

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860306

研究課題名(和文)エクソン45-55を欠失した短縮型ジストロフィンの機能とその役割の解析

研究課題名(英文)Functional role of truncated dystrophin with deletion exon 45-55

研究代表者

谷端 淳(Tanihata, Jun)

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・流動研究員

研究者番号：00508426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：DMDはジストロフィン(Dys)遺伝子変異が原因で発症し、骨格筋・心筋に重篤な臨床症状を起こす一方で、Dys遺伝子のexon45-55を欠損した患者はほぼ無症状である。この短縮型Dys(45-55Dys)の機能を45-55Dysのみが発現するマウス(Tg/mdx)を作出し検討した。45-55Dysは全長Dysと同等の機能を有していた。一方で、SRのリアノジン受容体(RyR1)はmdxと同程度ニトロシル化され、細胞内Ca²⁺濃度の上昇を惹起していたものの、その機能とSERCAの機能は野生型と同程度であった。細胞内Ca²⁺動態を調節することがDMDの治療法を考えるうえで重要である。

研究成果の概要(英文)：Duchenne muscular dystrophy (DMD) is caused by lack of dystrophin. Exon skipping is a promising treatment for DMD and “exon 45-55 skipping” strategy is thought to be one of the goals of this therapy, partly because Becker muscular dystrophy patients with exon 45-55 in-frame deletion show very mild skeletal muscle symptoms. However the function of exon 45-55 deleted dystrophin is not well investigated. We generated Tg/mdx mice and extensively analyzed their phenotypes. The improvement of muscle pathology and muscle function of Tg/mdx were confirmed. On the other hand, nNOS of Tg/mdx exists as an activated form and its localization was changed from sarcolemma to cytosol. We found that activated nNOS in Tg/mdx led to hyper-nitrosylation of the RyR1 and subsequent constant Ca²⁺ release from SR to cytosol. These phenomena were also confirmed in mdx. However, the function of RyR1 stimulated by caffeine and SERCA were maintained in Tg/mdx and wild type but not in mdx.

研究分野：筋生理学

キーワード：筋ジストロフィー 筋小胞体 SERCA nNOS カルシウム動態

1. 研究開始当初の背景

Duchenne muscular dystrophy (DMD) は筋ジストロフィーの中で最も重篤で発症頻度の高い進行性筋疾患である [1]。DMD は主にジストロフィン遺伝子のフレームシフト、ノンセンス変異、重複変異によって発症する [2]。Becker muscular dystrophy (BMD) は同じジストロフィンの遺伝子変異に起因するがその症状は DMD に比べ軽く、発症は成人期であることが多い。BMD の発症は主としてジストロフィン遺伝子のインフレーム欠失により、機能はあるものの短縮型ジストロフィンしか発現しないことに起因する [3]。一方で、ジストロフィンエクソン 45-55 を欠失した臨床例における骨格筋症状はほぼ無症状である。同患者の骨格筋、心筋では通常の発現量よりは少ないものの短縮型ジストロフィンが発現しているだけでなく DMD の患者では発現していない dystrophin glycoprotein complex (DGC) の構成分子の発現が回復しており、BMD の状態を示す [4]。

また、ジストロフィン遺伝子の特定のエクソンを標的とする antisense・oligonucleotide (AO) はリーディングフレームを回復させ BMD のような機能的なジストロフィン発現を惹起することが知られている [5]。その中でジストロフィン遺伝子の変異が集中している Ex. 45-55 すべてのエクソンを読み飛ばすことが出来れば、DMD 患者の約 60%が対象となる [6]だけでなく、重症の BMD にも治療の幅が広がると考えられている。実際、我々のグループはエクソン 52 を欠失している *mdx52* マウスのエクソン 45-55 の各エクソンを標的に AO を設計し、10 個のエクソンをスキップさせるマルチエクソン・スキップにより短縮型ジストロフィンの発現が認められ、筋機能が回復することを報告した [7]。

2. 研究の目的

しかし、エクソン 45-55 を欠失した短縮型ジストロフィンの機能的な役割については明らかとなっていない。また、AO を用いた *mdx52* マウスに対するマルチエクソンスキッピングでは骨格筋におけるジストロフィンの発現は認められたものの心筋でのジストロフィンの発現は認められなかったことから、心筋における機能的役割はより不明である。骨格筋・心筋におけるエクソン 45-55 を欠失した短縮型ジストロフィンの機能的役割を詳細に検討することはインフレーム欠失の筋ジストロフィー患者を早期に発見する方法の開発や、エクソン・スキップ治療の発展性を考えるうえで重要であるだけでなく BMD のモデル動物を初めて得るという点からも極めて重要である。

3. 研究の方法

これらの点を明らかにするため、エクソン

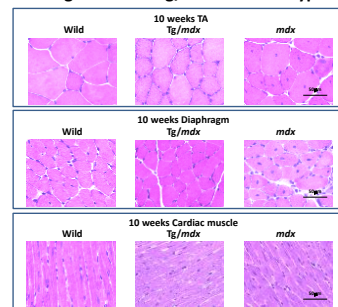
45-55 を欠失させたジストロフィン遺伝子を導入した Δ 45-55 トランスジェニックマウス (Δ 45-55 Tg) を作出した。この Δ 45-55 Tg とジストロフィン欠失の DMD モデルマウスである *mdx* マウスを交配させてエクソン 45-55 が欠失したジストロフィン遺伝子のみを持つ Δ 45-55 Tg/*mdx* を骨格筋、心筋を中心にエクソン 45-55 を欠失したジストロフィンの機能的役割を検討する。

4. 研究成果

① Δ 45-55 Tg/*mdx* の筋重量は正常マウス、*mdx* マウスと比較して特に速筋で優位に軽量であった。

② Δ 45-55 Tg/*mdx* 骨格筋の筋病理所見は *mdx* マウスで見られるような中心核線維や、筋線維の大小不同もなく正常マウスと同様の所見を示した。心筋の筋病理所見は 3 群間に大きな差は認められなかった (Fig. 1)。

Fig. 1 There is no difference in muscle pathological findings between Tg/*mdx* and wild type.



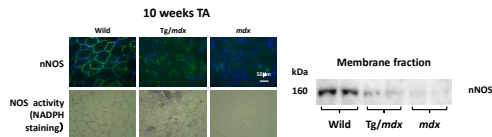
③ Δ 45-55 Tg/*mdx* 骨格筋線維数は変わらないものの筋径が小径化していた。この原因を明らかにするため、前脛骨筋 (TA) を用いて筋線維タイプの変化・萎縮・autophagy 経路の活性化が起こっているのかを検討した。その結果、 Δ 45-55 Tg/*mdx* TA の Type2B 線維は線維数は変わらないものの Type2B 線維自体が萎縮していた。一方で Type2A 線維は萎縮は認められず、線維数自体が増加していた。一方で、autophagy のマーカーである LC3A, LC3B の発現レベルに変化は認められなかった。

④ Δ 45-55 Tg/*mdx* の運動機能を Treadmill, Rota rod, Treadmill を用いて検討したところ Δ 45-55 Tg/*mdx* の運動機能は *mdx* マウスより有意に回復しており、正常マウスと同程度の機能を有していた。また、筋損傷のマーカーであり、*mdx* マウスで優位に上昇している血清クレアチンキナーゼの値も正常マウスと同程度まで低下していた。

⑤ Δ 45-55 Tg/*mdx* の筋細胞膜には *mdx* マウスでは消失している DGC の 1 つである β -dystroglycan, α -sarcoglycan の発現が回復しており、筋細胞膜が安定化していることが示された。

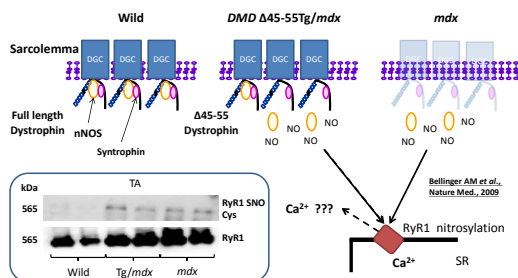
⑥ $\Delta 45-55$ Tg/*mdx* では、 β -dystroglycan, α -sarcoglycan といった DGC の発現が回復しているものの、DGC に含まれる一酸化窒素合成酵素 (nNOS) の局在が筋細胞膜から細胞質へ変化しており、細胞質で活性化していた (Fig. 2)。

Fig. 2 nNOS is localized the cytosol in $\Delta 45-55$ Tg/*mdx*



⑦ *mdx* マウスではジストロフィンの欠失に伴い nNOS を含む DGC の筋細胞膜での発現が消失しており、細胞膜に局在できなかった nNOS が筋小胞体 (SR) のリアノジン受容体 (RyR1) をニトロシル化することで、SR から細胞質へ Ca^{2+} が放出されていることが知られている [8]。 $\Delta 45-55$ Tg/*mdx* でも、細胞質に局在を変化させた nNOS が RyR1 をニトロシル化するかを検討した結果、*mdx* マウスと同程度 RyR1 がニトロシル化されていた (Fig. 3)。

Fig. 3 Cytosolic nNOS induced RyR1 hyper-nitrosylation in $\Delta 45-55$ Tg/*mdx* as well as *mdx*



⑧ RyR1 のニトロシル化に伴い SR から細胞質に Ca^{2+} が放出されるかを検討する為、長趾伸筋から single fiber を摘出し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を検討した。その結果、 $\Delta 45-55$ Tg/*mdx* の細胞内 Ca^{2+} 濃度は正常マウスと比較して有意に高く、*mdx* マウスと同様の傾向を示した (Fig. 4)。また、この Ca^{2+} 濃度の上昇は RyR1 の阻害剤 dantrolene により抑制されたことから、RyR1 のニトロシル化に伴い SR から細胞質に Ca^{2+} が放出されていることが示唆された (Fig. 5)。

Fig. 4 Constant RyR1 hyper-nitrosylation increased cytosolic Ca^{2+} concentration

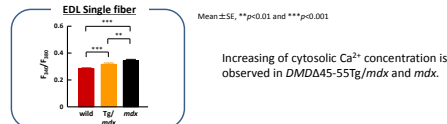
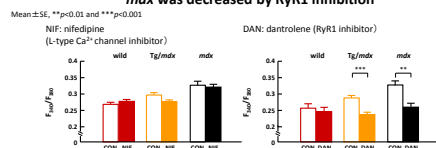


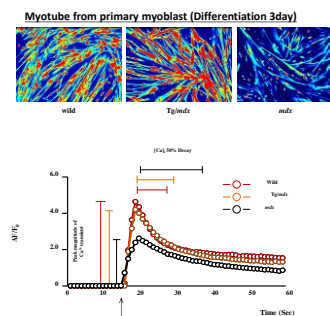
Fig. 5 Increasing of Cytosolic Ca^{2+} concentration in DMD $\Delta 45-55$ Tg/*mdx* and *mdx* was decreased by RyR1 inhibition



Increasing of cytosolic Ca^{2+} concentration in $\Delta 45-55$ Tg/*mdx* and *mdx* is not caused by influx of extracellular calcium but depends on calcium release from RyR1.

⑨ ニトロシル化された RyR1 の機能をアゴニストであるカフェインを各マウスから得られた myotube に付加して検討したところ、カフェインの刺激に対し $\Delta 45-55$ Tg/*mdx* は正常マウスと同様に Ca^{2+} を細胞質に放出したものの *mdx* マウスではその程度が有意に低かったことから $\Delta 45-55$ Tg/*mdx* の RyR1 は *mdx* マウスと同程度ニトロシル化されているにもかかわらず、機能は正常マウスと同程度維持されていることが示された (Fig. 6)。このことが、 $\Delta 45-55$ Tg/*mdx* と *mdx* マウスとの筋病理所見・筋機能との違いに表れていることが示唆された。

Fig. 6 The function of DMD $\Delta 45-55$ Tg/*mdx* RyR1 to caffeine contracture is maintained as well as the wild type



⑩ $\Delta 45-55$ Tg/*mdx* と *mdx* マウスの RyR1 は同程度ニトロシル化されているにも関わらず、なぜ機能が異なるかを細胞質から SR に Ca^{2+} を取り込む役割を担う SERCA に注目して検討した。その結果、*mdx* マウスの SERCA 機能は正常マウスより有意に低い一方で、 $\Delta 45-55$ Tg/*mdx* の SERCA 機能は正常マウスと同程度維持されていたことから、 $\Delta 45-55$ Tg/*mdx* 、正常マウスは *mdx* マウスと異なり SR 内に Ca^{2+} が大量に保存されていることが示唆された。このことが、カフェイン刺激に対する RyR1 の応答性の違い現れるところが考えられた。

以上より、エクソン 45-55 欠失の短縮型ジストロフィン筋細胞膜を安定させるものの nNOS の局在変化によりジストロフィン欠失の *mdx* マウスと同様に RyR1 のニトロシル化が惹起される。一方で、SERCA の機能が正常マウスと同様に維持されていることから筋病理所見、筋機能の維持に重要な役割を担っていることが明らかとなったことより、DMD や BMD に対する治療は筋細胞膜を安定させるだけでなく、細胞内の Ca^{2+} 動態を司る RyR1 や SERCA の機能維持が重要であることを示すことができた。

<引用文献>

1. Duchenne (1867) Br. Med. J., 2, 541-542
2. Hoffman EP, et al. (1987) Cell, 51, 919-928
3. Koenig M, et al. (1989) Am. J. Hum. Genet., 45, 498-506
4. Nakamura A, et al. (2008) J. Clin.

Neurosci., 15, 757-763

5. Yokota T, et al. (2009) Ann. Neurol., 65, 667-676

6. Beroud C, et al. (2007) Hum. Mutat., 28, 196-202

7. Aoki Y, et al. (2012) Proc Natl Acad Sci U S A., 109, 13763-13768

8. Bellingier AM, et al. (2009) Nat Med., 15, 325-330

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)

- 1) Hyzewicz J, Tanihata J, Kuraoka M, Ito N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Low intensity training of mdx mice reduces carbonylation and increases expression levels of proteins involved in energy metabolism and muscle contraction. Free Radic Biol Med, 82: 122-36, 2015, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.023. (査読有)
- 2) Echigoya Y, Aoki Y, Miskew B, Panesar D, Touznik A, Nagata T, Tanihata J, Nakamura A, Nagaraju K, Yokota T : Long-term efficacy of systemic multiexon skipping targeting dystrophin exons 45-55 with a cocktail of vivo-morpholinos in mdx52 mice. Mol Ther Nucleic Acids, 4: e225, 2015, doi: 10.1038/mtna.2014.76. (査読有)
- 3) Masaki Y, Inde T, Nagata T, Tanihata J, Kanamori T, Seio K, Takeda S, Sekine M : Enhancement of exon skipping in mdx52 mice by 2'-O-methyl-2-thioribothymidine incorporation into phosphorothioate oligonucleotides. Med Chem Commun, 6: 630-3, 2015, doi: 10.1039/C4MD00468J. (査読有)
- 4) Nakamura K, Fujii W, Tsuboi M, Tanihata J, Teramoto N, Takeuchi S, Naito K, Yamanouchi K, Nishihara M: Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. Sci Rep, 4: 5635, 2014, doi: 10.1038/srep05635. (査読有)
- 5) Echigoya Y, Lee J, Rodrigues M, Nagata T, Tanihata J, Nozohourmehrabad A, Panesar D, Miskew B, Aoki Y, Yokota T: Mutation types and aging differently affect revertant fiber expansion in dystrophic mdx and mdx52 mice. PLoS One, 8: 69194, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0069194. (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- 1) Tanihata J, Nagata T, Saito T, Ito N, Aoki Y, Nakamura A, Takeda S: Truncated dystrophin with exon 45-55 deletion induced muscle atrophy and fiber type change through the hyper-nitrosylation of the ryanodine receptor type-1 and constant release of Ca²⁺ to the

cytosol. 19th International Congress of the World Muscle Society, Berlin, Germany, 8.10, 2014

- 2) Hyzewicz J, Tanihata J, Kuraoka M, Ito N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Proteomic analysis shows that low intensity training reduces the carbonylation level and increases the expression of energy metabolism and muscle contraction proteins in mdx skeletal muscle. 43th European Muscle Conference, Salzburg, 9. 11-13, Austria, 2014
- 3) Nakamura K, Fujii W, Tsuboi M, Tanihata J, Teramoto N, Takeuchi S, Naito K, Yamanouchi K, Nishihara M: Generation of Dystrophin mutated rats with a CRISPR/Cas system as a new animal model of muscular dystrophy. 2014 FASEB Science Research Conferences (Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells) , Colorado, USA, 7.22, 2014
- 4) Saito T, Nagata T, Masuda S, Tanihata J, Ohata M, Tamaura A, Kanazawa M, Minami N, Goto K, Hayashi Y, Iwasawa K, Tatezawa K, Fukuda K, Mizutani T, Shimizu R, Suzuki M, Yamaguchi K, Tachimori H, Nishino I, Goto Y, Komaki H, Takeda S: Assessment of the Dystrophin Gene Exon 53 Skipping Using DMD Patient-Derived Fibroblasts for Exploratory Clinical Trial of Antisense Drug NS-065/NCNP-01. American society of gene & cell therapy 17th Annual meeting, Washington DC, USA, 5.20-24, 2014
- 5) 谷端 淳, 永田哲也, 齊藤 崇, 伊藤尚基, 中村昭則, 武田伸一: Exon45-55 を欠失した短縮型 dystrophin は RyR1 をニトロシル化し、細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させる. 第 69 回日本体力医学会大会, 長崎, 9.20, 2014
- 6) 中村克行, 藤井 渉, 坪井誠也, 谷端 淳, 寺本奈保美, 竹内志帆, 内藤邦彦, 山内啓太郎, 西原真杉: CRISPR/Cas 法を用いた筋ジストロフィーモデルラットの作出. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 札幌, 9.9, 2014
- 7) Janek Hyzewicz, 谷端 淳, 倉岡睦季, 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一: Low intensity endurance training restores the expression of troponin T and myosin binding protein C Fast type isoforms in gastrocnemius of mdx mice. 第 35 回日本炎症・再生医学会, 沖縄, 7.2, 2014
- 8) 松坂恭成, 岸宗一郎, 小牧宏文, 大矢 寧, 谷端 淳, 青木吉嗣, 武田伸一, 橋戸和夫: 血清 microRNA およびエクソソームマーカータンパク質による筋ジストロフィー新規診断法の確立と治療への応用. 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 11.25, 2014
- 9) 坂 翔太, 笠原優子, 積田奈々, 山本和弘, 水本秀二, 千代智子, 谷端 淳, 三宅紀子, 岳 鳳鳴, 小林身哉, 中山 淳, 佐々木克典, 福嶋義光, 松本直通, 菅原一幸, 野村義宏, 古庄知己, 武田伸一, 岡田尚巳: デ

ルマタン4-O-硫酸基転移酵素1欠損型エーラスダンロス症候群モデルマウスの病態解析. 第86回日本生化学会大会, 横浜, 9.13, 2013

- 10) 谷端 淳, 永田哲也, 齊藤 崇, 青木吉嗣, 清水裕子, 中村昭則, 武田伸一: Exon45-55 を欠失した短縮型 dystrophin の機能的役割の解明. 第68回日本体力医学会大会, 東京, 9.22, 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷端 淳 (TANIHATA Jun)

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 流動研究員

研究者番号: 00508426