

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860792

研究課題名(和文)筋ジストロフィーに対するMMP-9を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the therapy for Duchenne muscular dystrophy targeting MMP-9

研究代表者

柴 直子 (SHIBA, Naoko)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：00639289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：筋ジストロフィー患者の骨格筋変性におけるMMP-9の役割について、ジストロフィン及びMMP-9のダブルノックアウトマウス、MMP-9ノックアウトマウスを用いた骨格筋傷害モデルを用いて解析した。MMP-9は若年患者の骨格筋ではケモカインや炎症細胞の遊走に対する作用を介し炎症の収束遅延、組織変性の増悪を引き起こす一方で、高齢では間質線維成分を分解することで組織の線維化を抑制する作用が主体となることが明らかになった。MMP-9を標的とする治療は、若年患者には有効となる可能性があるが、臨床応用には治療を行う病期や投与期間を十分に検討する必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of genetic ablation of MMP-9 in the mdx mouse model (mdx/Mmp9^{-/-}). At the early disease stage, the muscles of mdx/Mmp9^{-/-} mice showed reduced necrosis and neutrophil invasion, accompanied by down-regulation of chemokine MIP-2. In addition, muscle regeneration was enhanced, which coincided with increased macrophage infiltration and upregulation of MCP-1, and resulted in increased muscle strength. The mdx/Mmp9^{-/-} mice also displayed accelerated upregulation of osteopontin expression in skeletal muscle at the acute onset phase of dystrophy. However, at a later disease stage, the mice exhibited increased fibroadipose tissue. These results showed that MMP-9 might have multiple functions during disease progression. Therapy targeting MMP-9 may improve muscle pathology and function at the early disease stage, but continuous inhibition of this protein may result in the accumulation of fibroadipose tissues and reduced muscle strength at the late disease stage.

研究分野：筋ジストロフィー

キーワード：ジストロフィン MMP-9 MCP-1 MIP-2 オステオポンチン

1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、筋ジストロフィーの最重症型で、全身の骨格筋が進行性に变性し小児期に歩行不能となり、さらには呼吸筋・心筋も傷害され 20-30 代で致命的となる X 連鎖遺伝性疾患である。発生頻度は、出生男児 3,500 人に 1 人と遺伝性筋疾患の中で最多である。DMD では、骨格筋の機械的安定性を保つために重要な膜蛋白質であるジストロフィンに欠くことにより骨格筋の脆弱性を来す。さらに再生や組織修復の障害も伴うため、壊死再生を反復する過程で筋傷害は次第に進行するが、その分子機構は不明な点が多い。

DMD の治療法としてこれまでに遺伝子治療、再生医療、エクソン・スキッピング治療などの研究開発が行われてきたがいずれも研究段階で、現時点では根本的治療法はない。ステロイド剤は、DMD の症状の進行を緩和させる効果があるが、免疫抑制作用や肥満、骨粗鬆症などの全身性の副作用が問題となり、長期的な投与が困難であるため、標的分子を絞った副作用の少ない薬剤の開発が望まれる。

我々は、従来から DMD 患者の傷害骨格筋に強発現する細胞外マトリックス分解酵素に着目してきた。DMD 患者およびそのモデルマウスである *mdx* マウスや筋ジストロフィー犬の骨格筋組織では、MMP-2 および MMP-9 の発現・活性が亢進していることを見出した。当研究室では、MMP-2 を欠損させた *mdx* マウスの病理組織学的検討から、MMP-2 が VEGF などの血管内皮増殖因子の発現を調節し、血管新生を介して再生筋線維の成長促進作用を有することを明らかにした。

一方で MMP-9 は、主にマクロファージや好中球などの炎症細胞で産生され、I・IV 型コラーゲンや基底膜成分を分解するとともに NF κ B や AP-1 などの転写因子の発現調節、TGF β などのサイトカイン産生、リン酸化酵素活性化等を介し、炎症惹起に働くことが報告されている。DMD 患者では、末梢血中の MMP-9 濃度が症状の進行に相関して高値を示すことが報告されており、筋变性の進行に MMP-9 が深く関与することが示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、DMD 患者およびそのモデル動物の骨格筋や末梢血で強発現し、症状の進行に深く関与すると推測されている細胞外マトリックス分解酵素である MMP-9 に着目し、DMD の骨格筋における働きについて、他分子との相互作用を含めて明らかにし、MMP-9 を標的とした治療の可能性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋傷害モデルでの解析

骨格筋における MMP-9 の機能を検討する目的で、野生型マウスと MMP-9 ノックアウト

マウス(MMP9^{-/-}マウス)の前脛骨筋内に cardiotoxin を注入することにより骨格筋傷害モデルを作成し、急性炎症から組織修復までの過程における局所の細胞浸潤およびケモカイン発現の変化について病理、分子生物学的手法を用いて解析した (n=4-5)。

(2) ダブルノックアウトマウスの解析

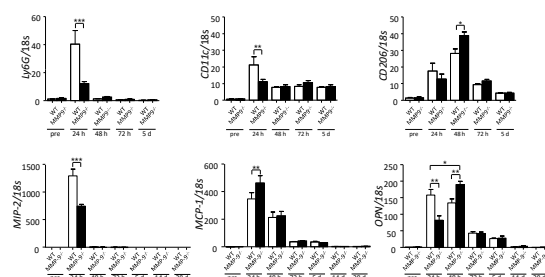
解析対象は、*mdx* マウス、*mdx*;MMP9^{+/-}マウス、*mdx*;MMP9^{-/-}マウス、MMP9^{-/-}マウス、および野生型マウス(全て C57Bl/6 系統)とした。

mdx マウスの骨格筋組織の病理学的変化は、2 週齢頃から徐々に顕在化し、8 週齢前後で顕著となるが、12 週齢以降では再生が安定しプラトーに達し、後のステージで徐々に線維化が進行する。ヒト DMD 患者に比し、筋变性や筋機能障害の進行は緩徐かつ軽症である。以上のような *mdx* マウス特有の筋变性のタイムコースの特徴を踏まえて、解析対象を 2, 4, 8, 14 週齢、1 歳齢とした。それぞれの週齢の各遺伝子型マウス (n=3) から前脛骨筋、腓腹筋、大腿四頭筋、横隔膜を摘出し、液体窒素で冷却したイソペンタンを用いて急速凍結固定、標本作成し免疫組織学的手法にて壊死、炎症、再生、線維化について各々のマーカーを用いて病理学的に解析した。さらに、凍結筋組織から mRNA および蛋白質を抽出し、炎症細胞、炎症性サイトカイン、シグナル伝達や筋の変性に関わる分子の mRNA 発現量、蛋白質量、活性レベルを RT-PCR や Western blotting, gelatin zymography などの分子生物学的手法を用いて解析を行った。

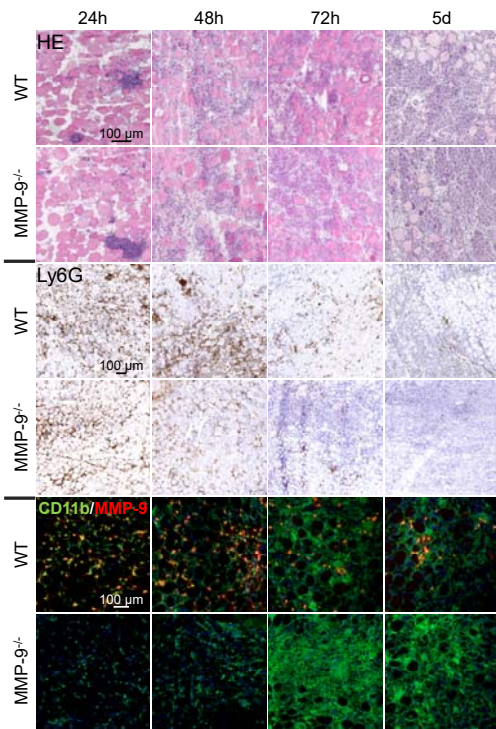
4. 研究成果

(1) 骨格筋傷害モデルの解析 [図 1, 2]

MMP-9 の欠損によりマクロファージ遊走ケモカインである MCP-1 の発現およびマクロファージ (CD11b 陽性) の浸潤が増加し、好中球遊走ケモカインである MIP-2 の発現および好中球 (Ly6G 陽性) の浸潤は減少していた。さらに再生促進作用を有する M2 マクロファージ (CD206 陽性) の浸潤は増加し、DMD の表現型の軽症化に関わるとされている osteopontin (OPN: マクロファージや壊死筋などで産生され、組織の炎症や再生を修飾する糖蛋白質) の発現増加を認めた。



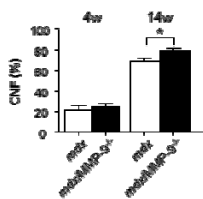
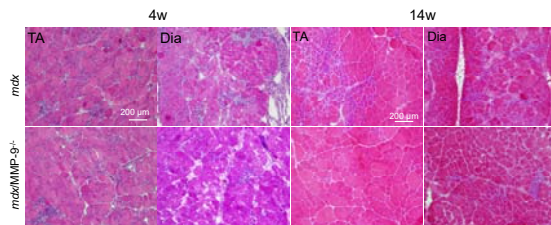
【図 1】 Cardiotoxin 投与後の組織の浸潤細胞 (好中球 (Ly6G), M1 マクロファージ (CD11c), M2 マクロファージ (CD206)), MIP-2, MCP-1, Osteopontin (OPN) の mRNA 発現レベルの経時的変化。



【図 2】
Cardiotoxin 投与後の傷害骨格筋組織像の経時的変化。

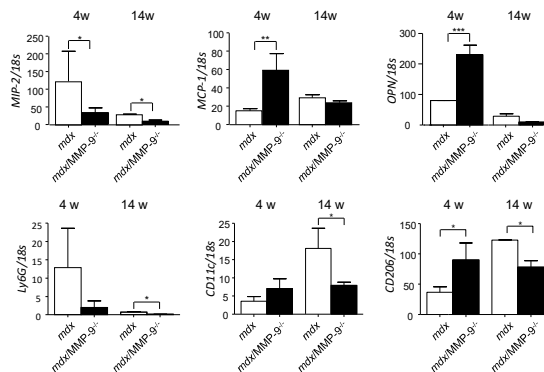
(2) ダブルノックアウトマウスの解析

4 週齢の *mdx*;*MMP9*^{-/-} マウスでは *mdx* マウスに比し MIP-2 の発現の低下, MCP-1 の発現の増加が認められ [図 4], 筋組織の炎症細胞浸潤はこれらに呼応する変化を示していた [図 3]。さらには osteopontin の一過性かつ著明な発現増加が認められた [図 4]



【図 3】
(上) 4 週齢および 14 週齢のマウスの前脛骨筋(TA)・横隔膜(Dia)の HE 染色。
(左) マウス前脛骨筋の中心核線維(再生線維)の割合。

【図 4】

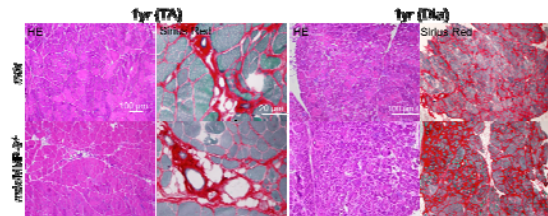


【図 4】 4 週齢及び 14 週齢のマウス前脛骨筋組織の浸潤細胞 (好中球 (Ly6G), M1 マクロファージ(CD11c), M2 マクロファージ (CD206), MIP-2, MCP-1, Osteopontin(OPN) の mRNA 発現レベル。

14 週齢の *mdx*;*MMP9*^{-/-} マウスの骨格筋では *mdx* マウスに比し再生線維が有意に増加し, 血清 CK 活性の低下と筋力の増加が確認された [図 3, 7]。

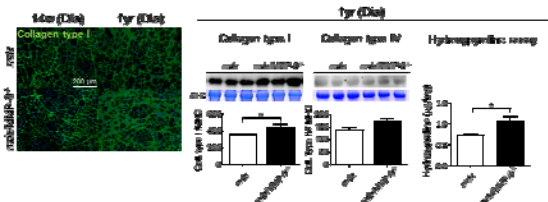
一方, 高齢マウス (1 歳齢) では, 両群間で炎症所見には大差を認めなかったが, *mdx*;*MMP9*^{-/-} マウスでは骨格筋の間質の I 型コラーゲンの蓄積が *mdx* マウスに比し有意に増加し, 筋力も低下していた [図 5-7]。

【図 5】



1 歳齢マウスの前脛骨筋(TA)・横隔膜(Dia)の HE 染色および Sirius Red 染色。

【図 6】

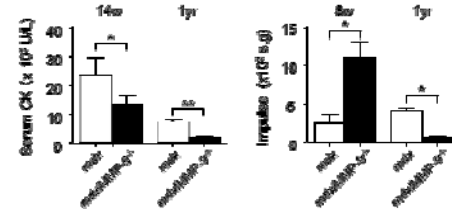


(左) 14 週齢および 1 歳齢のマウス横隔膜組織の 1 型コラーゲンの免疫染色。

(中央) 1 歳齢マウス横隔膜組織の 1 型・4 型コラーゲンのウェスタンブロット。

(右) Hydroxyproline assay.

【図 7】



(左) 14 週齢および 1 歳齢マウスの血清 CK 値。

(右) 8 週齢および 1 歳齢マウスのワイヤテストによる Impulse (筋力)。

以上の結果から *mdx* マウスの変性骨格筋における MMP-9 の主な役割は病期によって異なると考えられた。すなわち、ジストロフィー骨格筋では病初期～若年進行期には、MMP-9 がケモカインや炎症細胞の遊走に対する作用を介して組織の炎症の収束を遅延させ、組織変性・壊死を増悪させる働きを示す一方、高齢では I 型コラーゲンなどの間質にある線維成分の分解を促進し、組織の線維化を抑制する働きを有していることが明らかになった。

以上から、MMP-9 を標的分子とする治療開発では、若年例の DMD 患者には有効となる可能性があるが、臨床応用には治療を行う病期や投与期間を十分に検討する必要性が示唆された。

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 1 件)

- (1) Shiba N, Miyazaki D, Yoshizawa T, Fukushima K, Shiba Y, Inaba Y, Imamura M, Takeda S, Koike K, Nakamura A. Differential roles of MMP-9 in early and late stages of dystrophic muscles in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*. 1852: 2170-2182, 2015 (査読有り)

[学会発表] (計 3 件)

- (1) Shiba N, Miyazaki D, Yoshizawa T, Fukushima K, Imamura M, Takeda S and Nakamura A. Ablation of MMP-9 ameliorates the dystrophic phenotype by modulating chemotaxis in early stage but exacerbates fibrosis in late stage in *mdx* mice. 20th International Congress of World Muscle Society. Brighton UK. 1-4 October, 2015
- (2) 中村昭則, 柴直子, 宮崎大吾, 福島和広 「筋傷害モデルおよびジストロフィン欠損筋における MMP-9 の機能の解明」 第 56 回日本神経学会学術集会, 2015 年 5 月 20 日～23 日, 新潟
- (3) 柴直子, 宮崎大吾, 福島和広, 吉沢隆浩 「ジストロフィン欠損骨格筋における Matrix Metalloproteinase (MMP-9) の役割について」 第 9 回筋ジストロフィー治療研究合同発表会. 2014 年 11 月 1 日, 箱根

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴 直子 (SHIBA, Naoko)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：00639289

(2) 研究協力者

中村 昭則 (NAKAMURA, Akinori)

信州大学・医学部附属病院・教授 (特定雇用)
研究者番号：10303471

宮崎 大吾 (MIYAZAKI, Daigo)

信州大学・医学部附属病院・講師 (特定雇用)

研究者番号：80596370

福島 和広 (FUKUSHIMA, Kazuhiro)

信州大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：10421835

吉澤 隆浩 (YOSHIZAWA, Takahiro)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：40713392