

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25年 3月 31日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590950

研究課題名（和文） 筋ジストロフィー犬における機械刺激チャネルの動態解析とそれに基づいた治療法の開発

研究課題名（英文） Study on Mechano-Sensing Channel in muscular dystrophic dog

研究代表者 永田 哲也 (NAGATA TETSUYA)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所遺伝子疾患治療研究部・室長

研究者番号：50362976

研究成果の概要（和文）：

筋ジストロフィーにおいて骨格筋・心筋では恒常的に Ca 濃度が上昇した状態と考えられている。恒常的な Ca 濃度の上昇は、細胞内シグナル伝達系を活性化させることにより、細胞内での変化をもたらす細胞壊死を引き起こす。しかし Ca 流入の詳しいメカニズムは明らかでない。Trp (transient receptor potential) 遺伝子産物スーパーファミリーは、陽イオンチャネルとして機能する一群で、4 量体でチャネルを形成すると考えられている。機械刺激なので活性化され、高い Ca²⁺透過性を有する。本研究では、筋ジストロフィーの病態において、TRPV2 を含めた TRP family の関与を探索する為に、筋ジストロフィー犬の骨格筋および心筋を用いて解析した。

研究成果の概要（英文）：

A number of studies have reported the elevation of the cytosolic Ca²⁺ concentration in skeletal and cardiac muscles of muscular dystrophy. Chronic elevation of the cytosolic Ca²⁺ concentration could activate Ca²⁺-dependent cell signaling cascade and induce cell necrosis. The cellular mechanism for controlling Ca²⁺ influx in muscular dystrophy, however, is still unknown. The TRP channels form a large family of cation channels that likely function as tetramers in various processes, such as sensory signaling, most of which are permeable for Ca²⁺, and some also for Mg²⁺. To determine the relationship between TRP family and muscle degeneration, we analyzed the expression of TRP channel in skeletal and cardiac muscle of Canine models of Duchenne muscular dystrophy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1500000	450000	1950000
2011年度	1100000	330000	1430000
2012年度	800000	240000	1040000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3400000	1020000	4420000

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：神経分子病態学、SAC、TRP family、TRPV2、DMD

1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーにおいて骨格筋・心筋では恒常的に Ca 濃度が上昇した状態と考えられている。恒常的な Ca 濃度の上昇は、細胞内シグナル伝達系を活性化させることにより、細胞内での変化をもたらす細胞壊死を引き起こす。しかし Ca 流入の詳細なメカニズムは明らかでない。Trp (transient receptor potential) 遺伝子産物スーパーファミリーは、TRPC(7種)、TRPV(5種)、TRPM(8種)の3ファミリー等があり、いずれも形質膜を6回貫通するイオンチャネルであり、主として Ca²⁺を通過させる。細胞膜に存在する多くのイオンチャネルはそれぞれに異なるチャネル特性を有する。TRPV2 は哺乳類で初めて同定された stretch-activated cation channel である。正常組織では細胞内膜系に存在するが、生体内に異常(ストレス負荷等)が生じた場合、細胞膜に移行し、活性化される性質がある。心筋症・心不全、筋ジストロフィー症の病態発症に関与する可能性が高いと考えられている。(Iwata Y. *et al.* JCB 161:957-967, 2003)。すなわち、ジストロフィン複合体遺伝子の異常をもつ筋ジストロフィー又は拡張型心筋症患者および心筋症モデル動物の心筋、骨格筋では、このチャネルは常に形質膜に高発現し、活性化された状態にあることが示唆された。このチャネル遺伝子を心臓特異的に発現させた Tg マウスは著明な心肥大、心筋細胞壊死、繊維化を示す。一方、遺伝性心筋症と筋ジストロフィーを発症する BIO14.6 ハムスターの大腿骨格筋にこのチャネルのアンチセンス cDNA また

はドミナントネガティブ変異体を発現させた場合、筋細胞変性の組織病変と筋細胞の改善が報告されている。(Iwata Y. *et al.* Hum Mol Genet. 18:824-34, 2009)

2. 研究の目的

TRP 蛋白質は、種々の物理化学刺激によって活性化される広範な Ca²⁺流入チャネル群 (TRP チャネル遺伝子スーパーファミリー) である。この中で特に機械刺激チャネル TRPV2 は、正常組織では細胞内膜系に存在するが、生体内に異常が生じた場合、例えばマウス等の筋ジストロフィーや拡張型心筋症などの場合の筋変性疾患に伴って、TRPV2 が細胞膜に移行し、活性化される性質がある。本申請では筋ジストロフィー犬における TRPV2 を中心とした TRP 蛋白質の心筋及び骨格筋での発現変化の分子生物学的解析と目的とする。

3. 研究の方法

Canine では遺伝子自体が、正確にクローニングされていないものも多く、あくまでヒトやマウスからホモロジーから予想される配列の一部が報告されている。NCBI のデータベースから、Canine の Trp family から TRPV2 に加え TRPC1、TRPC6、TRPC7、TRPP2、TRPM3、TRPM4 等の予測される配列を検索した。次に、一つの遺伝子に対して複数のプライマーをデザインした。正常犬の筋組織から mRNA を抽出し、cDNA を作製した。複数のプライマーを用いて、標的遺伝子に対して 1000~1500bp 程度の partial cDNA をクローニングして塩

基配列を検索した。次にクローニング可能であった遺伝子に対しては primer3.0 を用いて real-time PCR に適切な 150-400bp 程度のプライマーの組み合わせをデザインした。これらを用いて正常犬／筋ジストロフィー犬／保因犬の心筋および骨格筋から作製した cDNA を用いて、その発現について比較検討した。また Canine または他種に対する TRPV2、TRPC1、TRPC6、TRPC7、TRPP2、TRPM3、TRPM4 の抗体を用いて、Canine での染色性や組織分布を正常犬／筋ジストロフィー犬／保因犬の心筋および骨格筋を用いて検討した。

4. 研究成果

TRPV2 に加え TRPC1、TRPC6、TRPC7、TRPP2、TRPM3、TRPM4 に関しては Canine の partial cDNA がクローニングでき、更に real-time PCR real-time PCR 用の適切なプライマーがデザイン可能であった。これを元に、筋ジストロフィー犬発症前及び発症後の骨格筋および心筋で比較したが、特に明らかな変化は見られなかった。一方で、正常犬と筋ジストロフィー犬および保因犬でその発現解析を行ったが、こちらも明らかな変化が観察されなかった。その為に、今度は各種チャンネルの局在について検討した。はじめに Canine にも反応する TRPV2 の抗体で染色したが、従来の抗体では TRPV2 の染色性が弱く、局在の同定が困難であった。その為、研究分担者である岩田が新たに作製した Canine TRPV2 に対する抗体では、骨格筋で筋ジストロフィー犬においては局在の変化が見られた。心筋でも同様な変化が観察された。TRPC6 TRPC7 TRPM4 TRPP2 TRPM3 では明らかな染色性や局在の変化は見られなかった。以上より筋ジストロフィー犬においては TRPV2 の局在の変化が病態に関係する可能性が示唆された。

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 4 件)

- 1) Aoki Y, Yokota T, Nagata T, Nakamura A, Tanihata J, Saito T, Duguez M. R. S., Nagaraju K, Hoffman P. E, Partridge T, Takeda S: Body-wide skipping of exons 45-55 in dystrophic mdx52mice by systemic antisense delivery. Proc Natl Acad Sci USA. 109 : 13763-13768, 2012 査読有 doi: 10.1073/pnas.1204638109
- 2) Yokota T, Nakamura A, Nagata T, Saito T, Kobayashi M, Aoki Y, Echigoya Y, Partridge T, Hoffman EP, Takeda S : Extensive and prolonged restoration of dystrophin expression with vivo-morpholino-mediated multiple exon skipping in dystrophic dogs. Nucleic Acid Ther. 22:306-315, 2012 査読有 doi: 10.1089/nat.2012.0368
- 3) Yamada T, Okaniwa N, Saneyoshi H, Ohkubo A, Seio K, Nagata T, Aoki Y, Takeda S, Sekine M: Synthesis of 2'-O-[2-(N-Methylcarbamoyl)ethyl]ribonucleosides Using Oxa-Michael reaction and chemical and biological properties of oligonucleotide derivatives incorporating these modified ribonucleosides. J Org Chem. 76: 3042-3053, 2011 査読有 doi: 10.1021/jo101963z
- 4) Aoki Y, Nakamura A, Yokota T, Saito T, Okazawa H, Nagata T, Takeda S : In-frame dystrophin following exon 51-skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient mdx mouse. *Mol Ther*. 18, 1995-2005, 2010 査読有 doi:10.1038/mt.2010.186

[学会発表] (計 9 件)

- 1) Tetsuya Nagata : Exon skipping approach;

- exon 45-55 skipping. 9th Japanese-French Symposium for 'muscular dystrophy', Tokyo, 9.7 - 8, 2012
- 2) 永田哲也 : シンポジウム Antisense Oligos for Muscular Dystrophy アンチセンスオリゴを用いた筋ジストロフィーの治療. 第51回日本神経学会総会, 東京, 5.21, 2010
 - 3) Aoki Y, Nagata T, Nakamura A, Saito T, Tanihata J, Duguez S, Nagaraju K, Hoffman E, Partridge T, Yokota T, Takeda S: Demonstration of Systemic Exon 45-55 Multiple Skipping in Dystrophic mdx52 Mice. American society of gene & cell therapy 15th Annual meeting, Philadelphia, USA, 5.16, 2012
 - 4) Saito T, Nagata T, Aoki Y, Tanihata J, Masuda S, Yokota T, Shimizu-Motohashi Y, Takeda S: Myogenic Transduction and Cell Surface Marker Selection of DMD Fibroblasts Stable Dystrophin mRNA Expression for Exon Skipping Assay. American society of gene & cell therapy 15th Annual meeting, Philadelphia, USA, 5.17, 2012
 - 5) Saito T, Nagata T, Aoki Y, Tanihata J, Masuda S, Yokota T, Motohashi Y, Takeda S: Myogenic Transduction and Cell Surface Marker Selection of DMD Fibroblasts for Exon Skipping Assay. The 11th Annual Scientific meeting of The Asian Oceanian Myology Center, Kyoto, Japan, 6.7, 2012
 - 6) Aoki Y, Nagata T, Shimizu Y, Takeda S: Challenges for antisense oligonucleotide based therapeutics, in particular for exon 51-skipping in Duchenne muscular dystrophy. 4th International conference on modeling, simulation and applied optimization. Kuala Lumpur, Malaysia, 4.21, 2011
 - 7) Aoki Y, Nagata T, Yokota T, Takeda S: Mechanism of uptaking Morpholino into dystrophin-deficient muscle fibers. American society of gene & cell therapy 14th Annual meeting, Seattle, USA, 5.20, 2011
 - 8) Shimizu Y, Saito T, Aoki Y, Yokota T, Nagata T, Nakamura A, Osawa M, Takeda S: Skipping of exons 6 and 8 of the DMD gene has been achieved in myogenic cells from an exon-7 deleted DMD patient: direct application of antisense sequences found in study with canine muscular dystrophy. 15th International Congress of World Muscle Society (WMS), Kumamoto, 10.15, 2010
 - 9) Aoki Y, Yokota T, Saito T, Nakamura A, Nagata T, Okazawa H, Takeda S : Feasibility and effectiveness of exon 51 skipping in human-like mdx mutation. American Society of Gene & Cell Therapy 13th Annual meeting, Washington DC, USA, 5.21, 2010
- 〔図書〕 (計3件)
- 1) Nagata T, Takeda S: The frontier of antisense oligonucleotide induced therapy (ed. by Takeda S). Fifty years of neuromuscular disorder research after discovery of creatine kinase as a diagnostic marker of muscular dystrophy, IGAKU-SHOIN Ltd., Japan, pp56-67, 2011
 - 2) Aoki Y, Shimizu Y, Nagata T, Takeda S: Challenges to oligonucleotides-based therapeutics, especially with regards to exon 51 skipping for Duchenne muscular dystrophy. Modeling, Simulation and Applied Optimization (ICMSAO). 2011.5775520.
 - 3) 永田哲也, 武田伸一: 筋ジストロフィーの新しい治療戦略. 神経内科, 74: 339-346, 2011
- 〔産業財産権〕
○出願状況 (計1件)
名称 : アンチセンス核酸

発明者：武田伸一，永田哲也ら

権利者：同上

種類：

番号：特願 010-196032

出願年月日：2010年9月1日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 哲也 (NAGATA TETSUYA)

独) 国立精神・神経医療研究センター・神経

研究所遺伝子疾患治療研究部・室長

研究者番号：50362976

(2) 研究分担者

武田 伸一 (TAKEDA SHIN' ICHI)

独) 国立精神・神経医療研究センター・神経

研究所・遺伝子疾患治療研究部・部長

研究者番号：90171644

岩田 裕子 (IWATA YUKO)

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子

生理部・室長

研究者番号：80171908