

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08346

研究課題名(和文) 中枢神経機能障害に着目した福山型筋ジストロフィーの治療法開発研究

研究課題名(英文) Research and development of therapeutic methods for Fukuyama congenital muscular dystrophy focusing on central nervous system dysfunction

研究代表者

岡崎 哲也 (Okazaki, Tetsuya)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30465299

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)：福山型筋ジストロフィー(FCMD)では中枢神経症状が知られている。FCMD疾患モデルマウスの筋組織ではmTOR経路の障害が生じていると考えられ、mTOR阻害剤投与により、筋の組織学的改善を示したとの研究報告がある。FCMDの中枢神経障害にもmTOR経路異常が関与している可能性があり、本研究の目的は中枢神経症状へのmTOR経路異常の関与を解明し、治療法の開発に結びつけることとした。SH-SY5Y細胞のFKTN遺伝子をsiRNAでノックダウンし解明を試みたが免疫染色以外の方法での実証ができなかった。中枢神経系での異常がない可能性の他、モデル細胞等実験対象の問題も課題として挙げられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経ではなく筋組織でmTOR異常を示した報告は新たにみられている(Experimental Physiology, 2020)。今回、福山型筋ジストロフィーの中枢神経症状におけるmTOR異常の関与につき細胞実験での実証を試みるも確認ができなかった。これまでの実験を踏まえ、モデル細胞等実験対象の検討が課題として挙がると考えている。

研究成果の概要(英文)：Central nervous system symptoms are known for Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD). It is considered that the muscle tissue of FCMD model mice has a dysfunction of mTOR pathway, and there is a research report that administration of an mTOR inhibitor showed histological improvement of the muscle. It is possible that mTOR pathway dysfunction are also involved in FCMD central nervous system disorders, and the purpose of this study was to elucidate the involvement of mTOR pathway abnormalities in central nervous system and to link them to the development of therapeutic methods. We tried to elucidate the FKTN gene of SH-SY5Y cells by knocking it down with siRNA, but we could not demonstrate it by any method other than immunostaining. In addition to the possibility that there are no abnormalities in the central nervous system, problems with experimental subjects such as model cells were also raised as issues.

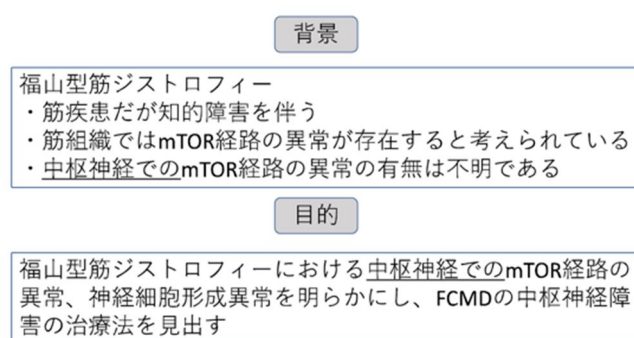
研究分野：小児神経

キーワード：福山型筋ジストロフィー

1. 研究開始当初の背景

福山型筋ジストロフィー (**FCMD**) は、国内の先天性筋ジストロフィーの中で最も患者数が多い疾患である。筋疾患に分類されるが、ほぼ全例で中枢神経症状として知的障害を認める。中枢神経の所見として、大脳皮質形成異常が知られている。**FCMD** 以外の大脳皮質形成異常では、**mTOR** 経路の異常が病態に強く関与していることが分かってきている。**FCMD** 同様に知的障害、大脳皮質形成異常を来す結節性硬化症 (**TSC**) では、合併する腎血管筋脂肪腫などに保険適応となっている **mTOR** 阻害剤が、てんかんにも効果があり、米国ではてんかんへの治療が **2018** 年 **4** 月に **FDA** 承認となった。**FCMD** の皮質形成異常と **mTOR** 経路の関係は不明だが、コンディショナルノックアウトマウスの筋組織では **mTOR** 経路の障害 (**mTORC1** 活性上昇) が生じていると考えられ、**mTOR** 阻害剤投与により、筋の組織学的改善を示した報告が **2016** 年に発表された (**Seteven J Foltz et al. Skeletal Muscle. 2016**)。FCMD の中枢神経障害にも **mTOR** 経路異常が関与している可能性がある。**TSC** では神経突起の過剰伸張といった神経細胞の形成異常が知られている (**Florin Floricel et al. Brain and Development. 2007**)。FCMD でも神経突起の増加があるとの報告 (**Saito Y et al. Acta Neuropathologica. 1999**) があり、類似した病態が生じている可能性がある。

図1：研究の概要



2. 研究の目的

本研究では **FCMD** の中枢神経障害に関する **mTOR** 経路を中心とした分子メカニズムを明らかにし、**mTOR** 阻害薬などによる治療法の可能性を検討することを目的とした。**FCMD** の中枢神経病変で **mTOR** 経路に注目した研究は現時点ではなく、**FCMD** の中枢神経での **mTOR** 経路異常、そして神経細胞形成異常の病態を明らかにすることで、他疾患の治療候補薬の **FCMD** への応用や、新たな治療法を見出すことができると考えられる。

3. 研究の方法

以下の方法を用いて **FCMD** モデル神経細胞での **mTOR** 異常の実証を試みることにした。

(1) **FCMD** 疾患モデル細胞として、ヒト由来培養神経細胞の **FKTN** を **siRNA** でノックダウンした細胞を用いる。既知の **mTOR** 経路に關与するタンパク発現を、抗体を用いた免疫染色、ウエスタンブロット法、リアルタイム **PCR** 等で確認し、**mTOR** 異常ならびにその部位を明らかにする。具体的には、はじめに筋組織で報告がある **mTOR** シグナルの上流分子の **Akt** に着目し、**Akt** のリン酸化状態をウエスタンブロット法により明らかにする。次に、**mTORC1** シグナル経路について、**mTOR**、または **TSC1/TSC2** のリン酸化状態、及び **mTOR** の下流分子である **S6** キナーゼや **4E-BP** シグナルについても検討を行う方針とした。

(2) 神経細胞形成異常の検討

共焦点レーザー顕微鏡を用いて神経細胞の形態学的特徴を明らかにする。**FCMD** の神経細胞では神経突起の増加があるとの報告 (**Saito Y et al. Acta Neuropathologica. 1999**) があり、類似した病態が生じている可能性がある。

(3) 上記で解明した **mTOR** 経路異常から、治療候補薬剤をリストアップする。**FKTN** のコンディショナルノックアウトマウスの筋組織では、**mTORC1** 活性上昇があり、**mTOR** 阻害剤であるラパマイシン投与で筋細胞の形態異常が改善したという報告がある。

(4) **FCMD** 疾患モデル細胞を用いて、治療候補薬投与による神経細胞形態の改善、**mTOR** 経路異常の改善を確認する。**mTOR** 阻害剤の効果については、リン酸化 **mTOR** の発現量を指標に、ウエスタンブロット法により検討を行う。

4. 研究成果

FCMD の疾患モデル神経細胞として、**SH-SY5Y** 細胞の **FKTN** を **siRNA** でノックダウンした細胞を作成した。**siRNA** でのノックダウンにあたっては、試薬量、反応時間の検討を要したため、**SH-SY5Y** 細胞の他、**cos** 細胞や **HeLa** 細胞でのノックダウン実験を併用した。また、免疫染色およびウエスタンブロット法で用いる **FKTN** 抗体の選択を複数回の実験で行った。抗体の選択にあたり、ベクターを用いて細胞の **FKTN** 活性を上昇させたうえで、免疫染色ならびにウエスタンブロット法での確認を行った。

FKTN をノックダウンした **SH-SY5Y** 細胞を用いて免疫染色を行い、筋組織での報告同様にリン酸化 **mTOR** 活性が上昇している結果が得られた (図2)。一方で、ウエスタンブロット法で本現象の実証を複数回試みるも、判断に適した結果を得ることができなかった。原因として、再現性を持って確認可能な抗体反応を得ることができなかったことが挙げられ、今後さらに異なる抗体を用いた実験が必要と考えている。これらの実験の他、**ELISA** 法を用いて疾患モデル細胞にラパマイシンを投与し、その反応を検討する実験を行った。しかし、免疫染色で確認されたリン酸化 **mTOR** 活性の上昇は認めず、また、ラパマイシンによるリン酸化 **mTOR** 等への影響は認めなかった。免疫染色以外の実験で再現ができなかった原因として、実験手技によるもの、特に構築した実験系におけるモデル細胞や抗体の問題等が挙げられた。中枢神経系で **mTOR** 異常が生じていない可能性も考える必要があるが、別のモデル細胞を用いることや、疾患モデルマウスの組織を用いるなど、実験対象の検討も含め、今後の方針を考えていく必要がある。

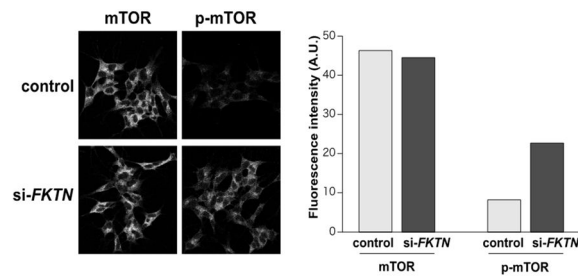


図2. **FKTN**ノックダウン細胞 (**SH-SY5Y**細胞) におけるリン酸化**mTOR**の亢進

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	檜垣 克美 (HIGAKI Katsumi) (90294321)	鳥取大学・研究推進機構・准教授 (15101)	
研究分担者	難波 栄二 (NANBA Eiji) (40237631)	鳥取大学・研究推進機構・教授 (15101)	
研究分担者	足立 香織 (ADACHI Kaori) (50609237)	鳥取大学・研究推進機構・助教 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------