

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：35303  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21591101  
 研究課題名（和文）マトリックスメタロプロテアーゼを標的とするサルコグリカン欠損筋ジストロフィー治療  
 研究課題名（英文）Matrix metalloproteinases as a therapeutic target of sarcoglycan-deficient muscular dystrophy  
 研究代表者  
 砂田 芳秀 (SUNADA YOSHIHIDE)  
 川崎医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：00240713

研究成果の概要（和文）：サルコグリカン(SG)欠損筋ジストロフィーは、 $\beta$ -ジストログリカン( $\beta$ -DG)のプロセッシングにより筋が変性すると考えられている。本研究はマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-2及び-9と $\gamma$ -SGの三重欠損マウスを作出し解析した。 $\beta$ -DGはプロセッシングされ、 $\gamma$ -SG単独欠損マウスと同様に骨格筋変性が認められた。SG欠損による $\beta$ -DGプロセッシングにはMMP-2及び-9以外のMMPも働いている。

研究成果の概要（英文）：Processing of  $\beta$ -dystroglycan ( $\beta$ -DG) by matrix metalloproteinases (MMPs) has been considered to play a fundamental role in muscle degeneration in sarcoglycan (SG)-deficient muscular dystrophy. Here we generate triple knockout (TKO) mice deficient to MMP-2, MMP-9, and  $\gamma$ -SG to investigate *in vivo* processing of  $\beta$ -DG by MMP-2, MMP-9. Muscle pathology of TKO mice was comparable to that of  $\gamma$ -SG-knockout mice. Unexpectedly, the 30-kDa-processed form of  $\beta$ -DG was present in TKO mouse muscles likewise  $\gamma$ -SG-null mouse muscles. These findings indicate that MMPs other than MMP-2/9 participate in the molecular mechanism underlying the processing of  $\beta$ -DG in sarcoglycan-deficient muscular dystrophy.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000円	450,000円	1,950,000円
2010年度	1,300,000円	390,000円	1,690,000円
2011年度	700,000円	210,000円	910,000円
年度			
年度			
総計	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：神経分子病態学 1

## 1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーとは骨格筋の変性・壊死及び不完全再生を特徴とする“ジストロフィー性変化”をきたす遺伝性疾患の総称で、現在治療法皆無の難病である。1987年に筋鞘膜の裏打ち蛋白質であるジストロフィンの欠損

によってデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)が発症することが報告され、以来30種類を超える筋ジストロフィーの原因遺伝子が同定されてきた。このうちサルコグリカン(SG)は筋形質膜に特異的に発現するジストロフィン-糖蛋白複合体(DGC)の構成成分の1つである。SG遺伝子変異による一次的SG

欠損によって発症する常染色体劣性肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)2C-Fの分子病態機構についてはこれまで殆ど明らかになっていない。またDMDにおいても二次的にSGが欠損するが、なぜジストロフィン欠損によってSGが欠損するのかについても全く解明されていない。

$\beta$ -ジストログリカン( $\beta$ -DG)はSGとともにDGCを構成する成分の1つで、筋基底膜-細胞外マトリックス-筋鞘膜の強固な結合を直接担当している膜蛋白質と考えられている。2001年松村らは、SG欠損によって発症するLGMD2Cモデルマウスの筋組織やDMDモデルマウスの骨格筋では、 $\beta$ -DG全長(43kDa)の他に30kDaのプロセッシング産物が存在する、一方SGが発現していない正常筋組織(骨格筋と心筋)ではこのプロセッシング産物が検出されないと発表した(Yamada, Matsumura, *et al.* Hum Mol Genet 10, 2001)。この結果から、SGは生理的には、筋特異的に発現して $\beta$ -DGプロセッシングを抑制して筋基底膜-筋鞘膜結合を維持する、一方SGの欠損するLGMD2C-FやDMDでは、このSGによる筋基底膜-筋鞘膜結合が破綻し筋ジストロフィーが発症すると推論した。興味深いことに阻害剤を用いた培養細胞の*in vitro*解析からは、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-2及び-9がこのプロセッシングを司っている。

この先駆的な発表を契機に、(1)マウスの実験的アレルギー性脳炎(EAE)モデルマウスではMMP-2及び-9が活性化して $\beta$ -DGプロセッシングが生じて血液脳関門が破綻する、一方MMP-2/MMP-9二重欠損マウスではこのプロセッシングが起らず血液脳関門破綻が生じないためEAEが発症しない(Agrawal, *et al.* JEM 203, 2006)、(2)口腔癌などの癌細胞ではMMPが活性化して癌脂肪膜と基底膜結合が破綻して転移能を得るが、MMP-2及び-9の阻害剤投与によって転移が防止できる(Shang, *et al.* Oral oncology 208, 2008)、といった非筋組織におけるMMP-2/MMP-9依存性 $\beta$ -DGプロセッシングを支持する報告が集積してきた。

ところが、SGを欠損した筋組織でMMP-2及び-9によって $\beta$ -DGをプロセッシングするののかという本質的問題については未だ解答がない。

## 2. 研究の目的

まずSG欠損筋ジストロフィーモデルマウスを用いて、骨格筋のMMP-2及び-9の発現について解析する。次いで、SGを欠損した筋組織で認められる $\beta$ -DGプロセッシングがMMP-2及び-9によって惹起されるかについて明らかにするために、 $\gamma$ -SGとMMP-2及び-9の三重欠損マウスを作成して、その骨格筋を *in*

*in vivo*解析する。これにより、骨格筋でSGがMMP-2及び-9による筋細胞の $\beta$ -DGのプロセッシングを抑制しているのか明らかにすることを研究の目標とする。更にMMP-2及び-9を分子標的としたSG欠損LGMD2C-F及びDMDの治療の可否についてモデルマウスへのMMP-2及び-9阻害剤投与によって検証することを最終目標とする。

## 3. 研究の方法

(1)  $\alpha$ 、及び $\gamma$ -SG欠損LGMD2C、及び2D筋ジストロフィーモデルマウス、DMDモデルマウスの骨格筋を用いて、 $\beta$ -DGプロセッシングの有無とMMP遺伝子発現及び蛋白量を解析した。

(2) MMP-2/MMP-9二重欠損マウスの作出: 米国Jacksonラボ社から購入したMMP-2及びMMP-9欠損マウスを交配してMMP-2/MMP-9二重欠損を作成する。前者ではMMP-2のエキソン2が、後者ではMMP-9のエキソン9がネオマイシンカセットで置換されているため、この部分に相当するプライマーをそれぞれ設定した。これらのプライマーを用いて、誕生したマウスの尾から抽出したゲノムをPCR法によって増幅して遺伝子型を解析した。交配F2世代のMMP-2/MMP-9二重欠損マウスを選択した。

(3)  $\gamma$ -SG/MMP-2/MMP-9三重欠損マウスの作出: 国立共同研究機構基礎生物学研究所笹岡俊邦博士との共同研究によって $\gamma$ -SG欠損マウスを搬入した。このマウスでは $\gamma$ -SGのエキソン1がネオマイシンカセットで置換されているため、この部分に相当するプライマーをそれぞれ設定して遺伝子型を解析した。このマウスとMMP-2/MMP-9二重欠損マウスを交配しF2世代で誕生した6種類の遺伝子型を示すマウス(野生型、MMP-2欠損、MMP-9欠損、MMP-2/MMP-9二重欠損、 $\gamma$ -SG/MMP-2/MMP-9三重欠損、 $\gamma$ -SG欠損マウス)について、系統維持を行った。

(4) 骨格筋解析: 野生型、MMP-2欠損、MMP-9欠損、MMP-2/MMP-9二重欠損、 $\gamma$ -SG/MMP-2/MMP-9三重欠損、 $\gamma$ -SG欠損マウスのそれぞれの骨格筋を採取して、3種類の $\beta$ -DG抗体を用いたウエスタンブロット解析によって $\beta$ -DGプロセッシングの有無について検討をおこなった。次いでH&E染色による組織解析と $\beta$ -DG抗体、 $\alpha$ 、及び $\gamma$ -SG抗体を用いた免疫組織学的解析によって $\gamma$ -SG欠損マウスで認められる“ジストロフィー性変化”が三重欠損マウスで改善するか否かについて検証した。

#### 4. 研究成果

(1)SG 欠損筋ジストロフィーモデルマウス骨格筋での $\beta$ -DG プロセッシングと MMP 過剰発現： $\alpha$ 、及び $\gamma$ -SG 欠損 LGMD2C、及び 2D 筋ジストロフィーモデルマウス骨格筋のウエスタンブロット解析では $\alpha$ 、及び $\gamma$ -SG が欠損し、全長 $\beta$ -DG (43 kDa)の他、プロセッシング型 (30 kDa)が認められた。DMD モデルマウスでは $\alpha$ 、及び $\gamma$ -SG と $\beta$ -DG は緒減していたが、 $\beta$ -DG については全長とプロセッシング型の双方の存在が確認された。これらの骨格筋のノザンブロット及びウエスタンブロット解析では、MMP-2、MMP-9、及び MMP-14、MMP-15 の遺伝子発現及び蛋白質発現が野生型マウスと比較して有意に上昇していた。

(2)MMP-2/MMP-9 二重欠損マウスの解析：MMP-2/MMP-9 二重欠損マウスでは MMP-2 マウスで認められた鼻骨の変形が認められたが、その他には野生型マウスと比較して外観や成長に明らかな差異は認められなかった。骨格筋組織解析では、二重欠損マウスは、野生型マウスと比較して中心核線維数が僅かに増加していたが、筋壊死や再生所見は認められなかった。

(3) $\gamma$ -SG/MMP-2/MMP-9 三重欠損マウスの骨格筋解析：野生型、MMP-2 欠損、MMP-9 欠損、MMP-2/MMP-9 二重欠損、 $\gamma$ -SG/MMP-2/MMP-9 三重欠損、 $\gamma$ -SG 欠損の 6 種類のマウス骨格筋について、3 種類の $\beta$ -DG 抗体を用いたウエスタンブロット解析をおこなった。野生型、MMP-2 欠損、MMP-9 欠損、MMP-2/MMP-9 二重欠損マウス骨格筋では全長 $\beta$ -DG のみで、プロセッシング型は存在しなかった。一方、 $\gamma$ -SG 欠損マウス骨格筋では $\beta$ -DG プロセッシング型が存在した。期待に反して、 $\gamma$ -SG/MMP-2/MMP-9 三重欠損マウス骨格筋でも同様に $\beta$ -DG プロセッシング型が存在した。体重及び握力は野生型、MMP-2 欠損、MMP-9 欠損、MMP-2/MMP-9 二重欠損マウスでは差異が認められなかったが、 $\gamma$ -SG マウスと $\gamma$ -SG/MMP-2/MMP-9 三重欠損マウスでは体重増加と握力低下が認められた。 $\gamma$ -SG 欠損マウスの骨格筋組織解析では筋線維肥大と一部の筋束で認められる筋線維壊死・再生の“ジストロフィー性変化”が認められ、 $\gamma$ -SG/MMP-2/MMP-9 三重欠損マウス骨格筋でもほぼ同様の所見であった。免疫組織学的解析では野生型、MMP-2 欠損、MMP-9 欠損、MMP-2/MMP-9 二重欠損マウス骨格筋では $\alpha$ 、及び $\gamma$ -SG 抗体によって筋鞘膜が染色された。一方 $\gamma$ -SG 欠損及び三重欠損マウスでは筋鞘膜は染色されなかった。 $\beta$ -DG の染色性についてはそれぞれのマウスで差異は認められなかった。

本研究では、骨格筋の SG の欠損によって $\beta$ -DG のプロセッシングが生じるという松村らの結果の再現性と、これら SG 欠損筋における MMP2、MMP-9 とその活性化に関連する MMP-14、MMP-15 の発現上昇を明らかとした。しかし作出した $\gamma$ -SG/MMP-2/MMP-9 三重欠損マウスの骨格筋では、 $\gamma$ -SG 欠損マウスで認められる $\beta$ -DG プロセッシング型が存在し筋ジストロフィー病変の改善も認められないという予想外の結果となった。本研究と松村らの培養細胞を用いた MMP 阻害剤の結果との解離については、①骨格筋では MMP2、MMP-9 以外の MMP が $\beta$ -DG プロセッシングに関与している、②MMP 以外のプロテアーゼによっても $\beta$ -DG プロセッシングが生じる、という 2 つの可能性が考えられる。そこで、この可能性を検証するために、三重欠損マウスの骨格筋での MMP 遺伝子発現について網羅的に解析を開始している。更に、 $\gamma$ -SG 欠損マウス骨格筋と $\gamma$ -SG/MMP-2/MMP-9 三重欠損マウス骨格筋の粗分画の $\beta$ -DG プロセッシング活性について、リコンビナント $\beta$ -DG を基質としてアッセイを進める予定である。SG 欠損による $\beta$ -DG のプロセッシングの分子機構の全貌が解明できれば、プロテアーゼを標的とした治療介入の糸口が得られる可能性がある。

#### 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 7 件)

1) Ohsawa Y, Okada T, Nishimatsu SI, Ishizaki M, Suga T, Fujino M, Murakami T, Uchino M, Tsuchida K, Noji S, Hinohara A, Shimizu T, Shimizu K, Sunada Y, An inhibitor of transforming growth factor beta type I receptor ameliorates muscle atrophy in a mouse model of caveolin 3-deficient muscular dystrophy. Lab Invest. 査読有 78, 2012.

DOI:10.1038/labinvest.2012.78. [Epub ahead of print].

2) Kuga A, Ohsawa Y, Okada T, Kanda F, Kanagawa M, Toda T, Sunada Y. Endoplasmic reticulum stress response in P104L mutant caveolin-3 transgenic mice. Hum Mol Genet. 査読有 20 (15):2975-2983, 2011.

DOI:10.1093/hmg/ddr201

3) Kawakami E, Kinouchi N, Adachi T, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanaka E, Noji S. Atelocollagen-mediated systemic administration of

myostatin-targeting siRNA improves muscular atrophy in caveolin-3-deficient mice. *Dev Growth Differ.* 査読有 53:48-54, 2011.

DOI:10.1111/j.1440-169X.2010.01221.X

4) Nakatani M, Kokubo M, Ohsawa Y, Sunada Y, Tsuchida K. Follistatin-derived peptide expression in muscle decreases adipose tissue mass and prevents hepatic steatosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 査読有 300:E543-E553, 2011.

DOI:10.1152/ajpendo.00430.2010

5) Hayashi S, Ohsawa Y, Takahashi T, Suzuki N, Okada T, Rikimaru M, Murakami T, Aoki M, Sunada Y. Rapid screening for Japanese dysferlinopathy by fluorescent primer extension. *Intern Med.* 査読有 49:2693-2696, 2010. DOI:10.2169/internalmedicine.49.3771

6) Murakami T, Ohsawa Y, Zhenghua L, Yamamura K, Sunada Y. The transthyretin gene is expressed in Schwann cells of peripheral nerves. *Brain Res.* 査読有 1348:222-225, 2010.

DOI:org/10.1016/j.brainres.2010.06.017

7) Murakami T, Fukai Y, Rikimaru M, Henmi S, Ohsawa Y, Sunada Y. Hereditary sensory ataxic neuropathy associated with proximal muscle weakness in the lower extremities. *J Neurol Sci.* 査読有 291:121-123, 2010. DOI:org/10.1016/j.jns.2009.12.011

[学会発表] (計 14 件)

1) Ohsawa Y, Fujino M, Okada S, Nishimatsu SI, Rikimaru M, Hayashi S, Nohno T, Sunada Y. Sarcolemmal nNOS prevents muscular wasting in a caveolin-3-deficient limb-girdle muscular dystrophy 1C model. International congress of muscle wasting, September 24-October, 2011. Ascona, Switzerland

2) 砂田芳秀: シンポジウム: 筋疾患に対する抗マイオスタチン抗体療法の開発と応用, 2011 年日本神経学会学術大会シンポジウム 5. 20, 2011. 名古屋

3) 大澤 裕: シンポジウム: 骨格筋再生療法, 2011 年日本神経学会学術大会 5. 19, 2011. 名古屋

4) 大澤 裕, 砂田芳秀, 岡田只士, 西松伸一郎, 林良雄, 土田邦博, 野地澄晴: TGF-beta シグナル制御による筋疾患治療法の開発, 平成23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「西野班」班会議 12. 6, 2011. 東京

5) 砂田芳秀, 大澤 裕, 岡田只士, 藤野雅広, 力丸満恵, 林 紗織, 村上龍文, 藤井 績: 線維芽細胞の direct による筋ジストロフィーの細胞治療, 平成 21 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総合班会議 1. 9, 2010. 東京

6) Sunada Y, Ohsawa Y, Fujino M, Okada T, Hayashi S, Rikimaru M, Murakami T, Nishimatsu SI, Nohno T, Nagao M : Wound-healing MRL-MpJ phenotype improves outcome of dystrophin deficient mdx mice. XII International Congress on Neuromuscular Diseases, 21-July, 2010. Naples, Italy,

7) 砂田芳秀: nNOS は caveolin-3 欠損症の病態を抑制する. 第 51 回日本神経学会総会 5. 21, 2010. 東京

8) 砂田芳秀: 筋ジストロフィーの分子病態. 第 28 回日本神経治療学会総会 7. 16, 2010. 横浜

9) 砂田芳秀, 大澤 裕, 岡田只士, 西松伸一郎, 石崎雅俊, 菅 智宏, 内野 誠, 濃野勉, 野地澄晴, 土田邦博: 筋ジストロフィーに対する抗 myostatin 治療薬の開発, 厚生労働省精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」平成 22 年度「砂田班」班会議 12. 3, 2010. 東京

10) Ohsawa Y, Okada T, Fujii I, Nishimatsu SI, Fujino M, Hayashi S, Rikimaru M, Murakami T, Nohno T, Sunada Y. Reprogrammed fibroblasts as a feasible source of cell-based therapy for muscular dystrophy. 15th International Congress of World Muscle Society, 12-October, 2010. Kumamoto, Japan

11) Ohsawa Y, Fujii I, Okada T, Nishimatsu SI, Hayashi S, Rikimaru M, Murakami T, Nohno T, Sunada Y. Reprogrammed fibroblasts are a source of cell therapy for caveolin-3-deficient and laminin  $\alpha$ -2-deficient muscular dystrophies. 2010 FASEB Summer Research Conferences:

Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells,  
18-23 July, 2010. Arizona, USA

12) Ohsawa Y, Fujino M, Okada T, Kuga A, Hayashi S, Rikimaru M, Sunada Y. Introduction of wound-healing MRL-MpJ phenotype improves skeletal muscle pathology in mdx mouse. 14th International Congress of The World Muscle Society, 9. 11, 2009. Geneve, Switzerland

13) 大澤 裕、久我 敦、林 紗織、力丸満恵、村上龍文、砂田芳秀 : TGF- $\beta$  タイプ I セリンスレオニンキナーゼ受容体阻害剤による筋ジストロフィー治療法の開発(第2報), 第27回日本神経治療学会総会 6. 11, 2009. 熊本

14) 砂田芳秀、大澤 裕、岡田只土、藤野雅広、力丸満恵、林 紗織、村上龍文、藤井績 : 線維芽細胞の direct reprogramming による筋ジストロフィーの細胞治療, 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分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」平成21年度「砂田班」班会議 12. 11, 2009. 東京

[図書] (計1件)

共著

1) 砂田芳秀 : Fifty Years of Neuromuscular Disorder Research after Discovery of Creatine Kinase as a Diagnostic Marker of Muscular Dystrophy -Development and application of anti-myostatin therapy for muscular dystrophy- 医学書院出版サービス, 医学書院, 2011, 37-45

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :

番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂田 芳秀 (SUNADA YOSHIHIDE)  
川崎医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 00240713

(2) 研究分担者

大澤 裕 (OHSAWA YUTAKA)  
川崎医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 80246511

村上 龍文 (MURAKAMI TATSUFUMI)  
川崎医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 3033059