

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07102

研究課題名（和文）マイトファジーを標的とした筋ジストロフィー - の新規治療法開発

研究課題名（英文）Development of a novel therapeutics for muscular dystrophy by targeting mitophagy.

研究代表者

細田 隆介（Hosoda, Ryusuke）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：20749428

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）：Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）の病態と障害ミトコンドリアの関連を解明するために実験を行った。DMDモデルマウスの骨格筋のミトコンドリアDNAを次世代シーケンサーで解析したが欠失部位を同定することはできなかった。一方で、オートファジー関連因子であるTFEBの核内局在は、DMDモデルマウスの骨格筋では有意に減少することが示された。今後はSIRT1の活性化がDMDにおいてTFEBの局在を核内に移行するのかどうかを明らかとする。そして、SIRT1活性化によるマイトファジ 促進メカニズムを解明して、マイトファジーを標的とした筋ジストロフィーの治療法開発を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の意義は筋ジストロフィー（DMD）の病態をマイトファジーと障害ミトコンドリアの観点から解明し、根本的な治療法がないDMDの病態解明と新規治療法の開発に結びつく点である。本研究によりDMDにおけるマイトファジーの障害にTFEBの活性低下が関与している可能性を示すことができた。さらにSIRT1を介したTFEBの活性化がマイトファジーを標的としたDMDの治療に結びつく可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to elucidate the relationship between the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy (DMD) and impaired mitochondria. mitochondrial DNA from skeletal muscle of DMD model mice was analyzed by next-generation sequencing, but deletion sites could not be identified. On the other hand, the nuclear localization of TFEB, an autophagy-related factor, was significantly reduced in the skeletal muscle of DMD model mice. In the future, we will clarify whether SIRT1 activation shifts the localization of TFEB to the nucleus in DMD. We will then elucidate the mitophagy-promoting mechanism via SIRT1 activation to develop a mitophagy-targeted therapy for muscular dystrophy.

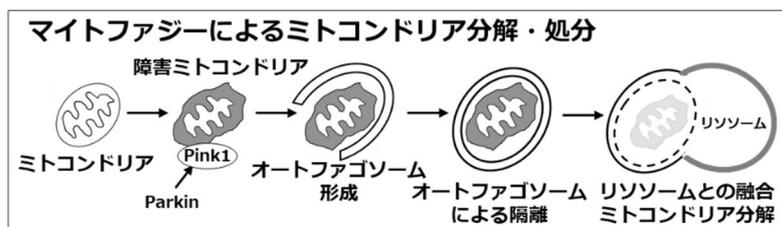
研究分野：薬理学

キーワード：筋ジストロフィー マイトファジー オートファジー SIRT1 ミトコンドリア

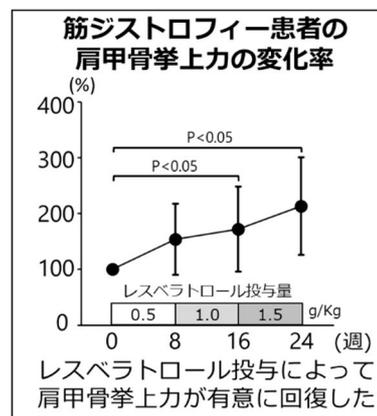
1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は重症の筋ジストロフィーであり、ジストロフィン遺伝子異常により進行性の筋力低下をきたす。本患者は男児 3,500 人に 1 人の頻度で 3 歳前後に発症後、12 歳には車いす生活となり、主に心筋障害による心不全で 30-40 歳代で死亡する。いまだ有効な治療法がなく、唯一のステロイド治療は病態の進行を 2 年ほど遅らせるにとどまり副作用も多い。最近のエクソン・スキップ療法の効果は限局的で、心筋への作用も不明であり、新たな治療法の開発が急務である。

SIRT1 は活性酸素種 (ROS) を低減させ細胞生存を促す蛋白質の脱アセチル化酵素である。また SIRT1 はオートファジーを促進して、体内の ROS の最も大きな発生源である障害ミトコンドリア (Balaban ら Cell 2005) を除去する (マイトファジー、上図)。



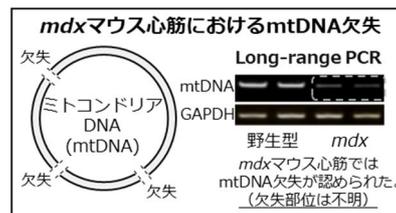
申請者らは SIRT1 の活性化薬であるレスベラトロールが DMD モデル動物である *mdx* マウスにおいて、骨格筋と心筋の障害を軽減することを見出した (Hori, Hosoda ら J Pharmacol Exp Ther 2011; Kuno, Hosoda ら J Biol Chem 2013)。さらに、札幌医科大学附属病院で 11 名の DMD を含む筋ジストロフィー患者の協力を得て、レスベラトロールの効果を評価する臨床研究を行った。その結果、レスベラトロールが有意な筋力増強と運動機能改善をもたらし、一部では筋崩壊の指標となる血中クレアチンキナーゼの値を大きく低下させることを見出した (右図; Kawamura ら Sci.Rep 2020)。



申請者は、SIRT1 活性化の保護メカニズムにおけるマイトファジーと障害ミトコンドリアの役割について、*mdx* マウスの骨格筋と心筋で検討した。そして以下を明らかにした (Kuno, Hosoda ら Sci.Rep. 2018; Sebori, Hosoda ら Oxid Med Cell Longev 2018)。

(1) *mdx* マウスでは、蛋白質合成を促進しかつオートファジーを阻害する mTOR が活性化しており、オートファジー、マイトファジーが抑制されていた。

(2) *mdx* マウスでは、ミトコンドリア DNA (mtDNA) に欠失をもつ障害ミトコンドリアが多く存在した (右図)。マイトファジー阻害により増加した障害ミトコンドリアが ROS を産生することにより病態を悪化させる可能性 (二次性ミトコンドリア病) が考えられた。



(3) レスベラトロールは障害ミトコンドリアを除去して細胞の ROS を著減させた。また予想に反して、レスベラトロールは mTOR 活性に影響を与えずにマイトファジーを促進した。

しかし障害 mtDNA の増加がいかに病態形成に関与するか、SIRT1 がマイトファジーをどのように促進するか、また他の治療法と比べて SIRT1 活性化が優れているかは不明である。

2. 研究の目的

- (1) DMDモデル動物である *mdx* マウスにおけるミトファジー阻害と障害ミトコンドリアの病態への関与の解明
 - (2) SIRT1のミトファジー促進メカニズム解明
 - (3) SIRT1活性化療法と既存の治療法の比較
- 以上3点が本研究の目的である。

3. 研究の方法

- (1) 筋ジストロフィーの病態進行に伴うミトファジーの阻害と障害ミトコンドリアの蓄積を評価するため、3ヶ月～16ヶ月齢の *mdx* マウスの心筋と骨格筋で下記の項目を評価した。

評価項目：

握力を計測して障害ミトコンドリアの蓄積と骨格筋機能との相関性を調べた。

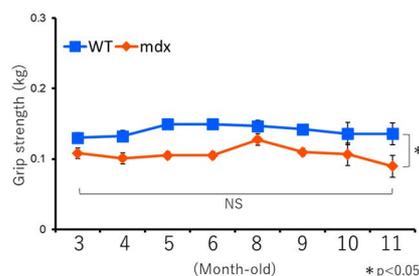
欠失mtDNA定量 (long-range PCR法、次世代シーケンス) による障害ミトコンドリア量の定量により、欠失ミトコンドリアDNAが月齢とともに増加するかを調べた。

- (2) DMDにおけるオートファジー抑制メカニズムとSIRT活性化によるミトファジー促進メカニズムを解明するために *mdx* から採取した骨格筋に対して定量PCRを用いてオートファジー関連因子の発現量を測定した。
- (3) DMDにおけるオートファジー抑制メカニズムとSIRT活性化によるミトファジー促進メカニズムを解明するために *mdx* から採取した骨格筋のオートファジーに関与する転写因子であるTFEBの活性を免疫蛍光染色で評価した。

4. 研究成果

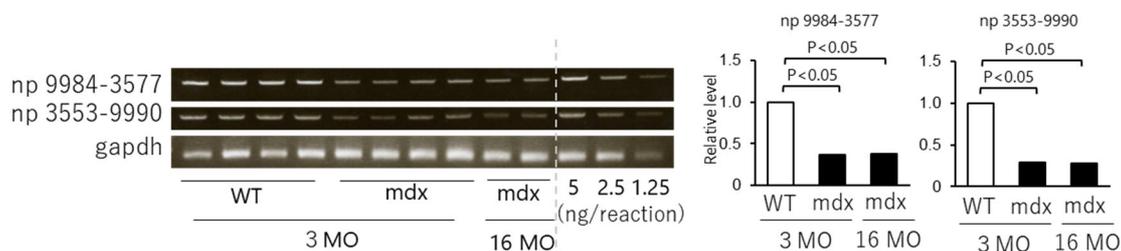
(1)-

Mdx マウスにおける骨格筋機能を grip test で評価した。野生型マウス(WT)と比較して *mdx* マウスは有意に握力が低下していた。一方で、*mdx* マウスにおいて経時的な握力の低下を確認することはできなかった。(右図)



(1)-

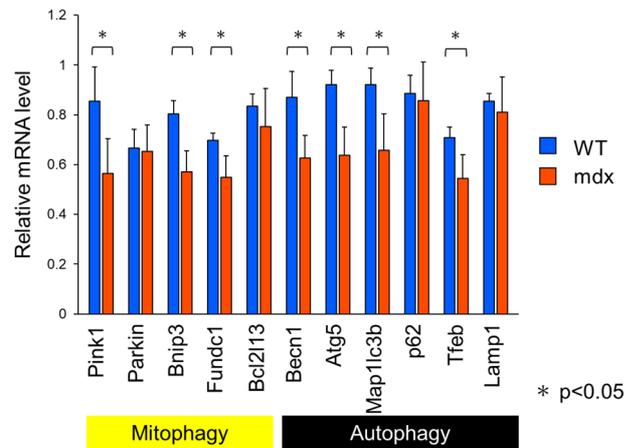
Long-rangePCR法を用いて経時的な mtDNA 欠失量の変化を確認した。3か月齢(3 MO)と16か月齢(16 MO)の *mdx* マウスの四頭筋において WT と比べて有意なミトコンドリア DNA の欠失増加が確認された。一方で、3ヶ月齢と16ヶ月齢の *mdx* マウスの間で有意な mtDNA の欠失の増加は見られなかった(下図)。



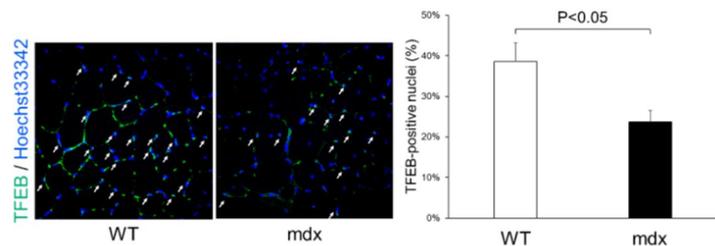
さらに、3ヶ月齢、6か月齢、16か月齢の *mdx* マウスの四頭筋における欠失 mtDNA の評価を次世代シーケンサーを用いておこなったところ、3ヶ月齢の *mdx* マウスにおいて、mtDNA の 10330 番目の塩基に変異がみられた。しかし、この変異の頻度は全リードのうち 3.2%のリードにおいてのみ確認されており、サンガーシーケンスでは再確認するのは困難と思われる頻度であった。

本研究の仮説と異なり、mdx マウスにおいて病態の進行にともなう、経時的な mtDNA 欠失の増加は確認することができなかった。そこで、これらの実験結果と研究の期間と費用の状況を鑑みて、筋ジストロフィーにおけるミトファジー障害のメカニズム解明に焦点を当てて研究計画を遂行することとした。

(2) 定量 PCR を用いて WT と mdx マウス前脛骨筋におけるミトファジー関連因子とオートファジー関連因子の発現を確認したところ、ミトファジー関連因子である PINK1、Bnip3、Fundc1 の発現の低下がみられた。また、オートファジー関連因子の Becn1、Atg5、Map1lc3b、TFEB の発現が mdx で有意に減少していることが確認され、mdx の前脛骨筋においてオートファジー/ミトファジーが障害されていることが示された(右図)。これらのオートファジー関連因子の中で、筋ジストロフィーの骨格筋において TFEB の活性の変化によるオートファジーの制御には未知な点が多く残されている。加えて、mdx マウスの骨格筋では TFEB を負に制御する因子である mTOR が活性化している。そのため、特に TFEB によるオートファジー制御メカニズムに注目した。



(4) TFEB は転写因子であり活性化されると核外から核内へと移行する。そこで、免疫蛍光染色で WT と mdx マウスの前脛骨筋の TFEB の局在の変化を評価したところ、WT と比較して mdx では TFEB の核局在が有意に減少しており TFEB の活性が低下していることが示された(右図)。



以上の研究成果から、筋ジストロフィーの骨格筋では TFEB の活性が低下してオートファジー/ミトファジーが抑制される可能性が示された。今後は SIRT1 の活性化が mdx マウスにおいて TFEB の局在を核内に移行するのかどうか検討する。加えて骨格筋特異的 SIRT1 ノックアウトマウスにおいて TFEB の局在が核外に移行しているのか検討することで、SIRT1 活性化によるミトファジー促進メカニズムを明らかとして、SIRT1 とミトファジー活性化を標的とした筋ジストロフィーの新規治療法開発を目指す。

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 1件）

1. 著者名 Hosoda Ryusuke, Hamada Hiroki, Uesugi Daisuke, Iwahara Naotoshi, Nojima Iyori, Horio Yoshiyuki, Kuno Atsushi	4. 巻 376
2. 論文標題 Different Antioxidative and Antiapoptotic Effects of Piceatannol and Resveratrol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 385 ~ 396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/jpet.120.000096	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 Fujiwara Daisuke, Iwahara Naotoshi, Sebori Rio, Hosoda Ryusuke, Shimohama Shun, Kuno Atsushi, Horio Yoshiyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 SIRT1 deficiency interferes with membrane resealing after cell membrane injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0218329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0218329	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 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 細田 隆介、久野 篤史、中島 龍汰、朝倉 聖大、岩原 直敏、野島 伊世里、國本 梨沙、堀尾 嘉幸
2. 発表標題 レスベラトロールはオートファジーを促進して加齢による筋萎縮と運動機能障害を抑制する
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細田 隆介、久野 篤史、中島 龍汰、朝倉 聖大、岩原 直敏、野島 伊世里、國本 梨沙、堀尾 嘉幸
2. 発表標題 レスベラトロールはオートファジーを活性化して加齢による筋萎縮と運動機能低下を軽減する
3. 学会等名 第72回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hosoda R, Kuno A, Asakura S, Iwahara N, Nojima I, Kunimoto R, Horio Y.
2. 発表標題 Treatment with resveratrol attenuates aging-related loss of muscle mass and function in mice.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hosoda R, Kuno A, Asakura S, Iwahara N, Nojima I, Kunimoto R, Horio Y.
2. 発表標題 レスベラトロールは加齢による筋萎縮を抑制し運動機能を維持する
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細田隆介 久野篤史 濱田博喜 堀尾嘉幸
2. 発表標題 植物由来ポリフェノールであるピセアタンノールとレスベラトロールのSIRT1活性化を介した細胞保護作用の比較
3. 学会等名 第71回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細田隆介、久野篤史、濱田博喜、堀尾嘉幸
2. 発表標題 SIRT1活性化を介したピセアタンノールとレスベラトロールの細胞保護作用の比較
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hosoda R, Kuno A, Asakura S, Horio Y.
2. 発表標題 Deletion of SIRT1 in the skeletal muscle decreases type IIa oxidative muscle fiber in mice.
3. 学会等名 Experimental Biology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細田 隆介、久野篤史、堀尾嘉幸
2. 発表標題 ミトファジー活性を標的とした筋ジストロフィーの新規治療法開発
3. 学会等名 第70回薬理学会北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細田隆介、久野篤史、濱田博喜、堀尾嘉幸
2. 発表標題 ピセアタンノールとレスベラトロールのSIRT1活性化を介した細胞保護作用の比較
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

札幌医科大学薬理学講座
<https://web.sapmed.ac.jp/pharmacology/index.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
研究分担者	堀尾 嘉幸 (Horio Yoshiyuki) (30181530)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	2020年度末に定年退職。
研究分担者	久野 篤史 (Kuno Atsushi) (30468079)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	
研究分担者	岩原 直敏 (Iwahara Naotoshi) (00613085)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	

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