

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07861

研究課題名(和文)ジストロフィンDp71による筋衛星細胞の分裂制御に関する研究

研究課題名(英文)Study on dystrophin Dp71 to regulate satellite cell division

研究代表者

松尾 雅文(Matsuo, Masafumi)

神戸学院大学・総合リハビリテーション学部・特命教授

研究者番号：10157266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ジストロフィンDp71が筋衛星細胞の分裂制御因子であることを明らかにするため、まず、筋衛星細胞でのDp71のmRNAの検出を図った。エクソンG1から79までの領域の増幅断片を得たが、その塩基配列では、エクソン71と78の2つのエクソン配列を欠き、Dp71abであった。驚くべきことに、衛星細胞ではDp71abのみが発現していた。そして、ヒトの不死化筋芽細胞にDp71abとDp71abの発現プラスミドをそれぞれ導入し、その細胞増殖能を解析した。Dp71は筋芽細胞の増殖を促さなかったが、Dp71abは有意に細胞数を増やした。Dp71abこそが筋芽細胞増殖促進因子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋衛星細胞は、数多くのDp71アイソフォームの中でDp71abのみを発現する極めて特徴的な細胞であることを明らかにした。また、筋芽細胞増殖作用解析において、Dp71が全く作用しなかったに対して、Dp71abは筋芽細胞増殖作用を発揮した。これは、Dp71が細胞増殖因子であるとのこれまでの説と大きく異なるもので、この作用が筋芽細胞特異的なのか、一般的な細胞増殖作用因子であるのか今後検討が必要である。Dp71abがin vivoでも筋細胞増殖作用を発揮し、Duchenne型筋ジストロフィーなどの筋萎縮疾患に対する治療の新たな分子となると大きく期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify a role of Dp71 in the satellite cell proliferation, Dp71 mRNA in human satellite cells was analyzed by reverse-transcription PCR amplification. The full length of Dp71 from exon G1 to 79 was PCR amplified as a clear band. Notably, sequencing of the product revealed that the product deleted exons 71 and 78, thereby encoding Dp71ab. Dp71ab was a sole isoform of Dp71 in satellite cells. Dp71 and Dp71ab expression plasmids were transfected into huma immortalized myoblasts and their proliferation was analyzed. Dp71 expression had no effect on cell proliferation. Remarkably, Dp71ab enhanced cell proliferation, significantly. It was concluded that Dp71ab is the molecule that regulates myoblast proliferation

研究分野：小児科学

キーワード：ジストロフィンDp71 衛星細胞

## 1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)は、ジストロフィン欠損による骨格筋の壊死・再生を主徴とする進行性の筋萎縮症で、若年死する。そのため、DMD の治療法の確立を目ざして様々な研究が世界的規模で極めて活発に行われている。その1つが、衛星細胞を外部から移植する DMD の治療である。これは、DMD では骨格筋の衛星細胞が枯渇しているとの仮説に基づいている。ところが、近年 DMD 患者の骨格筋では衛星細胞数は正常よりも増加していること、また、DMD 由来細胞で、細胞分裂に異常があることなどが次々と明らかにされた。そのため、現在では筋衛星細胞の分裂の抑制による筋前駆細胞の産生減少が DMD の筋萎縮の原因であるとされている。したがって、DMD の治療として、内在性の衛星細胞の分裂を促進する方策の確立が喫緊の課題となっている。

ジストロフィンをコードする *DMD* 遺伝子はヒト最大の遺伝子で、内在するプロモーターからジストロフィン Dp71 (Dp71) が産生される。Dp71 はジストロフィンとは異なり分子量が小さいため、細胞の核内にも存在する。近年 Dp71 は細胞分裂を制御する新しい分子として細胞生物学的に大きく注目されている。そして、Dp71 は核内でクロマチンと結合し細胞分裂を抑制すること、HEK293 細胞では Dp71 のアイソフォームである Dp71ab が核に特異的に存在することなどが明らかになった。一方、臨床病態的には Dp71 の発現の低下はがんの浸潤・転移を促進することが明らかにされ、Dp71 はがん抑制因子としても大きく注目されている。

松尾雅文は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて *DMD* 遺伝子のエクソスキッピングを誘導し、mRNA のアミノ酸読み取り枠を回復させ、ジストロフィンを発現させる DMD の治療方法を世界に先駆けて提唱した。この方法は世界の注目を集め、現在 DMD の治療法として確立されつつある。申請者の開発してきた独自の修飾核酸医薬もフェーズ I/II の臨床治験を実施中である。ところが、本治療は筋細胞でジストロフィンを発現させるもので、筋細胞数が少ないと効果は限定的となる。そのため、この治療法の効果を上げるにも、内在性の衛星細胞の分裂を促進する方策の確立が喫緊の課題となっている。

Dp71 はその発見以来これまで一貫して骨格筋には発現しないとされてきた。そのため、骨格筋の衛星細胞で Dp71 の細胞分裂制御作用が検討されることはなかった。最近、申請者は、Dp71 が骨格筋で発現していることを世界で初めて明らかにした。このことから Dp71 が衛星細胞に発現し「Dp71 は骨格筋の筋衛星細胞の分裂制御因子である」との独自の仮説をたてた。本研究では、この仮説を立証するものである。

## 2. 研究の目的

申請者は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて *DMD* 遺伝子のエクソスキッピングを誘導してジストロフィンの発現を促す Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の治療法を提唱し、その開発において世界のリーダーとして数多くの業績を挙げてきた。この治療法は、DMD 患者の骨格筋細胞において患者の *DMD* 遺伝子産物 mRNA をエクソスキッピングにより編集し機能的なジストロフィンを発現させるものである。そのため、治療効果を最大限に発揮するには骨格筋に十分な数の筋細胞の存在が必要である。ところが、DMD では筋壊死が進み筋細胞数は減少している。このことは、DMD に対するジストロフィン発現治療において、筋衛星細胞の分裂を促進する方策の確立が喫緊の課題となっている。

また、DMD では筋衛星細胞が枯渇し、筋細胞の増加には衛星細胞の移植が必要と考えられてきた。ところが、DMD では衛星細胞の分裂の抑制による筋前駆細胞の産生障害があることが明らかにされた。そのため、DMD で筋細胞の増加を図るには衛星細胞移植よりも、内在性の衛星細胞を分裂させて筋前駆細胞の産生を促すことが有用な手法である。

そこで、エクソスキッピング治療の治療効果のさらなる向上のため、あるいは単なる筋細胞増殖治療のために本研究は「Dp71 は骨格筋の筋衛星細胞の分裂制御因子である」との仮説を立証し、衛星細胞の分裂促進に手がかりを得るものである。そのため、1) 衛星細胞に Dp71 が発現すること、2) Dp71 の発現が筋芽細胞増殖を促進することを明らかにする。その成果は、内在性の筋芽細胞の分裂促進による筋細胞の産生増加を図る全く新しい DMD 治療法の開発に道を開くものと大きく期待される。

## 3. 研究の方法

本研究は、筋衛星細胞の核に Dp71 が発現すること、そして筋芽細胞の分裂を Dp71 が制御していることを世界で初めて明らかにするものである。そこで、衛星細胞で Dp71 mRNA の RT-PCR 法により検出し、それを解析する。また、Western blot 法により Dp71 タンパクを同定する。さらに、ヒト筋芽細胞に Dp71 発現プラスミドを導入し衛星細胞の細胞分裂を制御している分子であることを明らかにする。

そのために、以下①～ の研究を実施した。

#### ヒト衛星細胞での Dp71 の発現の同定

骨格筋衛星細胞における Dp71 の発現を明らかにした。そのために、ヒト衛星細胞から抽出した全 RNA を購入した。そして、逆転写 PCR 法 (RT-PCR 法) により Dp71 を増幅し、その塩基配列を解析した。また、ヒト衛星細胞のライゼートを購入し、ジストロフィンの C 末端に対する抗体を用いたウエスタンブロット法によりタンパクの同定を行った。

Dp71 と Dp71ab の塩基配列を pcDNA3.1(+) に挿入し、それぞれの発現プラスミドを作製した。そして、Dp71 発現プラスミドをヒトの不死化筋芽細胞へ導入し、Dp71 による細胞増殖を CCK-8 法と細胞数カウント法により解析した。

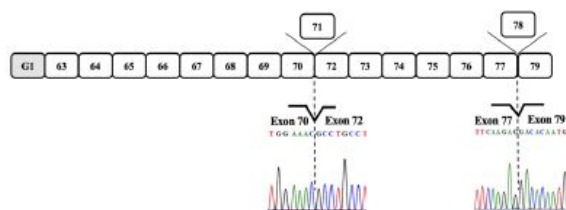
#### 4. 研究成果

##### Dp71ab mRNA の同定

筋衛星細胞の Dp71mRNA を解析するため、衛星細胞から抽出した RNA を購入した。RNA の抽出元となった筋衛星細胞の筋分化度を明らかにするために、筋分化に関与する遺伝子 PAX3、PAX7、Myf5、MyoD と myogenin の産物を RT-PCR 解析した。その結果、この衛星細胞は PAX7(+)MyoD(-) 細胞であると決定した。

そして、Dp71 の mRNA をエクソン G1 から 79 までの領域を一挙に PCR 増幅した。その結果、ほぼ目的サイズの増幅産物を得た。このことから Dp71 が衛星細胞で発現することが明らかとなった。さらに、増幅した Dp71 産物の塩基配列をした。その結果予想に反して、エクソン G1 から 79 の塩基配列からエクソン 71 と 78 の 2 つのエクソン配列を欠いていた。Dp71 には選択的スプライシングにより多様なアイソフォームが存在するが、得られた塩基配列はすべてエクソン 71 と 78 を欠くものであった。この両エクソンの欠失したアイソフォームは Dp71 で、衛星細胞は本来のアイソフォームである Dp71 も発現しない極めて特異なアイソフォーム発現組織であった。

図 1. Dp71 の配列はすべてエクソン 77 と 78 を欠失していた。

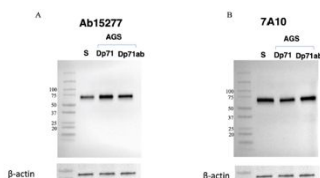


##### Dp71ab タンパクの同定

さらに、衛星細胞での Dp71ab のタンパクでも発現を明らかにするために衛星細胞のライゼートのウエスタンブロット解析を行った。タンパクのマーカースとして Dp71ab と Dp71 の発現プラスミドをそれぞれ作製し、発現させたタンパクをマーカースとした。そして衛星細胞のライゼートをウエスタンブロット解析すると Dp71ab のマーカースに一致してきれいなバンドを検出した。以上より、衛星細胞の Dp71ab の発現を mRNA・タンパクのレベルで明らかにした。

筋衛星細胞のトータル RNA から RT-PCR 解析により、Dp71 の mRNA の全長を増幅した。

図 2. Dp71ab の骨格筋でのウエスタンブロット解析

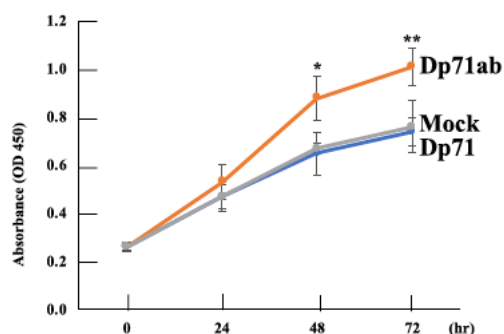


##### Dp71ab の筋芽細胞増殖作用

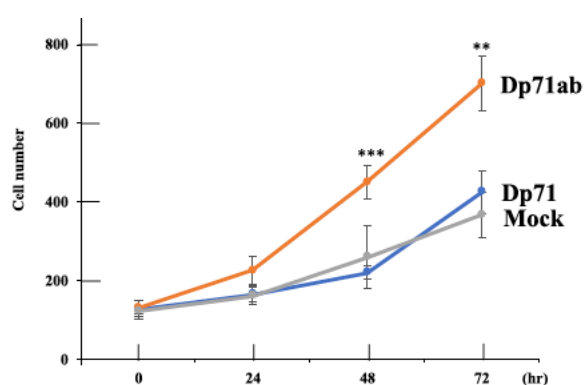
ヒトの不死化した筋芽細胞を用いて Dp71ab の細胞増殖作用を解析した。Dp71 と Dp71ab の発現プラスミドをそれぞれ筋芽細胞に導入し、その細胞増殖を 2 つの方法で解析した。1 つは CCK-8 アッセイ法で、もう一つは細胞カウティングである。その結果、72 時間の培養で両法の解析ともで Dp71 には筋芽細胞増殖促進作用は見られなかった。Dp71ab は Dp71 発現細胞よりも有意に細胞数が増え、増殖作用を示した。このことは Dp71ab を用いた筋芽細胞増殖治療が可能であることを示した。その成果は以下の論文に発表した。

図 3. 筋芽細胞の増殖

1) CCK-8 アッセイ法



2) 細胞数カウント法



考察

衛星細胞では数多くの Dp71 の中で、Dp71ab のみが発現することを明らかにした。Dp71 は多くのアイソフォームを有し、各種のアイソフォームが混じって発現することが知られている。この様に単独のアイソフォームのみの発現は極めて稀なことで、衛星細胞を特徴づけるものであった。筋芽細胞増殖作用解析において、Dp71 が全く作用しなかった。これは、これまで Dp71 が細胞増殖因子であるとの説と大きく異なるものである。これまでの検討が Dp71 であったのか Dp71ab であったのか再検討する必要がある。

Dp71ab は有意な筋芽細胞増殖作用を発揮した。この作用が筋芽細胞特異的なのか、一般的な細胞増殖作用因子であるのか今後検討が必要である。

今回の結果は、in vitro で筋細胞の増殖が Dp71ab により可能なことを示した。今後、Dp71ab が in vivo でも筋細胞増殖作用を有するか検討する必要がある。そして、in vivo でも Dp71ab による筋細胞増殖作用が明らかになれば Dp71ab は DMD 筋萎縮に対する治療の新たな分子となる可能性がある。

発表論文

1. Farea M, Rani A, Maeta K, Nishio H, and Matsuo M. Dystrophin Dp71ab is monochonally expressed in human satellite cells and enhances proliferation of myoblast cells. *Sci Rep.* 2020;10:17123.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Farea M, Rani A, Maeta K, Nishio H, and Matsuo M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Dystrophin Dp71ab is monoclonally expressed in human satellite cells and enhances proliferation of myoblast cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 17123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74157-y	査読の有無 無
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0件

〔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
---------	---------