

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14883

研究課題名(和文)細胞老化阻止による筋ジストロフィーモデルラット病態改善の試み

研究課題名(英文)An attempt to improve pathology of muscular dystrophy model rats by preventing cellular senescence.

研究代表者

山内 啓太郎(Yamanouchi, Keitaro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：70272440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はゲノム編集技術を用いてヒトデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の病態を極めて忠実に反映するモデルラットの作出に成功した。本モデルラット骨格筋では細胞老化因子p16の発現が若齢時より亢進していたことから、早期におこる細胞老化が病態の進行に關与する可能性を考え研究を遂行した。その結果、本モデルラット骨格筋ではTGF- β の発現が増加しており、それにより骨格筋の再生を担う筋衛星細胞の老化が生じていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We previously succeeded in generating rats having out-of-frame mutation in dystrophin gene by genome editing. The rats show very severe phenotype in their skeletal muscle, which is similar to that seen in Duchenne muscular dystrophy patients. Since the expression of p16, a senescent cell marker, was up-regulated in skeletal muscle of dystrophin-mutated rats, we hypothesized cellular senescence is involved in the progression of skeletal muscle pathology. As a result, we found that TGF- β expression is increased in the skeletal muscle of dystrophin-mutated rats, and thus increased TGF- β induces cellular senescence in satellite cells.

研究分野：獣医生理学

キーワード：筋ジストロフィー 骨格筋 筋再生 細胞老化 筋衛星細胞 間葉系前駆細胞 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

(1) 筋ジストロフィーモデル動物

進行性筋ジストロフィーは筋線維の壊死・再生を主病変とし、進行性の筋力低下と筋萎縮を認めるヒトの疾患である。中でも筋線維の強度維持に関わるジストロフィン遺伝子に変異を生じたデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、最も発生頻度が高く、筋力低下に起因する歩行障害・呼吸障害に加えて心筋の障害を伴い、若齢で死に至る極めて重篤な疾患である。この病態の解明並びに治療法開発に際し、これまでにイヌ、マウスを中心としたモデル動物が用いられてきた。ヒト DMD のモデルとして多用されている mdx マウスはヒト DMD と同様にジストロフィン遺伝子の点変異によるジストロフィン遺伝子産物の欠損がみられるが、運動能力や筋力に異常はなく、あったとしても症状は一過的で軽度である。またヒト DMD とは異なり間質の線維化や脂肪細胞の出現もみられず、寿命も正常マウスと変わらない。一方、イヌ DMD モデル (CDMD) はヒトに近い臨床症状を示すものの、繁殖・維持に多大な費用や労力が掛かるだけでなく個体差が大きいという点が課題であった。

(2) CRISPR 法による DMD ラットの作出

我々は 2014 年に新規ゲノム編集技術である CRISPR 法を利用することで、ジストロフィン遺伝子の変異によりジストロフィンタンパク質を完全に欠損したラットの作出に世界で初めて成功した (Nakamura et al., *Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. Sci Rep* 4: 5635 (2014))。このラット (DMD ラット) では、加齢とともに病態が進行し、10 ヶ月齢では体重の著しい減少や呼吸機能の低下とともに、間質の線維化や脂肪細胞の出現を伴う骨格筋の壊死像がみられる。これらはいずれもヒト DMD の病態末期の病理像を極めて忠実に反映していることから、これまで mdx マウスを用いた実験系では再現不可能であったヒト DMD の病態進行過程の解明に向けた研究が大きく進展することが期待される。

(3) 細胞老化が DMD の病態進行に関与する可能性

我々は、細胞老化の指標の一つである p16 (細胞周期進行抑制因子) の発現が病態末期の DMD ラット骨格筋では著しく亢進していることをみいだした。また同時に、筋再生を担う筋特異的幹細胞である筋衛星細胞の数が大きく減少していることを発見した。これらの知見は DMD では筋衛星細胞の老化が生じ、これが筋再生能の低下を招いていることを強く示唆するものであり、DMD の治療法開発の上で新たな標的分子の発見へと繋がる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では DMD ラットを用いて、その病態進行における筋衛星細胞の老化の関与について詳細に検証し、さらに、ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変により、*in vivo* での筋衛星細胞の老化阻止を図ることで DMD ラットの病態進行の改善を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TGF- β シグナル亢進による細胞老化誘導

DMD ラットおよび野生型ラット骨格筋における TGF- β およびそのシグナル関連因子の発現動態を調べた。また、TGF- β により野生型ラット骨格筋初代培養細胞において細胞老化が誘導されるかどうかについて検討を加えた。

(2) DMD ラット骨格筋に存在する老化細胞種の同定

DMD ラット骨格筋から単離した細胞を老化細胞マーカーである SA- β Gal および β 2M の発現を指標にセルソーターにより分離した。こうして得られた老化細胞における各細胞系譜特異的マーカーの発現を RT-PCR により調べた。

(3) p16 遺伝子改変ラットの作出

CRISPR/Cas法によりラット p16 遺伝子のエクソン 1 領域に変異を導入し、p16 発現を欠損したラットを作出した。

(4) ジストロフィン遺伝子に *in-frame* 変異をもつラットの作出・系統化および表現型解析

CRISPR 法により得られたジストロフィン遺伝子変異ラットの中に、ジストロフィン遺伝子に *in-frame* 変異をもつラットがみつかったため、それを系統化し、表現型の解析を行った。

4. 研究成果

(1) TGF- β シグナル亢進による細胞老化誘導

DMD ラット骨格筋では若齢時から TGF- β の発現とともに TGF- β シグナル関連因子 (リン酸化 Smad3、NOX-4 など) の発現が亢進していた。また、野生型ラット骨格筋より調整した初代培養細胞に対して TGF- β は細胞老化誘導作用をもつことが判明した。以上のことから、DMD ラット骨格筋にみられる細胞老化は TGF- β シグナルの亢進により引き起こされている可能性が示された。

(2) DMD ラット骨格筋に存在する老化細胞種の同定

老化細胞マーカーの発現を指標に分離した細胞では筋衛星細胞マーカーである Pax7 や筋芽細胞マーカーである MyoD とともに、間葉系前駆細胞マーカーである PDGFR α の

発現がみられた。これらの結果から DMD ラット骨格筋に存在する老化細胞には筋衛星細胞と間葉系前駆細胞に由来する複数の細胞種が混在していることが判明した。

(3) p16 遺伝子改変ラットの作出

CRISPR/Cas 法によりラット p16 遺伝子のエクソン 1 領域に out-of-frame 変異をもつラットを作出した。現在、DMD ラットと交配することにより p16 欠損 DMD ラットの作製が進行中である。

(4) ジストロフィン遺伝子に in-frame 変異をもつラットの作出・系統化および表現型解析

DNA シークエンスにより、本系統ではジストロフィン遺伝子のエクソン 3 から 16 にかけて 1902 bp の欠損が生じており、アミノ酸 634 を欠く短縮型ジストロフィンタンパク質を発現していることが判明した。その表現型解析を行ったところ、骨格筋では壊死・再生像や線維化が、心筋では線維化がそれぞれ観察された。しかしながらそれらは DMD ラットに比較して軽度であった。ヒトではジストロフィン遺伝子に in-frame 変異をもつ筋原生疾患としてベッカー型筋ジストロフィー (BMD) があり、DMD に比べて病態は軽度である。本系統は今後 BMD のモデルとして極めて高い利用価値があるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 9 件)

① Yamanouchi K

A novel rat model of muscular dystrophy and newly identified functional molecule in mesenchymal progenitor cells.

The 8th Joint Symposium of Veterinary research among Universities of Veterinary Medicine in East Asia, 2017, February 20, Taichung, Taiwan (招待講演)

② 山内啓太郎

再生器官としての筋肉とその疾患

日本チャールズリバー株式会社 教育講演 2016 年 9 月 9 日 つくば(招待講演)

③ 山内啓太郎

哺乳類骨格筋の発達と再生に関する研究 第 159 回日本獣医学会 学会賞記念講演 2016 年 9 月 7 日 藤沢 (招待講演)

④ 杉原英俊、寺本奈保美、中村克行、志賀崇徳、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉

ジストロフィン遺伝子変異ラットの骨格筋病変に対する細胞老化の関与 第 159 回日本獣医学会 2016 年 9 月 6 日

藤沢

⑤ Teramoto N, Sugihara H, Nakamura K, Shiga T, Tanihata J, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M

Pathological evaluation of rats carrying CRISPR/Cas-9-mediated in-frame mutation in dystrophin gene.

FASEB summer research conference "Skeletal Muscle Satellite Cells and Regeneration", 2016, July 25th, Keystone, CO, USA

⑥ 山内啓太郎

ゲノム編集を用いた筋疾患モデルラットの作出とその病態解析

第 91 回 実験動物コンファレンス 2015 年 12 月 12 日 東京 (招待講演)

⑦ 寺本奈保美、中村克行、杉原英俊、志賀崇徳、谷端淳、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉

Dystrophin 遺伝子に in frame 変異をもつラットの表現型解析

第 158 回 日本獣医学会 2015 年 9 月 8 日 十和田

⑧ 寺本奈保美、中村克行、杉原英俊、志賀崇徳、谷端淳、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉

Dystrophin 遺伝子に in-frame 変異をもつラットの表現型の解析

第 1 回 日本筋学会 2015 年 8 月 8 日 東京

⑨ 杉原英俊、中村克行、寺本奈保美、志賀崇徳、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの病態悪化に細胞老化が関与する可能性

第 1 回 日本筋学会 2015 年 8 月 8 日 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/seiri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 啓太郎 (YAMANOUCHI, Keitaro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70272440

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者
なし