

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07912

研究課題名(和文)nNOS活性化による筋ジストロフィー疾患修飾効果の検討

研究課題名(英文)Investigation of disease modifying effect of nNOS activation for muscular dystrophies

研究代表者

大澤 裕(Ohsawa, Yutaka)

川崎医科大学・医学部・特任准教授

研究者番号：80246511

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):ジストロフィン糖蛋白質複合体を構成するnNOSは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーで減少する。独自作出した筋ジストロフィーモデルマウスの解析から、nNOSがリン酸化によって活性化、この活性化によって筋芽細胞の筋管細胞への融合や筋再生が促進することを発見した(Ohsawa, BBRC 628, 2022)。本研究は、活性化nNOSが、筋ジストロフィー病態に対し抑制的に働くと仮説、リン酸化部位を常時活性化させたnNOSを発現させた筋ジストロフィーモデルマウスを作成し検証した。解析により、活性化nNOSが、筋ジストロフィー病態を改善することを明らかとした(未発表)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋ジストロフィーは骨格筋のジストロフィー変化によって進行性に筋力低下が進行するため、一刻も早い疾患修飾療法の実用化が待望されている難病である。その代表であるデュシェンヌ型筋ジストロフィーは筋細胞膜下のジストロフィン欠損に伴いnNOSが著減する(Brennan, Cell 82:743-752, 1995)。ところが、この酵素の筋ジストロフィー病態における役割は未解明であった。本研究は、nNOS不活化による筋ジストロフィー病態促進、反対に、NOS活性化による筋ジストロフィー疾患修飾効果を証明した。将来の新たな病態修飾療法の突破口を開いた学術的かつ社会的意義がある。

研究成果の概要(英文): nNOS, a component of the dystrophin glycoprotein complex significantly decreases in dystrophin-deficient Duchenne muscular dystrophy (DMD). From the analysis of an originally-developed caveolin-3-deficient muscular dystrophy model mice, we discovered that nNOS is capable of being activated by phosphorylation of the specific site. Of note, this nNOS activation promotes the myoblast fusion to myotube and muscle regeneration upon cardiotoxin injury (Ohsawa, BBRC 628, 2022). The current study, we hypothesized that activated nNOS suppresses the pathogenesis leading to muscular dystrophies. At first, we developed constitutively activated nNOS overexpression mice. Then, we mated these mice with two types of muscular dystrophy model mice. The constitutively activated nNOS overexpression alleviated muscle pathology and impaired muscle performance in these model mice (unpublished).

研究分野：神経内科学

キーワード：カベオリン-3 神経型No合成酵素 筋ジストロフィー 筋肥大 筋萎縮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 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は、筋細胞膜の裏打ち蛋白質ジストロフィンの欠損が原因で、筋線維壊死と不完全再生を反復する「ジストロフィー変化」により進行性に筋力低下・筋萎縮を呈する難病である。神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS)は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーではジストロフィン欠損に伴い筋細胞膜下で著減する (Brennan, Cell 82:743-752, 1995)。ところが、この酵素の病態での役割の全容は未解明である。

われわれが作出した筋細胞膜カベオリン-3が欠損した筋ジストロフィー (LGMD1C)モデルマウス(CAV3<sup>P104L</sup>: Sunada, HMG 10:173-178, 2001)は、著明な筋萎縮を呈するが、最近、筋細胞膜下 nNOS が特定の部位でリン酸化され、その酵素活性が亢進していることを発見した(未発表)。このリン酸化部位を常時活性化した nNOS を、マウス筋芽細胞系に導入すると、筋芽細胞融合が促進・多核筋管径が増大(未発表)、反対に、nNOS 欠損マウスでは、筋再生過程での筋融合が抑制されていた(未発表)。興味深いことに、ヒト筋生検試料ではジストロフィン欠損ばかりでなく、様々な筋ジストロフィーでも共通して、このリン酸化(活性化)nNOS が著減していた(未発表)。

#### 2. 研究の目的

発見したリン酸化(活性化)nNOS が、筋ジストロフィーの「ジストロフィー変化」を改善できるか?、筋萎縮・筋力低下を軽減できるか?、nNOS 活性化を起点として、どのような分子機構が働いて筋ジストロフィー病態を修飾するのか?、について明らかにすることを目的とする。

#### 3. 研究の方法

ジストロフィン欠損、カベオリン-3 欠損筋ジストロフィーモデルマウス、および野性型マウス骨格筋にリン酸化部位を常時活性化した nNOS を大量発現させる。

#### 4. 研究成果

本研究は、活性化 nNOS が、筋ジストロフィー病態に対し抑制的に働くと仮説し、リン酸化部位を常時活性化させた nNOS を大量発現させた筋ジストロフィーモデルマウスを作出して検証した。2020年度は、骨格筋特異的プロモーター下に nNOS リン酸化部位をアミン酸置換により常時活性化した相補 DNA を繋いだトランスジーンを作製した。このトランスジーンを、野生マウス受精卵に注入して、トランスジェニックマウスを作出した。2021年度は、この nNOS 常時活性化トランスジェニックマウスと、ジストロフィン欠損 DMD モデルマウス、およびカベオリン-3 欠損肢帯型筋ジストロフィーモデルマウス (LGMD1C) を交配して、ジストロフィン欠損 nNOS 常時活性化マウス、カベオリン-3 欠損 nNOS 常時活性化マウスの作出に成功した。2022年度には、それぞれのモデルマウス骨格筋の解析により、活性化 nNOS が、筋ジストロフィー病態を改善することを明らかとした(未発表)。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ohsawa Yutaka, Ohtsubo Hideaki, Saito Yoshihiko, Nishimatsu Shin-ichiro, Hagiwara Hiroki, Murakami Tatsufumi, Nishino Ichizo, Sunada Yoshihide	4. 巻 628
2. 論文標題 Caveolin 3 suppresses phosphorylation-dependent activation of sarcolemmal nNOS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 84 ~ 90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.08.066	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Munekane Asami, Ohsawa Yutaka, Okubo Mariko, Nagai Taiji, Nishimura Hirotake, Nishino Ichizo, Sunada Yoshihide	4. 巻 62
2. 論文標題 Becker Muscular Dystrophy Accompanied by Anti-HMGCR Antibody-positive Immune-mediated Necrotizing Myopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1345 ~ 1349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.0202-22	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Munekane Asami, Ohsawa Yutaka, Fukuda Tokiko, Nishimura Hirotake, Nishimatsu Shin-ichiro, Sugie Hideo, Saito Yoshihiko, Nishino Ichizo, Sunada Yoshihide	4. 巻 61
2. 論文標題 Maximal Multistage Shuttle Run Test-induced Myalgia in a Patient with Muscle Phosphorylase B Kinase Deficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1241 ~ 1245
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.8137-21	査読の有無 無
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 0件）

1. 発表者名 大澤 裕, 白河俊一, 西松伸一郎, 砂田芳秀
2. 発表標題 nNOS activation in the pathogenesis of caveolin-3-deficient limb-girdle muscular dystrophy 1C
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大澤 裕, 白河俊一, 藤野雅広, 丹田和恵, 西松伸一郎, 砂田芳秀
2. 発表標題 Caveolin-3/nNOSを起点とした筋ジストロフィー治療の基盤研究
3. 学会等名 第40回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大澤 裕, 砂田芳秀, 白河俊一, 藤野雅広, 西松伸一郎, 伊東史子, 林 良雄, 土田邦博
2. 発表標題 筋ジストロフィーにおけるカベオリン-3-TGF- $\beta$ 1シグナルの解明と分子標的医薬の開発
3. 学会等名 令和4年度「筋レポジトリーの拡充とそれを活用した筋ジストロフィー関連疾患の病態解明と診断・治療法開発」(2-5) 西野班 班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大澤 裕, 砂田芳秀, 藤野雅広, 西松伸一郎, 朱 容仁, 西野一三
2. 発表標題 サルコペニアの分子病態解析
3. 学会等名 令和4年度「筋レポジトリーの拡充とそれを活用した筋ジストロフィー関連疾患の病態解明と診断・治療法開発」(2-5) 西野班 班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大澤 裕, 藤野雅広, 西松伸一郎, 朱 容仁, 城所研吾, 西野一三, 砂田芳秀
2. 発表標題 サルコペニア分子機構への介入
3. 学会等名 令和4年度精神・神経疾患研究開発費 筋ジストロフィー研究班 合同班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Osawa Y, Shirakawa S, Nishimatsu SI, Sunada Y.
2. 発表標題 Molecular crosstalk between caveolin 3 and nNOS: implications for Limb-girdle muscular dystrophy 1C
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大澤 裕, 白河俊一, 藤野雅広, 西松伸一郎, 砂田芳秀
2. 発表標題 カベオリン3による筋鞘膜nNOS活性化の制御機構
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 大澤 裕, 砂田芳秀, 白河俊一, 藤野雅広, 西松伸一郎, 伊東史子, 林 良雄, 土田邦博
2. 発表標題 筋ジストロフィーにおけるカベオリン-3-TGF- $\beta$ シグナルの解明と分子標的医薬の開発
3. 学会等名 令和2年度「筋レポジトリーの拡充とそれを活用した筋ジストロフィー関連疾患の病態解明と診断・治療法開発」(2-5) 西野班 班会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大澤 裕, 白河俊一, 藤野雅広, 西松伸一郎, 砂田芳秀
2. 発表標題 カベオリン3は筋鞘膜nNOS活性化を抑制する
3. 学会等名 第6回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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	砂田 芳秀  (Sunada Yoshihide)  (00240713)	川崎医科大学・医学部・教授   (35303)	
研究分担者	西松 伸一郎  (Nishimatsu Shin-Ichiro)  (20222185)	川崎医科大学・医学部・教授   (35303)	
研究分担者	藤野 雅広  (Fujino Masahiro)  (50633856)	川崎医療福祉大学・医療技術学部・講師   (35309)	

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