査読無) [http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/05msd/msd2016\\_12.html](http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/05msd/msd2016_12.html)
5. 堀尾嘉幸、久野篤史、國本梨沙 長寿遺伝子サーチュイン THE LUNG perspectives Vol. 24 No.3 303-306, 2016 (査読無) <http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J001>

3\_2403

[学会発表](計 20 件)

#### 平成 29 年度

1. 堀尾嘉幸 タンパク質脱アセチル化酵素 SIRT1 の分子機能とその筋ジストロフィーへの応用 第 69 回北日本小児科学会 平成 29 年 9 月 2 日、招待講演、札幌
2. Kuno A, Hosoda R, Horio Y. Role of impaired autophagy caused by aberrant activation of mTORC1 in dystrophic cardiomyopathy. Keystone symposia Conference: Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease: Yokohama, Japan. May 15-19, 2017
3. Kuno A, Hosoda R, Sebori R, Horio Y Resveratrol restores autophagy and improves cardiac dysfunction in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. 第 90 回 日本薬理学会年会 平成 29 年 3 月 15-17 日:長崎

4. 細田隆介、久野篤史、瀬堀理生、堀尾嘉幸 Protective role of SIRT1 in the cardiomyocyte in doxorubicin-induced cardiotoxicity. (同)

5. Kuno A, Hosoda R, Horio Y. Restoration of impaired autophagosome clearance underlies amelioration of cardiomyopathy afforded by SIRT1 activation in dystrophin-deficient mice.

Cardiovascular and Metabolic Week 2017 (CVMW2017) 第 34 回 国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2017) 平成 29 年 12 月 8-10 日:大阪

6. 細田隆介、久野篤史、瀬堀理生、堀尾嘉幸 筋ジストロフィー心筋におけるオートファジー不全の意義 第 68 回 日本薬理学会北部会 平成 29 年 9 月 15 日:山形

7. Kuno A, Hosoda R, Horio Y. Role of impaired autophagosome clearance in cardiomyopathy of dystrophin-deficient mice.第 82 回 日本循環器学会学術集会 平成 30 年 3 月 23-24 日:大阪

#### 平成 28 年度

8. Kuno A, Tsukamoto M, Horio Y. Deletion of SIRT1 in the cardiomyocyte worsens

doxorubicin-induced cardiac dysfunction in mice. European Society of Cardiology Congress 2016. Rome, Italy. August 27 - 31, 2016

9. Kuno A, Hosoda R, Sebori R, Horio Y. Impaired Autophagy Induced by Activated mTORC1 Underlies Development of Dystrophic Cardiomyopathy.

American Heart Association 2016. New Orleans, LA, U.S.A. November 12 - 16, 2016

10. Kuno A, Hosoda R, Horio Y. SIRT1 Protects against Doxorubicin Cardiotoxicity In Vivo.

第80回 日本循環器学会 平成28年3月18-20日：仙台

11. Kuno A, Hosoda R, Horio Y. Protective roles of SIRT1 in the cardiomyocyte in doxorubicin-induced cardiotoxicity.

第33回 国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2016) 平成28年12月12-17日：東京

12. 久野篤史、細田隆介、瀬堀理生、堀尾嘉幸 筋ジストロフィーの心筋障害におけるオートファジー不全の意義

第39回日本分子生物学会 平成28年11月30日 12月2日：横浜

13. 細田隆介、久野篤史、瀬堀理生、堀尾嘉幸 心筋におけるSIRT1の欠損はドキシソルビシン誘導性心筋障害を悪化させる(同)

14. 久野篤史、細田隆介、堀尾嘉幸 筋ジストロフィー心筋障害におけるオートファジー不全の意義とレスベラトロールによる治療効果 第67回 日本薬理学会北部会 平成28年9月30日：札幌

15. 細田隆介、久野篤史、瀬堀理生、堀尾嘉幸 ドキシソルビシン誘導性心筋障害に対するSIRT1の役割解明(同)

### **平成27年度**

16. Kuno A, Miura T, Horio Y Resveratrol ameliorates dystrophic cardiomyopathy by activating FoxO transcription factors. European Society of Cardiology Congress 2015. London,

United Kingdom. August 29 -September 2, 2015

17. Kuno A, Sebori R, Miura T, Horio Y. Resveratrol attenuates cardiomyopathy in the dystrophin-deficient mdx mouse via FoxO transcription factors. 第79回日本循環器学会 平成27年4月24-26日：大阪

18. 久野篤史、細田隆介、斎藤慶樹、戸田悠貴、瀬堀理生、塚本美樹、堀尾嘉幸

マウス胎仔線維芽細胞の細胞老化におけるIGFBP5の役割 第38回日本分子生物学会 & 第88回日本生化学会 平成27年12月1-4日：神戸

19. 細田隆介、久野篤史、瀬堀理生、濱田博喜、堀尾嘉幸 ピセアタンノールとレスベラトロールの酸化ストレスに対する細胞保護効果の比較(同)

20. Tsukamoto M, Kuno A, Hosoda R, Sebori R, Horio Y SIRT1 in the Cardiomyocyte Counteracts Doxorubicin Cardiotoxicity in Vivo. AHA scientific sessions 2015, Orlando, USA, November 7-11, 2015

21. 細田隆介、久野篤史、戸田悠基、斎藤慶樹、瀬堀理生、林貴士、堀尾嘉幸 マウス線維芽細胞での細胞老化におけるIGFBP5の役割 第89回日本薬理学会 2016年03月09日~2016年03月11日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計1件)

名称：筋ジストロフィーを処置するための組成物  
発明者：堀尾嘉幸、久野篤史、堀佑輔  
権利者：公立大学法人札幌医科大学

種類：特許  
番号：第5850503号  
取得年月日：平成27年12月11日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ  
<http://web.sapmed.ac.jp/pharmacology/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀尾嘉幸 (HORIO Yoshiyuki)  
札幌医科大学・医学部・薬理学講座・教授  
研究者番号：30181530

### (2) 研究分担者

濱田博喜 (HAMADA Hiroki)  
岡山理科大学・理学部・臨床生命科学科・  
教授  
研究者番号：10164914

### (3) 連携研究者

二階堂光輝 (NIKAIDO Koki)  
札幌医科大学・医学部・小児科学講座  
研究者番号：90359993