

課題番号 15

細胞膜修復機構の活性化による 成人発症筋ジストロフィーの治療法開発

[1] 組織

代表者：小野 洋也（東北大学医学系研究科）
対応者：安井 明（東北大学加齢医学研究所）
菅野 新一郎（東北大学加齢医学研究所）
分担者：青木 正志（東北大学医学系研究科）
鈴木 直輝（東北大学医学系研究科）

研究費：物件費 18 万円

[2] 研究経過

本研究では、**dysferlinopathy**（ジスフェルリン異常症）の治療法開発を主たる目的とする。**dysferlinopathy** とは、筋細胞膜タンパク質 **dysferlin** の欠損によって引き起こされる成人発症の筋ジストロフィーの総称である。**dysferlin** 欠損によって筋細胞膜の修復機構が損なわれ、そのため筋細胞の変性、壊死が生じると考えられている。近年、**dysferlin** のほかにも筋細胞膜修復に関与する **dysferlin** 結合タンパク質が複数報告されているが、細胞膜修復機構の詳細はいまだ不明である。また明らかになっていない膜修復機構の鍵分子の存在が考えられる。本研究では、**dysferlin** のドメイン構造に着目し、プロテオミクス技術により新規 **dysferlin** 結合タンパク質を同定する。そしてレーザー膜損傷の実験系を用いて膜修復機構への関与を評価する。さらに薬剤スクリーニングにより細胞膜修復の治療候補を探索し、動物モデルへの薬剤投与による運動機能や骨格筋構造の異常回復効果の検証を経て、治療応用につなげる。

以下、研究活動状況の概要を示す。(3-1) 研究成果に示した実験は、東北大学医学部神経内科学教室と東北大学加齢学研究所で行った。**dysferlin** 結合タンパク質候補のサンプルの質量分析は、株式会社日本バイオサービスへ依頼した。随時電子メールで意見を交換し、1ヶ月に1回、加齢医学研究所で研究のまとめと打ち合わせを行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

dysferlin は、約 230kDa の大きな膜タンパク質であり、複合体を形成するため、免疫沈降法による結合

タンパク質の同定は難しい。そこで本研究では、**dysferlin** のドメイン構造に着目し、特定領域のアフィニティカラムを作成した。このカラムに細胞抽出物を反応させて相互作用するタンパク質を抽出し、**SDS-PAGE** により分離して、質量分析にかけることで、複数の結合タンパク質を同定した (図1)。

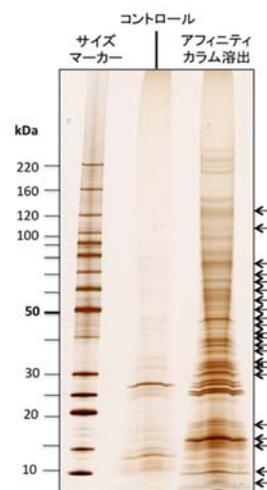


図1. **dysferlin** 特定領域の結合タンパク質候補 (SDS-PAGE の銀染色結果)

同定した結合タンパク質の一つである **AMPK** 複合体に注目し、レーザー膜損傷の実験系を用いて解析を行った。マウス骨格筋において **AMPK** 複合体がレーザーによる膜損傷部位に集積し、また培養細胞において **AMPK** 遺伝子発現抑制が筋細胞膜修復機能の低下に繋がることを発見した。さらに **dysferlin** 欠損マウス骨格筋のレーザー膜損傷で、**AMPK** 複合体の損傷部位への集積が遅延することから、膜修復機構において、**dysferlin** が **AMPK** 複合体の局在を規定している (**dysferlin** が足場タンパク質として機能している) ことを見出した。さらに **AMPK** 活性化剤の投与により、**dysferlin** 変異をもつ患者培養細胞において膜修復機能が改善することを明らかにするとともに (図2)、**dysferlinopathy** のモデル動物 (ゼブラフィッシュおよびマウス) において骨格筋の障害が改善することを確認した。

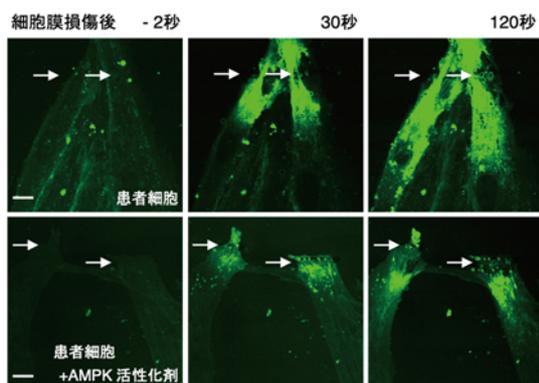


図2：AMPK 活性化剤により細胞外蛍光試薬流入量が減少する

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究成果は、2020年2月に米国遺伝子細胞治療学会の機関誌である「*Molecular Therapy*」のオンライン版に掲載された。本研究で得られたAMPK複合体が損傷を受けた筋細胞膜の修復において重要な役割を担っているという新たな知見は、根治療法がまだないdysferlinopathyの治療法の開発に結びつく可能性がある。本研究で得られた知見を発展させることで、dysferlinopathyのみならず、筋ジストロフィー全体の新しい治療法の開発が進むことも期待される。

[4] 成果資料

Title: AMPK complex activation promotes sarcolemmal repair in dysferlinopathy

Authors: Hiroya Ono, Naoki Suzuki, Shin-ichiro Kanno, Genri Kawahara, Rumiko Izumi, Toshiaki Takahashi, Yasuo Kitajima, Shion Osana, Naoko Nakamura, Tetsuya Akiyama, Kensuke Ikeda, Tomomi Shijo, Shio Mitsuzawa, Ryoichi Nagatomi, Nobukazu Araki, Akira Yasui, Hitoshi Warita, Yukiko K. Hayashi, Katsuya Miyake, and Masashi Aoki

Journal: *Molecular Therapy*

DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.02.006