

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16035

研究課題名(和文)生殖細胞特異的KRAB-ZFPによるトランスポゾン抑制機構の解析

研究課題名(英文)The analysis of the transposon repression performed by germline-specific KRAB-ZFP

研究代表者

八代 龍(Yashiro, Ryu)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 ラジオアイソトープ管理室・リサーチフェロ

研究者番号：70838119

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)：デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は生まれつきの難治性疾患である。近年、新しい治療法が開発されたものの、理論的には正しくても、全く効果のない人もいる。そこで本研究では、細胞死に着目した基礎研究を行い、第一選択肢となる治療法への布石を発見することを試みた。申請者は、本研究において、DMDではアポトーシスとネクロトーシスの2つの細胞死経路が働いて、野生型筋肉細胞に比べて大きく細胞死を促進していることを生化学的に解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は生まれつきの難治性疾患であり、難病であるがゆえ、治療法開発が進まなかった。近年開発された治療法についても、理論的には正しくても効果のない人も大勢いる。本研究では、細胞普遍的な経路である細胞死に着目し、DMDでは通常の筋肉細胞よりもより激しく細胞死が起こることを示唆する結果を得た。報告の少ない細胞死とDMDの関係性を生化学的に検証した本研究は、将来の細胞死に着目したDMD治療薬研究の参考になる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is the innate disease that is difficult to treat completely. Nowadays, a new treatment method is developed, however even though the method is correct theoretically, some patients can have no effectivity. Then in this research, a basic research of DMD which is focused in cell death system was performed and I tried to discover a new strategic way for DMD treatment. In this research, I could unveil the cell death system of DMD muscle cells was higher level than that of wild type muscle cells and this was caused by two major cell death pathways, Apoptosis and Necroptosis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：DMD MLKL 細胞死 アポトーシス ネクロトーシス

1. 研究開始当初の背景

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(以下、DMD とする)は生まれつきの疾患である。その原因は、筋肉細胞内にジストロフィン(以下、Dys とする)が存在しないことによる。患者の経過は、2~3 歳頃の運動機能発達遅滞で気づき、10 代では寝たきりとなる場合が多い。最終的には筋肉の炎症が心筋をもおかすことにより、30 歳前後で心不全によって死亡する。長らく治療法が対症療法に限られてきたが、最近、新たな遺伝子治療が台頭してきた。それはエキソスキッピング療法である。変異が入っている Dys のエキソン部分に対するアンチセンスオリゴを設計し、そのエキソンを読み飛ばすことで、短い正しい配列の Dys に変え、より症状の軽いベッカー型筋ジストロフィー(以下、BMD とする)に病気自体を変えようとする治療法である。BMD の症状には重いものから軽いものまでグラデーションがあり、症状の軽い患者では寿命で死亡するまで気付かないレベルのものまである。遺伝子を操作して BMD にする意義は十分にある。しかし、理論的には正しくても症状が改善しない場合も多く存在するのが実態である。したがって、他にも有用な治療法を新たに開拓する必要がある。そこで、申請者は細胞死機構に着目した。細胞死は DMD に限らず、細胞普遍的な機構であり、大きく 2 つの経路が存在する。アポトーシスとネクローシスである。そこで本研究では、DMD における 2 つの細胞死経路に関連するタンパク質について、その発現を検証し、DMD と細胞死との関係を理解することを目指した。

先行研究ならびに本研究における事前準備として、以下の内容が理解されている。

- (1) DMD における細胞死は長らくアポトーシスであると考えられてきた。しかし、DMD モデルマウス(*mdx* マウス)において、ネクローシス関連因子を調べてみると、その発現が亢進していることが確認された。また、DMD が細胞死を引き起こす要因の一つに酸化ストレスの可能性が示唆された(Morgan *et al*, *Nature Communications*, 2018)。
- (2) マウス横紋筋細胞株 C2C12 において、Dys を CRISPR/Cas9 系を用いてノックアウトし、DMD 模倣細胞株を作製することに成功した(Terumitsu and Yashiro *et al*, *in preparation*)。

2. 研究の目的

DMD とアポトーシスとネクローシスの関係について、詳細に解析した報告はほとんど存在しない。特にネクローシスと DMD の関係に言及した論文については、項目「1」で紹介した 1 報のみであり、さらなる解析が待たれる分野である。本研究では、作製した DMD 模倣細胞株を用いてアポトーシスならびにネクローシス関連因子の解析を行い、DMD と細胞死の関係を詳細に解析することを目的とした。

- (1) DMD 模倣細胞株におけるアポトーシス関連因子の解析

Dys をノックアウトし、DMD の病態を模倣した C2C12 筋肉細胞株を用いて、アポトーシス関連因子の発現を解析した。

- (2) DMD 模倣細胞株におけるネクローシス関連因子の解析

Dys をノックアウトし、DMD の病態を模倣した C2C12 筋肉細胞株を用いて、ネクローシス関連因子の発現を解析した。

3. 研究の方法

- (1) DMD 関連因子の探索と細胞死との関連の探索

DMD と細胞死の関連について、DMD では細胞死が起こることが知られていたが、それがアポトーシスであると漠然と考えられていた。しかし、項目 1 の(1)に挙げた論文において、ネクローシスとの関連が示唆されることとなった。そこで、論文や公開ソフトなど、様々な媒体を通して、DMD と細胞死の関連をさらに分析することとした。

- (2) DMD 模倣細胞株の作製

DMD の研究は Dys を欠損したモデルマウスを用いて研究を行われてきた。マウスという個体を用いるより、細胞株を用いる方が明らかに簡便である。もちろん、さらなる解析をマウス等の個体レベルで行わなければならないことは自明である。その前提で、今回、DMD と細胞死の関連を調べる一歩として、CRISPR/Cas9 システムを用いて DMD 模倣細胞株の作製を行った。

- (3) DMD 模倣細胞株を用いた細胞死関連タンパク質の解析

- ① アポトーシス関連タンパク質の解析

DMD における細胞死は従来、アポトーシスによるものと考えられてきた。本研究では、DMD 模倣細胞株を用いて、アポトーシス関連タンパク質の発現の変化について確認することで、DMD とアポトーシスの関連について調べた。

② ネクロトーシス関連タンパク質の解析

DMD における細胞死は従来、アポトーシスによるものと考えられてきたが、細胞の様子を確認すると、プログラム化された細胞死とは異なる動態を示していた例がある。その中で、先にも紹介したように、英仏合同グループによる DMD とネクロトーシスとの関連をにおわせる論文が出版され、本格的にネクロトーシスとの関連を具体的に示す意味が出てきた。そこで本研究では、DMD 模倣細胞株におけるネクロトーシス関連タンパク質の発現変化を確認することで、DMD とネクロトーシスとの関連について調べた。

4. 研究成果

(1) DMD 関連因子の探索と細胞死との関連の探索

本研究では、細胞死との関連が示唆される様々なタンパク質について、抗体を購入し検討した。断片的に報告されているネクロトーシスとの関連、DMD との関連や Zinc Finger タンパク質との関連などで登場する様々なタンパク質について検証した。結果的には、それらのうち、細胞死に特に新規の興味深いタンパク質の注目には至らなかったものの、通常の細胞死に関連するタンパク質群に興味深い変化が確認された。

(2) DMD 模倣細胞株の作製

マウス横紋筋細胞株 C2C12 を用いて、CRISPR/Cas9 法により、Dys をノックアウトした。DMD は Dys を完全欠損することによる疾患であり、その病態を模倣した細胞株と言え、DMD 模倣細胞株とした。

(3) DMD 模倣細胞株を用いた細胞死関連タンパク質の解析

① アポトーシス関連タンパク質の解析

ミトコンドリア関連タンパク質の Mitofilin を、siRNA を用いてノックダウンすると、アポトーシスのレベルが上昇するという報告があった(Ngonidzashe *et al*, *Am J Cell Physiology*, 2018)。そこで、本研究でも Mitofilin の発現が野生型株と DMD 模倣細胞株で発現が変化しているか確認した。その結果、DMD 模倣細胞株では野生型のおよそ 1/5 の発現に低下していた。次にアポトーシスによる細胞死の活性化が考えられたので、抗アポトーシスタンパク質である Bcl-2 とそのリン酸化フォームである p-Bcl2 の発現を検証した。その結果、Bcl2 の発現に有意な差は認められなかったが、p-Bcl2 について非リン酸化状態のおよそ 8 倍の発現上昇が認められた。ところで、Bcl2 は抗アポトーシスタンパク質であるが、リン酸化している状態がアポトーシスを促進する状態而非リン酸化している状態がアポトーシスを抑制する状態である。従って、リン酸化状態の発現が上昇しているということは、アポトーシスの促進が考えられる。ここで、Bcl2 を脱リン酸化するタンパク質として同定されている Calcineurin の活性を確認した。Calcineurin は A と B の 2 つのフォームがあり、それらが 1:1 で結合することで活性化する。その活性を確認したところ、DMD 模倣細胞株で活性が低下していることが分かった。この結果は、先の Bcl2 のリン酸化フォームの発現が上昇している結果とも一致する。最後に、JNK がアポトーシスを引き起こすのに重要であるという報告より、本研究でも JNK と p-JNK の発現を検証してみることにした(Miura *et al*, *Cell Reports*, 2018)。その結果、野生型と比べて DMD 模倣細胞株で p-JNK の発現が上昇していることが確認された。以上より、DMD においてアポトーシスが起きている可能性が強く示唆された。

② ネクロトーシス関連タンパク質の解析

ネクロトーシスはアポトーシスとは異なりネクロトーシスの一種であるが、もともとネクロトーシスは細胞が崩壊していく過程において、特にプログラム化されたものではないと考えられてきた。しかし、ここ 10~15 年の研究で、ネクロトーシスはアポトーシスと同様、緻密なタンパク質発現制御によって実行されるものであることが明らかになってきた。そこで本研究では、その実行タンパク質の最前線である MLKL の発現を確認した。MLKL は、マウスの場合は 345 番目のセリンがリン酸化されていることが活性化の指標となる(ヒトの場合は 348 番目のセリン)。そこで本研究では、zVAD 処理によりカスパーゼを抑制した条件で、p-MLKL の発現を確認した。その結果、野生型と比べて DMD 模倣細胞株において、発現亢進が認められた。従って、本研究では DMD において、ネクロトーシスも合わせて起きているものと結論づけた。

(4) 結論

以上より、DMD 模倣細胞株を用いた解析より、DMD において、活発な細胞死が起きていることが示唆された。それは、アポトーシスとネクロトーシスという 2 種類の細胞死経路を用いるもので、炎症反応への応答として、通常筋肉細胞よりも大きな反応が DMD では起きている可能性を生化学的に検証することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yasunari Matsuzaka, Jun Tanihata, Yoshiko Ooshima, Daisuke Yamada, Masayuki Sekiguchi, Shouta Miyatake, Yoshitsugu Aoki, Mika Terumitsu, Ryu Yashiro, Hirofumi Komaki, Akihiko Ishiyama, Yasushi Oya, Yukiko U. Inoue, Takayoshi Inoue, Shin'ichi Takeda and Kazuo Hashido.	4. 巻 18
2. 論文標題 The nSMase2/Smpd3 gene modulates the severity of muscular dystrophy and the emotional stress response in mdx mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Medicine	6. 最初と最後の頁 343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12916-020-01805-5	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryu Yashiro, Mika Terumitsu and Kazuo Hashido.
2. 発表標題 The Cell Death Crosstalk in Duchenne Muscular Dystrophy
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立精神・神経医療研究センター ラジオアイソトープ管理室ホームページ https://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_radio/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
---------------------------	-----------------------	----

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