

課題番号 60

細胞膜修復機構の活性化による 筋ジストロフィーの治療法開発

[1] 組織

代表者：鈴木直輝（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）
小野洋也（東北大学医学系研究科）

協力者：中村尚子（東北大学医学系研究科）

研究費：物件費 20 万円

[2] 研究経過

筋ジストロフィーは進行性の筋力低下と筋萎縮を呈する遺伝性の筋疾患で骨格筋の壊死・再生を主病態とする。dysferlin 異常症は筋細胞膜タンパク dysferlin の欠損により引き起こされる成人発症の筋ジストロフィーで、治療は対症療法のみで根治療法はおろか進行を抑制する治療法すら未だに開発されていない。dysferlin の主な機能は細胞膜修復であり、常に機械的ストレスにさらされている骨格筋にとって、筋幹細胞による筋再生とともに筋損傷に対抗する本質的で重要な機能である。細胞膜修復には損傷による Ca^{2+} の流入をトリガーとし、小胞が損傷部位に集まりシールのように損傷部位を埋める”パッチ形成”が行われると言われており、mitsugumin 53 (MG-53) や annexins など dysferlin と結合し細胞膜修復に関わるタンパクもいくつか発見されているものの、その詳細なメカニズムは未解明な部分が多く全容解明には至っていない。dysferlin 遺伝子の変異は遺伝子全長にわたって見られるものの、頻度別に見ると膜結合ドメインである C2 ドメインの 3、4 番目に挟まれた領域(第 II 領域)に集中している。第 II 領域には機能ドメインの多くが存在しているが、その機能は明らかになっておらず、私たちはこの第 II 領域に注目し、結合タンパクの探索と細胞膜

修復機能との関係を解明することを目的に研究を行った。

我々は加齢研の安井、菅野の協力により、筋細胞膜修復分子として AMPK 複合体以外にも複数の dysferlin 結合蛋白を検出している。dysferlin 結合蛋白に関して、レーザー膜損傷の系での動態やノックダウン/ノックアウト、過剰発現における細胞膜修復機能の修飾様式を検討する。さらに既報分子と筋細胞膜修復に関与する新規分子との関連について解析をすすめ、膜修復機構の全容解明につなげていく。

以下、研究活動状況の概要を示す。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、加齢医学研究所で、6 ヶ月に一度程度、研究のまとめと打ち合わせを行った。

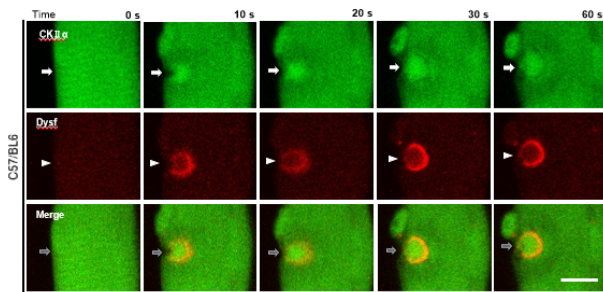
[3] 成果

(3-1) 研究成果

私たちは質量分析により第 II 領域に結合するタンパク候補を探索し、新たにセリン・スレオニンキナーゼである Casein Kinase II の catalytic subunit を構成する CK II α に注目した。実際にレーザーにより骨格筋細胞膜に損傷を起こすと損傷部位に CK II α が集積し、dysferlin と共局在することを確認した。CK II α を Knock Out (KO) したマウス筋芽細胞(C2C12)ではレーザー膜損傷実験で細胞膜修復機能が低下しており、また、シリンジローディングによる膜損傷時に漏出した ATP を測定すると、CK II α KO 細胞では野生型よりも有意に漏出量が多く、細胞膜修復率が低下していた。さらに、dysferlin 欠損 Bla/J マウスにおいて CK II α を過剰発現した骨格筋におけるレーザー膜損傷実験では、Bla/J マウスの細胞膜修復機能が改善していた。以上から CK II α が細胞膜修復機能を正に制御することが明らかになった。

次に、CKII α のリン酸化基質を同定するため CKII α KO 細胞と野生型細胞を用いてリン酸化プロテオミクス解析を行ったところ、dysferlin と共に細胞膜修復機能に関わることが報告されている annexin A1 が見出された。annexin A1 は Ca²⁺イオンの流入を契機に膜損傷部位に速やかに動員され、dysferlin と結合し、特に前述した“パッチ形成”に関わることが報告されており、リン酸化 annexin A1 と細胞膜修復との関連の報告はないものの、Annexin A1 のリン酸化により膜局在や小胞集簇が起こるといった報告はあり、CK II α が annexin A1 をリン酸化することで細胞膜修復機能を制御している可能性が示唆された。

図 1:CKII α は Dysferlin と共局在する



(3-2) 波及効果と発展性など

本研究結果より、細胞膜損傷が生じた際に dysferlin と共に CKII α と annexin A1 が損傷部位に動員され、CKII α による annexin A1 のリン酸化を介して、“パッチ形成”が起こることが想定された。dysferlin-CKII α -リン酸化 annexin A1 の分子連関は細胞膜修復機能を改善させる治療標的候補であり、dysferlin 異常症以外の筋ジストロフィーの筋再生にも広く重要な役割を担っていることが予想される。今後、リン酸化 annexin A1 と細胞膜修復機能の関係について検証すること、さらに annexin A1 以外の CKII α の細胞内基質についても探索を行い、CKII α が関わる細胞膜修復機能について全容解明を目指す。

[4] 成果資料

今年度は該当なし。

以下、参考資料

1. Izumi R, Takahashi T, Suzuki N, Niihori T, Ono H, Nakamura N, Katada S, Kato M, Warita H, Tateyama M, Aoki Y, Aoki M. The genetic profile of dysferlinopathy in a cohort of 209 cases:

Genotype-phenotype relationship and a hotspot on the inner DysF domain. Hum Mutat. 41(9):1540-1554, 2020. doi: 10.1002/humu.24036. 査読有

2. Ono H, Suzuki N, Kanno SI, Kawahara G, Izumi R, Takahashi T, Kitajima Y, Osana S, Nakamura N, Akiyama T, Ikeda K, Shijo T, Mitsuzawa S, Nagatomi R, Araki N, Yasui A, Warita H, Hayashi YK, Miyake K, Aoki M. AMPK Complex Activation Promotes Sarcolemmal Repair in Dysferlinopathy. Mol Ther. 28(4):1133-1153, 2020. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.02.006. 査読有