

機関番号：33501
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2008～2010
課題番号：20591035
研究課題名（和文）マトリックスメタロプロテアーゼ阻害薬を用いた筋ジストロフィー薬物治療の基礎的研究
研究課題名（英文）Evaluation of matrix metalloproteinase inhibitors for the therapy for muscular dystrophy
研究代表者
萩原 宏毅（HAGIWARA HIROKI）
帝京科学大学・医療科学部・教授
研究者番号：80276732

研究成果の概要（和文）：私たちは、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害薬が筋ジストロフィーの薬物治療として有効であるか検討することを当初の目的とした。研究の過程で、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がこれより強力に筋分化を促進することを見いだした。このヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の作用機序は不明であった。研究の結果、複数の筋原性制御因子や筋分化抑制因子に協調的に作用して筋分化のプロセスを巻き戻すことにより、最終的に骨格筋形成を促進させるという機序を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We studied whether matrix metalloproteinase inhibitors (MMPis) are effective for the therapy for muscular dystrophy at first. We showed that histone deacetylase inhibitors (HDACis) promote myotube formation more efficiently than MMPis. However, its exact mechanism remains unknown. We found that TSA enhances myogenesis by coordinating myogenic regulatory factors and transcriptional repressor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：マトリックスメタロプロテアーゼ、ジストログリカン、筋ジストロフィー、モデル動物、神経科学、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 筋ジストロフィーとは進行性の筋力低下・筋萎縮をきたし、骨格筋組織病理上、筋細胞構築の乱れ、間質の増生、脂肪化および筋細胞の壊死・再生を特徴とするいわゆるジストロフィー性の変化をきたす遺伝性疾患の総称である。現在に至るまで薬物療法や遺伝子治療など様々な治療法が試みられているが、いまだに効果的な治療法が無い難病である。その発症機序は、ジストログリカン (dystroglycan; DG) 複合体からなる筋細胞膜の架橋構造が破綻することが分かっているが、その詳細なメカニズムについては未だ明らかになっていない。

(2) 私たちはこれまでの研究で、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) やサルコグリカノパチー (sarcoglycanopathy) の筋細胞において、マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase ; MMP) 活性が特異的に上昇していることを見出した。またその MMP の特異的な阻害薬として BPHA を同定した。

2. 研究の目的

(1) MMP 阻害薬 BPHA が筋ジストロフィーの薬物治療として有効か検討することを当初の目的とした。

(2) その後の検討で、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (histone deacetylase inhibitors; HDACIs) もまた骨格筋由来培養細胞の筋形成を促進することが明らかになった。そこで、HDACIs の筋形成促進作用と MMP 特異的阻害薬 BPHA の作用とを比較検討することを次の目的とした。

(3) HDACIs が BPHA より強力であることを見いだしたため、HDACIs がどのように筋形成を促進するのかそのメカニズムを検討することを目的とした。具体的には、HDACIs の筋原

性制御因子 (myogenic regulatory factors; MRFs) やジストロフィン結合蛋白質複合体 (dystrophin-associated proteins complex; DAPC) の発現に対する効果を検討することを目指した。

3. 研究の方法

骨格筋由来 C2C12 細胞を用い、MMP 阻害薬は BPHA、HDACIs は効果が最も優れているとされている Trichostatin A (TSA) を使用した。比較のため Losartan も使用した。効果の検討は、まず形態的にこれらの薬物の効果を比較検討した。最も強力であった HDACIs については、どのように DAPC の発現に影響しているかを調べた。さらに、どのように筋原性制御因子 (MRFs) に影響するかも検討した。具体的には、通常の C2C12 細胞の培養において medium switch をする直前の 24 時間 TSA を作用させ、その効果をその効果を形態学的、生化学的に比較検討した。遺伝子の発現量を DNA チップ、リアルタイム PCR 法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) TSA は MMP 特異的阻害薬である BPHA より強力に骨格筋由来 C2C12 細胞の myotube への分化を促進した。通常の C2C12 細胞の培養に、MMP 特異的阻害薬 BPHA、HDACIs である TSA、および Losartan を作用させ、それらの myotube への分化に対する効果を比較検討した。3 者の比較では、TSA が最も myotube の太さが太く、また核の数も増加していた。特に medium switch 72 時間後にはその差は明瞭であった (図 1)。このことは myosin heavy chain (MHC) の免疫染色でも確認された。また fusion index は、TSA (-) が 30 ± 6 、TSA (+) が 74 ± 7 であり、TSA を加えることによって index の増加がみられた。

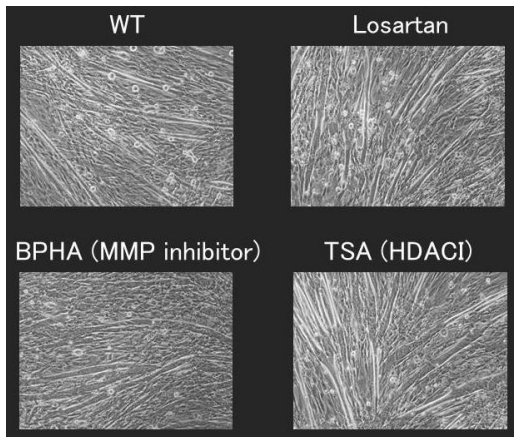


図 1 C2C12 細胞形態

これらの結果により、TSAにより myotube の形成が最も促進され、骨格筋を構成する MHC も発現が増加していることが示された。

(2) TSA により DAPC の発現は変わらず MHC は増加した。Dystrophin の発現を時系列に Western blot および RT-PCR で検討したが、TSA の有無で発現に差はみられなかった (図 2A)。また β -DG, α -SG の 72 時間後の発現も TSA による差はみられなかった。一方 MHC の 72 時間後の発現は、TSA を加えることにより亢進がみられた (図 2B)。

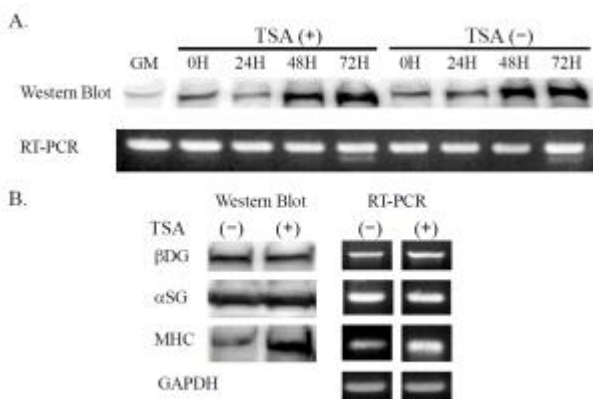


図 2 DAPC, MHC の発現

遺伝子の発現を網羅的に解析するために DNA チップを実施した。サンプルは TSA を 24 時間作用させた直後のサンプルを使用し、TSA を作用させていないサンプルをコントロールとした。

解析を行った全 25,395 遺伝子のうち、TSA を作用させることにより発現が 1.8 倍以上変化した遺伝子は 4,787 遺伝子あった。MeSH で muscle development に分類される 324 遺伝子のうち、かつ前記の条件を満たすものは 87 遺伝子であった。たいへん興味深いことに、Myf5 は 14.51 倍と極めて大きな増加を示し、これは全遺伝子で 2 番目に高い増加であった。これらの遺伝子を中心に関係する遺伝子を発現解析した。

(3) TSA は MRFs のうち Myf5, MEF2 の発現を亢進させ myogenin の発現を低下させた。TSA は筋原性制御因子 (MRFs) のうち Myf5 14.51, MEF2A 3.61, MEF2C 2.83 倍と発現を亢進させた。MyoD の発現は 1.14 倍とほぼ不変であった。一方、myogenin は -2.60 倍と発現を低下させた。また、DAPC である dystrophin, dystroglycan, α -SG, γ -SG, dystrobrevin, syntrophin などの発現はほとんど変化が認められなかった。対照的に、骨格筋の構成蛋白の発現は、MHC -3.93, Troponin T -3.28, Troponin C -2.78, Troponin I -4.17, desmin -2.06, muscle creatine kinase -3.17 倍と全般的に低下していた。

(4) TSA は筋分化抑制因子の発現も亢進させた。TSA を作用させることにより、筋分化抑制因子とされる Id2 や Id3 の発現が増加した。またこれらの上流にある転写抑制因子である RP58 の発現も増加していた。

(5) TSA の効果はリアルタイム PCR でも確認された。TSA の MRF や筋分化抑制因子の発現に対する影響はリアルタイム PCR でも確認し、TSA (+)は TSA (-)との相対比で、Pax7 は 2 ± 0.2 , Myf5 10.4 ± 0.4 , MEF2A 2.2 ± 0.3 倍と増加、MyoD は不変、一方 myogenin は 0.33 倍と低下していた。また、RP58 3.6 ± 0.2 , Id2 5.8 ± 0.2 倍と発現は増加していた (図 3)。以上 DNA チップと一貫した結果がみられた。

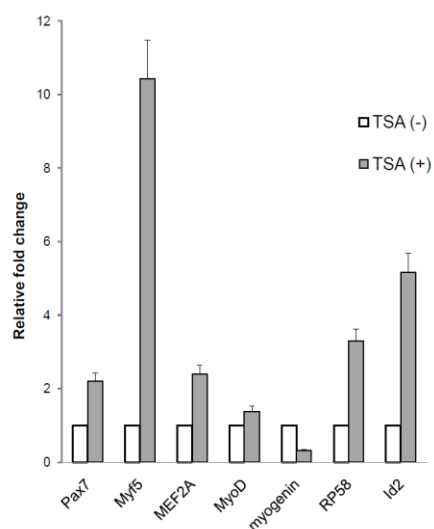


図 3 リアルタイム PCR

(6) 成果の位置づけとインパクト、今後の展望

以上の結果をまとめると、

- ① HDACIs である TSA は MMP 特異的阻害薬 BPHA よりも強力に myotube への分化を促進した。
- ② TSA により DAPC の発現は大きく変わらず、MHC は増加した。
- ③ TSA は筋原性制御因子 (MRFs) のうち、早期に働く factor (Myf5, MEF2) の発現を亢進させ、後期に働く factor (myogenin) の発現を低下させた。
- ④ TSA はまた、筋分化抑制因子の発現も亢進させた。

今まで HDACIs の作用機序は不明であった。今回の研究で、私たちが初めて HDACIs は協

調的に作用して筋分化のプロセスを巻き戻すことにより、最終的に骨格筋形成を促進させるという機序を明らかにした。このような機序のため、HDACIs による治療は筋ジストロフィーのみならず癌による悪液質や廃用性筋萎縮症など骨格筋が障害される疾患の治療薬としても有効である可能性がある。今後、モデル動物を用いて HDACIs の薬物療法への応用を検討する予定である。またその過程で、骨格筋形成や筋ジストロフィーの根本的な分子メカニズムの理解も目指したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 萩原宏毅、松村喜一郎、筋ジストロフィー治療薬としてのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤—臨床応用への展望、帝京医学雑誌、査読有、34、2011、10-16
- ② Hagiwara H、Nakamura A、Matsumura K、Histone deacetylase inhibitors as therapeutic targets for muscular dystrophy、Current Trends in Neurology、査読有、4、2011、71-80
- ③ 斉藤史明、松村喜一郎、萩原宏毅、清水輝夫、先天性筋ジストロフィーと α -dystroglycanopathy、臨床神経学、査読有、48、2008、543-549

[学会発表] (計 8 件)

- ① 萩原宏毅、斉藤史明、真先敏弘、大熊文美、池田美樹、清水輝夫、松村喜一郎、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の骨格筋、シュワン細胞由来培養細胞に対する効果の検討、平成 22 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフ

ィーおよびその関連疾患の病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」砂田班班会議、2010.12.4、東京

- ② 萩原宏毅、斉藤史明、大熊文美、松村喜一郎、清水輝夫、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の骨格筋由来培養細胞に対する効果の検討、日本神経学会総会、2010.5.18、東京
- ③ 斉藤史明、萩原宏毅、池田美樹、清水輝夫、松村喜一郎、 α -dystroglycanopathy に対する酵素補充療法の開発に関する研究。平成20年度厚生労働科学研究補助金 こころの健康科学研究事業「福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患のユニークな治療法開発と病態解明」会議、2009.3.5、大阪
- ④ Saito F、Arai Y、Hagiwara H、Shimizu T、Matsumura K、Glycosylation of α -dystroglycan in cultured cells and its restoration by glycosyltransferase、World Muscle Society Meeting、2008.10.16、Newcastle

[図書] (計1件)

萩原宏毅、松村喜一郎、南江堂、III [筋疾患] 5. 筋強直性ジストロフィー。神経疾患最新の治療 2009-2011 (小林祥泰、水澤英洋編集)、2009、306-308

[その他]

ホームページ等

<http://www.ntu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 宏毅 (HAGIWARA HIROKI)
帝京科学大学・医療科学部・教授
研究者番号：80276732

(2) 研究分担者

斉藤 史明 (SAITO FUMIAKI)
帝京大学・医学部・助教
研究者番号：40286993
松村 喜一郎 (MATSUMURA KIICHIROU)
帝京大学・医学部・准教授
研究者番号：50260992
清水 輝夫 (SHIMIZU TERUO)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：00107666

(3) 連携研究者

なし