

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07845

研究課題名(和文) タイチン分解酵素を阻害するDuchenne型筋ジストロフィーの新しい治療標的

研究課題名(英文) Research on novel therapeutic molecular target for Duchenne muscular dystrophy that inhibits titin-degrading enzymes

研究代表者

栗野 宏之 (Hiroyuki, Awano)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30437470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Duchenne型筋ジストロフィーのジストロフィン欠損筋では筋崩壊が生じているが、その病態はいまだ明らかではない。本研究ではタンパク分解酵素であるカルパインが筋崩壊に関連していると考え、その発現を調べた。患者由来の筋芽細胞、冷凍骨格筋等を用いて、リアルタイムPCR法またはウェスタンブロット法でカルパイン1および2、およびカルパインの内在性阻害タンパクであるカルパスタチンの発現を健康人と比較した。患者筋ではカルパイン1および2とカルパスタチンの発現の比は、健康人より高かった。この結果から、ジストロフィン欠損筋では、カルパインとその阻害タンパクの発現がアンバランスであることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)患者のジストロフィン欠損筋のカルパイン1およびカルパイン2の発現が、阻害タンパクであるカルパスタチンに比して増加していた。これはカルパインがDMD患者の筋崩壊の病態に関連することを示唆する結果である。また、DMDの筋崩壊を阻止する根治治療の標的分子の同定に寄与する結果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The dystrophin-deficient muscle of Duchenne muscular dystrophy has muscle breakdown, however, the pathophysiology has been unclear. In this study, we considered that calpain, a proteolytic enzyme, is associated with muscle breakdown, and investigated its expression. Using patient-derived myoblasts, frozen muscle, etc., the expression of calpain 1 and 2 and calpastatin, which is an endogenous inhibitory protein of calpain, were compared with healthy subjects by real-time PCR or Western blotting. The ratio of calpain 1 and 2 to calpastatin expression in DMD muscle samples was higher than in healthy subjects. It was clarified that the expression of calpain and its inhibitory protein was unbalanced in dystrophin-deficient muscle.

研究分野：筋疾患

キーワード：Duchenne型筋ジストロフィー カルパイン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)はジストロフィン遺伝子変異によるジストロフィン欠損により生じる致死性の進行性の筋萎縮症である。DMD のジストロフィン欠損筋では、筋崩壊が惹起されることが知られているが、その病態については明らかでない。それゆえ筋崩壊を阻止する根治治療がない。

タイチンはヒト最大のタンパクで、筋肉のサルコメアでバネの役割を果たしている。申請者は DMD の尿中にタイチン分解産物が健常人に比べ極めて多量に排出される結果を得、DMD ではタイチンの分解が活発であることを示した。このことから、DMD におけるタイチン分解の病態を明らかにすることが、タイチン分解阻害を目的とした DMD の新しい治療標的を同定すると考えた。

### 2. 研究の目的

DMD のジストロフィン欠損筋では、筋細胞膜における  $Ca^{2+}$ 流入増加により  $Ca^{2+}$ 要求性のプロテアーゼが活性化されると考えられている。 $Ca^{2+}$ により活性化されるプロテアーゼにはカルパインが知られている。そこで、DMD 患者の骨格筋におけるカルパインの発現や活性を測定し、正常より明らかに上昇していることを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1)カルパイン1、カルパイン2、カルパスタチンの解析:

試料に冷凍骨格筋、または筋芽細胞を用いた。骨格筋は DMD 患者から筋生検により採取し、冷凍保存してあるものを用いた。コントロールには非筋ジストロフィー患者の筋生検検体を使用した。

DMD 患者由来筋芽細胞は、筋生検サンプルから培養したのものを用いた。コントロールには Human skeletal myoblast(Gibco)を用いた。

骨格筋または筋芽細胞からの mRNA の抽出は Isogen(ニッポンジーン)を用いた。Agilent RNA6000 ナノキットと Agilent 2100 パイオアナライザー (Agilent) を用いて RNA integrity Number を測定し、値が 5 以上の検体を使用した。逆転写反応で cDNA を作成 (RNA to cDNA EcoDry Premix, Takara)。PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を用いて、7500 FAST system (Applied Biosystems) で Real time PCR を行った。内部標準に GAPDH を用いた。

(2)カルパイン1、カルパイン2、カルパスタチンタンパクの発現: DMD 患者由来の筋芽細胞を、10%ウシ胎児血清を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco)で4日間培養し、その後筋細胞への分化メディウム (DMEM + 2%ウマ血清)で5日培養し、筋細胞を回収した。コントロールには、Human skeletal myoblast(Gibco)から同様に分化させた筋細胞を用いた。筋細胞を RIPA buffer(WAKO)、protease inhibitor cocktail(100X) (Thermo)、phosphatase inhibitor cocktail (Thermo)と混合しライセートを作成した。ライセートは 4-20% ミニプロティアン TGX プレキャストゲル(Bio-rad)にアプライし電気泳動を行い、immun-blot PVDF membrane for protein blotting (BIO-rad)にトランスファーした。カルパイン1、カルパイン2、カルパスタチン、デスミン、GAPDH の 1 次抗体として、それぞれ Anti-calpain 1 (ab28258, Abcam), Anti-calpastatin2 ((ab226249, Abcam), anti-desmin (ab15200, abcam)を用いた。ウェスタンブロットで得られたバンドの定量には、Image Jを用いた。なお、定量を行うときは同じメンブレン上のバンドを比較した。

#### (3)ACTN3遺伝型の決定

ACTN3 遺伝子のエクソン15を直接シーケンス法で塩基配列を決定した。c.1729 がホモ接合体で C であるものを野生型、C と T のヘテロ接合体であるものをヘテロ型、T のホモ接合体を欠損型と定義した。

### 4. 研究成果

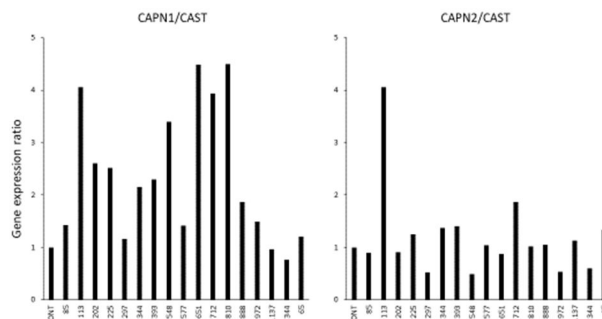
#### (1)骨格筋におけるカルパイン1、カルパイン2、カルパスタチンの発現

DMD 患者から 17 人、コントロール 1 人から試料を得た。DMD 患者のカルパイン 1、カルパイン2の relative expression をコントロールと比較したところ、それぞれ 5 人(29%)、2人(12%)で発現の増加を認めた。カルパスタチンは 1 人(6%)のみ発現が上昇していた。カルパイン1、カルパイン2、カルパスタチンの relative expression と筋生検時の年齢に強い相関はなく、カルパイン1とカルパイン2の発現と疾患のステージとの関連は認めなかった。

カルパスタチンはカルパインの内在性阻害タンパク質であり、カルパインの活性はカルパスタチンにより制御されている。次に、カルパイン1またはカルパイン2と、カルパスタチンの relative expression の関連を調べたところ、カルパイン1およびカルパスタチン2の発現が大きいほどカルパスタチンの発現が大きくなる正の相関を認めた。

カルパイン1および2と、カルパスタチンの relative expression の比をコントロールと比較したところ、DMD 患者の 15 人 (88%)、10 人 (59%) でそれぞれカルパイン1/カルパスタチン比、カルパイン2/カルパイン比の上昇を認めた (図1)。比と筋生検時の年齢に相関は認めなかった。

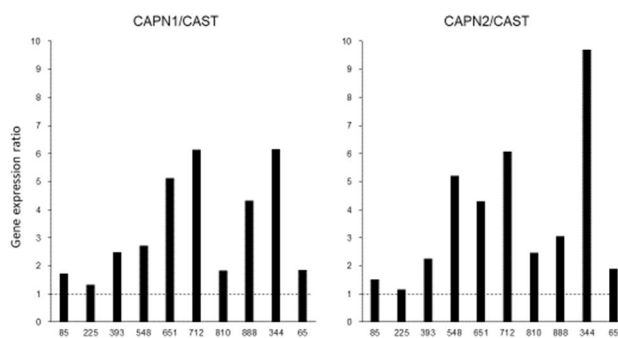
図1 患者骨格筋におけるカルパイン1/カルパスタチン、カルパイン2/カルパスタチンの発現比



(2) 筋芽細胞におけるカルパイン1、カルパイン2、カルパスタチンの発現

10 人の DMD 患者の筋芽細胞を使用した。カルパイン1、カルパイン2の relative expression をコントロールと比較したところ、すべての筋芽細胞で発現上昇をみとめた。一方、カルパスタチンの発現上昇を認めたのは1人のみであった。カルパイン1またはカルパイン2と、カルパスタチンの relative expression の関連を検討したところ、負の相関を認め、骨格筋で認めた傾向とは異なるものであった。カルパスタチン1/カルパイン比、カルパイン2/カルパスタチン比はすべての筋芽細胞でコントロールより上昇していた (図2)。

図2 患者由来筋芽細胞におけるカルパイン1/カルパスタチン、カルパイン2/カルパスタチンの発現比

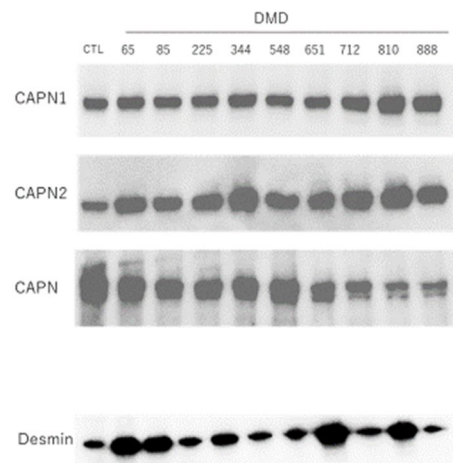


(3) 筋細胞におけるカルパイン1、カルパイン2、カルパスタチンの mRNA 発現とタンパク発現

9 人の DMD 患者の筋細胞を得た。カルパイン1、カルパイン2の relative expression をコントロールと比較したところ、それぞれ4人 (44%)、5人 (56%) で発現上昇をみとめた。カルパスタチンはすべての例で発現の上昇を認めた。カルパイン1またはカルパイン2とカルパスタチンの relative expression に強い相関は認めなかった。カルパスタチン1/カルパイン比、カルパイン2/カルパスタチン比が上昇していたのはどちらも2人のみであった。

次にカルパイン1および2、カルパスタチンのタンパク発現量を調べた。デスミンを内部標準として用いたカルパイン1の発現はコントロールに比べ同等か低下していた。またカルパイン2の発現は5例 (56%) で上昇を認めた。カルパスタチンはすべての患者由来筋細胞でコントロールに比べ発現が低下していた (図3)。カルパスタチン1/カルパスタチン比と、カルパイン2/カルパスタチン比を検討したところ、すべての患者由来筋細胞において発現が上昇していた。

図3 カルパイン1、カルパイン2、およびカルパスタチンのタンパク発現



(4) ACTN3 遺伝子型との関連

ACTN3 は骨格筋に発現する構造タンパクであり、アクチニン3をコードする。c.1729C>T は ACTN3 の高頻度多型であり、保有頻度は一般人口の 10-70% である。この多型をホモ接合性に有するもの (欠損型) は、アクチニン3を欠損し、欠損しない群とくらべ筋機能が劣ると報告されている。DMD 患者においても ACTN3 遺伝子多型が筋機能と関連することが報告されている。そこで、ACTN3 遺伝子多型とカルパインの発現の関連を検討したが、一定の傾向は認めなかった。

カルパイン1、カルパイン2、カルパスタチンの発現は、同じ DMD 患者由来の試料でも骨格筋、培養筋芽細胞、培養筋細胞で必ずしも一致しないことがわかり、分化の段階で発現に差があることが示唆され

た。DMD 患者由来の培養筋細胞の結果から、筋崩壊を惹起するカルパイン1およびカルパイン2の発現が、阻害タンパクであるカルパスタチンに比して増加していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masashi Nagai, Hiroyuki Awano, Tetsuya Yamamoto, Ryosuke Bo, Kazumoto Iijima, Masafumi Matsuo	4. 巻 26
2. 論文標題 The ACTN3 577XX null genotype is associated with low left ventricular dilation in Duchenne muscular dystrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of cardiac failure	6. 最初と最後の頁 841-848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cardfail.2020.08.002	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 -

1. 著者名 Matsuo M, Awano H, Maruyama N, Nishio H	4. 巻 2019
2. 論文標題 Titin fragment in urine: A nonvasive biomarker of muscle degradation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advances in Clinical Chemistry	6. 最初と最後の頁 1-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.acc.2019.01.001	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroyuki Awano
2. 発表標題 URINARY TITIN IS A NON-INVASIVE BIOMARKER TO DIAGNOSE DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY EVEN IN ADVANCED STAGE
3. 学会等名 15th International Congress on Neuromuscular Diseases (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 粟野宏之
2. 発表標題 尿中タイチンはDuchenne型筋ジストロフィー診断のバイオマーカーである
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永井正志、栗野宏之、山本哲志、坊亮輔、西尾久英、松尾雅文、飯島一誠
2. 発表標題 ACTN3ヌル遺伝子型はDMDの拡張型心筋症の早期発症と関連する
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nagai M, Awano H, Yamamoto T, Bo R, Nishio H, Matsuo M, Iijima K
2. 発表標題 The alpha-actinin-3 deficiency is related to early onset of dilated cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy patients
3. 学会等名 24th International Annual Congress of the World Muscle Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------