

Dysferlinopathyの遺伝子解析と治療法開発

小野 洋也[†] 高橋 俊明*第74回国立病院総合医学会
(2020年10月17日 於 新潟)

IRYO Vol. 76 No. 1 (45-49) 2022

要旨

dysferlinopathyはdysferlin遺伝子変異を原因とする筋ジストロフィーであり, 三好型遠位型筋ジストロフィー1型と肢帯型筋ジストロフィー2B型を主要病型とする. 著者らは20年以上にわたりdysferlinopathyの同遺伝子解析を継続してきた. 累計209家系の発端者が検出され, 病型内訳は三好型遠位型が49.8%, 肢帯型が39.2%であった. p.W999C変異はとくに肢帯型に多くみられる, またc.3373del変異は三好型遠位型では多いものの肢帯型ではほとんどみられない, という遺伝子型表現型の関連がある. ミスセンス変異に注目した解析では, p.W999Cとその他の5つの変異がIdysFドメインに存在し, 70.6%が本ドメインに集中していた. 頻度の高いp.W999CあるいはIdysFドメインは, dysferlinopathyの病態解析に重要であり, 将来的な治療標的となる可能性がある. また, dysferlinタンパクは筋細胞膜修復に関わるとされる. 著者らはdysferlinの結合タンパクを探索して, その生理的な機能を明らかにすることによりdysferlinopathyの治療法開発を進めている. dysferlinタンパクの特定領域のアフィニティカラムを作成し, 細胞抽出物を反応させて相互作用するタンパクを抽出して質量分析にかけることで, 複数の結合タンパクを同定した. 結合タンパクの一つであるAMPK複合体がマウス骨格筋において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ことを見いだした. 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, dysferlinopathyのモデル動物において骨格筋の障害が改善することを確認した. 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, dysferlinopathyの治療法の開発に結びつく可能性がある.

キーワード AMPK, dysferlin, IdysFドメイン, 肢帯型筋ジストロフィー2B型, 三好型遠位型筋ジストロフィー

はじめに

dysferlinopathyはdysferlin遺伝子の変異を原因と

する筋ジストロフィーであり, 常染色体劣性遺伝形式をとる. 主に三好型遠位型筋ジストロフィー1型と肢帯型筋ジストロフィー2B型(LGMD2B)を

国立病院機構岩手病院 脳神経内科 *国立病院機構仙台西多賀病院 †医師
著者連絡先: 小野洋也 国立病院機構岩手病院 脳神経内科 〒021-0056 岩手県一関市山目字泥田山下48番地
e-mail: ono.hiroya.yn@mail.hosp.go.jp
(2021年3月10日受付, 2021年6月16日受理)

Research for the Genetic Profile and Therapy of Dysferlinopathy
Hiroya Ono and Toshiaki Takahashi*, NHO Iwate Hospital, *NHO Sendai Nishitaga Hospital
(Received Mar. 10, 2021, Accepted Jun. 16, 2021)

Key Words: AMPK, dysferlin, inner DysF domain, limb-girdle muscular dystrophy type 2B, Miyoshi muscular dystrophy

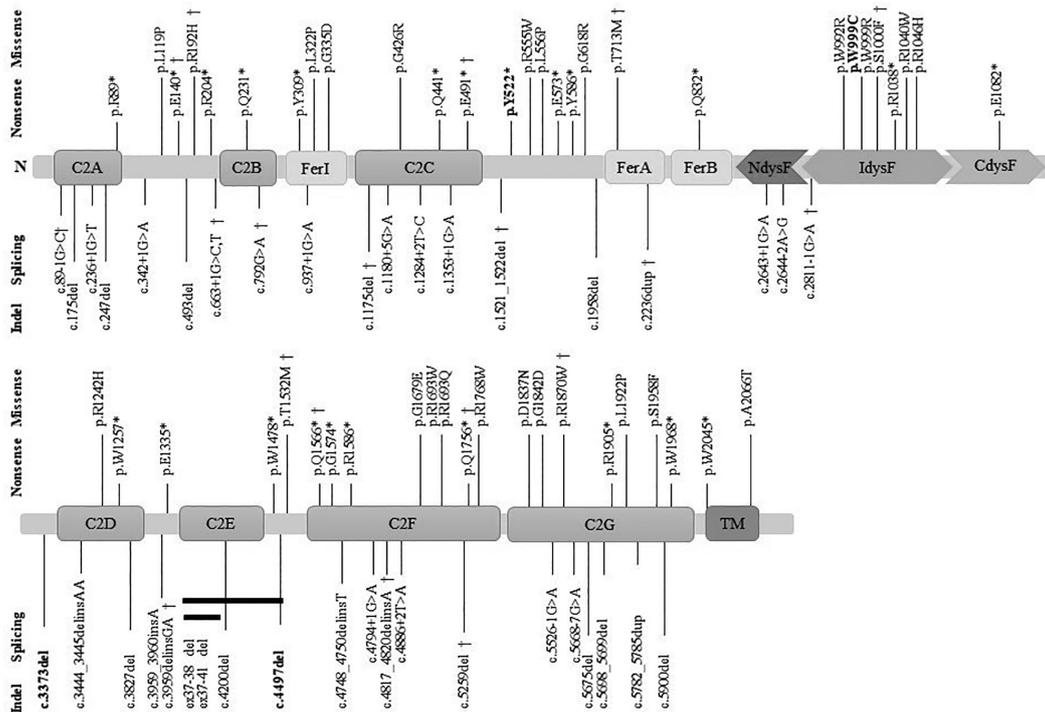


図1 日本人のdysferlin遺伝子変異 (文献7)より改変)

主要病型とする。またdysferlinopathyには患者数としては少ないものの、distal anterior compartment myopathy (DACM) またはdistal myopathy with anterior tibial onset (DMAT) といわれる前脛部の筋が初期から障害される遠位型筋ジストロフィーの病型もある。

dysferlinopathyの主要病型の一つ、三好型遠位型筋ジストロフィーはわが国の三好和夫らにより報告された。1967年の発表¹⁾が有名だが、実は1965年におそらく発症前の症例が高クレアチンキナーゼ血症(仮称)として発表²⁾されている。1986年のBrain誌の論文³⁾で世界的に認知されたが、1977年の英文総説⁴⁾でも少し触れられている。1994年に肢帯型筋ジストロフィー2B型の責任遺伝子座が決定された。翌1995年には三好型遠位型筋ジストロフィーの遺伝子座も同じであることがわかった。1998年にポジショナルクローニングにより東北大学神経内科の青木正志教授らによって原因遺伝子dysferlinが同定⁵⁾された。その際、三好型遠位型、肢帯型、DACM/DMATの3型にdysferlin遺伝子変異が認められることが示されdysferlinopathyという概念が確立してきた。

その後dysferlin遺伝子、タンパクの性質の研究が進められ、1999年には免疫染色により骨格筋の膜タンパクであることが見いだされ、この方法は現在も診断の一助として使用されている。2003年には膜の

修復に関与⁶⁾することも示された。このことはdysferlinopathyは壊れた骨格筋の修復がうまくいかないことで進行することや治療に対する戦略を考えさせることができるものである。

結 果

1. dysferlin遺伝子解析

著者らは東北大学神経内科で青木教授の指導のもと1998年から筋ジストロフィー患者でのdysferlin遺伝子解析を始めた。2020年9月に最新のデータを発表⁵⁾した。dysferlin遺伝子に変異を見いだしたのは計209家系で発端者の病型内訳は三好型遠位型が49.8%、肢帯型が39.2%、DACM/DMATが0.5%、高CK血症が6.2%、不明が4.3%だった。変異の種類を三好型遠位型と肢帯型でみるとp.W999C変異はとくに肢帯型に多くみられる、またc.3373del変異は三好型遠位型では多いものの肢帯型ではほとんどみられない、という遺伝子型表現型の関連がある。

図1に見いだされた変異90種類のdysferlinタンパク上での位置を示した。dysferlinでは発見時からC2ドメインを有することが有名である。C2ドメインはCaの存在下で膜の癒合に関わることも知られている。そのためdysferlinは早期から膜の修復に関与すると予想されていた。しかしdysferlinにはC2ドメイン以外にもとくに中間部に数種のドメイ

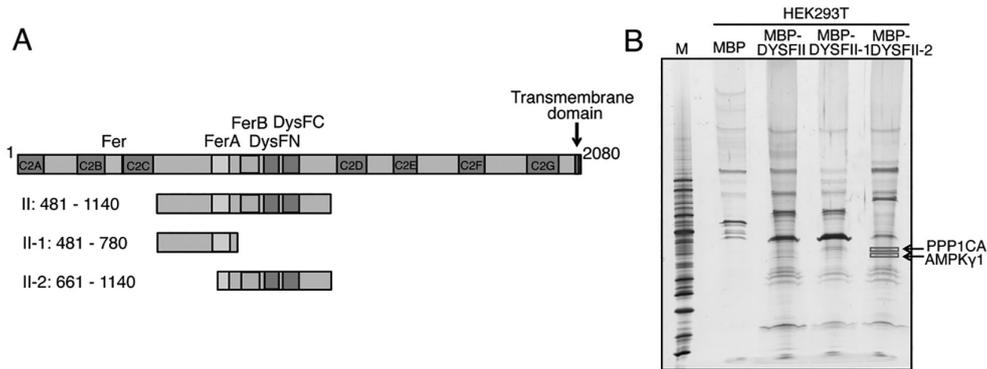


図2 プロテオミクスによるdysferlin結合タンパクの同定(文献9)より改変)

(A) dysferlinタンパクのドメイン構造。7つのC2ドメイン、2つのDysFドメイン、3つのFerドメイン、そして膜貫通ドメインをC末端にもつ。2つのC2ドメイン(C2C, C2D)に挟まれた領域(第II領域)について、リコンビナントタンパクを大腸菌で発現・精製し、アフィニティカラムを作成した。(B) 第II領域のアフィニティカラムに細胞抽出物(ヒト胎児由来腎細胞 HEK293T細胞)を加え、精製により結合タンパクを溶出させたあと、SDS-PAGEによりタンパクを分離した。図はその銀染色の結果。コントロールと実験結果を比較し、結合タンパクと考えられるバンドを切り出し、質量分析により複数の結合タンパク候補を見いだした。M; サイズマーカー, MBP; コントロール。

ンが集中し、C2ドメイン以外のドメインは機能もよくわかっていない。変異はタンパク(遺伝子)全体に広く分布している。このことは遺伝子診断を困難にしている。著者らも遺伝子解析に次世代シーケンサーを利用している。

この変異の中で日本人に最も多いp.W999C変異は特異な変異⁸⁾である。この変異を持つ患者は肢帯型で多くみられるようにつま先立ちが保たれる傾向にある。また発症年齢が遅いや血清CK値が低い傾向にあるなど軽症型と考えられる。なぜ肢帯型や軽症になったりするのかの理由は現時点でははっきりしないが今後の病態機序解明や治療法開発につながる所見と考えられる。この変異はIdysFドメインに位置するアミノ酸のミスセンス変異である。p.W999C変異は日本人で最多の変異であるためIdysFドメインにある変異の割合は圧倒的に多いが、この変異を除いてもIdysFドメインにあるミスセンス変異は最多である。

2. dysferlinopathyの治療法開発

dysferlin遺伝子は、2番染色体(2p13.3-p13.1)に存在し、55エクソン、6,243塩基対からなる遺伝子であり、その遺伝子産物dysferlinタンパクは筋細胞膜に局在する⁷⁾。dysferlinタンパクは筋細胞膜修復に関わるという特徴をもつ⁶⁾。これまでdysferlinのほかにも筋細胞膜修復に関与するdysferlin結合タンパクの存在が複数報告されているが、膜修復機構

の詳細はいまだ不明である。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。著者らはdysferlinタンパクのC2ドメインに挟まれた領域に着目した。細胞膜損傷時、これらの領域はループ構造を形成し高次構造が大きく変化すると考えられる。また、同領域はdysFドメインなどの幾つかの進化上保存された構造を持ち、生理活性を担うタンパクが結合することが予想された(図2A)。これら特定領域のアフィニティカラムを作成し、その結合タンパクを探索して、生理的な機能を明らかにすることを目標とした。既報とは異なるアプローチにより新たに同定した結合タンパク群を筋細胞膜修復分子に加え、筋細胞膜修復機構の全容解明を進めている。そして、筋細胞膜修復機能の強化によるdysferlinopathyの治療法開発を進めている。

今回著者らは、dysferlinタンパクの2つのC2ドメイン(C2C, C2D)に挟まれた領域について、リコンビナントタンパクを大腸菌で発現・精製し、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を同定した⁹⁾(図2B)。同定した結合タンパクのなかで、AMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)γ1に注目した。AMPKは、細胞内のエネルギー源であるATPが分解されてできるAMPによって活性化されることから、細胞内のエネルギーのセンサーとしての役割を

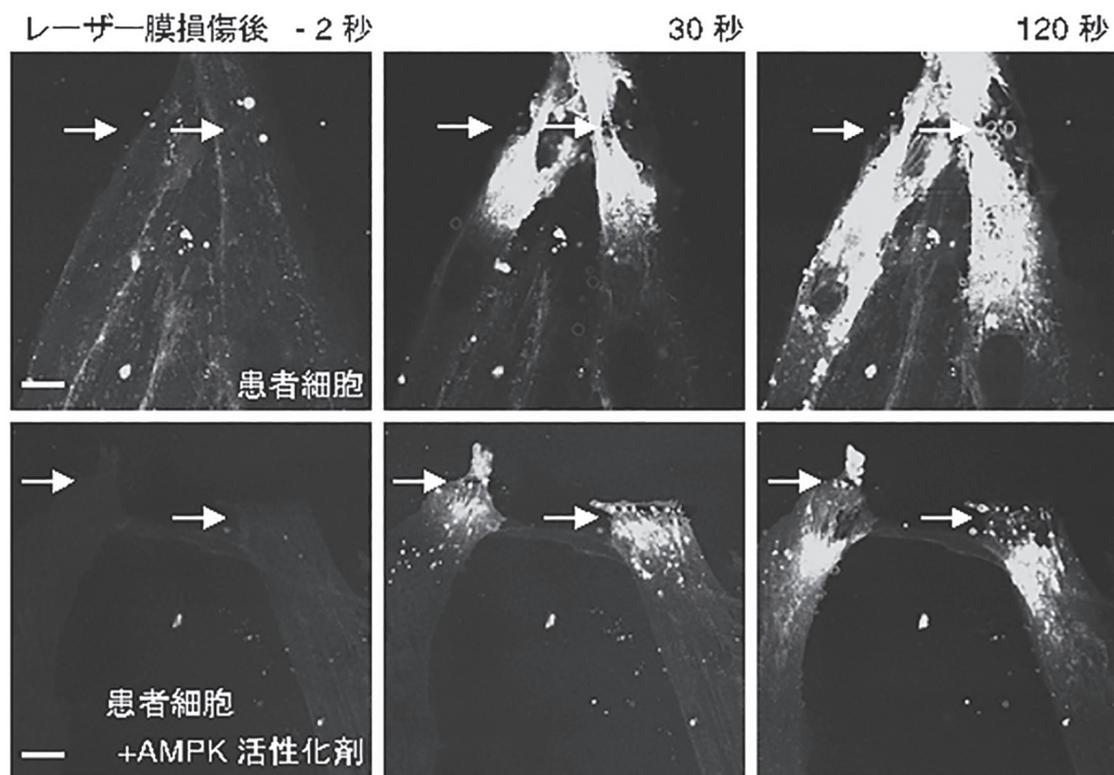


図3 AMPK活性化剤によりdysferlin変異患者細胞の細胞膜修復機能が改善する(文献7)より改変)

レーザー損傷後、患者由来のdysferlin変異骨格筋細胞では、細胞膜が修復されず、蛍光試薬が細胞内に広がっているが(上段)、AMPK活性化剤投与により、蛍光試薬の細胞内での拡がりや抑えられた(下段)

担っている。触媒作用をもつ α サブユニットと、調節作用をもつ β および γ サブユニットから構成されるヘテロ三量体を形成し、それぞれのサブユニットは異なる遺伝子によってコードされたアイソフォームが存在する。AMPK α は、PPP1CAによる脱リン酸化によって酵素活性が調節される。質量分析により、AMPK γ 1のみならず、AMPK複合体のリン酸化に関与するPPP1CAが同定されていること、また、筋萎縮の病態においてAMPKシグナリングが関与することが複数の研究によって報告されていることから、dysferlinopathyの病態にAMPK複合体が関わっている可能性が高いと考え、膜修復機構におけるAMPKの役割について解析を進めた。AMPK複合体について、レーザー膜損傷の実験系を用いて解析を行ったところ、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欠損マウス骨格筋では、レーザーによる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ことを見い

だした。また著者らは、dysferlin変異をもつ患者培養細胞において、AMPK活性化剤の投与により膜修復機能が改善することを見いだした⁹⁾(図3)。さらに臨床応用のために動物モデルでの検証実験を行った。ゼブラフィッシュのdysferlinopathyモデルで薬剤効果の検討を行った。初期胚にmorpholinoを用いたdysferlinopathyモデルでは生後3-4日に約33%の個体で、骨格筋の構造異常が観察されるが、AMPK活性化剤の投与により、その割合は約20%まで低下した。また、dysferlinopathyモデルマウスへのAMPK活性化剤投与により、筋力低下の一部改善、筋損傷マーカーである血清クレアチンキナーゼ(CK)値の低下、筋線維横断面面積の増加(筋萎縮の軽減)が得られた⁹⁾(図4)。

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。

〈本論文は第74回国立病院総合医学会シンポジウム(2020年)「筋ジストロフィー治療開発の最先端、次の

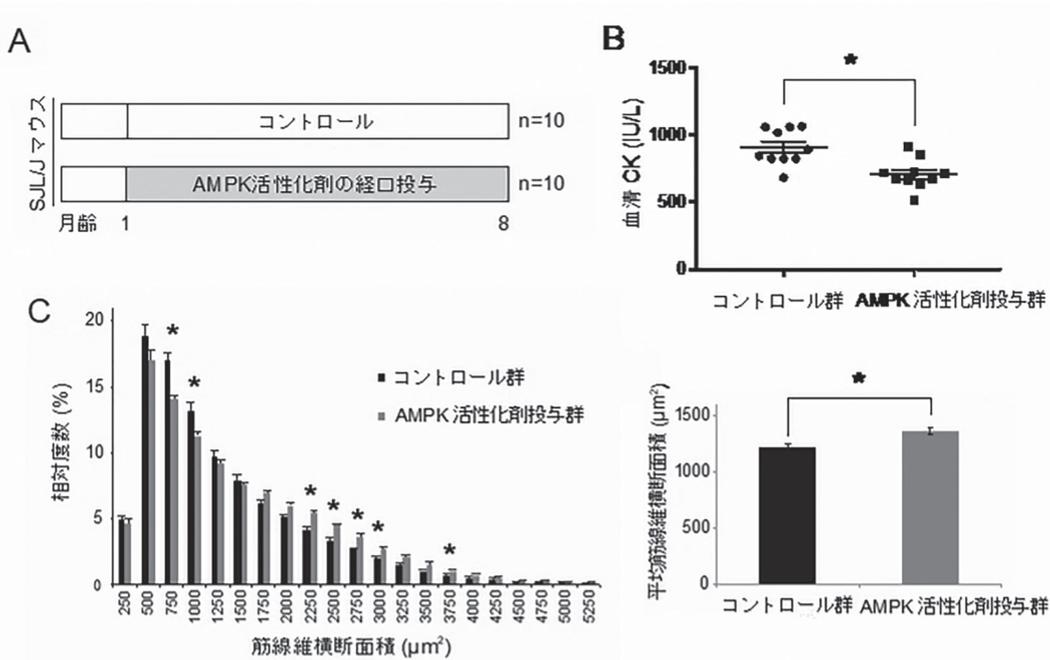


図4 AMPK活性化剤投与によりdysferlinopathyモデルマウスの血清CK，筋病理像が改善する（文献7）より改変）

(A) dysferlinopathyモデルマウスであるSJL/Jマウスに対して、生後一カ月（離乳後）から、AMPK活性化剤の経口投与を行った。AMPK活性化剤投与により、(B) 血清CK値の低下、(C) マウス腓腹筋の筋線維横断面積の増加がみられ、統計学的にも有意な改善を示した (* $p < 0.05$)。

10年に何が起きるか」において「ジスフェルリノパチーの治療法開発」（発表者：高橋 俊明/「ジスフェルリノパチーの治療法開発」（発表者：小野 洋也）としてそれぞれ発表した内容に加筆し、1編としてまとめたものである。）

謝辞：著者らをご指導いただいている東北大学神経内科青木正志先生ほかとくに文献5) 6) 7) の共同研究者に深謝いたします。

著者の利益相反：本論文に関して、開示すべき利益相反関連事項はない。

【文献】

- 1) Distalmyopathyと考えられる2家系4症例 三好和夫, 西条一夫, 栗生陽次郎ほか. 人類遺伝誌 1967 ; 12 : 113.
- 2) 高Creatinekinase血症（仮称）の2症例 三好和夫, 西条一夫, 吉松正明ほか. 臨神経 1965 ; 5 : 316.
- 3) Miyoshi K, Kawai H, Iwasa M, et al. Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an

autopsied case. Brain 1986 ; 109 (Pt 1) : 31-54.

- 4) Kazuo Miyoshi. Genetico-clinical type of progressive muscular dystrophy. Jap J Med 1977 ; 16 : 276-9.
- 5) Liu J, Aoki M, Illa I, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. Nat Genet 1998 ; 20 : 31-6.
- 6) Bansal D, Miyake K, Vogel SS, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. Nature 2003 ; 423 : 168-72.
- 7) Izumi R, Takahashi T, Suzuki N, et al. The genetic profile of dysferlinopathy in a cohort of 209 cases: Genotype-phenotype relationship and a hotspot on the inner DysF domain. Hum Mutat 2020 ; 41: 1540-54.
- 8) Takahashi T, Aoki M, Suzuki N, et al. Clinical features and a mutation with late onset of limb girdle muscular dystrophy 2B. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2013 ; 84 : 433-40.
- 9) Ono H, Suzuki N, Kanno SI, et al. AMPK Complex Activation Promotes Sarcolemmal Repair in Dysferlinopathy. Mol Ther 2020 ; 28 : 1133-53.