

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15052

研究課題名(和文)核膜病における筋線維タイプ特異的な病態の解明とNQO1を標的とした治療法の開発

研究課題名(英文) Muscle fiber type specific dystrophic phenotype in murine model of nuclear envelopathies and NQO1 as a target for potential therapy

研究代表者

和田 英治 (Wada, Eiji)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：60756948

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)：核膜関連タンパク質の異常で起こる核膜病の発見端緒ともなったエメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー(EDMD)は小児期に発症する筋疾患であり、筋ジストロフィー症状のほかに、関節拘縮や心伝導障害を伴う心筋症を主徴とする難病であり、エメリン遺伝子をはじめA型ラミン遺伝子の異常などが報告されている。エメリン欠損マウスとA型ラミンH222P変異導入マウスの2重変異(EH)マウスを作製したことがブレークスルーとなり、ミトコンドリアの機能異常(NQO1の発現低下)が骨格筋障害に寄与していると示唆した。本研究では、NQO1の発現増加が期待できる候補治療薬をEHマウスに投与し、骨格筋に対する治療効果を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋ジストロフィーは骨格筋の壊死・再生を主病変とする遺伝性筋疾患の総称であり、その中でエメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー(EDMD)は核膜関連タンパク質の遺伝子異常で起こる希少筋疾患である。これまで骨格筋の病態メカニズムが不明であったこともあり、有効な治療法は確立されていない。我々はEDMDの骨格筋病態を良く再現するモデルマウスを有しており、本研究ではEDMDにおける骨格筋病態メカニズムの解明とミトコンドリアの機能回復をターゲットにした候補治療薬の探索を行った。

研究成果の概要(英文)：Nuclear envelopathies are tissue-selective diseases that affect differently in organ systems. Mutations in nuclear envelope proteins, emerin (EMD) and lamin A/C (LMNA) genes, cause myopathy called Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD). Since there was no suitable model existed, the underlying molecular mechanism of skeletal muscle involvement in EDMD has not been clarified. Recently, we generated double mutant (Emd-null/LmnaH222P/H222P mutant; EH) mice which show the progression of muscular dystrophy before appearance of cardiac dysfunction similar to EDMD patients. From a micro-array analysis, some genes related to mitochondria functions are altered, especially in a NQO1 levels. In this study, several potential drugs for upregulating NQO1 levels are administered to evaluate the effectiveness in skeletal muscle phenotype in EH mice.

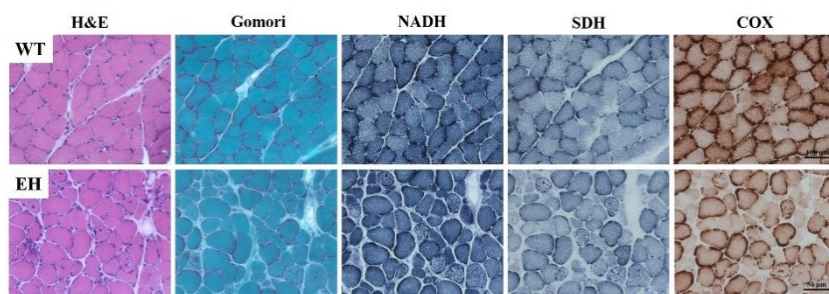
研究分野：筋生理学、筋疾患

キーワード：核膜病 骨格筋線維タイプ ミトコンドリア メカニカルストレス DNAダメージ 核

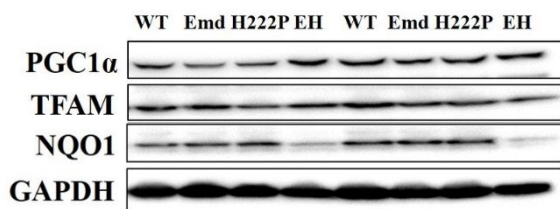
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

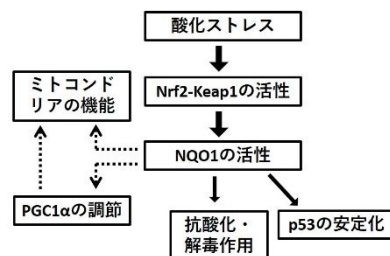
エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー (EDMD) は稀な筋疾患であり、核膜関連タンパク質の異常によって起こる核膜病にも分類される。核膜病は核内膜および核ラミナのタンパク質異常によって発症し、早老症や筋疾患、心疾患、代謝異常と多様な症状をしめす。基礎研究において、EDMD の心筋症状発症メカニズムや治療法の探索が進んでいるが、骨格筋に及ぼす影響や筋変性の分子機序の解明は進んでいない。その背景として、これまで EDMD 患者の骨格筋病態をよく再現するモデル動物がいなかったことが挙げられる。それで、EDMD の原因遺伝子でもあるエメリンと A 型ラミン H222P 変異の 2 重変異マウス (EH) を作製し、その結果、EDMD 患者と類似した骨格筋障害を示すことや化学組織染色によりミトコンドリアの分布 (発現) 異常が筋病態に関与する可能性を示唆した。



またマイクロアレイ解析の結果から、ミトコンドリア関連因子であり抗酸化酵素としても注目される NAD(P)H キノン酸化還元酵素 (NQO1) の発現が、EH マウスの遅筋線維でのみ低下していることを突き止め筋病態に大きく関与している可能性を見いだした。ウエスタンブロットによるタンパク質の発現を確認した結果、EH マウス骨格筋でのみ NQO1 の発現が低下していることを突き止めている。



【図】NQO1の作用



図で示すように、NQO1 の活性はミトコンドリアの機能向上だけでなく、抗酸化・解毒作用、さらに慢性的な活性が筋萎縮を引き起こすと言われる P53 の安定化にも寄与することが報告されている。このような背景から、筋疾患を含む様々な疾患モデルマウスを用いた先行研究をもとに、NQO1 の発現回復が期待できる候補治療薬を選択し、投与により EH マウスの骨格筋症状の改善が認められるかを検討する。

### 2. 研究の目的

本研究では、まず EH マウスの筋形態および機能変化の詳細な解析を行い、EDMD における骨格筋病態の発症メカニズムを解明するとともに、数種類の候補治療薬投与による NQO1 の発現回復と筋病態改善効果を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) EH マウスの骨格筋病態の詳細な解析を行う。病理学的な解析では、核膜病の筋障害が起こるメカニズムを遅筋線維と速筋線維の経時的変化に着目して評価する。筋生理学的な解析では、単離した長趾伸筋とヒラメ筋を用いて ex vivo 筋張力を評価する。また、ヘビ毒であるカルジオトキシンを筋中し、筋再生能 (筋サテライト細胞の機能) を評価する。

(2) NQO1 の発現増加が期待される治療薬として idebenone を用いる。この薬はミトコンドリア機能を高めるとともに、脂質過酸化反応を抑制することが知られている。また、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の心筋保護作用も報告されている (Buyse GM et al., Eur Heart J. 2009; Buyse GM et al., Lancet. 2015)。本研究では idebenone をエタノールとオリーブオイルに混合し、ゾンデを用いて経口投与 (200mg/kg/day) する。また、NQO1 に対する直接的な作用は報告されていないが、ミトコンドリア機能を回復することが期待されている治療薬 A と B を、それぞれ 150mg/kg/day と 100mg/kg/day になるよう飲水に混合して投与する。

## 4. 研究成果

### (1) EH マウスの特徴的な骨格筋症状の解明

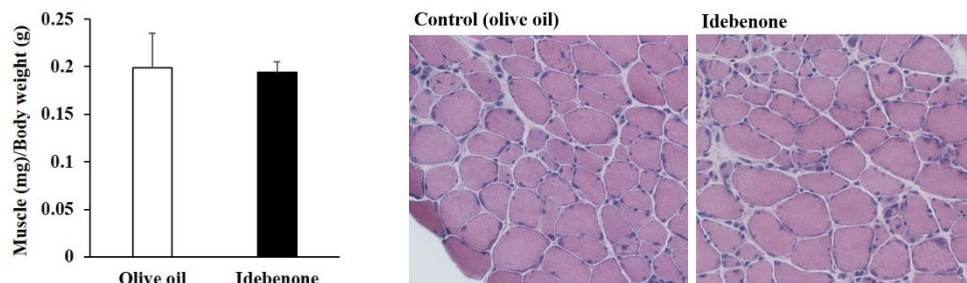
EH マウスの骨格筋を解析した結果、EDMD 患者同様に遅筋線維が優位に障害を受け、緩やかに筋症状が進行することが明らかとなった。単離した長趾伸筋とヒラメ筋を用いて *ex vivo* 筋張力を測定したところ、EH マウスで遅筋線維の多いヒラメ筋のみ筋張力が低下していたことから、核膜タンパク質の異常が筋線維タイプによって異なる影響をもたらすことが明らかとなった。筋線維タイプを評価したところ、Type1 線維から筋萎縮が起きるが、再生筋の占める割合は週齢によってそれほど変化しなかった。これは血中クレアチンキナーゼ値による筋障害の評価においても同様の結果であった。また組織免疫染色や電子顕微鏡を用いた観察から、週齢とともに異常な形態の筋核が蓄積することや筋サテライト細胞の形態は保たれていることが明らかとなった。筋サテライト細胞の機能については、カルジオトキシンによる人為的な筋障害からの筋再生を評価したが、EH マウスや他の EDMD モデルマウス (Emerin KO, H222P) も正常対照マウスと比較して、筋再生能に大差はなかった。

一方、EH マウスはトレッドミルを用いた強制運動負荷試験において運動機能の低下が認められ、運動後に筋障害の悪化したことから、メカニカルストレスに対する脆弱性が寄与していると示唆した。

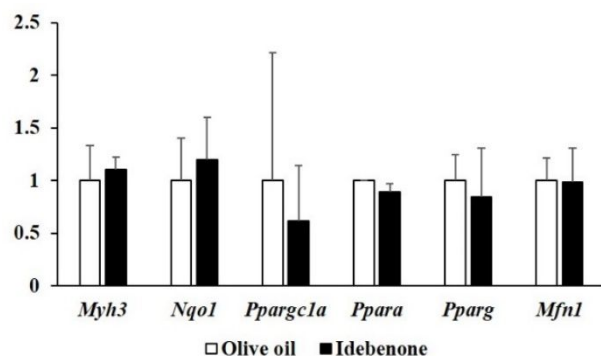
これらの結果から、新規に作出した EH マウスは EDMD 患者の骨格筋症状をよく再現する最適なモデルマウスであり、EH マウスを用いた病態メカニズムの解明や治療薬の探索は、EDMD 患者への応用も十分に期待できる (Wada E et al., PLoS One, 2019)。

### (2) NQO1 の発現回復をターゲットとした候補治療薬の検討

EH マウスに idebenone を生後 4 齢から 12 週齢まで毎日経口投与した結果、体重に対するヒラメ筋重量に変化はなく、骨格筋の大小不同や線維化領域に明らかな改善効果は認められなかった。



qPCR による遺伝子解析を行ったが、idebenone 投与による *Nqo1* や他のミトコンドリア関連遺伝子の発現に変化は認められなかった。これらの結果から、idebenone は DMD に対する効果は報告されていたものの、EDMD (EH マウス) の骨格筋に対する効果は確認できなかった。



次に、ミトコンドリア機能を回復することが期待されている(間接的に NQO1 の発現を増加する)治療薬 A および B の投与効果を検討した。これらは水溶性であり飲水に混合して毎日摂取させた。投与期間は 4 週齢から 14 週間とし、18 週齢で骨格筋を解析した。その結果、骨格筋症状に顕著な改善効果は認められなかった。一方、これらの候補治療薬は長期的な投与によって EH マウスの寿命が延長する傾向にあることから、現在も投与実験を継続して寿命や心筋への作用を解析中である。

現在のところ、EH マウスの骨格筋症状を改善する治療薬は見つかっていないが、詳細な骨格筋病態発症メカニズムを明らかにすることで、今後、改めて NQO1 の発現回復が骨格筋症状の改善に寄与するかを検討したい。

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 2件）

1. 著者名 Wada Eiji, Hamano Takayuki, Matsui Isao, Mizuko Yoshida, Hayashi Yukiko K., Matsuda Ryoichi	4. 巻 69
2. 論文標題 Renal involvement in the pathogenesis of mineral and bone disorder in dystrophin-deficient mdx mouse	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 661~671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12576-019-00683-8	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 Wada Eiji, Kato Megumi, Yamashita Kaori, Kokuba Hiroko, Liang Wen-Chen, Bonne Gisele, Hayashi Yukiko K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Deficiency of emerin contributes differently to the pathogenesis of skeletal and cardiac muscles in LmnaH222P/H222P mutant mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0221512
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0221512	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9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 和田英治、林由起子
2. 発表標題 核膜関連タンパク質と筋疾患
3. 学会等名 第98回 日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田英治、林由起子
2. 発表標題 核膜病における筋核形態異常と病態メカニズムの解明
3. 学会等名 日本筋学会 第6回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eiji Wada, Megumi Kato, Kaori Yamashita, Yukiko K. Hayashi
2. 発表標題 Emerin deficiency exacerbates skeletal muscle pathology in Lmna H222P/H222P mutant mice
3. 学会等名 FAOPS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田英治, 華藤恵美, 山下香, 國場寛子, 林由起子
2. 発表標題 エメリン欠損はLmnaH222P/H222Pマウスの骨格筋と心筋に異なる影響を与える
3. 学会等名 日本筋学会 第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eiji Wada, Yukiko K. Hayashi
2. 発表標題 Myonuclear abnormality in Nuclear envelopathies
3. 学会等名 第7回 若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eiji Wada, Megumi Kato, Kaori Yamashita, Hiroko Kokuba, Yukiko K. Hayashi
2. 発表標題 Different Impact of Emerin in Skeletal and Cardiac Muscles from LmnaH222P/H222P Double Mutant Mice
3. 学会等名 2019 ASCB (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田英治、林由起子
2. 発表標題 核膜病モデルマウスにおける骨格筋障害機序の解明
3. 学会等名 日本筋学会 第4回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eiji Wada, Yukiko K. Hayashi
2. 発表標題 Abnormal myonuclear morphology in murine models of Emery-Dreifuss muscular dystrophy
3. 学会等名 The 6th Society of Skeletal Muscle Cells
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田英治、華藤恵美、山下香、林由起子
2. 発表標題 核膜病モデルマウスの筋病態と筋再生 筋核と筋衛星細胞の理解を深める
3. 学会等名 2018年武田班班会議（招待講演）
4. 発表年 2018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
---------	---------