

令和元年6月6日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08726

研究課題名(和文)筋ジストロフィー病態における細胞内Ca²⁺動態の解明と新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Truncated dystrophin ameliorates the dystrophic phenotype of mdx mice by reducing sarcolipin-mediated SERCA inhibition.

研究代表者

谷端 淳 (Tanihata, Jun)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00508426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)はジストロフィンが欠失し、筋細胞膜が脆弱で細胞外からのCa²⁺流入の影響を受けやすく、この細胞質へのCa²⁺流入は慢性炎症や進行性の再生不良を惹き起こす。そこで我々は細胞内Ca²⁺動態を制御することでDMD病態を改善することを目指し、研究を行った。その結果、DMD病態ではSERCA機能が低下していることで、細胞内Ca²⁺濃度が上昇していること、このSERCA機能の低下にはその機能を負に調節するサルコリピン(SLN)が発現増加することが原因であることが明らかになった。そこでSLNが発現しないDMDモデルマウスを作出したところ、DMD病態が改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

明確な治療法が確立されていないDuchenne型筋ジストロフィーに対して、現在推進されていることは欠失しているジストロフィンを補う・代償することを目指しているが、本研究はそれら方向性とは異なり、細胞内のCa²⁺動態に着目した研究である。ジストロフィンの補填・代償する治療方法と併用することでより効果的な治療効果が得られることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Duchenne muscular dystrophy (DMD), the most common and severe form of muscular dystrophy in childhood, is caused by dystrophin deficiency. Absence of dystrophin has been shown to lead to an increased Ca²⁺ influx and an abnormal cytosolic Ca²⁺ homeostasis of myofibers, leading to increased necrosis. Several underlying mechanisms have been suggested to cause this abnormal cytosolic Ca²⁺ regulation in dystrophic muscle. Therefore, the aim of this study is to identify new therapeutic targets based on cytosolic Ca²⁺ regulation for DMD. We found that sarcolipin, an intrinsic inhibitory sarcoplasmic reticulum protein of SERCA, is abnormally high in the dystrophic muscle. In this study, we determined the physiological relevance in DMD following loss-of function by sarcolipin gene deletion. Knockdown of SLN ameliorated the cytosolic Ca²⁺ homeostasis and the dystrophic phenotype in DMD mice model. These findings suggest that SLN may be a novel target for DMD therapy.

研究分野：骨格筋生理学

キーワード：Duchenne型筋ジストロフィー 筋小胞体 SERCA サルコリピン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

致死性の筋疾患である Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する治療法は開発されていない。また、現在、臨床治験が進んでいるエクソン・スキップ治療は個別化医療に留まるので、新たな病態解明とその分子を標的とした治療法の開発が望まれている。申請者らはジストロフィン遺伝子のエクソン (Ex.)45-55 が欠失している BMD 患者の骨格筋症状は極めて軽微であることを見出した。そこで新たに Ex. 45-55 を欠失した短縮型ジストロフィンのみが発現するマウス ($\Delta 45-55Tg/mdx$) を作出した。同マウスでは筋細胞膜が安定し、筋病理所見や筋機能は DMD モデルマウスの *mdx* マウスと比較して野生型と遜色のないレベルまで回復していた。一方、ジストロフィン糖タンパク質複合体 (DGC) に含まれる神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) は通常細胞膜に局在するものの、*Tg/mdx* では細胞質に局在していた。このことは Ex. 45-55 を欠失した場合、nNOS の結合領域を一部欠くためと考えられる。一方、*mdx* はジストロフィン欠失に伴い細胞膜に局在できなくなった nNOS やマクロファージ等の浸潤細胞由来の iNOS が産生する NO が筋小胞体 (SR) のリアノジン受容体 (RyR1) をニトロシル化し、RyR1 が leaky になることで細胞内 Ca^{2+} 濃度が恒常的に高い。そこで *Tg/mdx* について検討すると、*mdx* と同程度 RyR1 がニトロシル化されていた。一方、*Tg/mdx* の細胞内 Ca^{2+} 濃度は野生型より高いものの、*mdx* と比較して低値で両群の中間の値を示した。意外なことに *caffeine* で RyR1 を刺激すると *Tg/mdx* におけるその応答性は *mdx* より高く、野生型と同程度保たれていた。以上から推測されるのは *Tg/mdx* と *mdx* との間で①細胞質から SR に Ca^{2+} を取り込む役割を担う SERCA の機能が異なること、②SERCA 機能の違いにより SR 内の Ca^{2+} 量が異なることであり、このことが DMD と BMD といった重症度の違いを反映していることである。実際、*mdx* では SERCA 機能が野生型と比較して有意に低下していること、SERCA を過剰発現させると筋ジストロフィー症状が改善するという報告もある。

2. 研究の目的

SR を介した細胞内 Ca^{2+} 動態を標的とした新たな治療法の開発である。具体的には SERCA 機能の改善を目指し、筋ジストロフィー病態の主要因である細胞内 Ca^{2+} 動態を制御することで DMD 病態が改善するかを検討する。

3. 研究の方法

SERCA 機能を調節する因子としてその機能を抑制的に制御する sarcolipin (SLN) をターゲットとする。SLN の発現を抑制することで DMD 病態の改善を目指すことを目的とし、以下の研究を行った。

(1) *mdx* 由来の筋芽細胞を採取し、筋分化誘導時に siRNA を用いて SLN の発現を抑制し、筋管形成後に *caffeine* 刺激を行った際、

- ① RyR1 機能がどのように変化するか、
- ② 細胞質へ放出された Ca^{2+} の SR への再取り込み時間が改善するかを検討する。

(2) SLN knock out (KO) マウスと *mdx* とを交配させ、SLN KO/*mdx* を作出し、筋病理、筋機能、細胞内 Ca^{2+} 動態解析を行う。

4. 研究成果

(1) *Tg/mdx*、*mdx* における SLN ならびに他の SERCA 調節因子の発現レベルの検討

各マウス前脛骨筋から RNA を抽出し、SLN と SERCA 調節因子である myoregulin (MLN) の発現を検討した (図 1)。その結果、MLN の発現は野生型と比較して *Tg/mdx*、*mdx* とともに大きな変化は認められないものの、SLN の発現が *mdx* のみ有意に増加しており、*mdx* で認められる SERCA 機能の低下はその機能を負に制御する SLN の発現増加に起因することが示唆された。

(2) SLN の発現抑制による SERCA 機能・RyR1 の Ca^{2+} 放出能の検討

mdx 骨格筋に対して siRNA を用いて SLN の発現を抑制すると SERCA 機能と、RyR1 の機能が如何に変化するかを野生型、*mdx* マウスから採取した筋芽細胞を用いて *in vitro* レベルで検討した。SLN に対する siRNA の効率を図 2 に示す。*mdx* 筋芽細胞における SLN に対する siRNA の抑制効果は十分でありことが示された。

そこで、SLN の発現を抑制した *mdx* 由来筋芽細胞に対し、*caffeine* を用いて RyR1 を刺激し、その Ca^{2+} 放出能とその後の SERCA 機能を検討した。その結果を図 3 に示す。

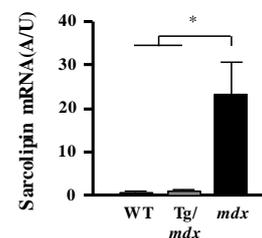


図 1. SLN の発現レベル

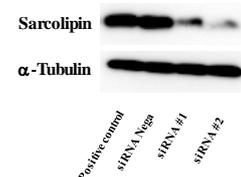


図 2. SLN に対する siRNA の抑制効果

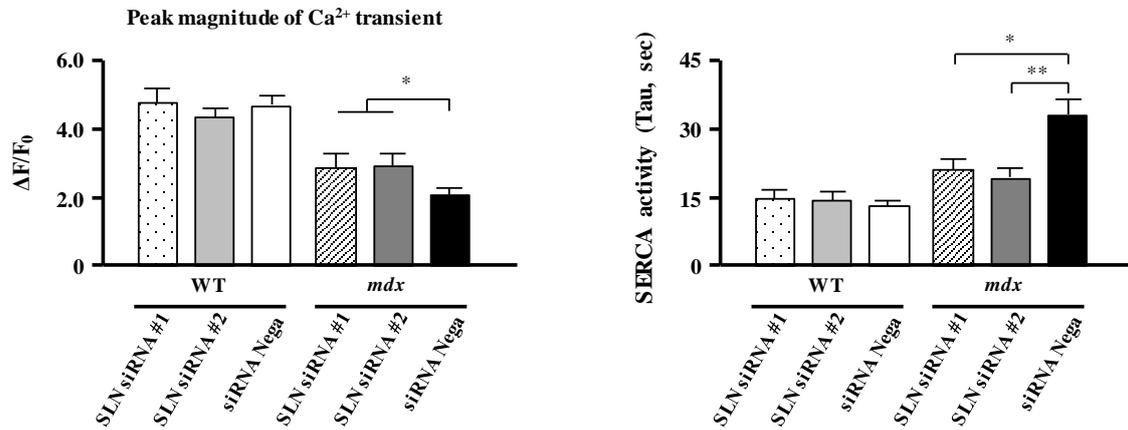


図 3. SLN 抑制による RyR1 機能と

SLN 抑制により、mdx 筋芽細胞の RyR1 の Ca²⁺放出能は回復し、SERCA の細胞質から筋小胞体への Ca²⁺取り込み能も有意に回復した。

(3) *In vivo* レベルにおける SLN の発現抑制による DMD 病態改善へのチャレンジ

In vitro レベルの検討により、SLN の発現抑制が SERCA 機能を改善し、mdx で認められるニトロシル化された RyR1 の機能改善にも寄与することが示唆されたことより、*in vivo* レベルにおける SLN 抑制が DMD 病態を改善するかを SLN KO マウスと mdx マウスを交配させ、SLN KO/mdx マウスを作出し、筋機能、筋病理像が改善するか否かを検討した。その結果、mdx マウスに対する SLN の発現抑制により、血清 CK 値の減少、筋機能の改善が認められた (図 4)。

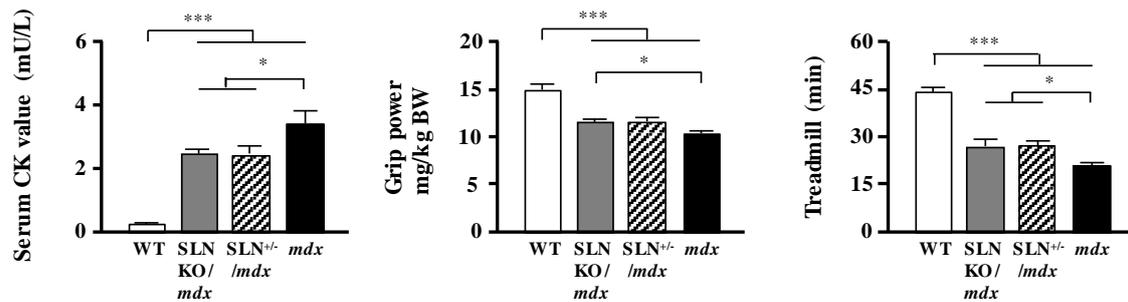


図 4. SLN KO/mdx マウスの血清 CK 値並びに筋機能測

次に、HE 染色により筋病理所見 (図 5) と筋変性の指標となる中心核線維の割合 (図 6) を検討した結果を示す。

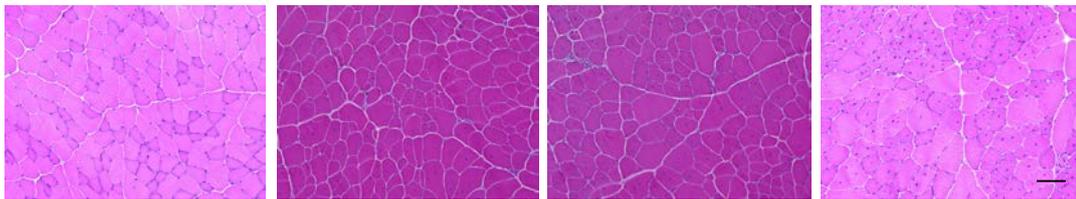


図 5. SLN KO/mdx マウスの HE 染色像

その結果、mdx に比べて中心核線維の割合は減少し、筋病理所見は若干の改善を認めたものの、野生型レベルまでの改善は認められなかった。

最後に mdx に対する SLN 抑制が筋細胞膜の安定性に関与するか否かを Evans blue dye を用いて検討した (図 7)。

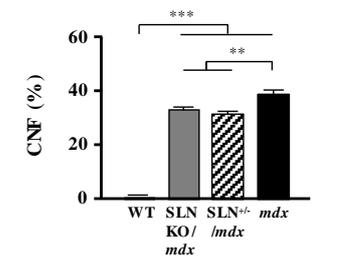


図 6. SLN KO/mdx マウスの中心核線維の割合染色像

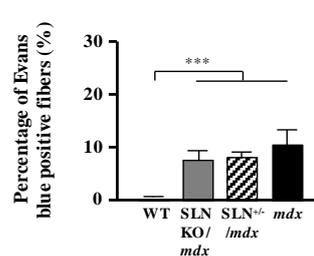


図 7. SLN KO/mdx マウスの Evans blue 陽性線維の割合

In vitro、*In vivo* レベルの検討により、SLN の発現抑制により細胞内の Ca²⁺動態を制御することが出来れば、筋ジストロフィー病態の改善がすることが明らかとなった一方で、DMD 病態の発症の要因となる筋細胞膜の安定性には関与しなかった。したがって、最善の方法として現在、DMD に対する治療法として最善と考えられているエクソン・スキップ治療と SLN の発現抑制を併用することで、より高い治療効果が得られると考えられる。また、今後は SLN の発現調節機構の解明により、SLN の発現を抑制する方法の解明を目指す必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- 1) Hosokawa M, Takeuchi A, Tanihata J, Iida K, Takeda S, Hagiwara M: Loss of RNA-binding protein Sfpq causes long-gene transcriptopathy in skeletal muscle and severe muscle mass reduction with metabolic myopathy. *iScience*, 2019
- 2) Shibasaki H, Imamura M, Arima S, Tanihata J, Kuraoka M, Matsuzaka Y, Uchiumi F, Tanuma SI, Takeda S: Characterization of a novel microRNA, miR-188, elevated in serum of muscular dystrophy dog model. *PLoS One*, 14: e0211597, 2019
- 3) Masaki Y, Yamamoto K, Inde T, Yoshida K, Maruyama A, Nagata T, Tanihata J, Takeda S, Sekine M, Seio K: Synthesis of 2'-O-(N-methylcarbamoyl)ethyl-5-methyl-2-thiouridine and its application to splice-switching oligonucleotides. *Bioorg Med Chem Lett*, 29: 160-163, 2019
- 4) Tanihata J, Nagata T, Ito N, Saito T, Nakamura A, Minamisawa S, Aoki Y, Ruegg UT, Takeda S: Truncated dystrophin ameliorates the dystrophin phenotype of mdx mice by reducing sarcolipin-mediated SERCA inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, 505: 51-59, 2018
- 5) Wada E, Tanihata J, Iwamura A, Takeda S, Hayashi KY, Matsuda R: Treatment with the anti-IL-6 receptor antibody attenuates muscular dystrophy via promoting skeletal muscle regeneration in dystrophin-/utrophin-deficient mice. *Skeletal Muscle*, 7: 23, 2017
- 6) Hyzewicz J, Tanihata J, Kuraoka M, Nitahara-Kasahara Y, Beylier T, Ruegg UT, Vater A, Takeda S: Low-Intensity Training and the C5a Complement Antagonist NOX-D21 Rescue the mdx Phenotype through Modulation of Inflammation. *Am J Pathol*, 187: 1147-1161, 2017
- 7) Matsuzaka Y, Tanihata J, Komaki H, Ishiyama A, Oya Y, Ruegg U, Takeda SI, Hashido K: Characterization and Functional Analysis of Extracellular Vesicles and Muscle- Abundant miRNAs (miR-1, miR-133a, and miR-206) in C2C12 Myocytes and mdx Mice. *PLoS One*, 11: e0167811, 2016
- 8) Suzuki H, Aoki Y, Kameyama T, Saito T, Masuda S, Tanihata J, Nagata T, Mayeda A, Takeda S, Tsukahara T: Endogenous Multiple Exon Skipping and Back-Splicing at the DMD Mutation Hotspot. *Int J Mol Sci*, 17: 1722, 2016

〔学会発表〕(計 35 件) 国際学会のみ記載

- 1) Tanihata J, Nagata T, Ito N, Saito T, Nakamura A, Minamisawa S, Aoki Y, Urs T, Takeda S: Truncated dystrophin ameliorates the dystrophic phenotype by sarcolipin-mediated SERCA inhibition. FAOPS 2019. Kobe, Japan, 2019
- 2) Tanihata J, Nagata T, Ito N, Saito T, Nakamura A, Minamisawa S, Aoki Y, Takeda S: Cytosolic Ca²⁺ Dynamics Through the SR is Associated with Pathology of

- Muscular Dystrophy. 20th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease (CaBP20). Awajishima, Japan, 2017
- 3) Takizawa H, Hara Y, Miyatake S, Tanihata J, Mizobe Y, Saito T, Takeda S, Aoki Y: Functional analysis of MyoD-transduced fibroblasts and urine-derived cells from healthy individual and patients with Duchenne muscular dystrophy. XXII World Congress of Neurology, Kyoto, Japan, 2017
 - 4) Tanihata J, Nagata T, Ito N, Saito T, Nakamura A, Minamisawa S, Aoki Y, Takeda S: Cytosolic Ca²⁺ dynamics through the SR is associated with pathology of muscular dystrophy. 第3回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会, 東京, 2017
 - 5) Tanihata J, Nagata T, Ito N, Nakamura A, Aoki Y, Takeda S: Cytosolic Ca²⁺ dynamics through the SR is associated with pathology of muscular dystrophy. Development and Homeostasis of Skeletal Muscle in Health and Disease. Society for muscle biology, Asilomar, CA, USA, 2016
 - 6) Teramoto N, Sugihara H, Nakamura K, Shiga T, Tanihata J, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M: Pathological evaluation of rats carrying CRISPR/Cas-9-mediated in-frame mutation in dystrophin gene. FASEB science research conference "Skeletal Muscle Satellite Cells and Regeneration" Keystone, CO, USA, 2016
 - 7) Hyzewicz J, Tanihata J, Kuraoka M, Kasahara Y, Takeda S: Low intensity training increases the infiltration of immune cells in skeletal muscle of mdx mice. 45th European Muscle Conference, Montpellier, France, 2016
 - 8) Hosokawa M, Takeuchi A, Tanihata J, Takeda S, Hagiwara M: The RNA-binding protein Sfpq regulates extra-long gene expression that is essential for skeletal muscle development. The 2016 joint annual meeting of the RNA Society and the RNA Society of Japan, RNA meeting. Kyoto, Japan, 2016
 - 9) Wada E, Tanihata J, Iwamura A, Takeda S, Hayashi Y, Matsuda R: Anti-IL-6R antibody attenuates muscular dystrophy via promoting muscle regeneration in dKO mice. The New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle Conference, Orlando FL, USA, 2016

〔図書〕(計 5 件)

- 1) 谷端 淳, 野口 悟: 骨格筋の機能解析 (筋肥大・萎縮誘導モデル, 運動・筋機能評価, 筋張力測定). 実験医学 増刊 超高齢社会に挑む骨格筋のメディカルサイエンス (武田伸一編), pp. 211-214, 羊土社・東京 (2018)
- 2) 谷端 淳, 武田伸一: 骨格筋内の遺伝子調節を介した全身のエネルギー代謝制御機構. Clin Calcium 運動器-エネルギー代謝関連 (山内 敏正編), 28 (1): 23-29, 医薬ジャーナル社・東京 (2018)
- 3) 谷端 淳, 武田伸一: 筋ジストロフィー病態における細胞内 Ca²⁺動態. Clin Calcium メカノバイオサイエンス-力の科学と医療の最前線- (中島 友紀編), 26 (12): 1677-1683, 医薬ジャーナル社・東京(2016)
- 4) 伊藤尚基, 谷端 淳, 武田伸一: 骨格筋の表現型解析. 実験医学別冊 マウス表現型解析スタンダード, (伊川正人, 高橋 智, 若菜茂晴編), pp. 169-176, 羊土社・東京

(2016)

- 5) Tanihata J, Takeda S: Changes in cytosolic Ca²⁺ dynamics in the sarcoplasmic reticulum associated with the pathology of Duchenne muscular dystrophy. *J Phys Fitness Sports Med*, 5: 309-312, 2016

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：武田 伸一

ローマ字氏名：TAKEDA Shin'ichi

所属研究機関名：国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター

部局名：神経研究所 遺伝子疾患治療研究部

職名：部長

研究者番号 (8桁)：90171644

研究分担者氏名：青木 吉嗣

ローマ字氏名：AOKI Yoshitsugu

所属研究機関名：国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター

部局名：神経研究所 遺伝子疾患治療研究部

職名：室長

研究者番号 (8桁)：80534172

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。