

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03594

研究課題名(和文)核膜病研究から解明する横紋筋(遅筋・速筋・心筋)機能の相違

研究課題名(英文)Functional diversity of striated muscles unraveled from nuclear envelopathy

研究代表者

林 由起子(Yukiko, Hayashi)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：50238135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は核膜病モデル動物を用いて、横紋筋である遅筋と速筋、心筋の相違を「核膜」というこれまでにない視点から明らかにすることを目的とした。その結果、遅筋・速筋・心筋で核膜及び関連タンパク質の発現が異なること、モデル動物は核形態の異常や関連分子の発現・局在が筋タイプにより病初期から異なっていること、骨格筋の再生能に明らかな異常を認めないこと、骨格筋培養細胞において、筋核はダイナミックに位置を変化させ、核膜病細胞ではその挙動が異なること、ラミンA/C変異マウスにおけるエメリン欠損の影響が骨格筋と心筋で著しく異なっていることなどを新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、同じ横紋筋であっても、骨格筋の遅筋と速筋、心筋で核膜タンパク質や関連分子の発現が異なっていること、核膜病では病初期から核膜関連分子の発現や局在の変化が認められることから核膜病の複雑な病態の一端を明らかにできた。また、骨格筋細胞内で核が複雑にその局在を変化させていることから、核の移動と病態との関連も強く示唆された。疾患筋で発現の異なる分子に対する薬物をモデルマウスに投与し、効果を検証中であり、今後新たな治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the differences between striated muscle types; slow-twitch, fast-twitch, and cardiac muscles from the unprecedented viewpoint of "nuclear envelope" using an animal model of nuclear envelopathy. We found different expression of the nuclear membrane proteins and their related proteins between three types of striated muscles. The abnormal nuclear shape, the expression and localization of nuclear envelope proteins in model animals differed from early stages of the disease, depending on the muscle type. Regeneration capacity of skeletal muscle was normal in the animal model. Myonuclei dynamically change their position in cultured skeletal muscle cells, and their behavior is different in nuclear envelopathy. Effects of emerin deficiency are significantly different in skeletal and cardiac muscles of lamin A/C mutant mice.

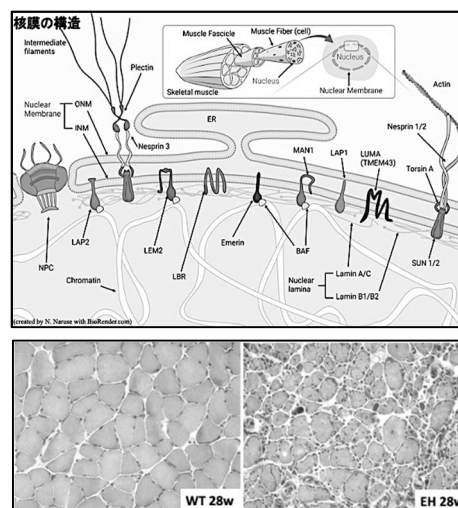
研究分野：生理学

キーワード：核膜 ラミンA/C エメリン 筋ジストロフィー 心筋症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核膜タンパク質の異常による核膜病は、Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー (EDMD) などの筋疾患、心筋症、脂肪萎縮症、末梢神経障害、早老症候群など多彩な遺伝性疾患を引き起こす。複雑な病態には、核膜蛋白質の異常による核膜自体の脆弱性や DNA の損傷、遺伝子発現変化などが関与していることが示唆されている。これまでの核膜病研究はモデル動物で顕著な症状の認められる心筋症や早老症などが中心であり、骨格筋障害の発症機序に関しては、適したモデル動物がなかったため、ほとんど明らかになっておらず、また治療戦略も立てられていない。我々は独自に作製した EH マウス (エメリン欠損マウス (Emd) と *LMNA* 変異導入マウス (H222P) を掛け合わせた重複変異マウス) が、これまでの核膜病マウスと異なり EDMD 患者の臨床経過と同様に、心筋障害に先行して進行性の骨格筋障害を示す最適の EDMD モデルマウスであることを見出した (Wada E, et al. PLoS One, 2019)。



2. 研究の目的

本研究は、EDMD モデルマウス並びに培養細胞を用いた解析を中心に、核内膜タンパク質であるエメリンと核ラミナの主要構成成分である A 型ラミナの異常がもたらす変化について、同じ横紋筋である骨格筋 (遅筋と速筋) と心筋での相違を「核膜」というこれまでにない視点から明らかにすることで、新たな横紋筋の障害機序を明らかにすると共に、病態に即した治療法の開発をめざすことを目的とした。

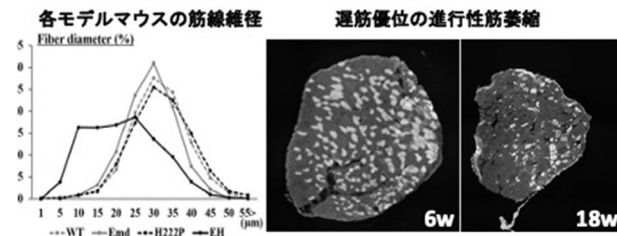
3. 研究の方法

- (1) 筋生理学的・組織学的解析：3 種のモデルマウス (Emd、H222P、EH) と野生型マウス (WT) を用い、遅筋の多い腓腹筋 (Sol) と速筋の多い長趾伸筋 (EDL) について、*ex vivo* の電気刺激による経時的な筋収縮力の変化、組織学的解析による筋線維タイプ別の割合と筋径の経時変化、カルディオトキシン筋注による実験的筋壊死・再生モデルによる骨格筋幹細胞 (筋衛星細胞) の機能評価、並びに運動負荷後の経時的筋病理変化と核の形態変化、初代骨格筋細胞培養系を用いた核形態の経時変化、培養単一筋線維を用いた超解像度顕微鏡による核の位置と形態の変化についての解析を行った。
- (2) 筋障害関連分子の選定と解析：Sol と EDL における網羅的遺伝子発現解析を行い、筋障害に直接関与すると考えられる分子を選定した。また、単一筋線維を用いた培養系を用いて筋線維タイプ別の遺伝子発現解析を行った。見出した筋障害関連候補分子の細胞内局在や機能をタンパク質レベルで検討した。
- (3) 心機能解析：心電図、心臓超音波、血清並びに心筋における心機能マーカーの発現変化、組織学的解析による各モデルマウスの心機能の経時変化を解析した。

4. 研究成果

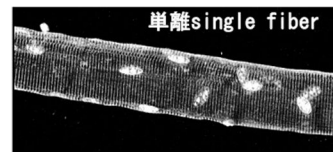
- (1) 筋生理学的・組織学的解析：EH マウスは EDMD 患者同様、速筋に比べ遅筋の障害が強いこと

を明らかにした。EDL と比較し、Sol は病初期から経時的に萎縮し、病理変化も強い。Sol の中でも遅筋線維が優先的に萎縮し、その数も減少することを見出した。また、核膜病の特徴の1つである核の形態変化も速筋より遅筋に強く、単離した単一筋線維の核形態も遅筋でその変化が強かった。形態変化を示す核においては、核膜関連タンパク質によって、その局在が複雑に変化していることを見出した。一方、興味深いことに初代骨格筋細胞培養系においては、筋芽細胞の核の形態変化は目立たず、筋分化後に形態変化を示すようになること、初代培養では、遅筋と速筋で核形態に差は認められないことを明らかにした。このことは、生体内において何らかの核形態の変化をきたす要因があることを示唆している。

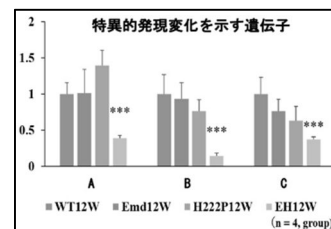


実験的筋壊死・再生モデルを用いて筋再生に重要な衛星細胞の機能を検討したところ、遅筋・速筋ともに再生能は保たれ、明らかな異常を認めなかった。再生筋では、その収縮能や筋線維径などは一旦回復するが、時間経過とともに再度、変性を示した。一方、運動負荷をかけると、EH マウスの骨格筋変性は増悪し、機械刺激が筋症状を悪化させることを明らかにした。

超解像度顕微鏡を用いた培養単一筋細胞の観察では、筋核が極めてダイナミックにその位置を変化させることを見出し、核膜病細胞ではその挙動が異なることを見出した。



- (2) 筋障害関連分子の選定と解析：遺伝子発現解析を行った結果、遅筋・速筋で病初期より発現が異なっている遺伝子やタンパク質を複数同定し、現在、具体的な骨格筋障害のメカニズムを検討している。また、EH マウス Sol で発現変化の認められた分子の機能を補完する薬剤を投与することにより、EH マウスの寿命が延長傾向にあることも見出している。



- (3) 心機能解析：EH マウスと H222P マウスの心機能を比較したところ、明らかな差が認められなかった。骨格筋では、エメリンの欠損がラミン変異マウスの筋変性を重篤化することから、心筋ではエメリンの欠損の影響が骨格筋に比べ乏しいという興味深い結果である。すなわち、エメリンの機能が横紋筋間で異なっている可能性を示唆する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 川原 玄理	4. 巻 156
2. 論文標題 疾患モデルゼブラフィッシュを用いた治療薬剤スクリーニング	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 355-358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Ueta Yuki, Akiba Yuki, Yamazaki Jun, Okubo Yoshihiko, Taguchi Takeshi, Terashi Hiroo, K. Hayashi Yukiko, Aizawa Hitoshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Cerebral Infarction and Myalgia in a 75-year-old Man with Eosinophilic Granulomatosis with Polyangiitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 3089 ~ 3092
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.5099-20	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 Hayashi Yukiko K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Nuclear envelope myopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurology and Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 298 ~ 303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ncn3.12602	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 Wongkitikamjorn Wirongrong, Hosomichi Jun, Wada Eiji, Maeda Hideyuki, Satrawaha Sirichom, Hong Haixin, Hayashi Yukiko K, Yoshida Ken-ichi, Ono Takashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Gestational Intermittent Hypoxia Induces Mitochondrial Impairment in the Geniohyoid Muscle of Offspring Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 e25088
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7759/cureus.25088	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 該当する

1. 著者名 Hayashiji Nozomi, Kawahara Genri, Xu Xing, Fukuda Tomohiko, Kerever Aurelien, Gu Jianguo, Hayashi Yukiko K., Arikawa-Hirasawa Eri	4. 巻 12
2. 論文標題 -1,6-Fucosyltransferase Is Essential for Myogenesis in Zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 144 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12010144	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 該当する

1. 著者名 Wongkitikamjorn Wirongrong, Wada Eiji, Hosomichi Jun, Maeda Hideyuki, Satrawaha Sirichom, Hong Haixin, Yoshida Ken-ichi, Ono Takashi, Hayashi Yukiko K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Metabolic dysregulation and decreased capillarization in skeletal muscles of male adolescent offspring rats exposed to gestational intermittent hypoxia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1067683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2023.1067683	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 該当する

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 林由起子
2. 発表標題 多様性に見る骨格筋研究の魅力.
3. 学会等名 第23回日本骨粗鬆症学会・第39回日本骨代謝学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川原玄理、林由起子
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いた筋疾患治療薬スクリーニング
3. 学会等名 第7回ゼブラフィッシュ・メダカ創薬研究会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川原玄理、林由起子
2. 発表標題 トランスジェニックゼブラフィッシュを用いた筋萎縮治療薬スクリーニング
3. 学会等名 第99回日本生理学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和田英治、林由起子.
2. 発表標題 核膜病における骨格筋の核形態異常と筋変性の関係.
3. 学会等名 第7回日本筋学会 学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田英治、林由起子
2. 発表標題 核膜病の骨格筋病態メカニズムにおける有力仮説の検証.
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林由起子
2. 発表標題 成人でみられる先天性ミオパチーの診断と治療へのアプローチ.
3. 学会等名 61回 日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hayashi YK
2. 発表標題 Unique pathomechanisms of nuclear envelope myopathy.
3. 学会等名 第61回 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林由起子
2. 発表標題 多様性が社会を強くする
3. 学会等名 第100回日本消化器内視鏡学会/第28回消化器関連学会週間(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川原玄理、中屋敷真未、林由起子
2. 発表標題 トランスジェニックゼブラフィッシュを用いた筋萎縮治療薬剤スクリーニング
3. 学会等名 第6回日本筋学会
4. 発表年 2020年

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

1. 発表者名 林由起子
2. 発表標題 核膜と核膜病研究の今
3. 学会等名 第100回日本生理学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 和田英治・林由起子
2. 発表標題 なぜ核膜異常で筋ジストロフィーが発症するのか？
3. 学会等名 第100回日本生理学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 和田英治	4. 発行年 2020年
2. 出版社 白水社	5. 総ページ数 234
3. 書名 14歳からの生物学 学校では教えてくれない ヒト の科学	

〔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
研究 分担 者	川原 玄理 (Kawahara Genri) (40743331)	東京医科大学・医学部・准教授 (32645)	

6. 研究組織（つづき）

	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	和田 英治 (Wada Eiji) (60756948)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	
研究分担者	華藤 恵美 (Kato Megumi) (20776025)	東京医科大学・医学部・助教 (32645)	
研究分担者	川幡 由希香 (Kawabata Yukika) (80778473)	東京医科大学・医学部・助教 (32645)	

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