

令和元年6月25日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19636

研究課題名(和文)筋ジストロフィーに対する分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of molecular targeted therapeutics for Duchenne muscular dystrophy

研究代表者

柴直子(Shiba, Naoko)

信州大学・再生医科学教室・助教(特定雇用)

研究者番号：00639289

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):MMP-9を欠損させたmdxマウスにおいて、病初期の変性骨格筋ではオステオポンチン(OPN)が一過性に強発現するとともに炎症の収束および再生が促進されることを明らかにし、MMP-9がOPNの発現を調節していること、さらにOPNが筋のリモデリングや再生に必要であることが示唆された。また、MMP-9、OPNと同様にCD44に結合するヒアルロン酸も病初期の変性骨格筋では強く共局在しており、これらの分子の炎症や再生に対する相互作用も示唆された。MMP-9を標的とする治療の有効性が期待されるが、臨床応用には治療を行う病期や投与期間、さらに分子同士の相互作用に関する十分な検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mdxマウスの骨格筋変性におけるMMP-9およびヒアルロン酸、OPNの役割、相互作用を解明することは、ジストロフィン欠損が引き起こす様々な分子機構の一端を解明するのみでなく、治療効果評価のための病勢マーカーの確立やステロイド剤に代わる新たな治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文):At a month of age, the dystrophic muscles of mdx/Mmp9<sup>-/-</sup> mice showed reduced necrosis and neutrophil invasion, accompanied by down-regulation of MIP-2. In addition, muscle regeneration was enhanced, which coincided with increased M2 macrophage infiltration and upregulation of MCP-1 and resulted in increased muscle strength. It also displayed an accelerated upregulation of osteopontin and hyaluronan expression colocalized with CD44, a receptor of MMP9 at the stage. However, in the later stage at one year of age, the mice exhibited muscle growth impairment through altered expression of myogenic factors and increased fibroadipose tissue. These results showed that MMP-9 might have multiple functions during disease progression. A therapy targeting MMP-9 may improve muscle pathology and function at the early disease stage, but the 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：小児神経学、筋疾患

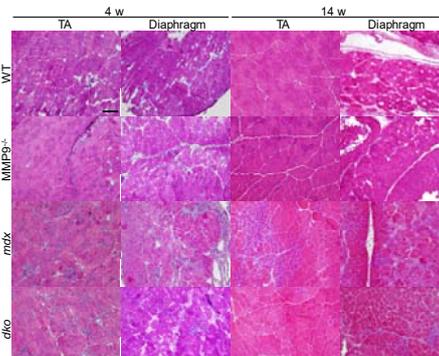
キーワード：筋ジストロフィー MMP-9 オステオポンチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

デュシャンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は出生男児 3000-5000 人に 1 人の頻度で発症する X 連鎖性遺伝性疾患である。全身の骨格筋、心筋の変性が徐々に進行し 10 代前半で歩行不能となり、若年成人で呼吸不全や心不全を来す。骨格筋の筋細胞膜直下に存在し機械的安定性の保持に重要な働きをするジストロフィンタンパクの欠損が根本的原因であるが、細胞の脆弱性のみでなく再生障害なども伴い筋変性の進行に加担していると考えられている。しかしながらそのメカニズムはまだ不明な点が多い。遺伝子治療や再生治療の研究開発が進んでいるが適応が限られ根本的治療法は確立されておらず、唯一保険収載されている治療薬であるステロイド剤は症状の進行を遅らせるエビデンスがあるものの、多方面に作用することから副作用も多く、特に肥満や骨粗鬆症などが問題となり長期投与は困難である。そこで、治療標的を限定した副作用の少ない薬剤の開発が必要である。研究代表者らは先行研究で、DMD の変性骨格筋において MMP-9 の発現が亢進していることに注目し、ジストロフィン欠損マウス (mdx マウス) に MMP-9 を欠損させたマウス (mdx;MMP9<sup>-/-</sup>マウス) の解析を行い、MMP-9 が筋ジストロフィーの骨格筋において炎症の収束を遅延させ、筋再生を低下させることで組織変性を助長させていることを明らかにし (右図)、MMP-9 を治療標的とする新規治療の可能性を見出した

(Shiba et al. 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(10 Pt A):2170-2182 2015)。



### 2. 研究の目的

DMD の骨格筋変性に係る MMP-9 と他分子との相互作用を解明し、DMD に対する治療薬としての MMP-9 抑制剤の有益性について検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

変性骨格筋における MMP-9、オステオポンチン (OPN)、ヒアルロン酸の発現パターン、組織の炎症、再生に関する作用について明らかにするとともに MMP-9 抑制剤の全身投与による筋ジストロフィーの筋変性に対する効果を検討する計画で研究を開始した。

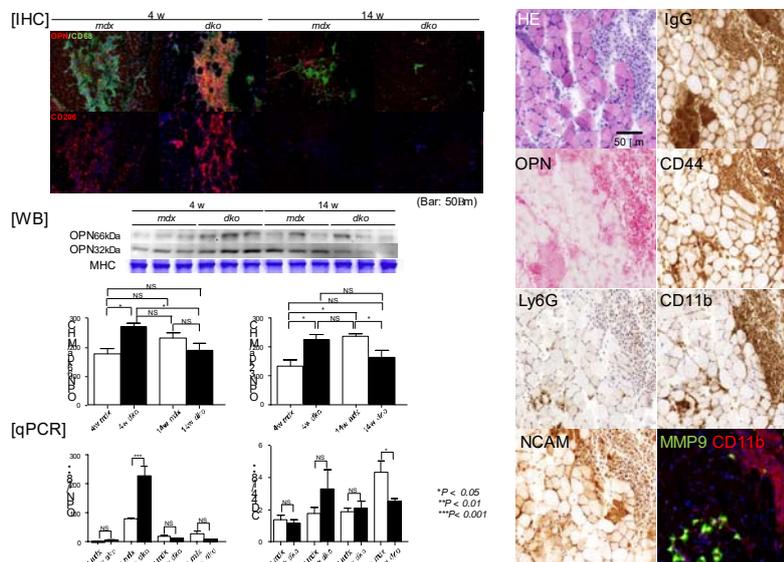
1) 野生型マウス、mdx マウスおよび mdx;MMP9<sup>-/-</sup>マウス、カルディオトキシンを用いた骨格筋傷害モデルを使用し、変性筋・傷害筋局所でのヒアルロン酸、OPN、MMP-9 との相互作用について病理および分子生物学的手法を用いて解析した。

2) MMP-9 抑制作用を有する薬剤である 4-MU を mdx マウスに投与し、骨格筋および心筋に対する効果について病理および分子生物学的手法で解析する予定とした。

### 4. 研究成果

1) ノックアウトマウスおよび骨格筋傷害モデルを用いた解析

mdx;MMP9<sup>-/-</sup>マウスの病初期の骨格筋では、一過性に OPN の発現が mdx マウスに比し著しく増加し、後のステージで骨格筋内の炎症が急速に収束し再生が促進されるという興味深い現象を見出した。この所見から mdx マウスの変性骨格筋において MMP-9 は急性炎症に伴う OPN の発現増加を制御している可能性が高いと考えられた。ヒアルロン酸は DMD 患者や mdx マウスの骨格筋の間質に多く存在する細胞外マトリックスでありオステオポンチンと同様に CD44 に結合する。CD44 は mdx マウスの再生骨格筋の筋膜で強発現しており、オステオポンチンおよびヒアルロン酸とともに CD44 への結合を介して骨格筋の変性や再生に何らかの影響していることが推測された。ヒアルロン酸は、低分子の状態では MMP-9、NFκB、各種炎症性サイトカインの産生



や Akt シグナルの誘導作用を有するが、高分子の状態では抗炎症作用、組織修復作用を有する。骨格筋の変性や保護に係るヒアルロン酸の作用、MMP-9 との関係は DMD の骨格筋変性に影響している可能性が高いと考えられた。mdx;MMP9<sup>-/-</sup>マウスの骨格筋では mdx マウスに比し高分子ヒアルロン酸合成酵素である HAS2 の発現が有意に増加し、主に低分子ヒアルロン酸の合成に働くと考えられている HAS3 の発現が減少していた。DMD の骨格筋変性に係るヒアルロン酸の役割および MMP-9 との関係を明らかにすることは DMD の病態解明や治療開発にも重要であると考えられ、今後研究を進展させたい。

## 2) MMP-9 抑制作用を有する薬剤である 4-MU の mdx への投与

先行研究により DMD に対する有効性が示唆された MMP-9 を標的とする治療の開発を前提として、MMP-9 の転写および活性を抑制する薬剤である 4-methylumbelliferone (4-MU) の mdx マウスに対する効果について解析する予定であった。4-MU は細胞外マトリックスを調節する多機能物質であり MMP-9 抑制作用の他に MMP-2 活性を亢進させ、ヒアルロン酸代謝を調節する作用も併せ持つ。ヒトへの投与の安全性も確認され、海外では癌に対する治験薬として臨床応用され始めている (Nagy et al, 2015)。筋ジストロフィーの骨格筋で MMP-2 は血管増殖因子の発現を誘導し再生線維の成長を促進する作用を有するため、4-MU の MMP-2 に対する作用も病態を改善させることが期待された。Mdx マウスに対する 4-MU の投与方法として、経口投与、腹腔内注射、皮下への浸透圧ポンプ埋め込みによる投与の 3 種類の方法を試みたが、いずれにおいても安定して投薬することができず、4-MU の骨格筋・心筋に対する効果の検討は本研究期間内に完了することができなかった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) [Shiba N](#) et.al. A Pediatric Case of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Onset following Varicella Zoster Ophthalmicus with Optic Neuritis. *Case Reports in Pediatrics*, 2018(Mar. 26) DOI:10.1155/2018/6931206 査読あり
- 2) Nishizawa H, [Shiba N](#) and Nakamura A. Importance of long-term motor function evaluation after prednisolone treatment for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Physical Therapy Science*, 2018. DOI:10.1589/jpts.30.1211 査読あり
- 3) Kadota S, [Shiba N](#) and Shiba Y. Cardiac Sodium Channel Disease Modeling Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *CIRCULATION JOURNAL*,81(12):1764-1765 2017(Dec.) 査読あり
- 4) Morikawa M, Takano K, Motobayashi M, [Shiba N](#), Kosho T, Nakazawa Y, Inaba Y. Clinical features of a female with WDR45 mutation complicated by infantile spasms: a case report and literature review. *Brain Dev*,39(9):804-807 2017(Oct.) 査読あり
- 5) Nakamura A, [Shiba N](#), Miyazaki D, Nishizawa H, Inaba Y, Fueki N, Maruyama R, Echigoya Y, Yokota T. Comparison of the phenotypes of patients harboring in-frame deletions starting at exon 45 in the Duchenne muscular dystrophy gene indicates potential for the development of exon skipping therapy. *J Hum Genet*,62(4):459-463 2017(Apr.) 査読あり
- 6) Nishizawa H, [Shiba N](#), Nakamura A. Usefulness of continuous actigraph monitoring in the assessment of the effect of corticosteroid treatment for Duchenne muscular dystrophy: a case report. *J Phys Ther Sci*,28(11):3249-3251 2016(Nov.) 査読あり
- 7) Nakamura A, Fueki N, [Shiba N](#), Motoki H, Miyazaki D, Nishizawa H, Echigoya Y, Yokota T, Aoki Y, Takeda S. Deletion of exons 3-9 encompassing a mutational hot spot in the DMD gene presents an asymptomatic phenotype, indicating a target region for multiexon skipping therapy. 査読あり *J Hum Genet*,61(7):663-7 2016(Jul.)

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 宮崎 大吾, 佐藤 充人, [柴 直子](#), 柴 祐司, 青木 吉嗣, 武田 伸一, 中村 昭則「DMD 患者 iPS 細胞由来の心筋細胞における分化・再生関連遺伝子の発現低下と心筋障害の発症機序に関する 研究」第 4 回日本筋学会学術集会, 2018 年 8 月 10-11 日, 倉敷
- 2) [柴 直子](#), 中村 昭則, 小澤 哲夫ら。「フクチン遺伝子の非挿入型変異の複合ヘテロ接合による重度心不全を呈した拡張型心筋症 (DCM1X) の 1 例」第 60 回日本小児神経学会総会, 2018 年 5 月 31 日-6 月 2 日, 幕張
- 3) 夏目 岳典, [柴 直子](#), 那須野 将ら。「West 症候群を合併した Xp21.1 微細欠失による Duchenne 型筋ジストロフィーの 1 例」第 60 回日本小児神経学会総会. 2018 年 5 月 31 日-6 月 2 日, 幕張
- 4) [柴 直子](#)ら。「重度発達遅滞を呈したジストロフィン遺伝子の一部を含む 3.36Mb の Xp21.1 微細欠失の 1 男児例」脳と発達, 第 58 回日本小児神経学会総会, 2016 年 6 月 2 日-6 月 5 日, 新宿

## 6. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：中村 昭則

ローマ字氏名：NAKAMURA, Akinori

所属研究機関名：信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：10303471

研究協力者氏名：宮崎 大吾

ローマ字氏名：MIYAZAKI, Daigo

所属研究機関名：信州大学・医学部附属病院・講師（特定雇用）

研究者番号：80596370

※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。