

令和元年6月17日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16132

研究課題名(和文)骨格筋幹細胞特異的遺伝子MEGF10の役割とミオパチー発症機序の解明

研究課題名(英文) Roles of MEGF10 in the pathomechanisms of myopathy

研究代表者

三橋 里美 (Mitsubishi, Satomi)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：40466222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：MEGF10の変異は、先天性ミオパチーを引き起こすが、その病態機序は不明な点が多い。筋細胞を用いて、MEGF10の喪失または、患者でみられるC774R変異体の強制発現で、骨格筋細胞の増殖と遊走が低下することを示した。さらに、筋発生に重要な働きを持つNotch1の細胞内ドメインが、Megf10の細胞内ドメインと共免疫沈降されることを見出し、Megf10のチロシン変異体およびチロシンリン酸化が低下するC774R変異体では、このNotch1との結合が低下することを示した。これにより、Megf10とNotchとの相互作用によるシグナリングが、先天性ミオパチーの発症機序に関わる可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、MEGF10の骨格筋におけるシグナリング分子を同定することで、MEGF10の変異によっておこる希少遺伝性筋疾患の分子病態メカニズムを示したことから、今後の治療法開発へも繋がることを期待される。また、骨格筋再生の基礎メカニズムにおけるMEGF10の役割についても、示唆的な結果を示すことができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Mutations in cell membrane protein MEGF10 cause early onset myopathy, areflexia, respiratory distress, and dysphagia (EMARDD), a rare congenital muscle disease, but the pathogenic mechanisms remain largely unknown. We demonstrate that loss of Megf10, as well as overexpression of the pathogenic human C774R mutation, leads to impaired proliferation and migration of C2C12 cells. Cell proliferation and migration are known to be regulated by the Notch receptor, which plays an essential role in myogenesis. Reciprocal co-immunoprecipitation studies show that Megf10 and Notch1 interact via their respective intracellular domains. These interactions are impaired by the pathogenic C774R mutation. Megf10 regulation of myoblast function appears to be mediated at least in part via interactions with key components of the Notch signaling pathway, and defects in these interactions may contribute to the pathogenesis of EMARDD.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋疾患 骨格筋再生

1. 研究開始当初の背景

骨格筋には、筋線維内に、筋衛星細胞とよばれる幹細胞が存在する。筋衛星細胞は、骨格筋がこわれたときに細胞分裂・分化し、融合して、あたらしい筋線維をつることができる。MEGF10は、骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞に発現する、一回膜貫通型タンパク質である。これまでに、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析や家系解析によって、MEGF10 遺伝子の変異により遺伝性ミオパチーを発症することを報告し、さらに本邦初の患者を2家系同定した (Takayama et al. 2014)。これまでの研究から、MEGF10 は、再生筋や筋ジストロフィーで発現が亢進していることを見いだしている。ミオパチーの原因遺伝子は100種類以上知られているが、骨格筋の幹細胞特異的に発現する遺伝子は、MEGF10のみである。MEGF10 ミオパチー患者では、MEGF10の機能喪失が、なんらかの機序で骨格筋幹細胞の機能不全をひきおこし、骨格筋の障害をきたすと考えられる。よって、MEGF10が骨格筋の機能に非常に重要であることは、間違いない。しかし、MEGF10が骨格筋幹細胞でどのような役割を担っているのか、筋再生のどの時期に、どのように関与しているのか、また、MEGF10がないとなぜ骨格筋が壊れるのか、詳細はまったく分かっていない。手がかりとしては、これまでの研究から、患者では、MEGF10細胞内ドメインのチロシンリン酸化が障害され、筋障害の重症度と、リン酸化低下の程度が一致することを見いだしている (Mitsuhashi et al. 2013)。これより、MEGF10のリン酸化がメディエートする下流のシグナル自体が、筋疾患発症に直接かかわっている可能性が高いと考えている。MEGF10の下流分子を解明することで、筋疾患発症にとって重要な、あたらしいメカニズムを明らかにし、治療法開発にも貢献できると考えられた。

2. 研究の目的

MEGF10のナンセンス変異がミオパチーを引き起こすこと、および、MEGF10が骨格筋の再生に必要な幹細胞である筋衛星細胞に特異的に発現することより、MEGF10は骨格筋の再生に重要な因子であると考えられる。これまでに、MEGF10が細胞内シグナル伝達に重要なチロシンリン酸化部位をもつこと、このチロシンリン酸化の喪失が細胞増殖にネガティブに働くこと、患者ではチロシンリン酸化が低下していることを見いだしている。MEGF10の下流ではたらくシグナル伝達経路および筋再生における役割を、結合タンパク質の同定、培養筋細胞や動物モデル、さらに網羅的遺伝子発現情報解析によって明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) MEGF10結合タンパク質の同定により、MEGF10シグナルの下流の分子機構を明らかにする
- (2) MEGF10ノックアウト細胞を用いて、MEGF10の骨格筋による役割を探索

4. 研究成果

マウス骨格筋細胞株であるC2C12を用いた実験を行い、shRNAノックダウンにより細胞増殖と細胞遊走能が低下していることを示した。また、融合細胞の核の数から算出されるfusion indexやアポトーシスの数には変化がなく、筋分化における役割はmyoblastの増殖と遊走が中心であることが示唆された。さらに興味深いことに、ミオパチー患者で報告されているMEGF10のナンセンス変異体C774RをC2C12に強制発現したところ、細胞増殖の低下が見られた。これにより従来考えられていた機能喪失以外の機序がある可能性が考えられた。

Megf10ノックアウトマウスの骨格筋には軽度の変化が見られるにとどまるが、dystrophinノックアウトマウスmdxとのダブルノックアウトマウスは明らかな筋症状の悪化を示す(図1)。このマウスの初代培養細胞では、細胞増殖能と細胞遊走能の低下が観察され、筋組織でもMegf10が骨格筋細胞において役割を持つことを裏付ける結果となった。

MEGF10の細胞内ドメインによるGST-pull downアッセイを行い、筋細胞のライセートから、MEGF10に結合するタンパク質を解析した。マスマスペクトロメトリー解析により網羅的な解析により、細胞内ドメインに結合している可能性のあるタンパク質を複数見出し、MEGF10との結合を免疫沈降により確認した。

C2C12において、Notch1とMEGF10は同じ時期に発現しており、ダブルノックアウトではNotch1の発現が低下していることが観察された。Notch1は筋肉の幹細胞である筋衛星細胞のメンテナンスに重要な役割を持つことが知られていたが、MEGF10との関わりは未知であったが、Notch1の細胞内ドメインがMEGF10の細胞内ドメインに結合し、細胞膜に共局在していることを見出した(図2)。さらに、C2C12においてMegf10ノックダウンはNotch1の核局在が減少することを見出した。また、病気の変異C774RではNotch1との結合が阻害されることを見出し、C2C12におけるC774Rのドミナントネガティブな機序についての示唆が得られた。これまでの研究によ

り C774R 変異体は MEGF10 のチロシンリン酸化が起こらなくなり、このチロシンリン酸化が細胞増殖に重要であることを見出してきていたが (Mitsuhashi et al. 2013)、新たに Megf10 のチロシン変異体では Notch1 との結合が低下することを見出した (図3)。これらの結果により、Notch1 が Megf10 の筋細胞における細胞増殖シグナリングに重要であることを示し、ミオパチーにおける Megf10 の新しい機序を示唆することができた。

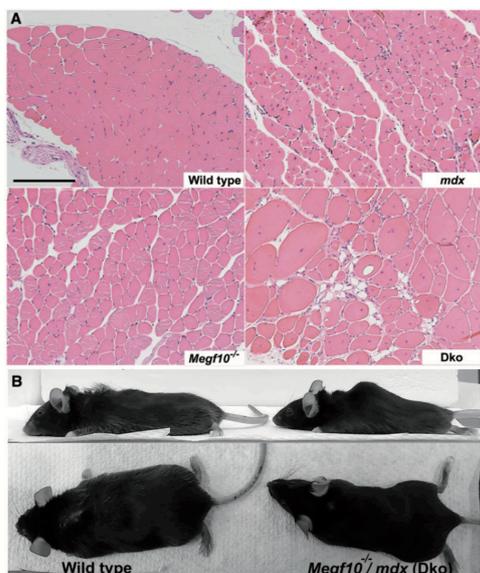


図 1. Megf10/Dmd ダブルノックアウトでは筋症状が見られる

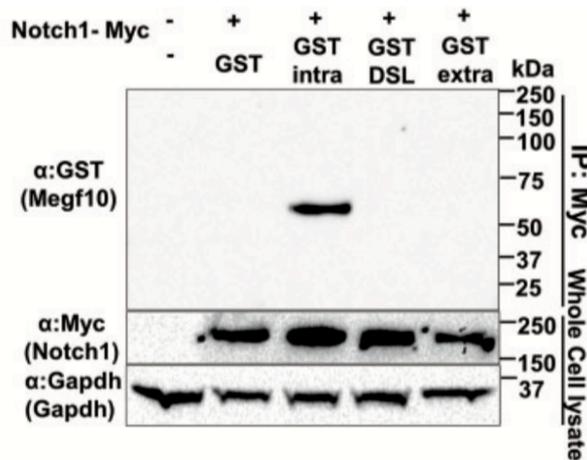


図 2. MEGF10 の細胞内ドメインが Notch1 と結合することを示した

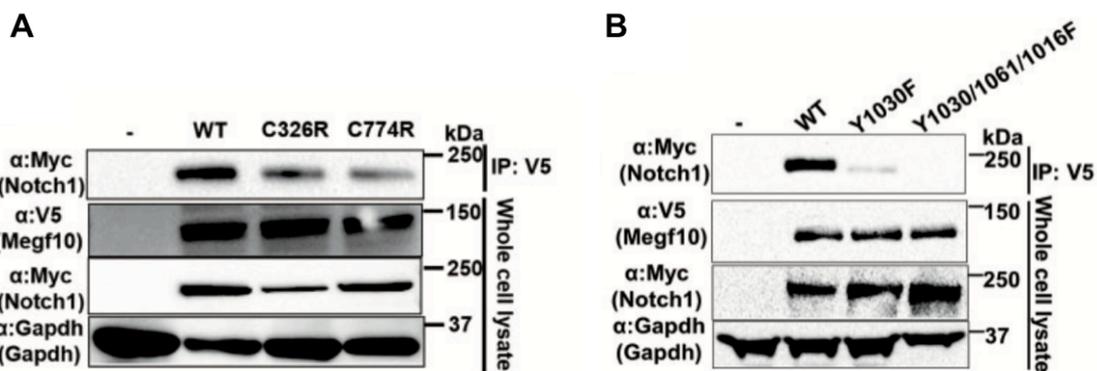


図 3. ミオパチーの患者がもつミスセンス変異体(A)、およびチロシンリン酸化変異体(B)では MEGF10-Notch1 の相互作用は低下していた (文献 1)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件） 査読有り

1. Saha M, Mitsuhashi S, Jones MD, Manko K, Reddy HM, Bruels CC, Cho KA, Pacak CA, Draper I, Kang PB. Consequences of MEGF10 deficiency on myoblast function and Notch1 interactions. Hum Mol Genet. 2017 Aug 1;26(15):2984-3000. doi: 10.1093/hmg/ddx189.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。