

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15437

研究課題名(和文)細胞膜修復機構の活性化による成人発症筋ジストロフィー治療戦略の開発

研究課題名(英文) Research for the pathogenesis and therapy of dysferlinopathy: Focusing on mechanisms of plasma membrane repair

研究代表者

小野 洋也 (Ono, Hiroya)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90803578

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)：dysferlinopathyは、筋肉細胞の膜タンパク質dysferlinの異常によって引き起こされる成人発症の筋ジストロフィーの総称である。dysferlinの欠損によって、筋細胞膜の損傷時の修復機能が損なわれ、その結果として筋細胞の変性・壊死が生じ、筋肉の萎縮と筋力の低下につながると考えられている。本研究では、dysferlinopathyの治療標的として、新たにAMPK複合体を同定した。また、AMPK活性化剤を投与することにより、dysferlinopathy患者由来の筋細胞で膜修復機能が改善すること、モデル動物で筋力低下や筋損傷が改善することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国の指定難病である筋ジストロフィーは、筋肉の萎縮や筋力の低下といった障害を示す、進行性の難治性遺伝性疾患である。本研究で得られたAMPK複合体が損傷を受けた筋細胞膜の修復において重要な役割を担っているという新たな知見は、根治療法がまだないdysferlinopathyについては筋ジストロフィー全体の治療法の開発に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mutations in dysferlin are responsible for a inherited muscular dystrophy known as dysferlinopathy. Using affinity purification method combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, we found that AMP-activated protein kinase (AMPK) 1 was bound to a specific region of dysferlin. Using ex vivo laser injury experiments, we demonstrated that the AMPK complex was vital for the sarcolemmal damage repair. Furthermore, it was found that the phosphorylation of AMPK was essential for plasma membrane repair, and treatment with an AMPK activator rescued the membrane-repair impairment observed in human myotubes with dysferlinopathy and dysferlin-null mouse fibers. Finally, it was determined that treatment with the AMPK activator improved the muscle phenotype in zebrafish and mouse models of dysferlin deficiency. These findings indicate that the AMPK complex is essential for plasma membrane repair and is a potential therapeutic target for dysferlinopathy.

研究分野：神経筋疾患

キーワード：筋ジストロフィー dysferlin 細胞膜修復 AMPK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 筋ジストロフィーは、進行性の筋力低下と筋萎縮を呈する難治性遺伝性疾患である。原因として筋細胞膜の構造タンパク質の異常や筋細胞膜の修復維持機構の破綻が知られている。前者の代表が小児発症の重篤な表現型をとる Duchenne 型筋ジストロフィー、後者として成人発症の dysferlin タンパク質の機能異常に起因する dysferlinopathy が挙げられる。

(2) *dysferlin* 遺伝子は、2 番染色体 (2p13.3-p13.1) に存在し、55 エクソン、6,243 塩基対からなる巨大遺伝子であり、その遺伝子産物 *dysferlin* は筋細胞膜に局在する (Liu, 青木ら, *Nat Genet* 1998, *Neurology* 2001)。Duchenne 型筋ジストロフィーの原因遺伝子である *dystrophin* をはじめ、筋ジストロフィー原因遺伝子の多くが筋鞘膜の構造安定性に関わるなかで、*dysferlin* タンパク質は筋細胞膜修復に関わるという特徴をもつ (Bansal, 三宅ら, *Nature* 2003)。これまで *dysferlin* のほかにも筋細胞膜修復に関与する *dysferlin* 結合タンパク質の存在が複数報告されているが、膜修復機構の詳細はいまだ不明である。明らかになっていない膜修復機構の鍵分子の存在が考えられる。

2. 研究の目的

dysferlin の新規結合タンパク質を同定し、レーザー膜損傷の実験系を用いて、筋細胞膜修復機構の全容解明を目指す。そして、得られた知見をもとに *dysferlinopathy* の治療法開発に取り組む。

3. 研究の方法

(1) アフィニティカラム法と質量分析による新規 *dysferlin* 結合タンパク質の同定；*dysferlin* のドメイン構造に着目し、機能分子の結合が予想された特定領域を大腸菌とバキュロウイルスを用いて発現・精製し、担体に固定化してアフィニティカラムを作成する。細胞抽出物を加えて相互作用するタンパク質を結合させ、アフィニティ精製により *dysferlin* 結合タンパク質を溶出させる。溶出させた結合タンパク質を SDS-PAGE により分離し、質量分析 (LC/MS/MS) により同定する。新規に同定した結合タンパク質は、タグ融合タンパク質さらには内在性タンパク質に対する共免疫沈降法により *dysferlin* との結合を確認し、また免疫組織化学により培養細胞やマウス/ヒト骨格筋での局在を確認する。

(2) 多光子顕微鏡による膜修復機構のライブセルイメージング；マウス筋芽細胞 C2C12、ヒト骨格筋芽細胞 HSMM、そして *dysferlin* 変異患者由来の筋芽細胞を用いる。アフィニティカラム法と質量分析で同定したタンパク質を蛍光標識して細胞内に発現させ、カメレオンレーザー装填の二光子顕微鏡で、レーザー膜損傷を引き起こす。ライブイメージングにより細胞膜損傷と修復における蛍光標識タンパク質の細胞膜内局在の変化を観察する。マウス (正常、*dysferlin* 欠損) 単離骨格筋の *ex vivo* モデルでも実験を行う。また、注目遺伝子について siRNA を用いてノックダウンし、結合タンパク質欠損状態での膜修復機構の破綻の有無を評価する。

(3) *in vitro* 細胞膜損傷モデルを用いた薬剤のスクリーニング；同定した結合タンパク質の機能から膜修復機構への関与の仮説を立て治療標的としての可能性を探る。たとえば、キナーゼ分子を同定した場合、キナーゼの活性化により膜修復機構が改善されるか、キナーゼ活性化剤を用いて検討する。上記レーザー膜損傷の実験系を用いて薬剤スクリーニングを行い、*dysferlinopathy* の治療薬剤候補を絞り込む。

(4) 薬剤投与によるモデル動物の異常回復効果の検証；動物モデル (ゼブラフィッシュ、マウス) への薬剤投与による運動機能や骨格筋構造の異常回復効果の検証を経て、治療応用につなげる。

4. 研究成果

(1) *dysferlin* のドメイン構造に着目し、特定領域のアフィニティカラムを作成した。このカラムに細胞抽出物を反応させて相互作用するタンパク質を抽出し、SDS-PAGE により分離して、質量分析にかけることで、複数の結合タンパク質を同定した (図 1)。

(2) 同定した結合タンパク質の一つである AMPK 複合体に着目し、レーザー膜損傷の実験系を用いて解析を行った。マウス骨格筋において AMPK 複合体がレーザーによる膜損傷部位に集積し、また培養細胞において AMPK 遺伝子発現抑制が筋細胞膜修復機能の低下に繋がることを発見した。さらに *dysferlin* 欠損マウス骨格筋のレーザー膜損傷で、AMPK 複合体の損傷部位への集積が遅延することから、膜修復機構において、*dysferlin* が AMPK 複合体の局在を規定している (*dysferlin* が足場タンパク質として機能している) ことを見出した。

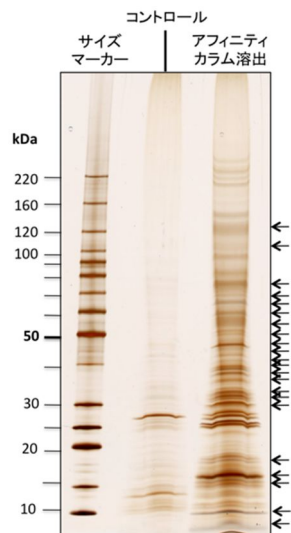


図 1. *dysferlin* 特定領域の結合タンパク質候補 (SDS-PAGE の銀染色結果)

(3) AMPK 活性化剤の投与により、*dysferlin* 変異をもつ患者培養細胞において膜修復機能が改善することを明らかにした(図2)。さらに臨床応用のために *in vivo* での検証実験を行った。初期胚に morpholino を用いた *dysferlinopathy* のゼブラフィッシュモデルでは、生後 3~4 日に約 35%の割合で骨格筋の構造異常が観察されるが、AMPK 活性化剤投与により、その割合は約 18%まで低下した。*dysferlinopathy* のマウスモデルでは、AMPK 活性化剤投与により、筋力低下の一部改善、筋損傷マーカーである血清クレアチンキナーゼ値の低下、筋線維横断面積の増加(筋萎縮の改善)が得られた(小野ら, *Mol Ther* 2020)。

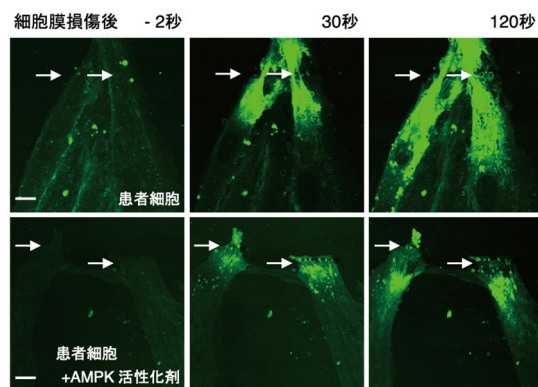


図2. 患者細胞において、AMPK 活性化剤により細胞外蛍光試薬流入量が減少する(レーザー膜損傷実験の結果)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 小野 洋也、青木 正志	4. 巻 38
2. 論文標題 Dysferlinopathyに対する治療法の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 神経治療学	6. 最初と最後の頁 278 ~ 281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15082/jsnt.38.3_278	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 Izumi Rumiko, Takahashi Toshiaki, Suzuki Naoki, Niihori Tetsuya, Ono Hiroya, Nakamura Naoko, Katada Shinichi, Kato Masaaki, Warita Hitoshi, Tateyama Maki, Aoki Yoko, Aoki Masashi	4. 巻 41
2. 論文標題 The genetic profile of dysferlinopathy in a cohort of 209 cases: Genotype-phenotype relationship and a hotspot on the inner DysF domain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Mutation	6. 最初と最後の頁 1540 ~ 1554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/humu.24036	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 Ono Hiroya, Suzuki Naoki, Kanno Shin-ichiro, Kawahara Genri, Izumi Rumiko, Takahashi Toshiaki, Kitajima Yasuo, Osana Shion, Nakamura Naoko, Akiyama Tetsuya, Ikeda Kensuke, Shijo Tomomi, Mitsuzawa Shio, Nagatomi Ryoichi, Araki Nobukazu, Yasui Akira, Warita Hitoshi, Hayashi Yukiko K., Miyake Katsuya, Aoki Masashi	4. 巻 28
2. 論文標題 AMPK Complex Activation Promotes Sarcolemmal Repair in Dysferlinopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 1133 ~ 1153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymthe.2020.02.006	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4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野洋也、鈴木直輝、菅野新一郎、川原玄理、割田仁、林由起子、三宅克也、青木正志
2. 発表標題 Dysferlinopathyに対する治療法の開発
3. 学会等名 第38回日本神経治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野洋也, 高橋俊明
2. 発表標題 ジスフェルリノパチーの治療法開発
3. 学会等名 第74回国立病院総合医学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野洋也、鈴木直輝、菅野新一郎、川原玄理、井泉瑠美子、高橋俊明、北嶋康雄、長名シオン、秋山徹也、池田謙輔、四條友望、光澤志緒、割田 仁、永富良一、荒木伸一、安井 明、林 由起子、三宅克也、青木正志
2. 発表標題 細胞膜修復機構に着目したdysferlin異常症の病態解明と治療法開発
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 小野洋也、鈴木直輝、菅野新一郎、川原玄理、井泉瑠美子、高橋俊明、北嶋康雄、長名シオン、秋山徹也、池田謙輔、四條友望、光澤志緒、割田 仁、永富良一、荒木伸一、安井 明、林 由起子、三宅克也、青木正志
2. 発表標題 Novel binding partner of dysferlin is a potential therapeutic target for dysferlinopathy
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学 プレスリリース：筋ジストロフィー(ジスフェルリン異常症)の新規治療標的を発見
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2020/02/press20200225-04-AMPK.html>
 東北大学大学院医学系研究科・医学部 プレスリリース
<https://www.med.tohoku.ac.jp/news/4329.html>
 東北大学医学部神経内科 研究内容
<http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/group.html>

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
---------	---------