

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07544

研究課題名(和文)ジストロフィン欠損と加齢による骨格筋萎縮発症の分子機序解明

研究課題名(英文)Age-related and mutation-independent proteomic changes in dystrophic mouse muscle

研究代表者

青木 吉嗣 (Aoki, Yoshitsugu)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・部長

研究者番号：80534172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：筋ジストロフィーは、遺伝子変異により、慢性的経過で筋萎縮が進行する難病である。一方、超高齢化社会を迎えたわが国では、加齢等に伴う筋萎縮(サルコペニア)はADL低下の主因である。筋ジストロフィーおよび高齢者の骨格筋では、共通してタイプII筋線維優位の萎縮を認めることから、ジストロフィー筋と加齢性筋萎縮に共通する分子病態が存在すると考えられた。この仮説を実証するため、DMDモデルマウスのジストロフィー筋を対象に、超高感度定量質量分析を実施し、タンパク質間相互作用のインタラクトミクス成果を報告し、DMDおよび加齢に伴う筋萎縮に共通する代謝、炎症、筋肉成長経路間のクロストークを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は筋萎縮の複雑な分子病態の解明に基づき、筋ジストロフィーおよび社会的課題であるサルコペニアの克服につながる。

研究成果の概要(英文)：Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe muscle-wasting disease characterised by loss of ambulation and cardiorespiratory problems. At this moment, many aspects of the pathology and disease progression over time are still unclear. Here, we have utilised high-resolution isoelectric focusing liquid chromatography-mass spectrometry to investigate differential protein expression in the tibialis anterior (TA) of mdx, mdx52 and wild-type controls (C57BL/6) at 8, 16 and 80 weeks of age. This technique has provided improved resolution of the proteome, whereby 4974 proteins were detected in all samples. Only slight differences in protein expression were observed between mdx and mdx52. This analysis showed apparent differences between the control and two dystrophic mice with 2148 proteins differentially expressed (t-Test, P=0.01). Additionally, protein expression changed significantly with ageing for both groups.

研究分野：神経内科学関連

キーワード：デュシェンヌ型筋ジストロフィー サルコペニア 筋萎縮 速筋型タイプII筋線維 超高感度定量質量分析 加齢 骨格筋

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、研究者個人に帰属します。

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、ジストロフィン遺伝子の変異により、骨格筋膜の裏打ちタンパク質であるジストロフィンが欠損して生じる、難治性のX連鎖病である。申請者らは若齢DMDを対象に、アンチセンス核酸を用いた“エクソン・スキップ治療”の開発を進めているが、筋線維減少と筋萎縮が進んだ高齢DMDに対する治療法が無い事が課題であった。

一方、高齢者の骨格筋では筋萎縮と筋線維数の減少が生じる。これは、加齢性筋萎縮症(サルコペニア)とも呼ばれ、超高齢社会を迎えた我が国の重要課題の1つである(Am J Clin Nutr. 1989;50:1231-3)。原因は、1. 代謝や慢性炎症などによる体内環境の老化、2. 筋衛星細胞(幹細胞)と微小環境の老化、3. 神経筋シナプスの老化が関与するとされるが、詳細な分子病態は明らかにされていない。興味深い事に、高齢者由来の骨格筋と、DMD由来の骨格筋では、共通して速筋型タイプII筋線維優位の筋萎縮を認める(図1)。

問い：DMD(筋ジス)と加齢による速筋優位の筋萎縮に共通する分子基盤は何か。

本研究では、超高感度定量質量分析で見出した加齢に伴って発現が変動する16種類のタンパク質に着目し、DMDと加齢に共通する速筋優位筋萎縮の分子病理を解明する。本研究の成功は、高齢DMDの筋萎縮バイオマーカー開発、筋萎縮の予防・治療法確立につ

図1: 筋ジスと加齢による筋萎縮の分子病理

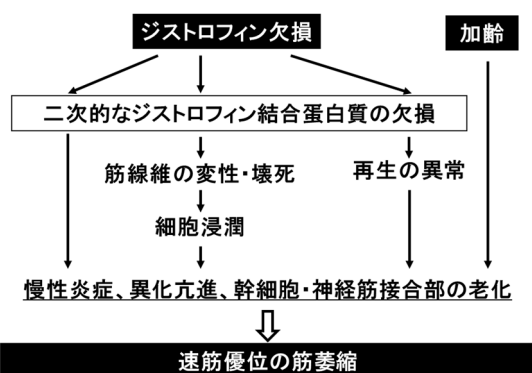
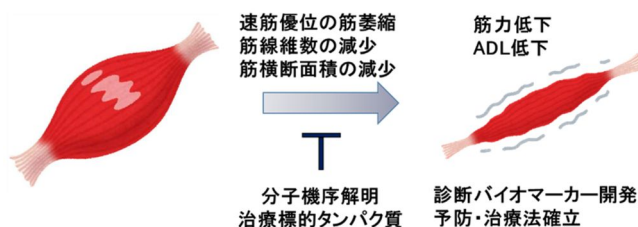


図2: 筋ジスと加齢に伴う筋萎縮: 研究の方針



本研究では、超高感度定量質量分析で見出した16種類のタンパク質の機能解析を行い、高齢DMDの筋萎縮病態との関連性を探求する

なると期待される(図2)。

2. 研究の目的

目的：マウス骨格筋の超高感度定量プロテオミクス解析により、DMDと加齢に共通する分子病態を明らかにし、加齢に伴う筋萎縮症の予防および治療法確立に必要な標的分子を探索する。

学術的独自性と創造性：申請者らは、DMDモデルマウスとして、*Dmd* 遺伝子のエクソン23にナンセンス変異を有する *mdx* に加えて、エクソン52を欠失する *mdx52* を保持する(BBRC. 1997;238:492-497)。両マウスは、骨格筋特異的に発現する全長型ジストロフィン(Dp427)タンパク質を欠くが、*mdx52* マウスはDp140とDp260のジストロフィン・アイソフォームが発現するとの違いがある。申請者らは、DMDモデルマウスの *mdx* と *mdx52* は類似の筋ジストロフィー症状を呈するが、*mdx52* は *mdx* と比べて、筋肥大が目立ち、特に高齢 *mdx52* は筋再生能が有意に高い事を見出したが、両マウスの表現型の違いについては詳細な検討がない(PLoS One. 2013;8:e69194., Hum Mol Genet. 2013;22:4914-28.)

本研究では、mdx と mdx52 マウスのバックグランド系統を C57BL/6 に統一した上で、若齢（8、16 週齢）と高齢（80 週齢）の骨格筋を対象に、ジストロフィン欠損と加齢が骨格筋プロテオームに与える影響を網羅的に解析した上で、DMD と加齢に伴って発現パターンが変動するタンパク質を選別し、筋萎縮関連タンパク質との相互作用を含め詳細な機能解析を行う点で、他に類例がなく極めて創造的である。さらに、High-Resolution Isoelectric Focusing Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (HiRIEF-LC-MS/MS) (Nat Methods. 2014;11:59-62) 結果の主成分分析では、データ再現性が極めて高いこと (n=3, each group) 2 種類の DMD マウスのプロテオームは近似すること、DMD マウス (mdx および mdx52) と野生型マウスプロテオームは大きく異なり、いずれも加齢と共に変化することが判った (図 3)。

3. 研究の方法

1 年目 / 研究期間 3 年

DMD と加齢に伴って変動するタンパク質発現レベルの妥当性検証

定量質量分析結果の妥当性の検証として、ジストロフィン関連タンパク質および前述の 6 種類の候補タンパク質 (図 4) の発現レベルをウエスタンブロット (WB) により確認する。

並行して、ジストロフィン関連タンパク質と候補タンパク質の mRNA 発現レベルを

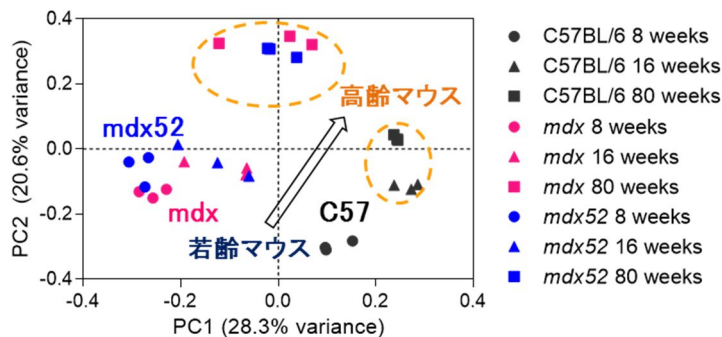


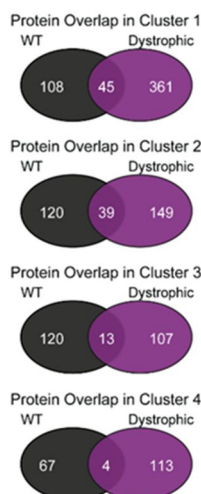
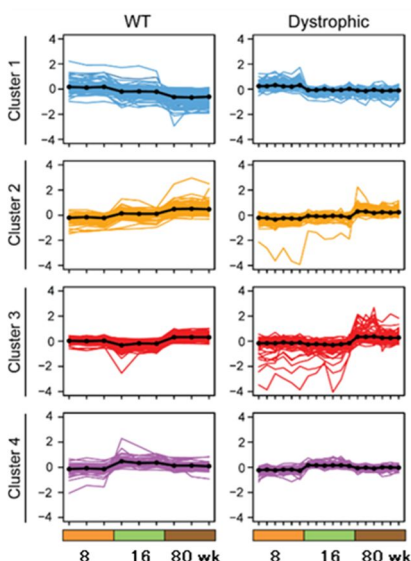
図 3 : マウス骨格筋プロテオームの主成分分析。 C57BL/6 (野生型) (黒)、mdx (ピンク)、mdx52 (青) の前脛骨筋を用いて超高感度定量質量分析を実施した (n=3, each group)。7110 種類のタンパク質を同定し、定量に成功した 4974 種類をプロットした。8/16 週齢は若齢、80 週齢は高齢と表記した。

qPCR 解析する。

マウス由来筋芽細胞である H2 k -mdx、H2 k -mdx52、H2 k -WT を対象に、筋分化過程における候補タンパク質発現レベルの経時変化を解析する。

2 年目 / 研究期間 3 年

マウス由来筋管を対象にした候補タンパク質の機能解析



H2 k -mdx、H2 k -mdx52、H2 k -WT 筋管を対象に、定量質量分析で見出した候補タンパク質を siRNA ノックダウンする。

MuRF-1、MAFbx-1/atrogen-1、IGF-1、Akt-1/PKB、FOXO、MAFbx-1 などの筋萎縮関連遺伝子の mRNA およびタンパク質発現レベルを定量 PCR と WB により評価する。

筋管分化度を、細胞形態と筋転写因子発現レベルを基に経時的評価する。

3年目 / 研究期間3年

マウスとヒト由来骨格筋における候補タンパク質発現の検討

高齢 *mdx* と *mdx52* マウスを対象に、共焦点顕微鏡下で候補タンパク質の局在を評価する。

高齢 *mdx* と *mdx52* マウスを対象にモルフォリノ核酸を経静脈全身投与し、2週間後に骨格筋を採取し、候補タンパク質の発現レベルと局在を、qPCR、免疫組織化学染色、WB等で評価する。

NCNPバイオバンクからDMD患者由来凍結筋ブロックを入手し、凍結筋切片を作成のうえ、候補タンパク質の発現と局在を、qPCR、免疫組織化学染色、WB等で評価する。

4. 研究成果

筋ジストロフィーは、遺伝子変異により、慢性の経過で筋萎縮が進行する難病である。一方、超高齢化社会を迎えたわが国では、加齢等に伴う筋萎縮（サルコペニア）はADL低下の主因である。筋ジストロフィーおよび高齢者の骨格筋では、共通してタイプII筋線維優位の萎縮を認めることから、ジストロフィー筋と加齢性筋萎縮に共通する分子病態が存在すると考えられた。この仮説を実証するため、DMDモデルマウスのジストロフィー筋を対象に、超高感度定量質量分析を実施し、タンパク質間相互作用のインタラクトミクス成果を報告し、DMDおよび加齢に伴う筋萎縮に共通する代謝、炎症、筋肉成長経路間のクロストークを明らかにした。

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe muscle-wasting disease characterised by loss of ambulation and cardiorespiratory problems. The disease arises due to a mutation in the DMD gene, leading to the loss of the dystrophin protein. The most commonly used mouse models are *mdx* and *mdx52* mice, which has a point mutation in exon 23 and a deletion of exon 52, respectively. At this moment, many aspects of the pathology and disease progression over time are still unclear. Here, we have utilised high-resolution isoelectric focusing liquid chromatography-mass spectrometry to investigate differential protein expression in the tibialis anterior (TA) of *mdx*, *mdx52* and wild-type controls (C57BL/6) at 8, 16 and 80 weeks of age. This technique has provided improved resolution of the proteome, whereby 4974 proteins were detected in all samples. Only slight differences in protein expression were observed between *mdx* and *mdx52*. This analysis showed apparent differences between the control and two dystrophic mice with 2148 proteins differentially expressed (t-Test, $P=0.01$). Additionally, protein expression changed significantly with ageing for both groups. These studies offer a view of the dystrophic proteome with unprecedented resolution and provide fundamental new insights into processes occurring in dystrophic muscle, with potential therapeutic implications.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tsoumpira Maria K., Fukumoto Seiji, Matsumoto Toshio, Takeda Shin'ichi, Wood Matthew J.A., Aoki Yoshitsugu	4. 巻 45
2. 論文標題 Peptide-conjugate antisense based splice-correction for Duchenne muscular dystrophy and other neuromuscular diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 630 ~ 645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2019.06.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Motohashi Norio, Shimizu-Motohash Yuko, Roberts Thomas, Aoki Yoshitsugu	4. 巻 8
2. 論文標題 Potential Therapies Using Myogenic Stem Cells Combined with Bio-Engineering Approaches for Treatment of Muscular Dystrophies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1066 ~ 1066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8091066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sato Mitsuto, Takizawa Hotake, Nakamura Akinori, Turner Bradley J., Shabanpoor Fazel, Aoki Yoshitsugu	4. 巻 12
2. 論文標題 Application of Urine-Derived Stem Cells to Cellular Modeling in Neuromuscular and Neurodegenerative Diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2019.00297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nordin Joel Z, Aoki Yoshitsugu	4. 巻 249
2. 論文標題 Autoimmune response and its long term consequences after exon skipping therapy in a Duchenne muscular dystrophy mouse model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 271 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5327	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsoumpra Maria K, Sawatsubashi Shun, Imamura Michihiro, Fukumoto Seiji, Takeda Shin'ichi, Matsumoto Toshio, Aoki Yoshitsugu	4. 巻 64
2. 論文標題 Dystrobrevin alpha gene is a direct target of the vitamin D receptor in muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 195 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JME-19-0229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takizawa Hotake, Hara Yuko, Mizobe Yoshitaka, Ohno Taisuke, Suzuki Sadafumi, Inoue Ken, Takeshita Eri, Shimizu-Motohashi Yuko, Ishiyama Akihiko, Hoshino Mikio, Komaki Hirofumi, Takeda Shin'ichi, Aoki Yoshitsugu	4. 巻 10
2. 論文標題 Publisher Correction: Modelling Duchenne muscular dystrophy in MYOD1-converted urine-derived cells treated with 3-deazaneplanocin A hydrochloride	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59351-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu-Motohashi Yuko, Komaki Hirofumi, Motohashi Norio, Takeda Shin'ichi, Yokota Toshifumi, Aoki Yoshitsugu	4. 巻 9
2. 論文標題 Restoring Dystrophin Expression in Duchenne Muscular Dystrophy: Current Status of Therapeutic Approaches	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm9010001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 青木吉嗣
2. 発表標題 デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する核酸医薬品開発の最新知見
3. 学会等名 第415回CBI学会講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青木吉嗣
2. 発表標題 神経筋難病の遺伝子を標的にした治療法開発
3. 学会等名 神経治療学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木吉嗣
2. 発表標題 ジストロフィン欠損と加齢による骨格筋萎縮発症の分子機序解明
3. 学会等名 東京農工大学 NCNP 第 5 回合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木吉嗣
2. 発表標題 Dystrophin networks in the brain of mdx and mdx52 mice
3. 学会等名 249th European Neuromuscular Centre International Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木吉嗣
2. 発表標題 Advanced PPMO combinations drive multi-exon skipping and dystrophin expression in dystrophic dogs
3. 学会等名 48th European Muscle Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木吉嗣
2. 発表標題 Targeting RNA to treat Duchenne muscular dystrophy
3. 学会等名 CNMC International Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木吉嗣
2. 発表標題 Significance of animal experimentation to drug development for muscular dystrophy
3. 学会等名 UCL London lecture (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 青木吉嗣	4. 発行年 2019年
2. 出版社 じほう	5. 総ページ数 6
3. 書名 PHARM TECH JAPAN	

1. 著者名 青木吉嗣	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 6
3. 書名 PrecisionMedicine	

1. 著者名 青木吉嗣	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団	5. 総ページ数 6
3. 書名 アンチセンス医薬開発の最前線(2)神経・筋疾患に対するアンチセンス医薬品	

1. 著者名 青木吉嗣	4. 発行年 2020年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 6
3. 書名 CLINICAL NEUROSCIENCE	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 エクソン51のスキッピングを誘導するアンチセンス核酸	発明者 青木吉嗣	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-033483	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 エクソン50のスキッピングを誘導するアンチセンス核酸	発明者 青木吉嗣	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-00000	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 アンチセンス核酸(エクソン45)	発明者 青木吉嗣	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、36434	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------