

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：34535

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07875

研究課題名（和文）筋芽細胞増殖因子のDp71abを発現させる化合物の探索・同定

研究課題名（英文）Identification of chemicals that enhance expression of myoblast growth factor Dp71ab

研究代表者

松尾 雅文（MATSUO, Masafumi）

神戸常盤大学・保健科学部・特命教授

研究者番号：10157266

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000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、進行性の筋萎縮症で筋芽細胞の枯渇による筋細胞の減少を特徴とする。筋芽細胞の増殖法の確立はDMD治療において喫緊の課題である。我々は、Dp71のアイソフォームのDp71abが筋芽細胞の増殖因子であることを世界で初めて明らかにした。本研究ではDp71abを発現させる化合物（Dp71abxx）の開発に成功し、さらに、Dp71abxxがヒト筋芽細胞の増殖を促進することを明らかにした。今後、Dp71abxxを用いた画期的DMD治療法が確立されることが大きく期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ヒト筋芽細胞の増殖を促進する化合物Dp71abxxを世界に先駆けて開発した。今後、筋芽細胞の移植治療のための体外での筋芽細胞を増殖あるいはDMD患者体内での筋芽細胞増殖治療などにDp71abxxが応用されることが大きく期待される。

研究成果の概要（英文）：Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a progressive muscular atrophy characterized by a decrease in muscle cells due to myoblast depletion. Establishment of a method for myoblast proliferation is an urgent issue in the treatment of DMD. We were the first in the world to demonstrate that Dp71ab, an isoform of Dp71, is a myoblast growth factor. In this study, we succeeded in developing a compound (Dp71abxx) that expresses Dp71ab and further demonstrated that Dp71abxx promotes proliferation of human myoblasts. It is greatly expected that an innovative DMD treatment using Dp71abxx will be established in the future.

研究分野：医学

キーワード：デュシェンヌ型筋ジストロフィー Dp71ab ジストロフィン 筋芽細胞 化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1 (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(DMD)は、*DMD* 遺伝子の異常によるジストロフィン欠損を原因とする進行性の筋萎縮症で、筋芽細胞の枯渇による筋細胞の減少を特徴とする。我々は、*DMD* 遺伝子のエクソスキッピング誘導によりジストロフィンを発現させる根本治療を提唱し、その実用化をリードして来た。しかし、*DMD* の根本治療としてジストロフィンを発現させても、筋細胞数が少ないためその治療効果は限定的である。治療効果の一層の向上には、筋幹細胞である筋芽細胞の増殖法の確立が喫緊の課題である。そこで、筋芽細胞の増殖に関する研究に着手した。Dp71 は *DMD* 遺伝子のイントロン 62 内にある Dp71 プロモーターから産生され、10 数種のアイソフォームを混成発現する。Dp71ab は Dp71 のアイソフォームの 1 種で、Dp71 からエクソン 71 と 78 の 2 個のエクソンを欠いたものである。これら Dp71 と Dp71ab の筋芽細胞の増殖及ぼす効果を検討するために、それぞれの発現ベクターを筋芽細胞に導入した。Dp71 発現ベクターを導入しても細胞の増殖促進作用を示さなかったが、Dp71ab を発現するベクターを導入すると筋芽細胞の増殖が有意に促進された。Dp71ab がヒト筋芽細胞の増殖を促すという衝撃的な結果を世界で初めて得た。この結果は、Dp71ab 発現促進が筋芽細胞の増殖に画期的な手法となることを示した。そこで、Dp71ab を産生させる化合物を探索することを計画した。

2. 研究の目的

我々は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて *DMD* 遺伝子のエクソスキッピングを誘導してジストロフィンの発現を促すデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の根本治療法を提唱し、その開発の世界のリーダーとして数多くの業績を挙げてきた。この治療法は、*DMD* 患者の骨格筋細胞でジストロフィンを発現させる。ところが、*DMD* では筋芽細胞が枯渇し筋細胞数が減少している。そのため、ジストロフィンを発現に成功しても筋細胞数が少ないためその効果は限定的である。治療効果の一層の向上には、筋細胞数の増加すなわち筋幹細胞である筋芽細胞の増殖法の確立が必須である。我々は、ジストロフィンのアイソフォームの Dp71 からエクソン 71 と 78 の 2 つのエクソンを欠いた Dp71ab が筋芽細胞の増殖因子であるという衝撃的な結果を世界で初めて得た。これは、Dp71ab 発現促進による筋芽細胞増殖が可能であることを示した。本研究は、Dp71ab を産生させる化合物が存在するとの仮説のもと、その化合物を探索・同定する。そして同定した化合物をヒト筋芽細胞に導入してその細胞増殖能を明らかにする。その結果、画期的 *DMD* 治療法を提唱するものである。

3. 研究の方法

(1) Dp71ab 産生化合物の探索

我々は、エクソスキッピング検出を迅速容易にはかる mCherry 赤色と eGFP 緑色の 2 色蛍光発光のスプライシング解析用のミニ遺伝子(FMv2)を保有している。この FMv2 をさらに改良し、遠隔 2 エクソンのスプライシングを同時にしかも定量的に解析する多エクソン 2 蛍光ミニ遺伝子を構築し Dp71ab 産生化合物の探索をはかる。

一方、Dp71ab を発現するプラスミドをすでに作製済みである。このことはスプライシングを応用することなく Dp71ab を直接させできる化合物の存在を示唆し、その化合物を探索した。

(2) Dp71ab 産生化合物によるヒト筋芽細胞の増殖

先に同定した化合物を HeLa 細胞に導入し、ジストロフィンの C 末端領域に対する抗体を用いたウェスタンブロット法により Dp71ab タンパクが産生されることを明らかにした。また、Dp71ab 産生化合物をヒト不死化筋芽細胞に導入し、CCK-8 アッセイ法を用いてその増殖促進作用を解析した。

4. 研究成果

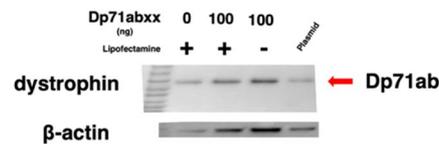
(1) Dp71ab を産生させる化合物の探索・同定

はじめにスプライシング解析用の 2 蛍光ミニ遺伝子の作製を図った。しかし、このミニ遺伝子の作製は対象とするエクソンのサイズが極めて小さいことなどのために非常に困難で、時間がかかることが想定された。そこで、直接 Dp71ab の産生をもたらす化合物を並行して探索した。その結果、Dp71ab の産生をもたらす化合物(Dp71abxx)の同定に成功した。

(2) Dp71abxx は Dp71ab タンパクの発現をもたらす

同定した Dp71abxx をヒト由来の HeLa 細胞に導入し、細胞のタンパクをウェスタンブロット法で解析した(図)。対照に Dp71ab mRNA を組み込んだプラスミドを HeLa 細胞に導入した細胞抽出液を用いたところ、きれいな 1 本のバンドが検出された(図

Dp71abxx導入によるDp71abタンパクの発現



plasmid)。Dp71abxx を細胞に導入す

るためにキャリアーとしてリポフェク

タミンと混合した。リポフェクタミン

のみを添加した HeLa 細胞抽出液から

薄くバンドが検出された(図

Dp71abxx 0, Lipofectamine +)。

これは、細胞に内在性に発現する Dp71 と考えられた。一

方、Dp71abxx をリポフェクタミンとともに導入したところ、Dp71ab に相当するバンドの濃

度が濃くなった(図 Dp71abxx 100, Lipofectamine +)。

この濃度の増加は、Dp71abxx が

Dp71ab タンパクの発現をもたらしたことを示した。さらに、Dp71abxx をリポフェクタミン

と混じることなく HeLa 細胞に導入したところ、やはり、Dp71ab に相当するバンドの濃度は

非導入細胞よりも濃くなった(図 Dp71abxx 100, Lipofectamine -)。

このことは、Dp71abxx はキャリアーなしで細胞内に導入されることを示し、臨床応用に際して障害が少ないことを示

した。

(3) Dp71abxx は筋芽細胞の増殖をもたらす

Dp71abxx がヒト筋芽細胞の増殖を促進することを明らかにすることを旨し Dp71abxx を培

養ヒト不死化筋芽細胞に導入した。そして、

Dp71abxx を導入した細胞を 72 時間培養した。細胞

増殖を 0, 24, 48, 72 時間に CCK-8 アッセイに

より解析したところ、吸光度(OD450)は培養時

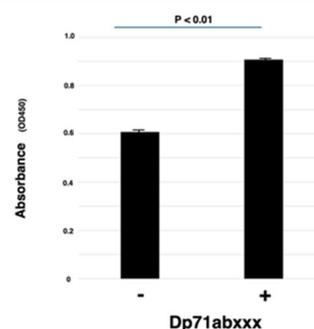
間毎に増加した。72 時間の培養で得た Dp71abxx

を導入した細胞と非導入の細胞の OD450 を比較

したところ、Dp71abxx 導入細胞の OD450 は非

導入細胞より約 1.5 倍有意に高かった(図)。この

Dp71abxx導入による筋芽細胞の増殖促進



ことは、Dp71abxx がヒト筋芽細胞の増殖を促進する作用を有することを明確に示した。
以上、Dp71abxx はヒト筋芽細胞を有意に増殖促進することから、Dp71abxx を用いた画期的
DMD 治療法を確立することが大きく期待される。

5 考察

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の治療ではジストロフィンの発現を回復させる根本治療
が注目されている。われわれが提唱した *DMD* 遺伝子のエクソンのスキッピングを誘導してジス
トロフィンを発現させる治療法は、DMD ではすでに筋芽細胞が枯渇し筋細胞数が減少している
ため、たとえジストロフィンの発現に成功しても筋細胞数が少ないためその効果は限定的であ
る。治療効果の一層の向上には、筋細胞数の増加すなわち筋幹細胞である筋芽細胞の増殖法の
確立が必須である。一方 DMD の治療として筋芽細胞の移植法もその選択肢の一つになってい
る。しかしながら、移植治療に必要な筋芽細胞の供給数に限界があるなどのため、実用化され
ていない。そのため、筋芽細胞の増殖法の確立が必須となっている。今回開発した Dp71abxx を
ヒト不死化筋芽細胞に導入し、Dp71abxx による筋芽細胞の増殖の促進を確認した。今後、
Dp71abxx を体外での筋芽細胞の増殖法として応用したり、Dp71abxx を直接患者に導入して筋芽
細胞の増殖をはかったりする画期的 DMD 治療法を確立することが大きく期待される。そのた
め、Dp71abxx の知財を確保し、動物実験などでその効果を実証するなどにより、Dp71abxx の臨
床応用を図る計画である。

6 . 主な発表論文等

Farea M, Maeta K, Nishio H, and Matsuo M. Human dystrophin Dp71ab enhances
the proliferation of myoblasts across species but not human nonmyoblast cells. *Front
Cell Dev Biol.* 2022;10:877612.

[その他]

ホームページ

<https://researchmap.jp/read0069601>

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 Farea M, Maeta K, Nishio H, and Matsuo M	4. 巻 10
2. 論文標題 Human dystrophin Dp71ab enhances the proliferation of myoblasts across species but not human nonmyoblast cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol	6. 最初と最後の頁 877612
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.877612	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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