

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430049

研究課題名(和文)筋ジストロフィーにおける細胞外分子補充療法の開発

研究課題名(英文)Protein-anchoring therapy for mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy

研究代表者

伊藤 美佳子 (Ito, Mikako)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60444402

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)：デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は骨格筋でのdystrophin欠損による筋力低下を特徴とする進行性遺伝疾患である。細胞外マトリックス分子であるbiglycanは、dystrophinの機能を代償し得るutrophinの発現を誘導することが知られている。本研究ではDMDモデルマウスであるmdxマウスにAAVを介してbiglycan遺伝子(BGN)を導入した。AAV-Bgnを全身投与したmdxマウスでは、筋組織および肝臓でのBiglycanの発現量が増加し、筋組織においてUtrophinの上昇が確認された。また運動症状が回復し、筋組織病理像の改善が見られたことから、有効性が示された。

研究成果の概要(英文)：Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a devastating muscle disease caused by loss-of-function mutations in DMD encoding dystrophin. Utrophin is a paralog of dystrophin and is highly expressed at the neuromuscular junction. In mdx mice, utrophin is naturally upregulated throughout the muscle fibers, which mitigates muscular dystrophy. The protein-anchoring therapy was applied to mdx mice in this study. rAAV8 carrying hBGN encoding human biglycan was intravenously injected into 5-week-old mdx mice. The rAAV8-hBGN treatment improved motor deficits and decreased plasma creatine kinase activities. In muscle sections of treated mice, the number of central myonuclei and the distribution of myofiber sizes were improved. The low transduction efficiency and improved motor functions suggest that biglycan expressed in a small number of muscle fibers was likely to have been secreted and anchored to the cell surface throughout the whole muscular fibers.

研究分野：神経科学

キーワード：筋ジストロフィー AAV Biglycan mdx

1. 研究開始当初の背景

(1)デュシャンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、骨格筋での dystrophin 欠損による筋力低下を特徴とする進行性の遺伝性疾患である。本疾患は X 染色体劣性遺伝であるが、突然変異率も高く、男児の 3300 人に 1 人の罹患率である。DMD に対する根本的な治療法はなく、進行を遅らせるための様々な取り組みがされている。DMD は 3-5 歳頃に発症し、骨格筋の変性・壊死により次第に筋力低下が進行していく疾患である。DMD は X 染色体に座する dystrophin の異常から発症し骨格筋での dystrophin 欠損を特徴とする。筋基底膜ではジストログリカン複合体( $\alpha$ -DG,  $\beta$ -DG)とサルコグリカン複合体 ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) が存在し、 $\alpha$ -DG,  $\beta$ -DG と dystrophin が結合し筋細胞内のアクチンフィラメントをマトリックスに固定している(図 1)。

(2)utrophin は通常神経筋接合部の周辺で発現しているが、dystrophin と類似のタンパクであり dystrophin の代用として働きうる。

biglycan は細胞外マトリックスにおいて  $\alpha$ -DG および  $\alpha, \gamma$  サルコグリカンに結合して utrophin の発現を誘導することが知られており、発達段階や筋組織の適時再生においてジストロフィン結合タンパク複合体の発現を調整する重要な分子である。

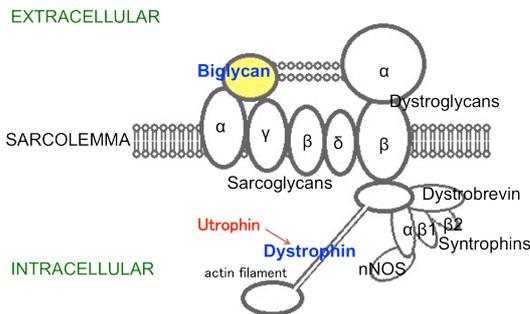


図 1. ジストロフィン結合タンパク複合体

2. 研究の目的

(1)本研究では、導入効率の高いアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて dystrophin 欠損 mdx マウスの筋細胞に biglycan 遺伝子を導入し、utrophin の発現誘導と筋膜構成分子の安定化を目標とする。

筋ジストロフィーに対する dystrophin 遺伝子補充研究はマウス、イヌを用いてされてきたが、筋細胞全てに遺伝子導入をすることは極めて困難であり、大量のウイルスの使用による副作用が障壁となる。現在までに、神経筋接合部に局在する細胞外分子 Collagen Q の AAV を用いた遺伝子治療をマウスで行い、運動機能の高い治療効果を得た(Ito et al, Mol. Ther 2012)。本研究は細胞外液を介して遺伝子導入分子である biglycan が非導入組織にも運搬され筋組織に集積し、utrophin の発現を誘導することが特色であり、これにより遺伝子導入効率と異所性発現の問題が回避でき、高い治療効果が期待できる。

3. 研究の方法

(1)dystrophin 欠損 mdx マウスに対してアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いて biglycan(BGN) 遺伝子導入し utrophin の発現誘導をする。AAV は筋細胞に特異性をもつ senotype8 を使用する。BGN 遺伝子は全長 1.1kb であるため、組換え AAV を作製する可能なサイズである。

(2)本研究では、4 週齢の mdx マウスの尾静脈から rAAV8-BGN を投与し、全身の骨格筋細胞への導入を行う。mdx が正常マウスより運動能力が大きく劣る 20 週齢において、握力、回転ホイール、ロタロッドテストにより運動能力試験を評価する。また、骨格筋中の utrophin、 $\alpha$ -DG、 $\beta$ -DG, dystrobrevin, nNOS, syntrophin の発現量を mRNA レベルとタンパクレベルで調査する。また、骨格筋組織切片において、

biglycan, utrophin, dystrobrevin 抗体を用いた免疫染色の発現量を調べ、筋組織の正常化を評価する。さらに肝機能などへの副作用調査を行い安全性を確認する。また、異所性発現の副作用の観点から筋組織特異的発現をするプロモーター human skeletal actin gene (HAS) 下で biglycan を発現させ、その治療効果を調査する。

4. 研究成果

(1)rAAV8-BGN ( $1 \times 10^{12}$ vg) を尾静脈より全身投与した mdx マウスは、注入後 2 週より運動機能が上昇し、回転ホイール、rota-rod テスト、握力テストで良好な成績を示した (図 2)。

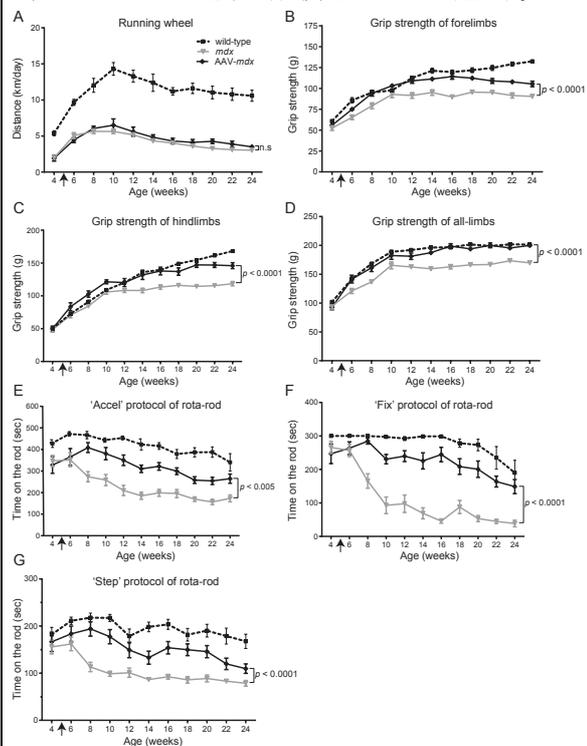


図 2. AAV-BGN を全身投与したマウスの運動能力は上昇し、維持された。

mdx マウスは成長過程で筋細胞の破壊より再生が活発であるため、ある程度運動機能が正常に近いが、横隔膜の筋肉は早い段階から筋の変性や繊維化が進む。mdx マウスは utrophin の発現が遅れる生後 6 週齢までと筋萎縮が始まる 16 週齢以降において、骨格筋組織では筋細胞の大きさにばらつきがあり、中心核が多く見られ、筋細胞の再生能が落ちることにより筋萎縮が促進する。Wild type, mdx, AAV-mdx マウスの大腿四頭筋、腓腹筋、上腕三頭筋を採取し、薄切切片を作製し、組織学的な病理像の解析を行った。Mdx マウスは筋繊維の大きさが不均一になり、中心核が現れる。AAV-BGN 治療マウスにおいて、筋繊維の大きさが改善し、中心核の比率も減少した。また、腓腹筋、上腕三頭筋の切片での筋繊維面積を測定し、分布グラフを作成した。治療マウスでは、小さい繊維が減少していることが明らかになった(図 3)。

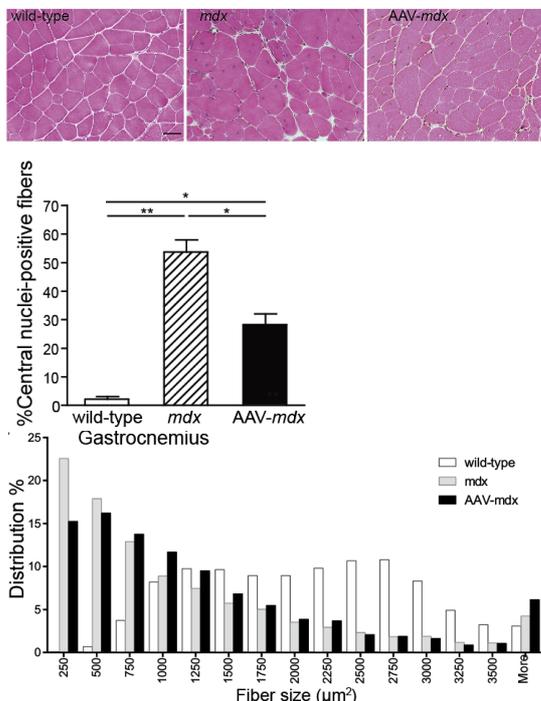


図 3. AAV-BGN を投与したマウスの筋繊維の病理像は正常化した。

(2) AAV を介した biglycan 遺伝子補充によりジストロフィン構成タンパクの発現量の変化を mRNA を定量し評価した。rAAV8-BGN を 4 週齢の mdx マウスの尾静脈より全身投与を実施し、24 週齢まで飼育した。その骨格筋において biglycan, utrophin, syntrophin の mRNA 量の増加が認められた(図 4)。つまり細胞に導入された Biglycan タンパクは細胞外に放出され、血流や細胞外液を介して筋細胞膜マトリックスの  $\alpha$ -DG および  $\alpha$ ,  $\gamma$  サルコグルカンに結合し、utrophin の発現が上昇したと予想される。

(3) 次に、骨格筋組織切片において、utrophin, dystrobrevin, syntrophin, sarcoglycan の抗体を用いた免疫染色を行い、イメージ解析により発現量を調査した(図 5)。

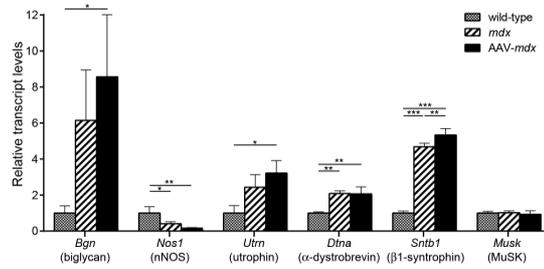


図 4. AAV-BGN を全身投与したマウスにおいて、骨格筋での遺伝子発現量に変化がみられた。

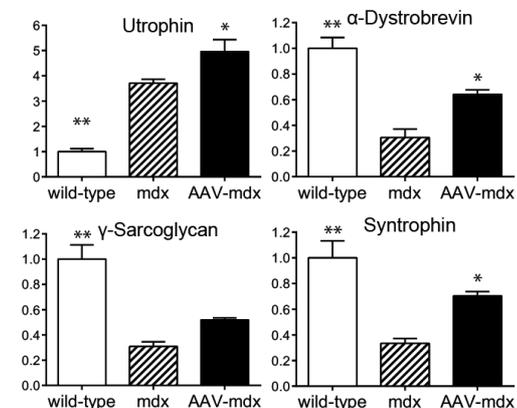
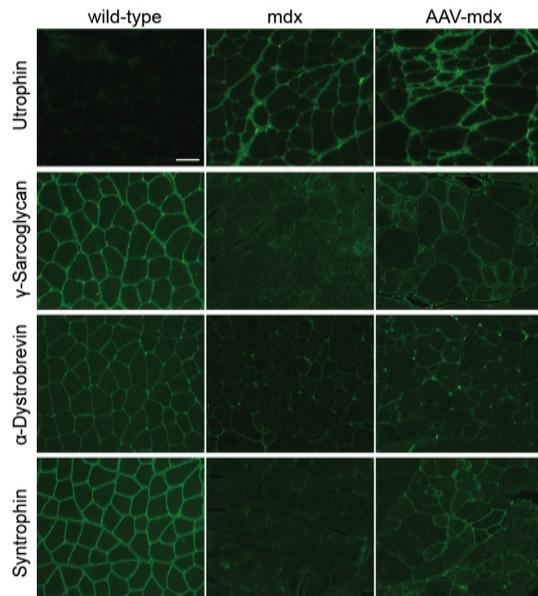


図 5. AAV-BGN 治療により筋組織では各ジストロフィン複合体分子の発現は増加した。

(4) 運動試験の結果では 24 週齢においても運動能の減衰が少なく、治療効果が持続していた。骨格筋中の utrophin と DAPC 分子の遺伝子発現量は変化し、biglycan においてはタンパクレベルで上昇していた。これらの結果からデュシャンヌ型筋ジストロフィーにおける AAV を介した Biglycan 治療の有効性が期待できる。

AAV は一部の筋組織に導入されるだけであるが、AAV8 を介した Biglycan 投与により、肝臓での感染が高く、肝臓において Biglycan の生産が増加していた。Biglycan は細胞外分子であるため、血液に運ばれて全身の

Biglycanが増加したと考えられる。このような細胞外分子を用いたタンパク係留治療は、必要な局所にタンパクを補充することができ、DMDのみならず様々な病態に効果が期待できる。

#### 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 27 件)

1. Mikako Ito, Yuka Ehara, Jin Li, Kosuke Inada, and Kinji Ohno Protein-Anchoring Therapy of biglycan for mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy *Human Gene Therapy* (in press) 査読有り
2. Mohammad Nazim, Akio Masuda, Mohammad Alinoor Rahman, Farhana Nasrin, Jun-ichi Takeda, Kenji Ohe, Bisei Ohkawara, Mikako Ito, Kinji Ohno Competitive regulation of alternative splicing and alternative polyadenylation by hnRNP H and CstF64 determines acetylcholinesterase isoforms. *Nucleic Acids Research* 2017 45(3):1455-1468. 査読有り
3. Hasegawa S, Ito M, Fukami M, Hashimoto M, Hirayama M, Ohno K Molecular hydrogen alleviates motor deficits and muscle degeneration in mdx mice *Redox Report* 2017 Jan;22(1):26-34. 査読有り
4. Lin Y, Ohkawara B, Ito M, Misawa N, Miyamoto K, Takegami Y, Masuda A, Toyokuni S, Ohno K. Molecular hydrogen suppresses activated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Sci Rep*. 2016 Aug 25;6:31986. 査読有り
5. Nakashima H, Ohkawara B, Ishigaki S, Fukudome T, Ito K, Tsushima M, Konishi H, Okuno T, Yoshimura T, Ito M, Masuda A, Sobue G, Kiyama H, Ishiguro N, Ohno K. R-spondin 2 promotes acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction via Lgr5. *Sci Rep* 2016 Jun 22;6:28512. 査読有り
6. Ohno K, Ito M, Otsuka K Roles of collagen Q in MuSK antibody-positive myasthenia gravis *Chem Biol Interact*. 2016 Nov 25;259(Pt B):266-270. 査読有り
7. Muramatsu Y, Ito M, Oshima T, Kojima S, Ohno K Hydrogen-rich water ameliorates bronchopulmonary dysplasia (BPD) in newborn rats. *Pediatr Pulmonol*. 2016 Sep;51(9):928-35. 査読有り
8. Yasuhiko Takegami, Bisei Ohkawara; Hiroaki Nakashima, Mikako Ito, Akio Masuda; Naoki Ishiguro; Kinji Ohno R-spondin 2 facilitates differentiation of proliferating chondrocytes into hypertrophic chondrocytes by enhancing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in endochondral ossification. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Apr 22;473(1):255-64. 査読有り
9. Azuma Y, Nakata T, Tanaka M, Shen XM, Ito M, Iwata S, Okuno T, Nomura Y, Ando N, Ishigaki K, Ohkawara B, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Sokabe M, Ohno K. Congenital myasthenic syndrome in Japan: ethnically unique mutations in muscle nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Neuromuscul Disord*. 2015 25(1):60-9. 査読有り
10. Sobue S, Yamai K, Ito M, Ohno K, Ito M, Iwamoto T, Qiao S, Ohkuwa T, Ichihara M. Simultaneous oral and inhalational intake of molecular hydrogen additively suppresses signaling pathways in rodents. *Mol Cell Biochem*. 2015 403(1-2):231-41 査読有り
11. Hiromi Fujii, Kohki Matsubara, Kiyoshi Sakai, Mikako Ito, Kinji Ohno, Minoru Ueda, Akihito Yamamoto Dopaminergic neuron-like stem cells from human deciduous teeth promote neurological recovery in Parkinsonian rats by cell replacement and paracrine neuroregenerative mechanisms 2015 *Brain Research* 10;1613:59-72. 査読有り
12. Masuda A., Takeda J., Okuno T., Okamoto T., Ohkawara B., Ito M., Ishigaki S., Sobue G., Ohno K. Position-specific binding of FUS to nascent RNA regulates mRNA length. *Genes Dev*. 2015 29(10):1045-57. 査読有り
13. Kishimoto Y, Kato T, Ito M, Azuma Y, Fukasawa Y, Ohno K, Kojima S Hydrogen ameliorates pulmonary hypertension in rats by anti-inflammatory and antioxidant effects. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2015 150(3):645-654.e3. 査読有り
14. Iwata S, Ito M, Nakata T, Noguchi Y, Okuno T, Ohkawara B, Masuda A, Goto T, Adachi M, Osaka H, Nonaka R, Arikawa-Hirasawa E, Ohno K. A missense mutation in domain III in HSPG2 in Schwartz-Jampel syndrome compromises secretion of perlecan into the extracellular space. *Neuromuscul Disord*. 2015 25(8):667-71. 査読有り
15. Kenji Otsuka, Mikako Ito, Bisei Ohkawara, Akio Masuda, Yu Kawakami, Ko Sahashi, Hiroshi Nishida, Naoki Mabuchi, Akemi Takano, Andrew G. Engel, Kinji Ohno Collagen Q and anti-MuSK autoantibody competitively suppress agrin/LRP4/MuSK signaling. *Sci. Rep* 2015 5:13928. 査読有り
16. Masatoshi Ichihara, Sayaka Sobue, Mikako Ito, Masafumi Ito, Masaaki Hirayama, Kinji Ohno Beneficial Biological effects and the underlying

- mechanisms of molecular hydrogen - Comprehensive review of 321 original articles *Medical Gas Research* 2015, 5:12 査読有り
17. Kenichi Mishima, Hiroshi Kitoh, Bisei Ohkawara, Tatsuya Okuno, Mikako Ito, Akio Masuda, Naoki Ishiguro, Kinji Ohno Lansoprazole upregulates polyubiquitination of TRAF6 and facilitates Runx2-mediated osteoblastogenesis *EBio Medicine* 2015 2(12):2046-61. 査読有り
  18. Ohno, K., Ito, M. and Kawakami, Y. Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for dissecting the mechanisms of anti-MuSK myasthenia gravis. *J. Mol. Neurosci.* 2014 53(3):359-61. 査読有り
  19. Asai N, Ohkawara B, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. LRP4 induces extracellular matrix productions and facilitates chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 451(2):302-7.
  20. Kobayashi M, Ohno T, Ihara K, Murai A, Kumazawa M, Hoshino H, Iwanaga K, Iwai H, Hamana Y, Ito M, Ohno K, Horio F. Searching for genomic region of high-fat diet-induced type 2 diabetes in mouse chromosome 2 by analysis of congenic strains. *PLoS One.* 2014 May 1;9(5):e96271.
  21. Ohkawara, B., Cabrera-Serrano, M., Nakata, T., Milone, M., Asai, N., Ito, K., Ito, M., Masuda, A., Ito, Y., Engel, A. G. and Ohno, K. LRP4 third  $\beta$ -propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated musk signaling in a position-specific manner, *Hum. Mol. Genet.* 2014 1;23(7):1856-68. 査読有り
  22. Mano, Y., Kotani, T., Ito, M., Nagai, T., Ichinohashi, Y., Yamada, K., Ohno, K., Kikkawa, F. and Toyokuni, S. Maternal molecular hydrogen administration ameliorates rat fetal hippocampal damage by in utero ischemia-reperfusion, *Free Radic. Biol. Med.* 2014 69:324-30. 査読有り
  23. Takamatsu, A., Ohkawara, B., Ito, M., Masuda, A., Sakai, T., Ishiguro, N. and Ohno, K. Verapamil protects against cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, *PLOS ONE* 2014 Mar 21;9(3):e92699. 査読有り
  24. Matsushita, M., Kitoh, H., Ohkawara, B., Mishima, K., Kaneko, H., Ito, M., Masuda, A., Ishiguro, N. and Ohno, K. (2013) Meclozine facilitates proliferation and differentiation of chondrocytes by attenuating abnormally activated FGFR3 signaling in achondroplasia. *PLoS ONE*, 8(12) : e81569 査読有り
  25. Rahman, M. A., Masuda, A., Ohe, K., Ito, M., Hutchinson, D. O., Mayeda, A., Engel, A. G. and Ohno, K. (2013) HnRNP L and hnRNP LL antagonistically modulate PTB-mediated splicing suppression of CHRNA1 pre-mRNA, *Sci. Rep.* 2013 (3):2931 査読有り
  26. Nakata T, Ito M, Azuma Y, Otsuka K, Noguchi Y, Komaki H, Okumura A, Shiraishi K, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Ohno K. Mutations in the C-Terminal Domain of ColQ in Endplate Acetylcholinesterase Deficiency Compromise ColQ-MuSK Interaction. *Hum Mutat.* 2013 34 (7): 997-1004. 査読有り
  27. Iio A, Ito M, Itoh T, Terazawa R, Fujita Y, Nozawa Y, Ohsawa I, Ohno K, Ito M. Molecular hydrogen attenuates fatty acid uptake and lipid accumulation through downregulating CD36 expression in HepG2 cells. *Med Gas Res.* 2013 Mar 1;3(1):6. 査読有り
- [学会発表] (計 3 件)
- ① 伊藤美佳子、江原佑佳、李 晋、稲田亘佑、大野欽司デュシャンヌ型筋ジストロフィーmdx マウスにおける biglycan タンパク係留療法 第 39 回分子生物学会年会 2016 年 12 月 2 日 パシフィコ横浜 神奈川県 横浜市 ポスター発表
  - ② 伊藤 美佳子、岩田 哲、中田 智彦、野口 陽一朗、奥野 達矢、大河原美静、増田章男、後藤知英、安達昌功、小坂 仁、野中 里 紗、平澤 恵理、大野 欽 司 Schwartz-Jampel 症候群を引き起こす HSPG2 (パールカン) の遺伝子変異 第 1 回日本筋学会 2015 年 8 月 8 日 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 東京都 小平市 ポスター発表
  - ③ Ito M, Nakata T, Azuma Y, Otsuka K, Noguchi Y, Komaki H, Okumura A, Shiraishi K, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Ohno K. Mutations in the C-terminal domain of ColQ in endplate acetylcholinesterase deficiency compromise ColQ-MuSK interaction XIV International symposium on Cholinergic Mechanisms 2013 年 5 月 7 日 Hangzhou China ポスター発表
- [その他]  
ホームページ等  
<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 美佳子 (Mikako Ito)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60444402