

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09330

研究課題名(和文)カベオリン-3による筋ジストロフィー病態制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of caveolin-3 on pathomechanisms leading to muscular dystrophies

研究代表者

砂田 芳秀 (Sunada, Yoshihide)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00240713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：筋細胞膜カベオラ内膜を構成するカベオリン-3は、様々なシグナル伝達の足場蛋白質である。デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)では、カベオリン-3が高発現するが、その病態における役割は不明である。本研究は、カベオリン-3高発現DMDモデルマウスを作出し、カベオリン-3が「ジストロフィー病態」に抑制的に働くのか、促進的に働くのかを検討した。このマウスは、DMDモデルマウスと比較しジストロフィー性変化、筋萎縮とも改善した。カベオリン-3は「ジストロフィー病態」に抑制的に働くと考えられ、現在、網羅的遺伝子発現解析によりカベオリン-3が制御する筋ジストロフィーシグナルの解明に取り組んでいる。

研究成果の概要(英文)：Caveolin-3, which forms the inner membrane of the muscle cell membrane caveolae, is a scaffold protein of various signal transductions. In Duchenne muscular dystrophy (DMD), caveolin-3 is highly expressed, but its role in its pathology remains unknown. In this study, we developed caveolin-3 highly expressing DMD model mice and investigated whether caveolin-3 inhibits or promotes the dystrophic changes in DMD model mice. Both dystrophic change and myofiber atrophy were improved in caveolin-3 highly expressing DMD model mice, compared to DMD model mice. These findings indicate that caveolin-3 shows an inhibitory effects on the pathogenesis leading to DMD. We are currently elucidating the molecular mechanisms through caveolin-3.

研究分野：神経内科学

キーワード：シグナル伝達 遺伝子 福祉・医療 ナノ材料 マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、出生男児4,000人に1人の頻度で発症するX染色体劣性遺伝形式を示す難病で、進行性に筋力低下・筋萎縮を呈し、現在その一刻も早い病態解明と治療法開発が待望されている。ジストロフィン遺伝子変異により、筋細胞膜の裏打ち蛋白質であるジストロフィン蛋白質の欠損が原因で、骨格筋線維が壊死と不完全再生を反復する、いわゆる「ジストロフィー変化」を、その病理学的特徴としている。

カベオリンは、オリゴマーを形成して細胞膜の細胞質側へのフラスコ状陥入構造物カベオラを形成するばかりでなく、Ha-ras, Src, EGFR, Gタンパク質, NOSなどのシグナル分子と結合し、その活性を調節するシグナル伝達の足場蛋白質として働くとも考えられている (Galbiati, et al. *Cell*. 2001;

106(4):403-11)。1998年に、その筋細胞特異的なアイソフォームであるカベオリン-3 遺伝子変異による常染色体性優性肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)1Cが報告され、この分子を起点とした筋ジストロフィー発症の分子機構が注目されている (Minetti, et al. *Nature Genet*. 18: 365-368, 1998)。われわれも、カベオリン-3 遺伝子変異を導入したLGMD1C 疾患モデルマウスを作出し、筋細胞におけるカベオリン-3欠損により、骨格筋の神経型NOS活性 (Sunada, et al. *Hum Mol Genet*. 10: 173-178, 2001)、マイオスタチン活性が亢進 (Ohsawa, et al. *J Clin Invest*.

2006;116(11):2924-34)、また、心筋では血管型NOS活性亢進 (Ohsawa, *Hum Mol Genet*. 2004;13(2):151-7) が、それぞれ、筋萎縮性ミオパチーと、肥大型心筋症発症に関与することを発表した。

興味深いことに、DMD患者やその疾患モデルマウスの筋細胞では、カベオリン-3が高発現 (Hagiwara, et al. *Neuromuscular Disorders* 7, 1997; 7: 6-7; Vaghy, et al. *FEBS Letters*

1998; 431, 125-127) している。ところが、その「ジストロフィー変化」の発症病態における役割は、依然として解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、連携研究者深田が作出した重症表現型 (Fukada, et al. *Am J Pathol*. 2010 May;176(5):2414-24) を示すデュシェンヌ型モデルDBA/2-mdx マウスとカベオリン-3 欠損およびカベオリン-3 高発現(未発表)マウスを交配し、誕生する二重変異マウスの解析により、カベオリン-3 が、「ジストロフィー病態」に抑制的に働くのか、促進的に働くのかを検討する。すなわち、われわれが独自作出した3種類の遺伝子改変マウスにより、代表的な筋ジストロフィー病型であるジストロフィン欠損による筋ジストロフィー病態シグナルに対する、足場蛋白質カベオリン-3による上位制御機構の解明を目指す。できれば、網羅的遺伝子発現解析によりカベオリン-3 が制御する筋ジストロフィー病態の分子機構を詳細に解明し、新規病態介入治療への突破口とする。

3. 研究の方法

筋ジストロフィー病態におけるカベオリン-3 作用の検討: DMD モデル DBA/2-mdx マウス にカベオリン-3 欠損マウスを交配する。F1 世代で誕生するヘテロマウスを交配し、DBA/2-mdx マウスと DBA/2-mdx : cav3-/- マウスの骨格筋を比較解析し、「ジストロフィー変化」の変容について検証する。同様に、DBA/2-mdx にカベオリン-3 高発現マウスを交配、DBA/2-mdx/cav3+/+ マウスの骨格筋の「ジストロフィー変化」を解析する。

カベオリン-3 によるジストロフィン欠損筋ジストロフィー病態制御機構の解析: 作出した DBA/2-mdx : cav3-/- マウスと DBA/2-/cav3+/+ マウスと DMD モデル DBA/2-mdx マウスの骨格筋遺伝子発現を網羅的に解析して、カベオリン-3 のジストロ

フィン欠損筋ジストロフィーシグナルへの分子制御機構を明らかとする。遺伝子発現変動分子を、レトロウイルスベクターで筋芽細胞へ導入、プラスミドベクターで前脛骨筋蛇毒系へ導入し、それぞれ、筋分化・筋再生への作用を検討する。

4. 研究成果

平成27年度には、DBA/2-mdxマウスとカベオリン-3高発現マウスを交配したが、繁殖数が少ないことから、平成28年度は科研費前倒し請求により、DBA/2-mdxマウス受精卵に骨格筋特異的プロモーター(MCK promoter/nhancer)下に、カベオリン-3相補DNA・SV40ポリA付加シグナルを繋いだカベオリン-3高発現

DBA/2-mdxマウスを作出した。平成29年度には、

DBA/2野性型マウス、 DBA/2-mdxマウス、

カベオリン-3高発現DBA/2-mdxマウス、カベオリン-3欠損DBA/2マウスの4種類の遺伝子型を示すマウスの作出し、骨格筋を解析した。カベオリン-3高発現DBA/2-mdxマウスでは、DBA/2-mdxマウスと比較してジストロフィー性変化、筋萎縮とも改善、一方、カベオリン-3欠損DBA/2マウスでは、それらの悪化が認められた。カベオリン-3は「ジストロフィー病態」に抑制的に働くと考えられ、現在、骨格筋の網羅的遺伝子発現解析によりカベオリン-3が制御する筋ジストロフィー病態の分子機構の解明に取り組んでいる。

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 1 件)

Fukai Y, Ohsawa Y, Ohtsubo H, Nishimatsu SI, Hagiwara H, Noda M, Sasaoka T, Murakami T, Sunada Y. Cleavage of β -dystroglycan occurs in sarcoglycan-deficient skeletal muscle without MMP-2 and MMP-9. *Biochem Biophys Res Commun*. 492(2):199-205, 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.048, 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

深井雄太, 大澤 裕, 大坪秀明, 西松伸一郎, 萩原宏毅, 笹岡俊邦, 村上龍文, 砂田芳秀. β -dystroglycan プロセッシングの

分子機構の解析, 平成 29 年度「筋ジストロフィー関連疾患の分子病態解明とそれに基づく診断法・治療法開発」(29-4) 西野班 班会議, 2017 年 12 月 4 日, 国立精神・神経医療研究センター(東京都小平市)

大澤 裕, 砂田芳秀, 深井雄太, 大坪秀明, 藤野雅広, 西松伸一郎, 高山健太郎, 伊東史子, 林 良雄, 土田邦博. 筋ジストロフィーにおけるカベオリン-3-TGF- β シグナルの解明と分子標的医薬の開発, 平成 29 年度「筋ジストロフィー関連疾患の分子病態解明とそれに基づく診断法・治療法開発」(29-4) 西野班 班会議, 2017 年 12 月 4 日, 国立精神・神経医療研究センター(東京都小平市)

Fukai Y, Ohsawa Y, Ohtsubo H, Nishimatsu S, Fujino M, Sunada Y. CAVEOLIN-3 CONTROLS SARCOLEMMA nNOS ACTIVITY: IMPLICATION IN LIMB-GIRDLE MUSCULAR DYSTROPHY 1C, XXIII World Congress of Neurology 第 58 回日本神経学会学術大会, 2017 年 9 月 20 日, 国立京都国際会館(京都府京都市)

Sunada Y. MYOPATHY GENETICS, XXIII World Congress of Neurology 第 58 回日本神経学会学術大会, 2017 年 9 月 20 日, 国立京都国際会館(京都府京都市)

深井雄太, 大澤 裕, 大坪秀明, 西松伸一郎, 藤野雅広, 砂田芳秀. nNOS はカベオリン欠損マウスの筋萎縮を予防する, 第 3 回日本筋学会学術集会, 2017 年 8 月 4 日, 国立精神・神経医療研究センター(東京都小平市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 心疾患または筋疾患の診断薬
発明者: 学校法人川崎学園 川崎医科大学
砂田芳秀, 大澤 裕

権利者: 学校法人川崎学園

種類:

番号: W02017/094837

出願年月日: 2017 年 6 月 8 日

国内外の別: 国外

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂田 芳秀 (SUNADA Yoshihide)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：00240713

(2) 研究分担者

大澤 裕 (OHSAWA Yutaka)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：80246511

西松 伸一郎 (NISHIMATSU Shin-ichiro)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20222185

藤野 雅広 (FUJINO Masahiro)
川崎医療福祉大学・医療技術学部・講師
研究者番号：50633856

村上 龍文 (MURAKAMI Tatsufumi)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30330591

(3) 連携研究者

深田 宗一郎 (FUKADA So-ichiro)
大阪大学・薬学研究科・准教授
研究者番号：20432445

(4) 研究協力者

()