

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591281

研究課題名(和文)カベオリン3を介した神経型NO合成酵素制御による筋萎縮の病態治療研究

研究課題名(英文)Analysis of caveolin-3/nNOS w-null mice

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：筋細胞膜カベオリン構成蛋白質 caveolin-3はシグナル分子と結合しその活性を制御する。われわれは肢帯型筋ジストロフィーモデルとして筋萎縮を表現型とする変異caveolin-3 (CAV-3P104L)マウスを作出した。骨格筋ではcaveolin-3が欠損し、nNOS活性は亢進していた。nNOS活性亢進が、筋萎縮発症に促進的に働くか、抑制的に働くか検証するため、nNOS/caveolin-3二変異マウスを作出した。二重変異マウスでは、CAV-3欠損マウスと比較し、筋萎縮と筋力低下が増強した。caveolin-3欠損によるnNOS活性亢進は筋萎縮を抑制している。

研究成果の概要(英文)：Caveolin, an integral membrane protein of the plasma membrane caveolae, binds to and regulates nitric oxide synthases (NOS) in several cells and tissues. However, interaction of caveolin-3 and neuronal NOS (nNOS) in myofiber has remained unknown. We previously generated a model of limb-girdle muscular dystrophy by overexpressing the disease-causing mutant caveolin-3 (CAV-3P104L) in skeletal muscle. Loss of caveolin-3 resulted in atrophic myopathy with increased sarcolemmal nNOS activity, indicating caveolin-3 binding and suppression on nNOS in myofiber. Here, we generated and characterized the double mutant mice showing both deficiency of nNOS and loss of caveolin-3 (CAV-3P104L+/+, nNOS-/-). The double-mutant mice exhibited a reduction in the muscle mass and strength in comparison with the mutant caveolin-3 mice. Thus, increased sarcolemmal nNOS activity by the loss of caveolin-3 could prevent muscle atrophy in the pathogenesis leading to LGMD1C.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋ジストロフィー 再生医療 シグナル伝達 国際情報交換

1. 研究開始当初の背景

骨格筋萎縮(muscle atrophy あるいは muscle wasting)は、筋ジストロフィーや筋萎縮性側索硬化症などの神経筋疾患ばかりでなく、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、癌など様々な疾患で生命予後を規定する病態である。近年、骨格筋萎縮に至る分子機構が明らかとなってきたが、治療法は皆無であり早急な開発が期待されている。

代表的な筋ジストロフィーであるデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)では筋細胞膜(鞘膜)下のジストロフィン欠損によってジストロフィン糖蛋白質複合体(DGC)の構成成分の一つである神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)蛋白質が欠損する。最近、ジストロフィー欠損マウス(*mdx*)では nNOS の欠損が骨格筋の二次的血流障害を惹起して筋変性と筋疲労を促進するという“two hit hypothesis”が提唱されている(Kobayashi, et al. Nature 456, 511-515, 2008)。更に、細胞膜 DGC に破綻がないジスフェルリン欠損肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)2B、メロシン欠損先天性筋ジストロフィー(MDC)1A、ステロイド糖尿病、廃用性筋萎縮、加齢性筋萎縮(サルコペニア)驚くべきことに、筋萎縮性側索硬化症などの神経原性筋萎縮においても筋鞘膜 nNOS 蛋白質量が著減すると報告され(Hedderick, et al. Neurology 76, 969-967, 2011)、筋鞘膜 nNOS 活性と筋萎縮病態との関連について注目が集まっている。一方で nNOS 欠損マウスの骨格筋では骨格筋萎縮や筋ジストロフィー変化が生じない(Brenman, et al. Cell 82, 743-752, 1995) また NO 供与体の投与によっても *mdx* マウスの筋萎縮が改善しないといった nNOS と筋萎縮の関連に否定的な報告もあり、筋萎縮の分子機構にお

ける nNOS の役割については、なお結論が出ていないのが現状である。

カベオリン(caveolin)はオリゴマーとなって細胞膜のフラスコ状陥入構造カベオラを形成するだけでなく、NOS など様々なシグナル伝達分子と結合しその活性を制御する重要な足場蛋白質である。このうち血管内皮細胞ではカベオリン-1が内皮型 NO 合成酵素(eNOS)と直接結合し活性を抑制することが NO による血管運動調節の一翼を担う(Balakumar, et al. JMCC, 2011, Rpi ahead of print)。一方、正常骨格筋ではカベオリン-3が nNOS と結合することが証明されていたが、その意義は長らく不明であった(Vernema, et al. JBC, 272, 28187-28190, 1997)。1998年にカベオリン-3 遺伝子変異による常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー1C(LGMD1C)家系が初めて報告され(Minetti, et al. Nat Med 18, 365-368)、われわれは筋特異的プロモーター下にこの家系で認められたドミナントネガティブ変異カベオリン-3(CAV3^{P104L})を発現するトランスジェニックマウス(CAV3^{P104L} Tg)を作出した(Sunada, Hum Mol Genet 10, 173-178, 2001)。このマウスの骨格筋は萎縮してカベオリン-3は著減し nNOS 蛋白質量と筋鞘膜局在には変化がないものの、筋鞘膜 nNOS 活性[NADH Diaphorase(NDP)法]は著明に亢進していた。すなわち正常な筋鞘膜におけるカベオリン-3による nNOS 活性抑制機構(図2)を明らかとした。この結果は後に、患者骨格筋でも証明された(Kubish, et al. Ann Neurol 53, 512-520, 2003)。

2. 研究の目的

本研究は、このカベオリン-3欠損による nNOS 活性亢進(脱抑制)が、筋萎縮病態に促進的に作用するのか、あるいは抑制的に作用するのか、について検証する。すなわ

ち、カベオリン-3欠損筋においてnNOSを欠損させると筋萎縮が増強するか？抑制されるか？により、是非を検証することを目標とする。これにより、筋萎縮分子機構でのnNOS活性の役割、ひいてはnNOS上流の制御分子であるカベオリン-3の役割の解明に繋げる。

3. 研究の方法

カベオリン-3欠損 LGMD1C モデルマウスとnNOS欠損マウスを交配し二重欠損マウスを作出する。カベオリン-3欠損マウスの筋萎縮性ミオパチーが二重欠損マウスで増悪するか改善するかについて骨格筋を解析する。これによってnNOS活性亢進がカベオリン-3欠損に起因する筋萎縮に抑制的に働いているか、促進的に働いているかについて病態機構への関与を解明する。

これと併行して、筋萎縮モデル(坐骨神経切除)におけるカベオリン-3及びnNOS欠損について解析するを標的とした分子治療の基盤を確立する。

4. 研究成果

まず、カベオリン-3欠損マウス(CAV3^{P104L} Tg: CAV3^{P104L}+/+)と、nNOS欠損マウス(nNOS exon 1欠損: nNOS-/-)を交配し、野生型(CAV3^{P104L}-/-/nNOS+/+)、カベオリン-3欠損(CAV3^{P104L}+/+/nNOS+/+)、カベオリン-3/nNOS二重欠損(CAV3^{P104L}+/+/nNOS-/-)、nNOS欠損(CAV3^{P104L}-/-/nNOS-/-)の4種類の表現型を示すマウスを作出した。6-16週齢の体重及び握力の増加は、野生型及びnNOS欠損マウスは同等であった。これらと比較して、カベオリン-3欠損マウスは、成長が有意に減少し、カベオリン-3/nNOS二重欠損マウスは、カベオリン-3欠損マウスと比較しても、より有意に減少を認めた。16週齢の骨格筋解析では、カベオリン-3欠損マウスでは、野生型及びnNOS欠損マウスと比較して、骨格筋量が減少し、単一

筋線維断面積・筋線維数の減少が認められた。カベオリン-3/nNOS二重欠損マウスでは、カベオリン-3欠損マウスより有意に減少を示した。カベオリン-3欠損マウスでは、骨格筋のnNOS蛋白質量は野生型と比較して同等であったが、筋細胞膜のnNOS活性(NDP染色)は著明に亢進し、骨格筋粗分画のnNOS活性(トリチウム・シトルリン法)も亢進を示した。一方、カベオリン-3/nNOS二重欠損マウスおよびnNOS欠損マウスでは、筋細胞膜及び骨格筋粗分画のnNOS活性は消失を認め、血管型NOS(eNOS)及び、誘導型NOS(iNOS)の代償性発現は認められなかった。すなわち、カベオリン-3欠損によるnNOS活性亢進は、筋萎縮発症に抑制的に作用すると結論できる。さらに、野生型、カベオリン-3欠損、nNOS欠損、カベオリン-3/nNOS二重欠損マウスの一側座骨神経を切除し、1週間後に小動物CTで骨格筋断面積(下腿中央)、2週間後に前脛骨筋とヒラメ筋の筋重量・単一筋線維断面積を測定した。カベオリン-3欠損マウス及びnNOS欠損は野生型コントロールと比較して座骨神経除神経後の骨格筋断面積、筋重量、単一筋線維断面積は有意に減少した。カベオリン-3/nNOS二重欠損マウスでは、カベオリン-3欠損マウス及びnNOS欠損と比較して、さらに減少が著明であった。カベオリン-3及びnNOSは、神経原性筋萎縮を抑制している可能性が示された。nNOSとその上位制御分子カベオリン-3による骨格筋萎縮抑制のより詳細な分子機構解明のため、現在、骨格筋遺伝子発現解析に取り組んでいる。

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5件)

Kutoku Y, Ohsawa Y, Kuwano R, Ikeuchi T, Inoue H, Ataka S, Shimada H, Mori H, Sunada Y. A second pedigree with amyloid-less familial Alzheimer's disease harboring an identical mutation in the amyloid precursor protein gene (E693delta).

Intern Med, 54(2):205-208, 2015, doi: 10.2169/internalmedicine.54.3021, 査読有

Takayama K, Noguchi Y, Aoki S, Takayama S, Yoshida M, Asari T, Yakushiji F, Nishimatsu S, Ohsawa Y, Itoh F, Negishi Y, Sunada Y, Hayashi Y. Identification of the minimum peptide from mouse myostatin prodomain for human myostatin inhibition. J Med Chem, 58(3):1544-1549, 2015, doi: 10.1021/jm501170d, 査読有

Kawakami E, Kawai N, Kinouchi N, Mori H, Ohsawa Y, Ishimaru N, Sunada Y, Noji S, Tanaka E. Local applications of myostatin-siRNA with atelocollagen increase skeletal muscle mass and recovery of muscle function. PLoS One, 8(5):e64719, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0064719, 査読有

Rikimaru M, Ohsawa Y, Wolf AM, Nishimaki K, Ichimiya H, Kamimura N, Nishimatsu S, Ohta S, Sunada Y. Taurine ameliorates impaired the mitochondrial function and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. Intern Med, 51(24):3351-3357, 2012, 査読有

Ohsawa Y, Okada T, Nishimatsu S, 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, 92(8):1100-1114, 2012, doi: 10.1038/labinvest.2012.78, 査読有

〔学会発表〕(計2件)

大澤 裕, 砂田芳秀, 筋ジストロフィーに対するマイオスタチン阻害ペプチドの開発、第32回日本神経治療学会総会、2014年11月22日、東京ドームホテル(東京都文京区)

砂田芳秀, 深井雄太, 大澤 裕, 村上龍文、マトリックスポテアーゼを介するサルコグリカン欠損筋ジストロフィー発症機構の解析、第55階日本神経学会学術大会、2014年5月22日、福岡国際会議場(福岡市)

〔図書〕(計6件)

砂田芳秀, ミトコンドリア脳筋症、今日の治療指針 2015版 私はこう治療している、2096(921-922)、2015

砂田芳秀, VLCAD(極長鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ)欠損症、代謝性ミオパチー、

査読有、272(114)、2014

砂田芳秀、フィンランド型家族性アミロイドポリニューロパチー - 本邦患者の臨床像と遺伝子異常 -、神経内科、第81巻第1号、122(97-101)、2014

砂田芳秀、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、Neuroinfection、Vol.19、No.1、121(64-67)、2014

砂田芳秀、脳・神経疾患、臨床栄養管理学会論 第2版、190(1-4)、2014

大澤 裕, 砂田芳秀、【サルコペニアとフレイル-臨床と研究の最前線-】骨格筋萎縮に対するマイオスタチン阻害医薬の最前線、Geriatric Medicine、Vol.52、No.4、144(387-392)、2014

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称: マイオスタチン阻害ペプチド
発明者: 砂田芳秀、林 良雄、大澤 裕、西松伸一郎、薬師寺文華、伊東史子、高山健太郎、青木 進、野口百合
権利者: 学校法人川崎学園、学校法人東京薬科大学

種類: 特許
番号: PCT/JP2014/052345
出願年月日: 2014年1月31日
国内外の別: 国外

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
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
村上 龍文 (MURAKAMI Tatsufumi)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 30330591

大澤 裕 (OHSAWA Yutaka)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：80246531

(3)連携研究者

()

研究者番号：