

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591261

研究課題名(和文) 創傷治癒マウスの再生促進分子によるデュシェンヌ型筋ジストロフィー治療法の開発

研究課題名(英文) Screening of muscle regenerative molecules for Duchenne muscular dystrophy

研究代表者

大澤 裕(Ohsawa, Yutaka)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：80246511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：MRLマウスは個体識別の耳穴が完全に閉鎖するユニークな形質から発見された創傷治癒促進モデルで、その分子生物学的機構は未だ解明されていない。デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルであるmdxマウスとMRLマウスを交配してMRL導入mdxマウスを作出した。mdxマウスと比較するとマウス横隔膜の筋線維径と再生線維の割合が増加して線維化が減少した。横隔膜遺伝子発現の網羅的解析により、MRLに起因する幾つかの骨格筋再生促進遺伝子候補を見出し、そのうち2つの遺伝子は実際に筋芽細胞の筋管細胞分化を促進した。創傷治癒MRL形質に起因する骨格筋再生分子は筋ジストロフィーの新たな治療の糸口となるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：The MRL mouse shows complete closure of ear punch wounds. However, genetic and molecular mechanisms underlying the accelerated wound healing have remained largely unknown. We have mated dystrophin-deficient mdx mice with MRL mice to generate and characterize MRL-introduced mdx mice. Compared to the mdx mice, the MRL-mdx mice showed increased myofiber size and centrally-nucleated myofiber number, but decreased fibrosis in the diaphragm. By comparing the gene expression profile in diaphragm between mdx and MRL-mdx mice, we found several candidate genes contributing to the MRL-originated muscle regeneration. Among them, two genes eventually accelerating myotube formation in cultured myoblasts. Our results suggest that the introduction of the MRL wound-healer accelerates muscle regeneration by reducing muscle fibrosis, thereby becoming a novel therapeutic option for the dystrophin-deficient muscular dystrophy.

研究分野：ライフサイエンス(ゲノム)

科研費の分科・細目：ライフサイエンス(医学・医療)

キーワード：筋ジストロフィー 創傷治癒 再生医療

1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーとは筋力低下と筋萎縮を臨床型とし、骨格筋組織では、筋線維壊死と不完全再生、及び線維化・脂肪化を特徴とするジストロフィー性変化を呈する遺伝性疾患群で、治療法が皆無の難病である。これまでに遺伝子療法や幹細胞療法が疾患モデル動物に対して根治療法として試みられてきたが、その臨床応用には技術的倫理的課題が山積しているのが現状である。

一方、根治療法ではないものの筋ジストロフィーに至る骨格筋シグナル伝達異常や筋損傷機構を是正する分子標的療法も臨床応用が可能な現実的治療法として注目されている。わたしたちは分子標的療法の開発研究の過程で、創傷治癒促進モデルである MRL マウスに着目した。

MRL マウスは米国 Whister 研究所で個体識別のために穿った耳穴が約 4 週間で完全に閉鎖するユニークな形質から発見された劣性遺伝形式を示す自然変異マウスであり、その責任遺伝子は未だ同定されていない (Clark, et al. *Clin Immunol Immunopathol* 88, 35-45, 1998)。これまでに、心筋凍結創傷の治癒促進 (Leferovich, et al. *PNAS* 98, 9830-9855, 2001) 角膜アルカリ損傷の治癒促進 (Ueno, et al. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 46, 4097-4106, 2005) 切断四肢の再生 (Gourenvitch, et al. *Wound Rep Reg* 17, 447-455, 2009) といった様々な急性創傷に対する線維化を伴わない再生促進効果が明らかとなり、「哺乳類の線維化を伴わない組織完全再生」のモデルとして脚光を浴びるようになった。しかしこの創傷治癒促進の分子機構については殆ど解明がされていない (Bedelbaeva, et al. *PNAS*, 5845-5850, 2010)。わたしたちは常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 1C の原因遺伝子

産物である caveolin-3 を欠損するモデルマウスを作出し筋萎縮作用を有する TGF- β ファミリー分子であるマイオスタチンの阻害療法によって筋病変が改善することを世界に先駆け報告した (Ohsawa Y, et al. *Hum Mol Genet* 13, 151-157, 2004, Ohsawa Y, et al. *J. Clin. Inv* 116, 2924-2934, 2006, Ohsawa Y, et al. *Acta Myol* 28, 19-24, 2008)。このマイオスタチン阻害療法によって筋ジストロフィーの線維化が著減するから、組織学的な類似性により「線維化を伴わない」創傷治癒促進 MRL マウスに着目した。平成 20 年度科学研究費補助金：萌芽研究「創傷治癒形質導入による筋ジストロフィー治療効果の解析」によって MRL マウスとデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデル *mdx* マウスを交配し創傷治癒形質 MRL を導入した *mdx* マウス (MRL-*mdx*) の作出に成功した (藤野ら、川崎医学会誌 35, 295-305, 2009)。この MRL/*mdx* マウスの骨格筋は *mdx* マウスで認められた筋線維萎縮が改善し再生筋の増加と間質線維化の著減が認められた。この成果を踏まえて、まず MRL 導入による筋再生候補分子のスクリーニング、次いでこの絞り込んだ分子の筋ジストロフィー病変改善の可否を解析していく本研究を着想した。

2. 研究の目的

創傷治癒促進 MRL マウスは個体識別のための耳穴が完全閉鎖するという驚くべき表現型から発見された自然変異マウスである。わたしたちは交配によって MRL 形質を導入したデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウス (MRL-*mdx*) を作出し、筋ジストロフィーが改善することを示した。本研究はまず MRL/*mdx* マウス骨格筋の遺伝子発現解析と筋芽細胞を用いた分化アッセイによって MRL 形質による筋再生促進分子をスクリーニング

する。次いで *mdx* マウスに、この分子のウイルスによる遺伝子導入、あるいはレコンビナント蛋白質の投与を行い筋ジストロフィーの改善について検証する。創傷治癒という観点から筋ジストロフィーの新規治療法開発を目指す。また一般に両生類などの下等動物では切断肢の再生に際して切断部に“blastema”が形成されこれを起源に骨格筋や血管など様々な組織が分化し再生することが知られている。一方、哺乳類などの高等動物では創傷治癒機転が働き通常は線維化による自己再生能の阻害が起こるために完全な組織再生はあり得ないとされてきた。従って本研究が目標としている MRL 由来の線維化を伴わない再生促進分子が同定できれば、下等動物から高等動物の進化の過程で失われた自己再生機構の本質に迫るといった学術的価値がある。

3. 研究の方法

(1)横隔膜遺伝子発現の網羅的解析：わたしたちが作出した MRL-*mdx*、*mdx*、MRL、野生型の 4 種類の遺伝子型を示すマウスについて、14 週齢で横隔膜を採取して mRNA を単離し、マイクロアレイによって骨格筋遺伝子発現プロファイリングを行う。これによって MRL-*mdx* 群と *mdx* 群で発現に差異のある分子について登録する。14 週齢マウス横隔膜から mRNA を単離する。この mRNA から第 1 鎖、更に第 2 鎖 cDNA を作成し、これを鋳型にピオチンラベルされたりボヌクレオチドと T7RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写反応によってピオチン化 cRNA プローブを作成する。プローブでマウス全遺伝子マイクロアレイ(41,000 遺伝子)をスクリーニングする。*mdx* マウスと比較し MRL 導入 *mdx* マウスで遺伝子発現が上昇している遺伝子について筋再生候補分子として登録する。

(2)筋芽細胞 *in vitro* 筋分化アッセイ：筋再生候補分子をマウス筋芽細胞 C2C12 にウイルスベクターで導入する筋管細胞分化効率に

ついて解析し候補分子をスクリーニングする。候補分子群の cDNA を PCR 法で増幅してレトロウイルス発現ベクター pMXs-IRES-GFP にクローニングする。このベクターを PLAT-E パッケージング細胞ヘトランスフェクションしウイルスを抽出する。

C2C12 細胞に感染させて各分子を発現させる。得られた筋芽細胞について、それぞれ低濃度ウマ血清培地による分化誘導アッセイを行う。単筋芽細胞から多核筋管細胞への分化促進作用について Wright-Giemza 染色による筋管細胞融合指数、筋細胞分化マーカー胎児 myosin heavy chain (eMyHC), myogenin, creatine kinase によるウエスタンブロットによって定量的に検討する。

(3)レコンビナント蛋白質の作成と *mdx* マウスへの投与：絞り込まれた筋再生候補分子とヒト免疫グロブリンの Fc 部分を融合した可溶性レコンビナント融合蛋白質を作成してデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウスに投与する。pcDNA3.1-Fc 蛋白発現プラスミドを CHO 細胞にトランスフェクションし細胞の可溶画分からプロテイン A カラムで融合蛋白質を精製する。4 週齢 *mdx* マウス (n=20, 雄、雌) 腹腔内にレコンビナント蛋白質を、それぞれ連日ないし一回投与を行う。投与群マウスについて、4 週齢から 16 週齢まで経時的に生理学的解析(体重・握力)を行っていく。非投与群と比較して成長抑制・筋力低下が改善するか否かについて評価する。投与前(4 週齢) 8 週齢、及び 16 週齢で横隔膜と大腿四頭を採取する。投与群において筋萎縮・筋線維化・筋張力減少の改善が得られるか否かについて生理生化学的解析(筋重量測定、血清 CK 値測定、骨格筋ヒドロキシプロリン含有量の HPLC 解析、筋テタニー刺激による張力計測)を行う。骨格筋組織学的な解析(単一筋線維断面積、中心核再生線維比率、線維化間質量計測)によってジストロフィー変化が改善しているか

を定量的に検討し筋ジストロフィー再生促進分子を同定する。

4. 研究成果

(1)横隔膜遺伝子発現解析：4.1 万の遺伝子を搭載したマイクロアレイを用いて14週齢マウス横隔膜の遺伝子発現を解析した。これにより *mdx* マウスと比較して MRL-*mdx* で発現が3倍以上に上昇した遺伝子群125個、3倍以下に低下した遺伝子246個が得られた。このうち実際の遺伝子発現をノザンプロット解析で確認した42個を骨格筋再生促進の候補遺伝子として登録した。機能が既知の遺伝子が28個、未知の遺伝子が14個に内訳された。線維化学抑制という観点からわたしたちが注目している TGF-βファミリー関連分子は6個あり、このうち p21(Cdkn1a)は MRL マウスで野生型と比較して5倍以下に発現低下、一方、*mdx* マウスでは7倍以上に発現が上昇し、MRL-*mdx* マウスでは *mdx* マウスと比較して3倍以下の発現低下が認められた。

(2) *in vitro* 筋分化アッセイ：筋再生候補遺伝子42個のうち TGF-βファミリー関連分子6個を選択してマウス筋芽細胞 C2C12 にウイルスベクターで導入した。低濃度ウマ血清培地による分化誘導アッセイでは、2個の分子が筋管細胞融合指数の上昇と、筋細胞分化マーカー-myosin heavy chain (eMyHC), myogenin, creatine kinase の発現上昇を示し、*in vitro* 筋分化の促進作用が明らかとなった。

(3) 可溶性リコンビナント融合蛋白質の作成と *mdx* マウスへの投与：絞り込まれた2個の TGF-β関連筋再生候補分子について、C-末端にヒト免疫グロブリンの Fc 部分を付加した発現ベクターを作成した。CHO 細胞にトランスフェクションし細胞の可溶画分からプロテインAカラムで可溶性リコンビナント融合蛋白質融合蛋白質を精製した。4週齢 *mdx* マウス腹腔内にレコンビナント蛋白質を、それぞれ連日投与し生理学的解析(体重・握力)を行っている。これまでに結果では非投与群

と比較して成長抑制・筋力低下が改善している。現在、張力、骨格筋ジストロフィー性変化について解析中で、これらの MRL 創傷治癒形質由来の分子が筋ジストロフィーの骨格筋再生促進を惹起するか検討している。

本研究では MRL 創傷治癒形質導入によるデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウスの改善機構の解析から TGF-β関連の2種類の筋再生促進候補分子を絞り込んだ。今後は、その臨床応用を目指し、リコンビナント蛋白質のモデルマウスへの投与による、有効性と安全性の証明に取り組む。

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9件)

Song YZ, Zhang ZH, Lin WX, Zhao XJ, Deng M, Ma YL, Guo L, Chen FP, Long XL, He XL, Sunada Y, Soneda S, Nakatomi A, Dateki S, Ngu LH, Kobayashi K, Saheki T. SLC25A13 gene analysis in citrin deficiency: sixteen novel mutations in East Asian patients, and the mutation distribution in a large pediatric cohort in China. *PLoS One*. (査読有)8(9):e74544, 2013

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*. (査読有)8(5): e64719, 2013

Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno SI, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H. Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular A and Differential

Drug Responsiveness. *Cell Stem Cell*. (査読有)12(4): 487-496, 2013

Murakami T, Iwanaga T, Ogawa Y, Fujita Y, Sato E, Yoshitomi H, Sunada Y, Nakamura A. Development of sensory neuropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Brain and Behavior*. (査読有) 3(1): 101-107, 2012

Rikimaru M, Ohsawa Y, Alexander M. Wolf, 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. *Internal medicine*. (査読有) 51(24): 3351-3357, 2012

Ohsawa Y, Fujino M, Nishimatsu S, Rikimaru M, Hayashi S, Sunada Y. Muscle-specific overexpression of caveolin 3 causes muscle atrophy, but not muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. (査読有)22(9-10): 834, 2012

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. *Laboratory Investigation*. (査読有)92(8): 1100-1114, 2012

Murakami T, Sunada Y. Plasmid DNA Gene Therapy by Electroporation : Principles and Recent Advances. *Current Gene Therapy*. (査読有)11(6): 447-456, 2011

Kuga A, Ohsawa Y, Okada T, Kanda F, Kanagawa M, Toda T, Sunada Y. Endoplasmic reticulum stress response in P104L mutant caveolin-3 transgenic mice. *Hum Mol Genet*. (査読有) 20(15): 2975-2983, 2011

[学会発表](計 20 件)

大澤 裕. TGF-beta 阻害低分子医薬による筋消耗性疾患とメタボリック症候群の治療戦略. 第 31 回日本神経治療学会総会, 22, 11, 2013, 東京

Sunada Y, Rikimaru M, Ohsawa Y, Murakami T, Nishimatsu S, Hagiwara H, Ohta S. Taurine ameliorates mitochondrial dysfunction and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. XXI World Congress Of Neurology, 22, 9, 2013, Vienna, Austria

Ohsawa Y, Nishimatsu S, Fujino M, Hagiwara H, Hinohara A, Sunada Y. Inverse regulation of myogenesis and adipogenesis by caveolin-3 through type I TGF- receptor kinase. EMBO Workshop - Molecular Mechanisms of muscle growth and wasting in health and disease, 15-20, 9, 2013, Ascona, Switzerland

大澤 裕. TGF-beta シグナル制御による筋消耗性疾患治療法の開発, 第 54 回日本神経学会学術大会, 31, 5, 2013, 東京

村上龍文, 三五一憲, 渡部和彦, 大澤裕, 李 正花, 山村研一, 砂田芳秀. ヒト異型トランスサイレチン遺伝子を発現する不死化シュワン培養細胞の確立, 第 54 回日本神経学会学術大会, 30, 5, 2013, 東京

大澤 裕、力丸満恵、砂田芳秀. 低分子 T RI キナーゼ阻害剤による骨格筋消耗性疾患の薬物治療への展望, 30, 11, 2012, 福岡

砂田芳秀. 診療・治療の最前線 4 「筋ジストロフィーの分子治療」, 29, 11, 2012, 福岡

村上龍文, 岩永崇志, 小川芳尚, 藤田吉明, 佐藤英治, 吉富博則, 砂田芳秀, 中村明弘. ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスの感覚ニューロパチーの発現, 第 35 回日本神経科学大会, 20, 9, 2012, 名古屋

Ohsawa Y, Nishimatsu S, Sunada Y. Caveolin-3 controls satellite cells and myoblasts through type I TGF-beta receptor kinase. FASEB Science Research Conferences SKELETAL MUSCLE SATELLITE AND STEM CELLS, 16, 8, 2012, Lucca, ITALY

Ohsawa Y, Nishimatsu S, Sunada Y. Caveolin-3 controls satellite cells and myoblasts through type I TGF-beta receptor kinase. FASEB Science Research Conferences SKELETAL MUSCLE SATELLITE AND STEM CELLS, 16, 8, 2012, Lucca, ITALY

Ohsawa Y, Nishimatsu S, Sunada Y. Roles of the caveolin-3-transforming growth

factor-beta axis in skeletal myogenesis and muscle atrophy.
DEVELOPMENT, FUNCTION AND REPAIR OF THE MUSCLE CELL Society for Muscle Biology, 7,6,2012, New York, USA

村上 龍文, 小川 芳尚, 岩永 崇志, 藤田 吉明, 佐藤 英治, 吉富 博則, 中村 明弘, 砂田 芳秀. ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスのニューロパチーの検討: 小径線維障害について, 第 53 回日本神経学会学術大会, 25,5,2012, 東京

大澤 裕, 力丸 満恵, 林 紗織, 村上 龍文, 砂田 芳秀. 直接リプログラミング戦略による筋ジストロフィーの再生療法, 第 53 回日本神経学会学術大会, 24,5,2012, 東京

Murakami T, Ohsawa Y, Watabe K, Zhenghua L, Yamamura K, Sunada Y. Transthyretin gene expression in Schwann cells of peripheral nerves, 第 8 回 FAP 国際シンポジウム, 19,11,2011, 熊本

Ohsawa Y, Fujino M, Okada T, Nishimatsu S, Rikimaru M, Hayashi S, Sunada Y. Sarcolemmal nNOS prevents muscular wasting in a caveolin-3-deficient limb-girdle muscular dystrophy 1C model. INTERNATIONAL CONFERENCE ON MUSCLE WASTING 2011, MOLECULAR MECHANISMS OF MUSCLE GROWTH AND WASTING IN HEALTH AND DISEASE, 18-23-September 2011, Switzerland

村上龍文, 大澤 裕, 渡部和彦, 李 生花, 山村研一, 砂田芳秀. 末梢神経系でのトランスサイレチン遺伝子発現の再検討, 第 34 回日本神経科学大会-こころの脳科学-, 17,5,2011, 横浜

村上龍文, 岩永崇志, 小川芳尚, 藤田吉明, 佐藤英治, 吉富博則, 中村明弘, 砂田芳秀. ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスでのニューロパチー発現機序の検討: 神経成熟・成長障害の関与について, 第 22 回日本末梢神経学会学術集会, 2,9,2011, 沖縄

砂田芳秀. 筋ジストロフィー研究の現状, 第 52 回日本神経学会学術大会, 22,5,2011, 名古屋

村上 龍文. PIGF-2 遺伝子治療はマウスの糖尿病性感覚ニューロパチーを改善させる, 第 52 回日本神経学会学術大会, 19,5,2011, 名古屋

大澤 裕. direct reprogramming による筋

細胞の樹立と筋ジストロフィー治療への応用, 第 52 回日本神経学会学術大会, 19,5,2011, 名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: マイオスタンチン阻害ペプチド
発明者: 大澤 裕, 砂田芳秀, 林 良雄, 他 6 名
権利者: 学校法人川崎学園・学校法人東京薬科大学
番号: PCT/JP2014/052345
出願年月日: 平成 26 年 1 月 31 日
国内外の別: 国外

名称: マイオスタンチン阻害ペプチド
発明者: 大澤 裕, 砂田芳秀, 林 良雄, 他 6 名
権利者: 学校法人川崎学園・学校法人東京薬科大学
番号: 特願 2013-17540
出願年月日: 平成 25 年 1 月 31 日
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 裕 (OHSAWA YUTAKA)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号: 80246511

(2) 研究分担者

砂田 芳秀 (SUNADA YOSHIHIDE)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00240713

村上 龍文 (MURAKAMI TATSUFUMI)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 30330591